

Jessika Cristina Alves da Silva

Análise do sistema toxina-antitoxina tipo II na fisiologia bacteriana de uma cepa híbrida: *Escherichia coli* enteropatogênica atípica e *E. coli* extraintestinal

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Toxinologia do Instituto Butantan, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2022

Jessika Cristina Alves da Silva

Análise do sistema toxina-antitoxina tipo II na fisiologia bacteriana de uma cepa híbrida: *Escherichia coli* enteropatogênica atípica e *E. coli* extraintestinal

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Toxinologia do Instituto Butantan, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Roxane Maria Fontes Piazza

São Paulo
2022

Catálogo na Publicação
Instituto Butantan
Dados inseridos pelo(a) aluno(a)

Silva, Jessika Cristina Alves da

Análise do sistema toxina-antitoxina tipo II na fisiologia bacteriana de uma cepa híbrida: *Escherichia coli* enteropatogênica atípica e *E. coli* extraintestinal / Jessika Cristina Alves da Silva ; orientador(a) Roxane Maria Fontes Piazza - São Paulo, 2022.
88 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Escola Superior do Instituto Butantan, Programa de Pós-Graduação em Ciências - Toxinologia. Linha de pesquisa: Toxinas e sistemas biológicos.

Versão corrigida final

1. Toxinas e sistemas biológicos 2. Sistemas toxina-antitoxina. 3. *Escherichia coli* patogênica. 4. Expressão gênica I. Piazza, Roxane Maria Fontes . II. Escola Superior do Instituto Butantan. III. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Toxinologia. IV. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela equipe da Biblioteca do Instituto Butantan

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO DE TRABALHO

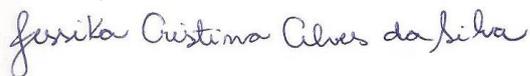
Eu, Jessika Cristina Alves da Silva, aluno de mestrado/doutorado do Programa de Pós-graduação em Ciências-Toxinologia do Instituto Butantan, autorizo a divulgação de minha dissertação/tese por mídia impressa eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total desta dissertação/tese após publicação, para fins acadêmicos desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação da dissertação/tese após a data da defesa:

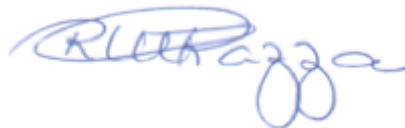
- Imediato
 06 meses
 12 meses
 Não autorizo a divulgação

Justifique:

São Paulo, 18 de Setembro de 2022



Aluna: Jessika Cristina Alves da Silva



De acordo
Orientadora: Dra. Roxane Maria Fontes Piazza



**PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS-TOXINOLOGIA
INSTITUTO BUTANTAN**

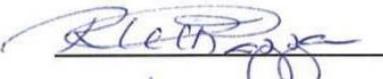
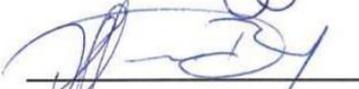
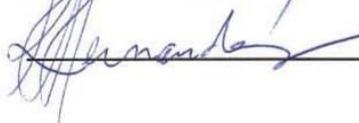
RESULTADO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO

MESTRADO

NOME DA ALUNA: Jessika Cristina Alves da Silva

DATA DO EXAME: 24/10/2022

BANCA EXAMINADORA: Profs. Drs.

NOME	Assinatura	Aprovada	Reprovada
Roxane Maria Fontes Piazza (Presidente)		(X)	()
Orlando Gracia Ribeiro Filho		(X)	()
Rodrigo Tavanelli Hernandes		(X)	()

DECISÃO FINAL: APROVADA (X)

REPROVADA ()

Comentários da Banca (opcional):

São Paulo, 22nd March 2022**CERTIFIED**

We certify that the Research "Analysis of the type II toxin-antitoxin system in the bacterial physiology of a hybrid strain: atypical enteropathogenic *Escherichia coli* and extraintestinal *E. coli*", protocol number CEUAX 5778020222 (ID 000359), under the responsibility Roxane Maria Fontes Piazza, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of Butantan Institute, and was approved in the meeting of day February 14, 2022.

Certificamos que o protocolo do Projeto de Pesquisa intitulado "Análise do sistema toxina-antitoxina tipo II na fisiologia bacteriana de uma cepa híbrida: *Escherichia coli* enteropatogênica atípica e *E. coli* extraintestinal", protocolado sob o CEUAX nº 5778020222, sob a responsabilidade de Roxane Maria Fontes Piazza, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto Butantan, e foi aprovado na reunião de 14 de fevereiro de 2022.



Maria Leonor Sarno de Oliveira
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan



Nancy Oguiura
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

Á minha mãe, Roseli, pelo amor, incentivo e apoio constante nesta jornada.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Roxane Piazza, pela confiança, apoio, aprendizado durante este mestrado e a oportunidade de realizar este projeto. Muito obrigada!

Às minhas colaboradoras, Dra. Thais Mitsunari e Dra. Danielle Munhoz, pelos auxílios prestados, pelas discussões enriquecedoras e apoio.

Aos pesquisadores Dr. Lázaro Moreira e Dra. Luciana Leite, pela colaboração na realização dos ensaios de PCR quantitativo.

Ao Dr. Enéas de Carvalho, pela colaboração nas análises do genoma.

A todos os meus amigos da Bacteriologia, alunos e funcionários, pelo apoio e companheirismo.

Aos meus colegas de bancada, Bruna, Juliana, Gabriel, Daniela, Camila, Carol, Izabella e Miriam, pelo apoio, ótimas risadas e momentos de descontração.

À Kethely, pelo amor, apoio e pela torcida sempre.

À minha família, pelo apoio e incentivo. Principalmente aos meus pais, Roseli e Paulo, por acreditarem em mim sempre. Á minha irmã, Isabelly, pela grande torcida. E à minha avó Maria, por ter acreditado em mim.

A todos que me apoiaram para a realização deste projeto.

Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS ÀS AGÊNCIAS DE FOMENTO

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil. Com auxílio financeiro da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2017/14821-7) e a Fundação Butantan, bolsa concedida através do programa de pós-graduação em Ciências-Toxinologia do Instituto Butantan no período de 18/09/2020 a 18/09/2022. E o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

SILVA, Jessika Cristina Alves da. **Análise do sistema toxina-antitoxina tipo II na fisiologia bacteriana de uma cepa híbrida: *Escherichia coli* enteropatogênica atípica e *E. coli* extraintestinal.** 2022. 88 f. Dissertação (Ciências-Toxinologia), Instituto Butantan, São Paulo, 2022.

Os sistemas toxina-antitoxina (TA) são módulos genéticos que estão associados a alguns processos das bactérias, como formação de células persistentes, formação de biofilme, proteção contra bacteriófagos e respostas a ambientes estressantes. Nesses sistemas, a toxina está relacionada à inibição de processos fisiológicos e a antitoxina fornece proteção à célula contra a toxina. Cinco sistemas TA tipo II presentes no genoma da cepa híbrida BA1250 (*E. coli* enteropatogênica atípica e cepa de *E. coli* extraintestinal) foram analisados. A cepa híbrida BA1250 pode colonizar diferentes nichos do hospedeiro e pode enfrentar diferentes ambientes de estresse, por tanto, por meio de análises de transcrição sob condições de estresse como nutricional, oxidativo, osmótico e ácido, os sistemas CcdB-CcdA, YhaV-PrIF, MazF-MazE, YoeB-YefM e Pasi-PasT foram avaliados tanto na fase log quanto estacionária do cultivo da cepa BA1250. Observamos diferenças significativas nos níveis de expressão dos sistemas CcdB-CcdA, YhaV-PrIF, YoeB-YefM e PasT-Pasi na presença de estresse nutricional na fase estacionária. No estresse ácido foi observado um aumento de expressão gênica das toxinas YhaV, YefM e PasT em fase estacionária. Em contraste, a análise do sistema MazF-MazE não apresentou nenhuma alteração nos níveis de expressão nas condições de estresse avaliadas. Esses dados indicam que esses quatro sistemas TA parecem estar envolvidos na resposta ao estresse da cepa BA1250, portanto envolvidos em processos fisiológicos da BA1250.

Palavras-chave: Expressão gênica. Toxinas bacterianas. *Escherichia coli* patogênica. Sistema toxina-antitoxina. Cepa híbrida.

ABSTRACT

SILVA, Jessika Cristina Alves da. **Analysis of the type II toxin-antitoxin system in the bacterial physiology of a hybrid strain: atypical enteropathogenic *Escherichia coli* and extraintestinal *E. coli*.** 2022. 88 p. Dissertation (Science-Toxinology). Butantan Institute, São Paulo, 2022.

The toxin-antitoxin (TA) systems are genetic modules associated with some bacterial processes, such as cell formation persistence, biofilm formation, protection against bacteriophages and responses to stressful environments. In these systems, the toxin is related to the inhibition of physiological processes and the antitoxin provides protection to the cell against the toxin. Five TA type II systems present in the genome of the hybrid strain BA1250 (atypical enteropathogenic *E. coli* and extraintestinal *E. coli* strain) were analyzed. The hybrid strain BA1250 can colonize different host niches and can face different stress environments, therefore, through transcription analysis under stress conditions such as nutritional, oxidative, osmotic and acid, the CcdB-CcdA, YhaV-PrIF, MazF-MazE, YoeB-YefM and PasI-PasT were evaluated both in the log and stationary phases of BA1250 strain. We observed significant differences in the expression levels of the CcdB-CcdA, YhaV-PrIF, YoeB-YefM and PasT-PasI systems in the presence of nutritional stress in the stationary phase. In acid stress, an increase in the gene expression of YhaV, YefM and PasT toxins in stationary phase was observed. In contrast, the analysis of the MazF-MazE system did not show any change in expression levels under the stress conditions evaluated. These data indicate that these four TA systems seem to be involved in the stress response of the BA1250 strain, therefore involved in the physiological processes of BA1250.

Keywords: Gene expression. Bacterial toxins. *Escherichia coli*. Toxin-antitoxin system. Hybrid strain.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- A/E do inglês *attaching and effacing* (adesão e apagamento)
- aEPEC *Escherichia coli* enteropatogênica atípica
- APEC *E. coli* patogênica aviária
- BFP do inglês *Bundle-forming pilus* (fimbria em forma de feixes)
- cDNA Ácido desoxirribonucleico complementar
- CT do inglês *Cycle threshold* (limite de ciclo)
- DAEC *Escherichia coli* difusamente aderente
- DEC *Escherichia coli* diarrreio gênica
- DNA Ácido desoxirribonucleico
- dNTP Desoxirribonucleotídeos trifosfato
- DO Densidade ótica
- EAEC *Escherichia coli* enteroagregativa
- EAF do inglês EPEC *adherence factor* (fator de aderência de EPEC)
- E. coli Escherichia coli*
- EHEC *Escherichia coli* enterohemorrágica
- EIEC *Escherichia coli* enteroinvasora
- EPEC *Escherichia coli* enteropatogênica
- Esp do inglês *Escherichia coli secreted protein* (Proteína secretada de *E. coli*)
- ETEC *Escherichia coli* enterotoxigênica
- ExPEC *Escherichia coli* extraintestinal
- ITU infecção do trato urinário
- LB Caldo lisogênico (meio Luria-Bertani)
- LEE do inglês *locus of enterocyte effacement* (*locus* de apagamento de enterócitos)
- Log logarítmica
- M9 Meio mínimo
- mRNA Ácido ribonucleico mensageiro
- nm Nanômetro
- NMEC *Escherichia coli* causadora de meningite
- pb Pares de bases
- PBS Tampão salina-fosfato
- PCR Reação em cadeia da polimerase

pH Potencial hidrogeniônico

RT-PCR Transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase

qPCR Reação em cadeia da polimerase quantitativo

RNA Ácido ribonucleico

rpm Rotações por minuto

SST3 Sistema de secreção do tipo III

STEC *Escherichia coli* produtora da toxina Shiga

Stx Toxina Shiga

TA Toxina-antitoxina

TAE Solução Tris-acetato EDTA

TE Solução Tris EDTA

tEPEC *Escherichia coli* enteropatogênica típica

UFC Unidades formadoras de colônias

UPEC *Escherichia coli* uropatogênica

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mecanismos de ação dos sistemas Toxina Antitoxina tipo I, II, III, IV, V, VI, VII e VIII.....	20
Figura 2 - Mecanismos de ação dos sistemas Toxina Antitoxina tipo V, VI, VII e VIII.....	21
Figura 3 - Mecanismo de regulação transcricional dos sistemas TA tipo II.....	23
Figura 4 - Árvore filogenética da cepa BA1250.....	29
Figura 5 - Delineamento experimental.....	33
Figura 6 - Representação do genoma completo com os contigs que contém os <i>locus</i> TAs previstos.....	49
Figura 7 - RT-PCR do cDNA da cepa BA1250 na ausência de estresse bacteriano.....	55
Figura 8 - RT-PCR do cDNA da cepa BA1250 em escassez nutricional.....	56
Figura 9 - Sobrevivência bacteriana sob diferentes cultivos em fase logarítmica e estacionária.....	57
Figura 10 - Curva de dissociação do qPCR para o teste de eficiência dos iniciadores <i>ccdB</i> , <i>ccdA</i> , <i>mazF</i> , <i>mazE</i> , <i>pasT</i> e <i>pasI</i>	59
Figura 11 - Curva de dissociação do qPCR para o teste de eficiência dos iniciadores <i>yhaV</i> , <i>prfF</i> , <i>yoeB</i> , <i>yefM</i> , <i>hcaT</i> e <i>rpoA</i>	60
Figura 12 - Curva padrão do ensaio de eficiência de <i>ccdB</i>	61
Figura 13 - Curva padrão do ensaio de eficiência de <i>ccdA</i>	61
Figura 14 - Curva padrão do ensaio de eficiência de <i>mazF</i>	62
Figura 15 - Curva padrão do ensaio de eficiência de <i>mazE</i>	62
Figura 16 - Curva padrão do ensaio de eficiência de <i>yhaV</i>	63
Figura 17 - Curva padrão do ensaio de eficiência de <i>prfF</i>	63
Figura 18 - Curva padrão do ensaio de eficiência de <i>pasT</i>	64
Figura 19 - Curva padrão do ensaio de eficiência de <i>pasI</i>	64
Figura 20 - Curva padrão do ensaio de eficiência de <i>yoeB</i>	65
Figura 21 - Curva padrão do ensaio de eficiência de <i>yefM</i>	65
Figura 22 - Curva padrão do ensaio de eficiência de <i>hcaT</i>	66
Figura 23 - Curva padrão do ensaio de eficiência de <i>rpoA</i>	66
Figura 24 - Análise do qPCR dos transcritos <i>ccdB</i> e <i>ccdA</i> sob condições de	

estresse.....	69
Figura 25 - Análise do qPCR dos transcritos <i>mazF</i> e <i>mazE</i> sob condições de estresse.....	70
Figura 26 - Análise do qPCR dos transcritos <i>pasT</i> e <i>pasI</i> sob condições de estresse.....	71
Figura 27 - Análise do qPCR dos transcritos <i>yhaV</i> e <i>prfF</i> sob condições de estresse.....	72
Figura 28 - Análise do qPCR dos transcritos <i>yoeB</i> e <i>yefM</i> sob condições de estresse.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sistemas TA tipo II da cepa BA1250 e seus respectivos alvos celulares.....	30
Tabela 2 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores.....	35 e 36
Tabela 3 - Temperaturas para padronização da PCR.....	37
Tabela 4 - Condições ideais para os genes dos sistemas toxina-antitoxina no PCR.....	37 e 38
Tabela 5 - Condições dos cultivos em estresse em fase logarítmica aplicadas na cepa BA1250.....	40
Tabela 6 - Condições dos cultivos em estresse em fase estacionária aplicadas na cepa BA1250.....	40
Tabela 7 - Sequência dos oligonucleotídeos dos genes de referência.....	44
Tabela 8 - Relação dos sistemas Toxina-Antitoxina tipo II da cepa BA1250 encontrados na sequência montada por QUASt.....	48
Tabela 9 - <i>Locus</i> TA preditos em <i>E. coli</i> BA1250 pela ferramenta TAFinder.....	50 e 51
Tabela 10 - Localização dos genes TA da cepa BA1250.....	53
Tabela 11 - Valores de eficiência dos iniciadores.....	67

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Sistema Toxina-Antitoxina.....	19
1.2. <i>Escherichia coli</i>	26
1.3. Sistemas TA tipo II da cepa BA1250	30
2. OBJETIVO	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1. Cepa bacteriana.....	33
3.2. Análise do genoma da cepa BA1250	34
3.2.1. Predição e busca dos sistemas TA	34
3.2.2. Predição dos genes TA no plasmídeo F	34
3.3. Análise por PCR	35
3.3.1. Desenho dos iniciadores oligonucleotídeos	35
3.3.2. Padronização das reações de PCR	36
3.4. Cultivos em condições de estresse	38
3.4.1. Contagem de células bacterianas	38
3.4.2. Padronização do cultivo bacteriano em condições de estresse	38
3.4.3. Cultivo da cepa BA1250 em condição de escassez nutricional	41
3.4.4. Cultivo da cepa BA1250 em estresse oxidativo	41
3.4.5. Cultivo bacteriano em estresse osmótico.....	41
3.4.6. Cultivo bacteriano em choque ácido	42
3.5. RT-PCR (transcriptase reversa)	42
3.5.1. Extração de RNA	42
3.5.2. Síntese do DNA complementar.....	43
3.5.3. RT-PCR do cDNA da cepa BA1250 em condições normais	43
3.5.4. RT-PCR do cDNA da cepa BA1250 em condição de estresse com	

escassez nutricional em fase log	43
3.6. PCR quantitativo em tempo real	44
3.6.1. Desenho dos iniciadores oligonucleotídeos para os genes de referência para PCR quantitativo	44
3.6.2. Teste de eficiência dos iniciadores para o qPCR.....	45
3.6.3. Análise de transcrição dos genes em qPCR.....	45
3.7. Análises estatísticas	46
4. RESULTADOS	48
4.1. Análise do genoma.....	48
4.1.1. Predição dos sistemas TA no genoma completo	48
4.1.2. Localização dos sistemas analisados	52
4.2. Análise qualitativa da transcrição dos sistemas TA	54
4.3. Sobrevivência bacteriana dos cultivos em estresse	56
4.4. Eficiência dos iniciadores para o qPCR	57
4.5. Análise de transcrição pelo PCR quantitativo em tempo real	67
4.5.1. Análise de transcrição do sistema CcdB-CcdA.....	67
4.5.2. Análise de transcrição do sistema MazF-MazE	69
4.5.3. Análise de transcrição do sistema PasT-PasI.....	70
4.5.4. Análise de transcrição do sistema YhaV-PrIF	71
4.5.5. Análise de transcrição do sistema YoeB-YefM	72
5. DISCUSSÃO	74
6. CONCLUSÃO.....	79
REFERÊNCIAS.....	80

1. INTRODUÇÃO

1.1. Sistema Toxina-Antitoxina

Os sistemas toxina-antitoxina (TA) são módulos genéticos compostos por uma antitoxina lábil que inibe uma toxina estável, estes são encontrados em plasmídeos e cromossomos de bactérias e de arqueas. Esses sistemas são compostos por dois genes, presentes no mesmo *operon* que codificam a toxina e a antitoxina. A toxina é geralmente traduzida como uma proteína e a antitoxina pode ser uma proteína ou um pequeno RNA (KEDZIERSKA & HAYES, 2016; GOEDERS & VAN MELDEREN, 2014; LEPLAE *et al.*, 2011). A toxina está relacionada com a inibição de processos fisiológicos bacterianos e a antitoxina confere proteção à célula bacteriana (HARMS *et al.*, 2018).

Os genes dos sistemas toxina-antitoxina foram inicialmente encontrados no plasmídeo F de *Escherichia coli* e relacionados à sobrevivência celular (OGURA & HIRAGA, 1983; LEE & LEE, 2016). Nas células que apresentam os plasmídeos com os genes TA, as toxinas permanecem silenciadas pela síntese contínua das antitoxinas, no entanto, nas células bacterianas onde o plasmídeo não está presente, ocorre uma diminuição das antitoxinas, deixando a toxina livre para ter sua ação na célula, resultando na eliminação dessas células da população, este processo é denominado de morte celular pós-segregacional (HERNANDEZ-ARRIAGA *et al.*, 2014).

Os sistemas TA presentes nos cromossomos podem estar associados a algumas atividades na célula bacteriana, como a formação de persistência celular, regulação da formação de biofilme, proteção contra bacteriófagos, resposta a ambientes extremos como deficiência de nutrientes e tratamento com antibióticos (GHAFOURIAN *et al.*, 2014).

Até o presente momento, oito tipos de sistemas TA já foram descritos, são classificados de acordo com a natureza e ação da antitoxina (**Figuras 1 e 2**). Nos módulos TA do tipo I, tipo III e tipo VI II as antitoxinas são pequenos RNAs não codificantes, enquanto que nos módulos TA do tipo II, tipo IV, tipo V, tipo VI e tipo VII são pequenas proteínas (SINGH *et al.*, 2021).

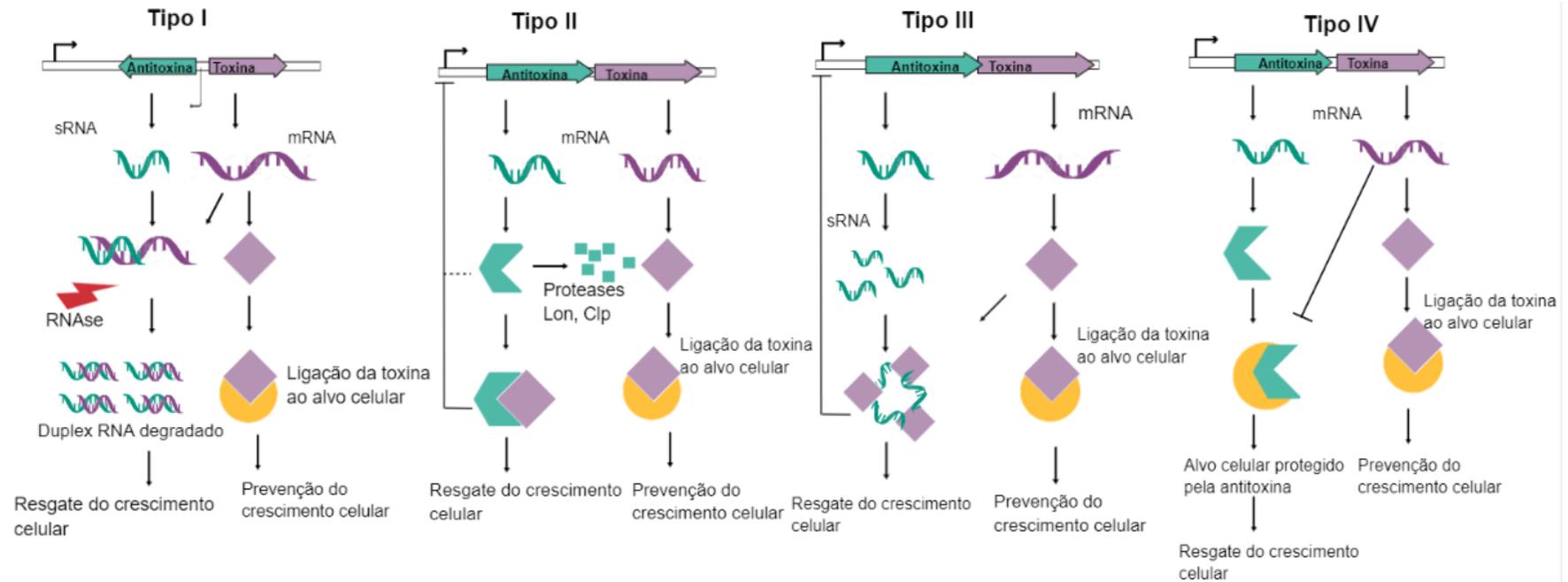


Figura 1 - Mecanismos de ação dos sistemas Toxina-Antitoxinas Tipo I, II, III e IV. No tipo I, a antitoxina que é um RNA se liga no mRNA da toxina, assim impedindo a tradução da mesma. No tipo II, a antitoxina forma um complexo proteico que sequestra a toxina, se a antitoxina for degradada por proteases, a toxina é liberada podendo agir no alvo celular. No tipo III, a antitoxina é um RNA que se liga diretamente na toxina, sequestrando ou bloqueando sua atividade. No tipo IV, a antitoxina é uma proteína que interfere na ligação da toxina ao seu alvo.

Fonte: Adaptado de Srivastava *et al.*, 2021.

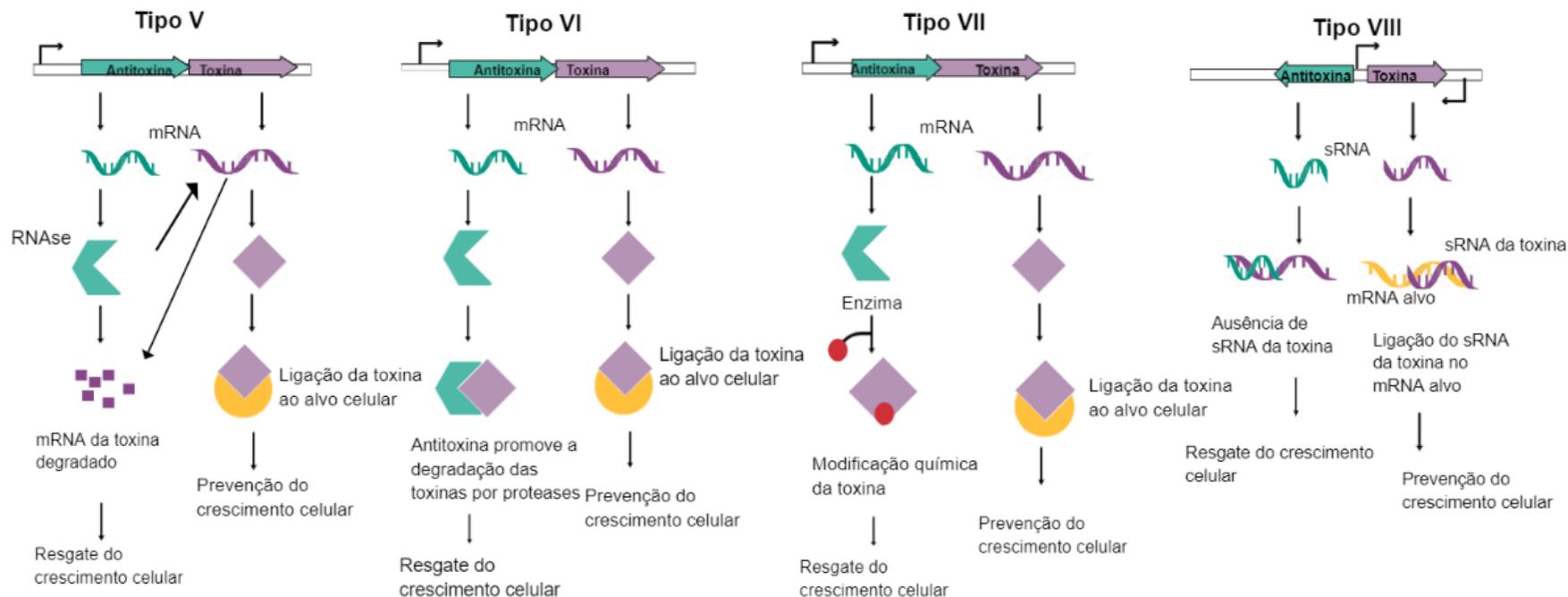


Figura 2 - Mecanismos de ação dos sistemas Toxina-Antitoxinas Tipo V, VI, VII e VIII. No tipo V, a antitoxina impede a tradução da toxina, clivando seu mRNA. No sistema tipo VI, a antitoxina atua como um adaptador proteolítico, promovendo a degradação da toxina através de proteases. No tipo VII, as antitoxinas modificam enzimaticamente as toxinas para impedir sua ação no alvo celular. E no tipo VIII, o sRNA da antitoxina se liga ao sRNA da toxina, impedindo que a toxina se ligue ao mRNA alvo.

Fonte: Adaptado de Srivastava *et al.*, 2021.

Nos sistemas TA do tipo I, as toxinas são pequenas proteínas altamente hidrofóbicas e as antitoxinas são pequenos RNAs antisense. Nesse sistema, o sRNA se liga ao mRNA da toxina, resultando na inibição da tradução da toxina (GHAFOURIAN *et al.*, 2014). Os genes mais estudados dessa categoria de sistema são “*hok-sok*” do plasmídeo R1 de *Escherichia coli*. Neste caso a antitoxina é um RNA antisense que é codificado de forma cis, ou seja, os pares de genes transcritos são sobrepostos de forma convergente. Há também o sistema *tisB-istR1* que é codificado de forma trans, em que os pares de gene transcritos são localizados divergentemente um do outro (BRANTL, 2012; YANG & WALSH 2017; FOZO *et al.*, 2010).

Sistemas TA do tipo II são amplamente distribuídos nos genomas bacterianos, nesse sistema, a antitoxina é uma proteína lábil que inibe a atividade da toxina. Com a primeira sequestrando a toxina através da formação de complexos proteicos. A antitoxina lábil tem uma estrutura menos ordenada, ficando suscetível a degradação proteolítica. Devido a essa degradação, a concentração da antitoxina é reduzida na célula e, dessa maneira, a expressão do TA aumenta, tornando esse sistema um módulo de dependência (YANG & WALSH 2017; GHAFOURIAN *et al.*, 2014). A configuração genética dos *operons* TA tipo II podem ocorrer de duas formas, para alguns sistemas o *operon* apresenta o gene da antitoxina precedendo o gene da toxina e em outros sistemas ocorre uma configuração inversa, onde o gene da toxina precede o gene da antitoxina e promotores adicionais auxiliam na expressão gênica (**Figura 3**) (FRAIKIN, GOORMAGHTIGH & VAN MELDEREN, 2020).

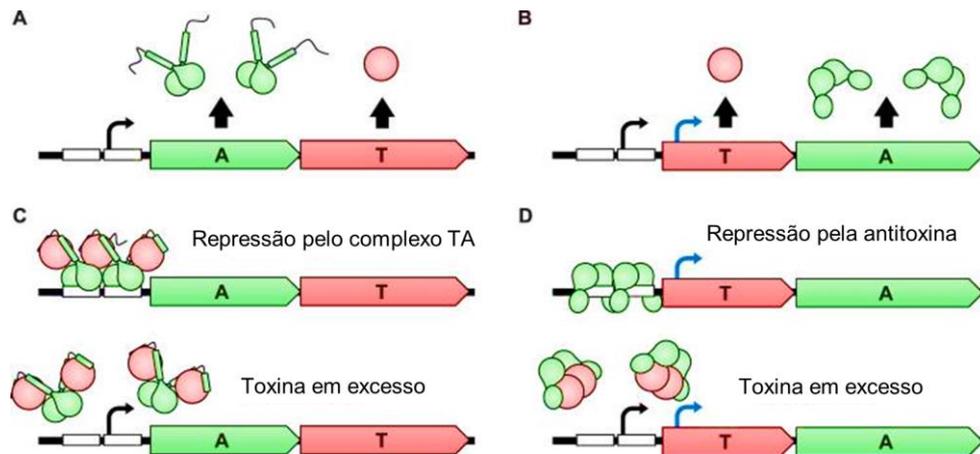


Figura 3 – Mecanismo de regulação transcricional dos sistemas TA tipo II. Os genes das toxinas são representados em vermelho e os genes das antitoxinas em verde. A. O *operon* TA é transcrito por um único promotor autorregulado. (B) Transcrição de sistemas de TA organizados de forma reversa. É geralmente transcrito por um único promotor autorregulado (seta preta). O excesso da concentração de antitoxina ocorre através de sua transcrição exclusiva por outros promotores (seta azul). (C) A cooperatividade condicional dos sistemas TA. Complexos insaturados de toxina-antitoxina ligam fortemente seus operadores para reprimir a transcrição. A concentração da toxina em excesso leva à formação de complexos saturados que não ligam seus operadores e ocorre a repressão negativa. (D) Repressão de sistemas organizados inversamente. O excesso de antitoxina reprime a transcrição de todo o *operon*. O excesso da concentração da toxina desloca a antitoxina de seus operadores, levando à repressão negativa e à transcrição de todo o *operon*.

Fonte: Adaptado de Fraikin, Goormaghtigh & Van Melderen, 2020.

A regulação transcricional desses sistemas é realizada de forma autorregulatória, utilizando um mecanismo de cooperatividade condicional, a concentração de toxina e antitoxina na célula determina a transcrição. Nos *operons* que apresentam a antitoxina precedendo a toxina, a repressão ocorre pelo complexo toxina-antitoxina e quando há toxina em excesso ocorre a repressão negativa. Para os *operons* que apresentam a configuração inversa, a repressão ocorre pela antitoxina que se liga ao operador e em situações de toxina em excesso, a toxina desloca a antitoxina dos operadores e assim há a repressão negativa do *operon* (FRAIKIN, GOORMAGHTIGH & VAN MELDEREN, 2020). Esses sistemas TA do tipo II, são os mais descritos, e em grande parte as toxinas atuam como endoribonucleases, inibindo o mecanismo de tradução celular. Por exemplo, as toxinas MazF e RelE, a primeira responsável pela clivagem do mRNA livre e a segunda por clivar o mRNA associado ao ribossomo (CHAN, ESPINOSA & YEO, 2016). Porém, as toxinas do tipo II como CcdB e ParE também podem atuar na inibição direta da atividade da DNA girase, afetando assim a replicação do DNA. Dessa forma, essas toxinas podem atuar em diferentes alvos intracelulares (GHAFOURIAN *et al.*, 2014; CHAN, ESPINOSA & YEO, 2016).

No sistema TA do tipo III, as antitoxinas são RNAs que se ligam diretamente à

toxina, sequestrando ou bloqueando sua atividade bioquímica (WEN & FOZO, 2014). As toxinas realizam atividade de endoribonuclease, degradando sua antitoxina e outros mRNAs vitais para a célula. Elas formam complexos macromoleculares juntamente com o RNA da antitoxina, com a forma de pseudo-nó (KANG *et al.*, 2018). As principais funções do sistema TA tipo III, são a defesa contra bacteriófagos induzindo a morte da célula, um mecanismo denominado de infecção abortiva. Dessa forma a população infectada é reduzida para evitar a propagação de fagos. Um exemplo desse sistema é o ToxIN de *Pectobacterium atrosepticum*, que também é encontrado em *Serratia* e *E. coli*. Este foi o primeiro sistema tipo III a ser descrito e a principal atividade da toxina ToxN é a resistência a fagos (SHORT *et al.*, 2018; KANG *et al.*, 2018; WEN & FOZO, 2014).

No sistema TA do tipo IV, a antitoxina é uma proteína que interfere na ligação da toxina ao seu alvo, não agindo diretamente na toxina como outros sistemas TA. A toxina CbtA (YeeV) tipo IV está associada com a inibição de proteínas essenciais do citoesqueleto (TAN, AWANO & INOUYE, 2011). A toxina CbtA se liga e polimeriza as proteínas do citoesqueleto, MreB e FtsZ, e a antitoxina CsbA (YeeU) age diretamente nas proteínas alvo da toxina, neutralizando sua toxicidade (MASUDA, *et al.*, 2012; WEN, BEHIELS & DEVREESE 2014).

O sistema GhoT-GhoS foi descrito e classificado para o tipo V. A antitoxina GhoS é uma endoribonuclease específica que impede a tradução de GhoT, clivando seu mRNA. Esse sistema codifica uma proteína lítica de membrana, dessa forma a membrana da célula é danificada e há alterações na sua morfologia, causando a formação de células fantasmas. A toxina GhoT também está associada ao aumento da formação inicial de biofilme (WANG *et al.*, 2012; WEN, BEHIELS & DEVREESE, 2014).

No sistema do tipo VI, a antitoxina utiliza proteases para realizar a degradação da toxina. No sistema SocB-SocA, o gene da toxina *socB* é controlado pela protease ClpXP, enquanto SocA atua como um adaptador proteolítico, promovendo a degradação da toxina SocB pela ClpXP. Esse sistema tem ações importantes em *Caulobacter crescentus*, atuando em ambientes estressantes, para evitar a replicação do DNA (YANG & WALSH 2017; AAKRE *et al.*, 2013).

No sistema tipo VII as antitoxinas modificam enzimaticamente as toxinas por meio de interações transitórias, diferentemente do sistema do tipo II, em que a

inibição da toxina ocorre por meio de ligação e formação de um complexo proteico (WANG *et al.*, 2020). Um exemplo desse sistema relatado em *E. coli*, foi o sistema Hha-TomB. A antitoxina interage transitoriamente com a toxina, aumentando assim a oxidação dos resíduos de cisteína de Hha, resultando na neutralização da toxina. (MARIMON *et al.*, 2016).

Em 2018 foi descrito o sistema tipo VIII, neste módulo a toxina e a antitoxina são pequenos RNAs, e o primeiro sistema identificado desta classe é SdsR – RyeA. O sRNA da antitoxina RyeA se liga ao sRNA de SdsR, inibindo sua toxicidade (CHOI *et al.*, 2018).

Os sistemas toxina-antitoxina estão amplamente distribuídos nos cromossomos bacterianos. As bactérias possuem uma diversidade de sistema TA, como por exemplo, as bactérias *Nitrosomonas europaeae*, *Sinorhizobium meliloti* e *Mycobacterium bovis* que contêm mais de 50 sistemas descritos (VAN MELDEREN & SAAVEDRA DE BAST, 2009). Em um estudo realizado por Sala, Bordes & Genevoux (2014) foi descrito mais de 70 tipos de sistemas TA em *Mycobacterium tuberculosis*, sendo 50 cópias do sistema TA tipo II VapBC. Em *E. coli* K12, foram descritos 36 genes de sistemas TA, que pertencem aos sistemas do tipo I, II, IV e V (YAMAGUCHI & INOUE, 2011).

A relação dos sistemas TAs com bactérias patogênicas vem sendo cada vez mais descritas, na revisão de Fernández-García e colaboradores (2016) alguns estudos sobre os sistemas TA foram relacionados a virulência de diferentes patógenos. A associação de sistemas TA tipo I com a resposta SOS foi descrita em *E. coli*. Em *Salmonella typhimurium* sistemas TA são necessários para a formação de células persistentes induzidos por macrófagos. Em *Haemophilus influenzae* a inativação de sistemas TA tipo II do tipo Vap reduziu a virulência do patógeno (FERNÁNDEZ-GARCÍA *et al.*, 2016). Em 2015, Tiwari e colaboradores mostraram que a inativação de três sistemas MazEF em *Mycobacterium tuberculosis* reduziu a patogenicidade em macrófagos, no baço e pulmões de porquinhos-da-índia (TIWARI *et al.*, 2015). Já em um modelo de infecção murina causada por *E. coli* uropatogênica (UPEC), foi relatado que os sistemas YefM-YoeB e YbaJ-Hha aumentaram a colonização da bexiga. Ainda no mesmo estudo foi descrito que o sistema Pasi-PasT auxiliou na sobrevivência bacteriana nos rins e aumentou a formação de células persistentes (NORTON *et al.*, 2012).

1.2. *Escherichia coli*

Escherichia coli, é uma das principais bactérias que colonizam o intestino do homem e de animais homeotérmicos, portanto é parte importante da microbiota (KAPER *et al.*, 2004). *E. coli* é uma bactéria gram-negativa, anaeróbia facultativa, não esporulada e altamente versátil, pois sobrevive em diferentes ambientes como solo, água e alimentos. Por transferência horizontal de genes, ilhas de patogenicidade, bacteriófagos e transposons, cepas de *E. coli* evoluíram e adquiriram genes de virulência, tornando-se patogênicas (LEIMBACH *et al.*, 2013).

As cepas patogênicas de *E. coli* apresentam fatores de virulência específicos que contribuem com a geração de um amplo espectro de doenças, como a diarreia e as doenças extraintestinais, como infecções do trato urinário (ITU), sepse e meningite em humanos. As cepas que causam as doenças extraintestinais são denominadas de *E. coli* extraintestinal (ExPEC) e são classificadas de acordo com seu local de infecção, sinais clínicos, hospedeiro e fatores de virulência, dessa forma, são denominadas de *E. coli* uropatogênica (UPEC), *E. coli* associada a meningite neonatal (NMEC), *E. coli* associada à sepse (SEPEC) e *E. coli* patogênica aviária (APEC). Cepas de *E. coli* que levam a doenças entéricas são denominadas *E. coli* diarreiogênicas (DEC) e são divididas em seis patótipos, são eles: *E. coli* enteropatogênica (EPEC) subdividida em típica (tEPEC) e atípica (aEPEC), *E. coli* produtora da toxina de Shiga (Stx) (STEC) e seu subgrupo *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) também subdividida em típica (tEAEC) e atípica (aEAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC) (KAPER, NATARO & MOBLEY, 2004; GOMES *et al.*, 2016; CROXEN *et al.*, 2013).

A doença diarreica é uma das principais causas de mortalidade infantil, ocorrendo aproximadamente 525 mil mortes em crianças menores de cinco anos de idade, a cada ano (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). A diarreia é definida por fezes moles ou líquidas que ocorrem três vezes ou mais por dia, podendo durar por vários dias, causando desidratação que pode gerar problemas graves ou morte. É uma infecção no trato gastrointestinal, que pode ser causada por vários tipos de microrganismos, dentre eles, as bactérias (WHO, 2017). Esta é uma doença que tem como via de transmissão fecal-oral, por alimentos e água contaminados, de pessoa

para pessoa, como resultado da falta de higiene (WHO, 2017). Estima-se que, 88% das mortes causadas por diarreia ocorram pela falta de saneamento básico e higienização correta (WHO & UNICEF, 2009).

EPEC é uma das principais causas de mortalidade infantil e está associada com a diarreia aguda e persistente, superior a 14 dias. Somente em 2011 ocorreram 79.000 mil mortes ocasionadas por este patotipo (OCHOA *et al.*, 2011; WALKER *et al.*, 2012). O principal mecanismo da patogenicidade de EPEC é a lesão *attaching/effacing* (A/E), que é caracterizada pela aderência íntima da bactéria ao epitélio intestinal do hospedeiro seguido pelo rearranjo do citoesqueleto e destruição das microvilosidades. A lesão A/E é associada a ilha de patogenicidade chamada *locus of enterocyte effacement* (LEE) que contém os genes que codificam a intimina, um sistema de secreção do tipo III (SST3), diversas proteínas secretadas (Esp) e o receptor de intimina translocado chamado Tir (TRABULSI, KELLER & GOMES, 2002). Além da aderência íntima ao hospedeiro, durante a etapa inicial da infecção as cepas de EPEC típica (tEPEC) utilizam a fímbria BFP (*Bundle-forming pilus*) para uma aderência inicial da bactéria ao seu hospedeiro. A fímbria BFP é codificada pelo plasmídeo EAF (EPEC *adherence factor*) que é encontrado apenas nas EPEC típicas (GIRON *et al.*, 1991; TRABULSI, KELLER & GOMES, 2002). Dessa forma, as cepas de EPEC atípicas (aEPEC) diferenciam de tEPEC, pela ausência do plasmídeo EAF e não expressão da fímbria BFP (TRABULSI, KELLER & GOMES, 2002; ABE *et al.*, 2009; NARA *et al.*, 2010).

As doenças causadas pela ExPEC levam à altas taxas de mortalidade e morbidade, sendo, a causa mais comum de bacteremia e uma das principais causas de sepse (LAUPLAND *et al.*, 2013; VAN DER MEE-MARQUET *et al.*, 2015). Nas ITUs, UPEC é a principal causa das infecções adquiridas na comunidade, causando cistite e pielonefrite aguda, sendo responsável por 70-95% dos casos de ITUs e umas das principais causas das ITUs hospitalares (50% dos casos) (FOXMAN, 2010; PITOUT, 2012). Durante o processo infeccioso, a UPEC necessita de diferentes fatores de virulência para que essa patogênese ocorra, esses fatores incluem fímbrias, toxinas secretadas, cápsula de polissacarídeo e sistemas de aquisição de ferro. A adesão de UPEC no epitélio urinário, é realizada pela adesina fimbrial H (FimH). Durante o processo de invasão de UPEC na bexiga, ocorrem interações entre a FimH e integrinas do epitélio que estão agrupadas com actina,

resultando na desestabilização dos microtúbulos. Estes processos levam a um rearranjo da actina local, resultando na internalização das bactérias aderidas. Com a internalização de UPEC, a bactéria pode formar comunidades bacterianas intracelulares (IBCs) semelhantes ao biofilme. Além dos IBCs, a UPEC pode ascender para os rins. Já de forma quiescente, persistindo na bexiga, podem ocorrer reinfecções nos pacientes. O estado de quiescência permite que a bactéria sobreviva em vacúolos protegidos da imunidade do hospedeiro (CROXEN & FINLAY, 2010). Além das preocupantes ITUs ocasionadas por ExPECs, nas infecções de meningite neonatal causadas por bactérias gram-negativas, NMEC é a causa mais encontrada nas infecções em recém nascidos, com 40% de letalidade. O processo infeccioso de NMEC é bastante complexo, já que a bactéria precisa sair do trato gastrointestinal, invadir a corrente sanguínea e ultrapassar a barreira hematoencefálica para atingir o sistema nervoso central, o que pode levar a morte ou graves lesões neuronais. A bactéria é adquirida perinatalmente da mãe, e a colonização é seguida por transcitose de enterócitos na corrente sanguínea (CROXEN & FINLAY, 2010).

Devido a grande plasticidade genética de *E. coli*, é observado cada vez mais relatos de cepas patogênicas híbridas, ou seja, que apresentam os genes de virulência de dois ou mais patótipos. Dentre os exemplos destacamos uma cepa híbrida *E. coli* produtora da toxina de Shiga enteroagregativa O104:H4, que causou um surto em 2011 na Alemanha, responsável por causar gastroenterite e síndrome hemolítico-urêmica (SHU), neste surto foram relatados 3816 casos e 22% dos casos evoluíram para SHU, um quadro clínico mais grave (FRANK *et al.*, 2011). Outro caso relatado foi a cepa híbrida de EPEC/ETEC, que foi isolada de uma criança com diarreia aguda e sanguinolenta, a análise dos fatores de virulência da cepa revelou que a bactéria induz a lesão A/E e produz a toxina termolábil (LT) provocando um quadro mais grave durante a infecção (DUTTA *et al.*, 2015). Outro patógeno híbrido de *E. coli* também descrito na literatura foi uma cepa de ExPEC/EPEC que inicialmente causou uma diarreia e posteriormente evoluiu para um quadro de bacteremia, isso se deve ao fato deste patógeno apresentar os fatores de virulência enteropatogênicos e extraintestinais (KESSLER *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2020). Esses relatos demonstram a gravidade da infecção causada por uma cepa híbrida, este é o caso da cepa BA1250 de *E. coli*, que apresenta os genes de aEPEC e

ExPEC, uma bactéria que vem sendo estudada no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan. Inicialmente caracterizada como uma cepa aEPEC isolada de uma criança com diarreia, posteriormente a análise do sequenciamento do seu genoma por MUNHOZ *et al.*, 2021, revelou a presença de genes de virulência de ExPEC. A análise filogenética da cepa BA1250 foi realizada por Munhoz e colaboradores (2021), utilizando um grupo de 33 cepas, 16 cepas de ExPEC, 13 cepas de aEPEC e 4 protótipos DEC (**Figura 4**). Foi identificado que a cepa BA1250 apresentou um ancestral comum mais recente com as cepas de ExPEC, demonstrando que a cepa BA1250 compartilha características genéticas com os isolados de ExPEC. Dessa forma, a BA1250 foi classificada como uma cepa patogênica híbrida (MUNHOZ *et al.*, 2021).

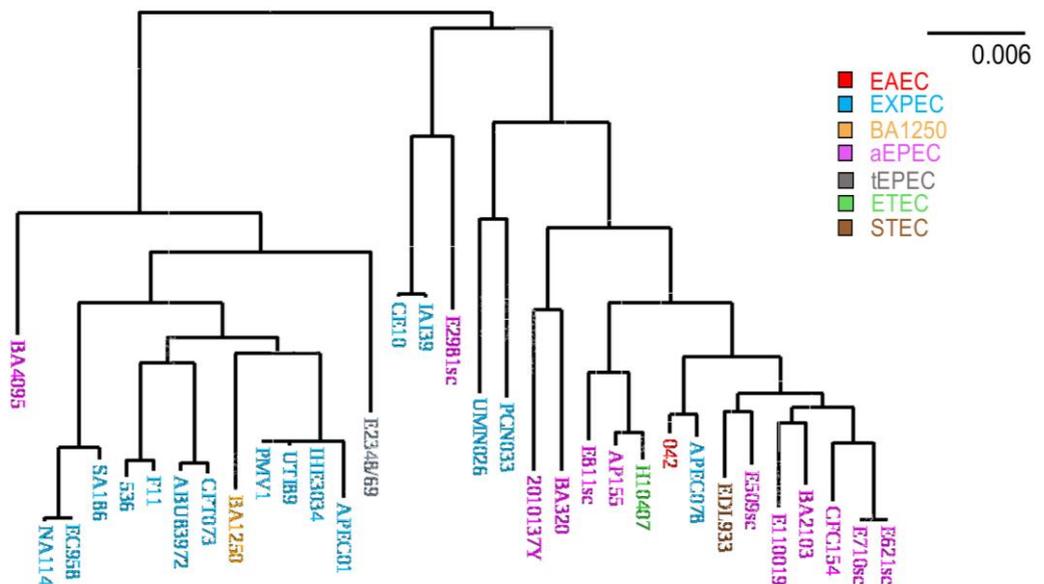


Figura 4 – Árvore filogenética da cepa BA1250. As cepas são coloridas de acordo com o grupo patogênico de *E. coli*, vermelho para cepa protótipo de *E. coli* enteroagregativa (EAEC) 042, em azul estão as cepas de ExPEC, laranja para a cepa aEPEC BA1250, em rosa as cepas de aEPEC, cinza para *E. coli* enteropatogênica típica (tEPEC) cepa protótipo E2348/69, verde para *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) cepa protótipo H10407 e marrom para cepa protótipo de *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) EDL933.

Fonte: Munhoz *et al.*, 2021.

Esses dados nos levaram ao presente trabalho que consiste em entender o papel dos sistemas TA presente no genoma da cepa BA1250 e sua relação com a fisiologia e/ou a patogenicidade da cepa. Neste estudo, destacamos os sistemas TA tipo II, pois são os módulos TAs amplamente encontrados em cepas bacterianas, estima-se que cromossomos bacterianos codifiquem em média 3,8 dos sistemas tipo II (GOEDERS & VAN MELDEREN, 2014).

1.3. Sistemas TA tipo II da cepa BA1250

Os sistemas TAs tipo II analisados foram CcdA-CcdB, MazE-MazF, PasI-PasT, PrIF-YhaV e YefM-YoeB. Esses sistemas podem atuar de diferentes formas na célula bacteriana (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Sistemas TA tipo II da cepa BA1250 e seus respectivos alvos celulares

Sistema TA	Alvo	Processo Celular
CcdA-CcdB	DNA Girase	Replicação Celular
YhaV-PrIF	Ribossomo independente	Tradução
MazF-MazE	mRNA interferase	
	Ribossomo independente	Tradução
YoeB-YefM	mRNA interferase	
	Ribossomo dependente	Tradução
PasT-PasI	mRNA interferase	
	Subunidade ribossômica 50S	Tradução

Fonte: BERNARD & COUTURIER, 1992; SCHIMIDT *et al.*, 2007; CHRISTENSEN *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2003.

O sistema CcdB-CcdA, é um módulo TA bastante estudado na literatura, a toxina CcdB tem como alvo a DNA girase, uma topoisomerase tipo II essencial em *E. coli*. A toxina CcdB envenena o complexo DNA girase, bloqueando a passagem das polimerases e levando a quebra da fita dupla do DNA, dessa forma, ocorre a inibição da replicação celular, indução da resposta SOS, filamentação celular e morte celular (BERNARD & COUTURIER, 1992; GOEDERS & VAN MELDEREN, 2014). O operon CcdB-CcdA é autoregulado a nível transcricional. O CcdB pode se ligar sozinho ao operador do seu promotor, porém a repressão é dependente da razão do complexo CcdB-CcdA (HAYES *et al.*, 2014, AFIF *et al.*, 2001). Porém, como sua antitoxina está frequentemente sendo degradada pela protease Lon, a transcrição dos genes está em um equilíbrio dinâmico (LEE & LEE, 2016).

Outro sistema TA tipo II, amplamente descrito na literatura é MazF-MazE. A toxina MazF tem como alvo o mRNA, clivando a região ACA do mRNA (ZHANG *et al.*, 2003). Em condições não estressantes, a toxina é inibida pela antitoxina, porém, em condições estressantes, a antitoxina é degradada pelas proteases Lon e ClpAP, e a toxina MazF fica livre para exercer sua atividade de endoribonuclease (AMITAI *et*

al., 2004; NIKOLIC *et al.*, 2018). Sua ação na bactéria está relacionada com a morte celular programada, resposta ao estresse, podendo induzir um estado de dormência reversível quando há escassez de aminoácidos. MazF pode ser ativado em diferentes situações de estresse bacteriano, escassez nutricional, estresse oxidativo e danos ao DNA (CHRISTENSEN *et al.*, 2003; HAZAN *et al.*, 2004).

O sistema PasT-PasI também atua na síntese de proteínas, mas sua toxina tem como alvo a subunidade 50S ribossomal, inibindo assim a síntese proteica (ZHANG *et al.*, 2011). Norton *et al.* (2012), em seus estudos observaram uma relação entre o sistema PasT-PasI com a resposta ao estresse, a toxina PasT foi relacionada com um aumento da resistência bacteriana em estresse oxidativo e nitrosativo.

O sistema YhaV-PrIF não é um módulo TA amplamente estudado. Mas sabe-se, que é um sistema da super família MazF-MazE, pois sua toxina YhaV atua como uma endoribonuclease do mRNA dependente de ribossomo, sendo um sistema que está relacionado com a inibição do crescimento celular (SCHIMIDT *et al.*, 2007; CHOI *et al.*, 2017).

Outro módulo TA tipo II que atua no mRNA, é o YoeB-YefM, este sistema atua no processo de tradução, a toxina YoeB age clivando o mRNA e a superprodução da protease Lon desencadeia esse processo inibindo a antitoxina YefM (CHRISTENSEN *et al.*, 2004; KAMADA *et al.*, 2005).

O papel desses sistemas TA na patogênese dessa cepa híbrida (aEPEC/ExPEC) e sua importância nos processos fisiológicos, ainda não foram estabelecidos. Como a cepa híbrida BA1250 (aEPEC/ExPEC) pode causar tanto a doença diarreica como uma doença sistêmica, a compreensão desses sistemas TA e a importância nos processos fisiológicos bacterianos é necessária para entendermos a relação dos sistemas TA com a patogênese. Compreender se esses sistemas estão envolvidos em respostas a ambientes estressantes que uma cepa híbrida pode enfrentar ao colonizar diferentes nichos do hospedeiro. Portanto, aqui discutimos a relação dos sistemas TA tipo II na resposta ao estresse da cepa híbrida BA1250, avaliando a expressão gênica desses sistemas.

2. OBJETIVO

Análise da transcrição dos genes que compõem os sistemas toxina-antitoxina tipo II, CcdB-CcdA, YhaV-PrIF, MazF-MazE, YoeB-YefM e PasT-PasI na cepa híbrida BA1250 em diferentes condições de estresse.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Para cumprir os objetivos propostos foi desenhado o seguinte plano de trabalho (**Figura 5**).

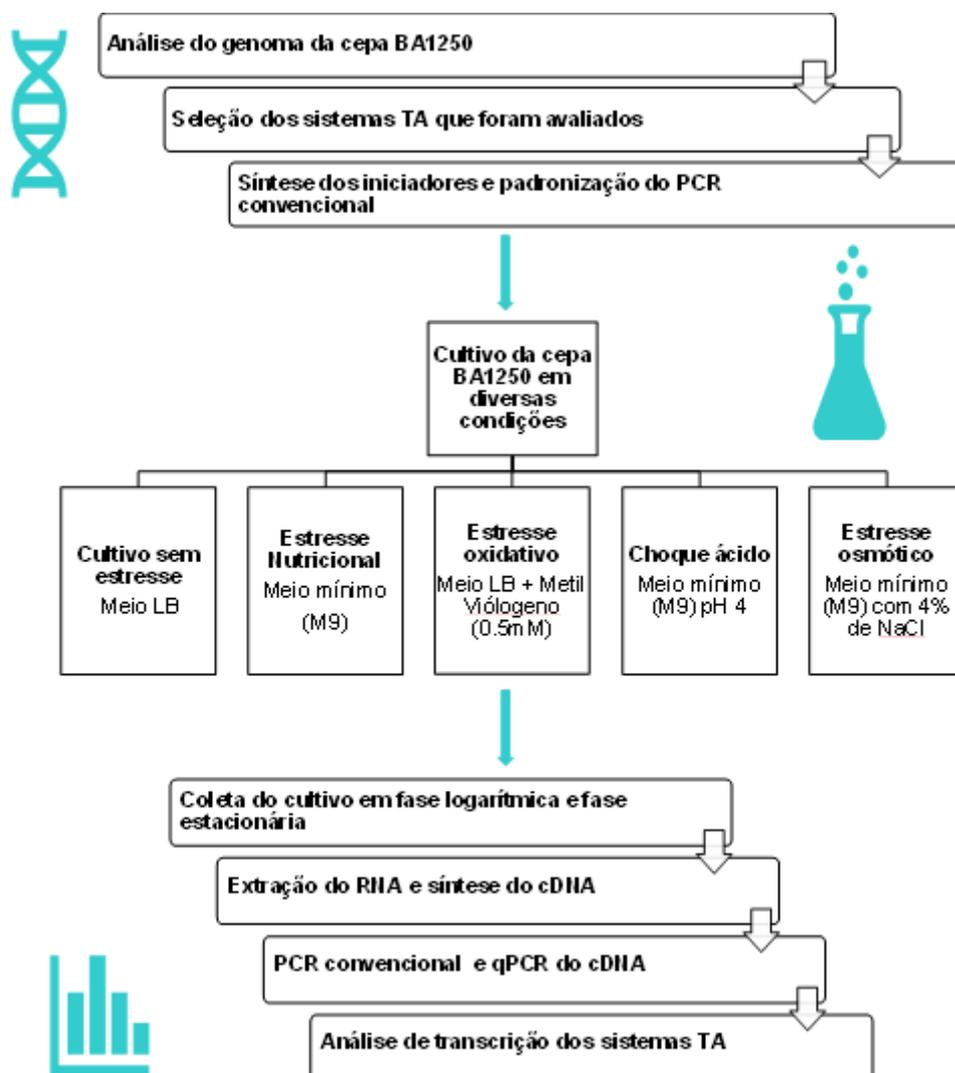


Figura 5 - Delineamento experimental. Plano de trabalho do projeto.

Fonte: Próprio autor.

3.1. Cepa bacteriana

Neste trabalho foi utilizada a cepa híbrida BA1250, sorotipo ONT:H6, que foi isolada das fezes de uma criança com diarreia durante um estudo epidemiológico realizado em Salvador - BA (BUERIS *et al.*, 2007). Inicialmente caracterizada como aEPEC (ABE *et al.*, 2009; MUNHOZ *et al.*, 2018), foi recentemente redefinida como

uma cepa híbrida aEPEC/ExPEC após sequenciamento e análise total de seu genoma (MUNHOZ *et al.*, 2021). A cepa bacteriana foi retirada do estoque em freezer -80° C e cultivada em caldo lisogênico (LB) a 37° C por 18 h e posteriormente em placa contendo meio ágar MacConkey a 37° C por 18 h.

3.2. Análise do genoma da cepa BA1250

3.2.1. Predição e busca dos sistemas TA

O sequenciamento do genoma da cepa BA1250 foi realizado no trabalho de Munhoz e colaboradores (2021), a montagem foi realizada com o SPAdes e para analisar o genoma montado foi utilizado a ferramenta QUAST alinhando a um genoma de referência. Portanto, no presente trabalho a sequência montada por Munhoz e colaboradores (2021) foi visualizada com o auxílio do editor de texto Sublime possibilitando a verificação de quais genes dos sistemas toxina-antitoxina estavam presentes em seu genoma.

Para uma análise mais aprofundada deste genoma, foi aplicada a ferramenta TAFinder que identifica *locus* genéticos dos sistemas TA tipo II e através de predições localiza genes homólogos da toxina ou da antitoxina utilizando o servidor BLASTP e HMMer3. Os dados utilizados na predição realizada estão arquivados no banco de dados TADB (XIE *et al.*, 2018). Desta forma, as 139 sequências dos contigs do genoma completo encontradas no banco de dados GenBank sob o número de acesso JADPBX000000000 foram aplicadas na ferramenta para predição dos genes.

3.2.2. Predição dos genes TA no plasmídeo F

A cepa BA1250 apresenta em seu genoma o plasmídeo F com 158 genes anotados pelo Prokka, identificado através do software PlasmidFinder que encontrou o grupo IncFIB/IncFII (MUNHOZ *et al.*, 2021). Como os sistemas TA podem ser distribuídos tanto no cromossomo quanto no plasmídeo (GOEDERS & VAN MELDEREN, 2014) foi realizado uma análise da localização dos genes TA *ccdA*, *ccdB*, *mazE*, *mazF*, *pasI*, *pasT*, *prfF*, *yhaV*, *yoeB* e *yefM*. Para tanto, foram utilizados

dois métodos, sendo o primeiro a montagem do plasmídeo pelo algoritmo SCAPP, seguido por uma classificação de todos os contigs em plasmidiais ou cromossomais pelo programa PlasFlow. Dessa forma, as sequências desses genes TA foram submetidos na ferramenta BLAST contra o genoma completo (controle da análise), o plasmídeo montado pelo SCAPP e os contigs separados em cromossomais e plasmidiais pelo PlasFlow para identificar a localização dos genes.

3.3. Análise por PCR

3.3.1. Desenho dos iniciadores oligonucleotídeos

Os iniciadores foram desenhados de acordo com a sequência dos genes da cepa BA1250, com o auxílio da ferramenta Primer 3 (<https://primer3.ut.ee/>). Dez genes dos sistemas toxina-antitoxina foram selecionados para a síntese dos iniciadores, são eles: *ccdB-ccdA*, *yhaV-prlF*, *mazF-mazE*, *yoeB-yefM* e *pasI-pasT*. Deste modo, as sequências dos genes selecionados foram inseridas no programa Primer 3 para gerar as sequências ideais para os iniciadores (**Tabela 2**). Os iniciadores foram sintetizados pela empresa Exxtend nas condições solicitadas.

Tabela 2 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores

Gene	Sequência iniciadora	Produto de Amplificação
<i>ccdB</i>	F: GCCGCGTTTCCCTTTGTTAT R: CAAAATTTCGTTCCCAGCGC	215 pb
<i>ccdA</i>	F: GAGTTAGTCAATCGCGCTCG R: CATCCGGTTTCATCAGCCAA	158 pb
<i>yhaV</i>	F: AAAGGGTTAATGGTTGGGCG R: CCTAACGACTTGCCATGACG	214 pb
<i>prlF</i>	F: GGACAAACAACACTATCCCCGC R: CAATGTTGACGTCCATGCCA	250 pb
<i>mazF</i>	F: TGTTGTCCTGAGTCCGTTA	197 pb

	R: CTGGGGCAACTGTTTCCTTTC	
<i>mazE</i>	F: GGCTACGTTAATGCAGGCG	186 pb
	R: TCCTTATCTTTGGCTCCCC	
<i>mazE</i> *(qPCR)	F: AAAGCGTTGGGGAAATTCAC	161 pb
	R: TGACCAGTTCAGCAAGCGTA	
<i>yoeB</i>	F: CTGGTCTGAGGAATCATGGGA	171 pb
	R: ATAATGCGTCGGGACCAGAA	
<i>yefM</i>	F: GAAGCGCGTCAGAATTTGTC	174 pb
	R: CATCAATCTCCGGGCGTTAG	
<i>pasT</i>	F: GTTTACAACCCGCAACCAGT	188 pb
	R: TAAACACACGACCAAAGGCG	
<i>pasI</i>	F: GCGACGGTTGAAGAAGCTAT	161 pb
	R: TCGGCAATGAGAGGACGATA	

Fonte: Próprio autor.

3.3.2. Padronização das reações de PCR

Para os ensaios de PCR foi realizada a extração do DNA bacteriano. A cepa foi cultivada em caldo LB a 37° C por 18 h, sem agitação, e 1 mL do cultivo foi centrifugado a 6.000 x g por 3 min. O sedimento foi então ressuspensão em 100 µL de água destilada autoclavada e incubado a 100° C por 5 min em banho seco, posteriormente centrifugado a 6.000 x g por 3 min, e o sobrenadante obtido foi armazenado em freezer a -20° C até sua utilização. As reações foram compostas por 2,5 µL de tampão de reação de PCR 10X buffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos, 1 mM MgCl, 0,2 mM dNTPs, 1,0 µL do iniciador *Forward* (20 pmol) e 1,0 µL do iniciador *Reverse* (20 pmol), 0,2 µL Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos), 1,0 µL do DNA e água ultrapura para um volume final da reação de 25 µL. As reações foram amplificadas no termociclador *Veriti 96 well Thermal cycler* (Applied Biosystems, Waltham, MA, Estados Unidos) e as condições dos ciclos foram programadas para diferentes temperaturas de anelamento (**Tabela 3**) para sabermos a condição ideal para cada

gene.

Tabela 3 - Temperaturas para padronização da PCR

Condições testadas								
Teste 1			Teste 2			Teste 3		
Temperatura	Tempo	Número de ciclos	Temperatura	Tempo	Número de ciclos	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
94° C	5 min	1	94° C	5 min	1	94° C	5 min	1
94° C	1 min	30	94° C	1 min	30	94° C	1 min	30
56° C	1 min	30	60° C	1 min	30	64° C	1 min	30
72° C	1 min	30	72° C	1 min	30	72° C	1 min	30
72° C	7 min	1	72° C	7 min	1	72° C	7 min	1

Fonte: Próprio autor.

Deste modo, três reações de PCR de cada gene foram realizadas nas condições definidas para amplificação. A análise da amplificação foi feita por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com *GelRed* (Biotium, Fremont, CA, Estados Unidos) em tampão TAE (40 mM de tris-acetato; 2 mM de ácido etilenodiaminotetracético). O marcador de peso utilizado foi o 1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos). A migração foi realizada sob voltagem constante de 80 V em tampão TAE. Os géis foram fotografados com o auxílio do sistema de imagem *Alliance 6.7* (UVItec, Cambridge, Reino Unido). As temperaturas de anelamento foram padronizadas e foi definido para cada gene (**Tabela 4**) para ser aplicado nas reações de PCR.

Tabela 4 - Condições ideais para os genes dos sistemas toxina-antitoxina no PCR.

Gene	Temperatura de anelamento
<i>ccdB</i>	60° C
<i>ccdA</i>	56° C
<i>yhaV</i>	60° C
<i>prIF</i>	60° C
<i>mazF</i>	60° C
<i>mazE</i>	56° C

<i>yoeB</i>	60° C
<i>yefM</i>	56° C
<i>pasT</i>	60° C
<i>pasI</i>	56° C

Fonte: Próprio autor.

3.4. Cultivos em condições de estresse

3.4.1. Contagem de células bacterianas

Com o intuito de ser utilizada como um controle da multiplicação bacteriana nos diferentes tipos de estresse de acordo com a condição de cultivo, foi realizada contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC). As cepas bacterianas foram cultivadas em meio LB ou meio mínimo M9 (Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaCl, NH₄Cl, MgSO₄, CaCl₂, Ácido Casamínico 0,05%, Glicose 0,4% e água deionizada, conforme a condição de estresse aplicada, 100 µL do cultivo foi coletado e diluído em 900 µL de PBS 0.01 M pH 7.2 estéril. As diluições seriadas desse material foram plaqueadas em ágar LB, utilizando-se a técnica de plaqueamento por gota de 10 µL ou 20 µL, para a contagem das células bacterianas pelo método de UFC. Após plaqueadas, as placas foram mantidas a 37 °C por 16 h e as colônias foram posteriormente contadas.

3.4.2. Padronização do cultivo bacteriano em condições de estresse

Os sistemas TA cromossomais foram descritos como relacionados a resposta ao estresse, dessa forma, aplicamos diferentes condições de estresse para analisar a transcrição desses sistemas (GHAFOURIAN *et al.*, 2014). Por tanto a padronização de cada cultivo foi realizada nas condições de estresse nutricional, ácido, osmótico e oxidativo. Para a padronização do cultivo bacteriano em condições de estresse foi realizado um pré cultivo em meio líquido LB a 37° C por 18 h. Este foi então utilizado em uma diluição de 1:100 em 10 mL de meio LB ou meio mínimo M9, conforme a condição de estresse aplicada. Na **Tabela 5** estão descritas as condições de estresse empregadas durante a fase de crescimento logarítmico e na

Tabela 6 as condições empregadas durante a fase estacionária. Para estes ensaios, a fase de crescimento logarítmico foi definida como DO 600nm entre 0,6-0,8 e a fase estacionária definida após 30 min do estabelecimento do platô.

Tabela 5 - Condições dos cultivos em estresse em fase logarítmica aplicadas na cepa BA1250

Condição de estresse	Cultivo	Tempo de cultivo	Temperatura	Agitação	D.O. 600 nm	UFC/mL
Sem estresse	LB	3h	37° C	200 rpm	0,6 - 0,8	4,5x10 ⁸
Escassez Nutricional	M9	4h20	37° C	200 rpm	0,6 - 0,8	2x10 ⁸
Estresse oxidativo	LB + Metil Viológeno (0.5 mM)	5h	37° C	200 rpm	0,6 - 0,8	6x10 ⁸
Estresse osmótico	M9 com 4% NaCl	24h	37° C	200 rpm	0,6 - 0,8	9x10 ⁷
Choque ácido	M9 lavado com M9 pH4	17h	37° C	200 rpm	0,6 - 0,8	5x10 ⁸

Fonte: Próprio autor.

Tabela 6 - Condições dos cultivos em estresse em fase estacionária aplicadas na cepa BA1250.

Condição de estresse	Cultivo	Tempo de cultivo	Temperatura	Agitação	D.O. 600 nm	UFC/mL
Sem estresse	LB	8h	37° C	200 rpm	1,7	2,2x10 ⁹
Escassez Nutricional	M9	14h	37° C	200 rpm	1,6	1x10 ⁻⁹
Estresse oxidativo	LB + Metil Viológeno (0.5 mM)	10h	37° C	200 rpm	1,8	2x10 ⁹
Estresse osmótico	M9 com 4% NaCl	48h	37° C	200 rpm	1,5	2,3x10 ⁸
Choque ácido	M9 lavado com M9 pH4	48h	37° C	200 rpm	1,4	2x10 ⁹

Fonte: Próprio autor.

3.4.3. Cultivo da cepa BA1250 em condição de escassez nutricional

A cepa bacteriana foi cultivada em triplicata experimental e duplicata biológica, em 3 mL de caldo LB a 37° C por 18 h, após esse período foi adicionado uma diluição 1:100 do pré-inóculo para um novo cultivo de 10 mL de meio mínimo M9 modificado a 37° C sob agitação constante à 200 rpm. A primeira coleta do cultivo foi realizada na fase logarítmica, 2 mL do cultivo foram utilizados na extração do RNA e 100 µL para contagem de unidade formadora de colônia. A segunda coleta foi realizada na fase estacionária, quando foi coletada uma alíquota de 2 mL para a extração de RNA e 100 µL para contagem de UFC. As amostras coletadas foram centrifugadas a 4.000 x g por 5 min, e descartado o sobrenadante. Ao sedimento bacteriano foi aplicado 1 mL de RNAlater (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos) e submetidos a temperatura de 4° C por 1 h sob agitação e posteriormente armazenados em freezer -20° C até o momento do uso.

3.4.4. Cultivo da cepa BA1250 em estresse oxidativo

A cepa bacteriana foi cultivada em triplicata experimental em 3 mL de caldo LB a 37° C por 18 h, após esse período foi adicionado uma diluição 1:100 desse pré-inóculo para um novo cultivo de 10 mL de meio LB acrescido de metil viológeno 0.5 mM a 37°C sob agitação de 200 rpm, como descrito na literatura (Norton *et al.*, 2012). Posteriormente as coletas foram realizadas em fase log e estacionária até o momento da extração de RNA.

3.4.5. Cultivo bacteriano em estresse osmótico

Para o cultivo em estresse osmótico foi utilizado o protocolo adaptado de Hucker e colaboradores (2017). A cepa BA1250 foi cultivada em 3 mL de meio líquido LB a 37° C por 18 h, após esse período foi adicionado uma diluição 1:100 desse pré-inóculo para um novo cultivo de 10 mL de meio mínimo M9 com adição de NaCl 4%, em triplicata experimental o cultivo foi incubado a 37°C, sob agitação de 200 rpm até o momento das coletas em fase log e fase estacionária.

3.4.6. Cultivo bacteriano em choque ácido

O cultivo da BA1250 para o choque ácido foi realizado conforme protocolo de LeRoux *et al.* (2020). A cepa foi cultivada em 3 mL de meio líquido LB a 37° C por 18 h, após esse período, foi coletado 1 mL do cultivo e centrifugado a 4.000 x g por 5 min, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em 1 mL de meio mínimo M9 modificado em pH 4, a amostra foi centrifugada novamente e descartado o sobrenadante. Ao sedimento foi adicionado 1 mL de meio M9 em pH base e então, uma diluição de 1:100 desse cultivo foi adicionado em um novo cultivo de 10 mL de meio mínimo M9 modificado em pH base em triplicata experimental e duplicata biológica, o cultivo bacteriano foi incubado a 37°C, sob agitação de 200 rpm até o momento das coletas em fase log e fase estacionária.

3.5. RT-PCR (transcriptase reversa)

3.5.1. Extração de RNA

O RNA das amostras foi extraído e purificado de acordo com as recomendações do kit de extração RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, North Rhine-Westphalia, Alemanha). A eluição do RNA foi realizada em água ultrapura sem RNase. Após o procedimento de extração, o RNA obtido foi submetido a um tratamento com DNase para garantir a ausência de DNA no lisado e evitar contaminação. Após o tratamento foi realizada uma reação de PCR com os iniciadores *rpoA* como controle da reação para detectar algum DNA ainda existente na amostra, assim o gene *rpoA* seria amplificado. Para a reação foi adicionado, 2,5 µL de tampão de reação de PCR 10X buffer, MgCl (1mM), 0,2 mM dNTPs, 1,0 µL iniciador *forward* (20 pmol), 1,0 µL iniciador *reverse* (20 pmol), 0,2 µL de Taq DNA Polymerase, 1,0 µL de RNA e 18,3 µL de H₂O e o ciclo de 94° C por 5 min, 94°C por 1 min 30 vezes, 56° C por 1 min 30 vezes, 72 ° C por 30 vezes e 72° C por 1 min. Após a reação de PCR, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 1% para visualização da amplificação e como não houve amplificação, não havia resquícios de DNA nas amostras de RNA.

3.5.2. Síntese do DNA complementar

O RNA obtido das amostras foi quantificado por NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos) e para a reação foi utilizado 1 µg do RNA. Para tanto, foi adicionado em 1 µg de RNA, 1 µL de random primer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos) e 1 µL dNTP. A reação foi incubada a 65° C por 5 min, posteriormente em gelo por 1 min, e foi adicionada na reação 10 µL de uma reação contendo 1 µL de tampão, 4 µL de MgCl₂, 2 µL de DTT (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos), 1 µL RNase out (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos), 1 µL de enzima SuperScript III (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos) e 1 µL de H₂O livre de RNA. Toda a reação foi incubada por 10 min a 25° C, posteriormente a 50° C por 50 min e a 85 ° C por 5 min. O DNA complementar (cDNA) obtido foi quantificado por NanoDrop 2000 e posteriormente armazenado em freezer -20° C.

3.5.3. RT-PCR do cDNA da cepa BA1250 em condições normais

Após os procedimentos de extração de RNA e síntese do cDNA, o material obtido foi utilizado nas reações de PCR para observar a transcrição dos genes do sistema toxina-antitoxina em condições nutricionais e ambiente favoráveis para a bactéria. As reações de PCR foram realizadas nas condições previamente padronizadas para cada gene (**Tabela 3**). Para a reação foram utilizados os seguintes controles: um controle interno da integridade do cDNA *rpoA*, um controle positivo foi utilizado o DNA da bactéria e como controle da reação nenhum material genético foi adicionado. Após a amplificação, as reações foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1% e os géis fotografados com o auxílio do sistema de imagem *Alliance 6.7*.

3.5.4. RT-PCR do cDNA da cepa BA1250 em condição de estresse com escassez nutricional em fase log

A bactéria foi cultivada em 3 mL de meio líquido LB a 37° C por 18 h, após esse período foi adicionado 1:100 desse pré-inóculo para um novo cultivo de 10 mL

de meio mínimo M9 modificado a 37° C sob agitação de 250 rpm até D.O. de 0,6 na absorbância de 600 nm. Após o cultivo, foi realizada a extração de RNA pelo Kit RNeasy Mini Kit e síntese de cDNA. O cDNA obtido foi submetido a uma reação de RT-PCR para avaliação da transcrição dos genes dos sistemas TA e como controle positivo foi utilizado o cDNA obtido do cultivo sem estresse bacteriano que há a presença de todos os genes, como controle da integridade do cDNA foi utilizado os iniciadores da *rpoA* e como controle negativo foi feito uma reação sem o material genético. Para análise da transcrição, as reações foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1% e fotografadas com o auxílio do sistema de imagem *Alliance* 6.7.

3.6. PCR quantitativo em tempo real

3.6.1. Desenho dos iniciadores oligonucleotídeos para os genes de referência para PCR quantitativo

Para os ensaios do PCR quantitativo (qPCR) foram utilizados os genes constitutivos *hcaT* e *rpoA* como genes de referência. O gene *hcaT* foi identificado como gene de referência para análises de transcrição por Zhou *et al.* (2011), e codifica um transportador da membrana celular (ZHOU *et al.*, 2011). O gene *rpoA* foi escolhido pois é um importante gene para a bactéria por codificar a proteína de subunidade alfa da RNA polimerase (IGARASHI *et al.*, 1991). Deste modo, os iniciadores foram desenhados de acordo com a sequência dos genes obtidos no site KEGG, na busca em *E. coli*, com o auxílio da ferramenta Primer 3 (<https://primer3.ut.ee/>). Na **Tabela 7** se encontram as sequências de cada iniciador.

Tabela 7 - Sequência dos oligonucleotídeos dos genes de referência

Gene	Sequência iniciadora	Produto de Amplificação
<i>hcaT</i>	F: GTTGCCGTGGTTGATAGTGG R: ACGGTCATGATGGCGATACT	165 pb
<i>rpoA</i>	F: CGGCACAATCGATCCTGAAG R: AGCGGACAGTCAATTCCAGA	173 pb

Fonte: Próprio autor.

3.6.2. Teste de eficiência dos iniciadores para o qPCR

A reação de qPCR foi realizada com um pool do cDNA obtido das extrações do cultivo em controle do meio LB em fase log. Contendo na reação de 20 μL , 6,8 μL de cDNA, 10 μL de 2X SYBR Green Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos), 0,8 μL iniciador *forward* (5 μM), 0,8 μL do iniciador *reverse* (5 μM) e 1,6 μL de água. As condições de amplificação foram 1 ciclo de 50° C por 2 min, 1 ciclo de 95° C por 10 min, 40 ciclos de 95° C por 15 seg. e 40 ciclos de 60° C por 1 min. Após o ciclo de amplificação foi feito um ciclo para a curva de dissociação 2 ciclos de 60° C por 1 min e 2 ciclos de 95° C por 15 seg. A reação de qPCR foi realizada no equipamento 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Waltham, MA, Estados Unidos) em uma placa de PCR de 96 poços. Para analisar a eficiência dos primers, foram realizadas diluições seriadas do pool do cDNA, dessa forma, o cDNA com 87,72 ng/ μL , 43,86 ng/ μL , 21,93 ng/ μL e 10,96 ng/ μL foi analisado. As reações foram realizadas para todos os genes TA. Após a amplificação do produto, os dados foram obtidos e visualizados pelo software do equipamento 7500 Real-Time PCR System. Os valores de Cts obtidos foram avaliados em gráficos do Excel para obtenção da curva padrão e dos valores do R². Os valores de inclinação da curva padrão foram obtidos e submetidos a ferramenta qPCR Efficiency Calculator da ThermoFisher (<https://www.thermofisher.com/br/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/qpcr-efficiency-calculator.html>) para obtenção do valor da eficiência de cada iniciador.

3.6.3. Análise de transcrição dos genes em qPCR

As reações de qPCR foram realizadas no equipamento LightCycler 480 II (Roche, Basel, Suíça). Em uma placa de 384 poços foram analisadas todas as amostras obtidas nos ensaios de condições de estresse em fase logarítmica e fase estacionária. As reações foram feitas em duplicatas para os genes *ccdB*, *ccdA*, *yhaV*, *prfF*, *mazF*, *mazE*, *yoeB*, *yefM*, *pasT*, *pasI*, *hcaT* e *rpoA*. Para cada reação foi utilizado 5 μL de SYBR Green I Master LightCycler 480 II (Roche, Basel, Suíça), 0,4

μL do iniciador *forward* (5 μM), 0,4 μL do iniciador *reverse* (5 μM), 1,7 μL de água ultrapura e 2,5 μL do cDNA. Na placa de 14 poços foi aplicado somente água para controle da reação. As condições de amplificação foram de 1 ciclo de 95° C por 5 min, 45 ciclos de 95°C por 10 seg., 45 ciclos de 60° C por 20 seg., 45 ciclos de 72° C por 15 seg. Para a curva de dissociação as condições foram de 1 ciclo de 95° C por 5 seg. e 1 ciclo de 65° C por 1 min. Após a amplificação, os dados foram gerados através do software do LightCycler 480 II. Os valores de Cts foram obtidos e analisados em uma tabela do Excel. Primeiramente, foi realizada uma média aritmética dos valores de Cts das duplicatas e uma média aritmética entre os valores da média dos Cts dos genes de referência *hcaT* e *rpoA*. Para obtenção do valor da razão da expressão gênica relativa (*fold change*) dos genes TA testados, foi utilizado o método de $\Delta\Delta\text{Ct}$, descrito por Livak e Schmittgen (2001), para isso foi aplicado a seguinte fórmula:

$$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} \quad (1)$$

Para obtermos o $\Delta\Delta\text{Ct}$, foram realizados os seguintes cálculos:

Ct do gene TA tratado nas condições de estresse - Ct do gene de referência tratado na condição de estresse = ΔCt da amostra tratada (2)

Ct do gene TA não tratado com condição de estresse - Ct do gene de referência não tratado na condição de estresse = ΔCt da amostra não tratada (3)

Após a obtenção dos resultados do ΔCt das amostras tratadas e não tratadas, foi realizado uma média aritmética do ΔCt da amostra não tratada, dessa forma, foi aplicado o seguinte cálculo:

$$\Delta\text{Ct} (\text{amostra tratada}) - \Delta\text{Ct} (\text{média amostra não tratada}) = \Delta\Delta\text{Ct} \quad (4)$$

Com o valor do $\Delta\Delta\text{Ct}$ obtido de cada amostra tratada, foi então utilizada a equação (1) para obtenção do *fold change* valor relativo de expressão de cada gene. Os valores obtidos foram analisados através de diferentes gráficos confeccionados no programa GraphPad Prism 6.

3.7. Análises estatísticas

As análises estatísticas utilizadas foram através do programa GraphPad Prism 6, para as comparações estatísticas da expressão gênica foram aplicados o Teste T

não pareado e o Teste F para comparar as variâncias. E para os ensaios de sobrevivência celular foi aplicado o Teste T não pareado.

4. RESULTADOS

4.1. Análise do genoma

4.1.1. Predição dos sistemas TA no genoma completo

Na fase inicial do trabalho foi realizada uma busca de quais e quantos sistemas toxina-antitoxina estavam presentes no genoma da cepa BA1250, a sequência montada por Munhoz e colaboradores (2021) pela ferramenta QUASt alinhado a um genoma de referência foi visualizada utilizando o editor de texto Sublime e a busca dos sistemas TA foi feita de acordo com a anotação dos genes com a nomenclatura toxina-antitoxina (**Tabela 8**).

Tabela 8 - Relação dos sistemas Toxina-Antitoxina tipo II da cepa BA1250 encontrados na sequência montada por QUASt

Sistema TA	Nº de cópias do gene no genoma
CcdB-CcdB	1
HigB-HigA	5
YhaV-PrIF	1
MazF-MazE	1
YoeB-YefM	1
PasI-PasT	1
HipA-HipB	1
TabA	3

Acesso GenBank: GCA_016786245.1. Fonte: Próprio autor.

Para buscar sistemas TAs que não haviam sido anotados na sequência montada pela ferramenta QUASt, foi realizada uma análise de predição de genes utilizando uma ferramenta específica para a busca de *locus* TA tipo II. Portanto, a sequência do genoma completo indexada no GenBank foi aplicada na ferramenta TAFinder que realiza a predição de genes TAs por similaridade. O genoma completo foi dividido por 139 contigs e então o genoma de BA1250 foi analisado. Nesta busca por sistemas TA, foram encontrados *locus* TA em 14 contigs da sequência completa da cepa BA1250 (**Figura 6**).

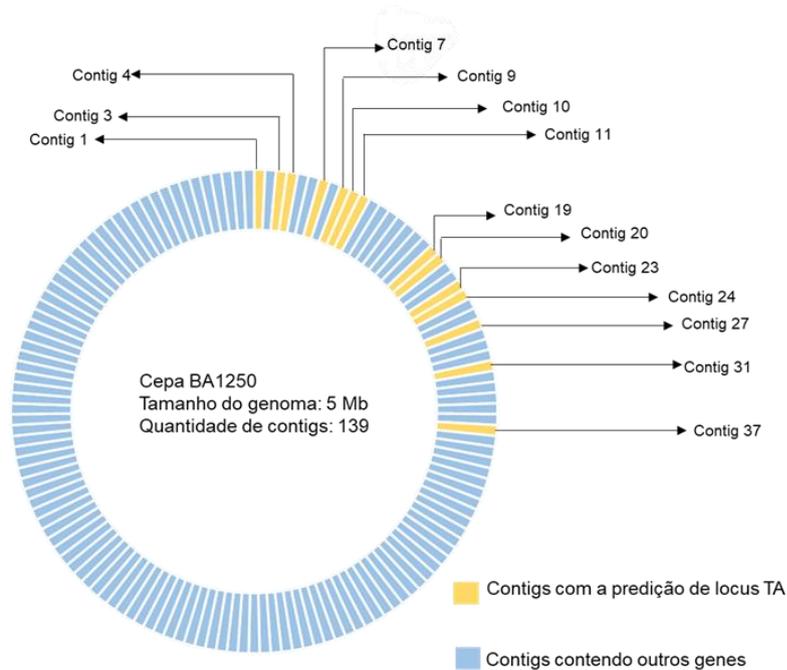


Figura 6 - Representação do genoma completo com os contigs que contém os *locus* TAs preditos. Genoma completo com os contigs que contém os *locus* TA em amarelo.
Fonte: Próprio autor.

Na **Tabela 9** observa-se a lista e nomenclatura dos genes e domínios TAs encontrados através da ferramenta de predição que buscou similaridades nas sequências empregadas com os locus TA tipo II utilizando os métodos BLASTP e HHMer3 com os genes TA inseridos no banco de dados TADB. Ao todo foram preditos 21 sistemas TAs no genoma da cepa BA1250 pela ferramenta TAFinder.

Tabela 9 - Locus TA preditos em *E. coli* BA1250 pela ferramenta TAFinder

Contig	Tipo	Gene	Tamanho (aa)	Domínio	Família	Domínio conservado	Identificação BLASTP	Pontuação HMMer	Nº de Locus TA tipo II
Contig 1	Antitoxina	-	113	Xre	Xre-like_domain	cd00093	100.000	1.87	2
	Toxina	-	100	RelE	relE-like_domain	COG3549	100.000	70.91	
	Antitoxina	-	103	Xre	Xre-like_domain	-	31.461	-	
	Toxina	-	331	PIN	PIN-like_domain	-	43.750	-	
Contig 3	Antitoxina	-	82	RHH	RHH-like_domain	-	81.707	-	3
	Toxina	-	91	RelE	relE-like_domain	-	76.923	-	
	Antitoxina	-	265	Xre	Xre-like_domain	-	36.207	-	
	Toxina	-	91	RelE	relE-like_domain	-	76.923	-	
Contig 4	Antitoxina	-	111	-	yeeU	-	69.444	-	2
	Toxina	-	113	-	yeeV	-	59.434	-	
	Antitoxina	-	77	RHH	ccdA	-	100.000	-	
	Toxina	-	104	MazF	MazF-like_domain	-	98.077	-	
Contig 7	Antitoxina	-	94	-	higA	-	100.000	-	1
	Toxina	-	110	RelE	relE-like_domain	-	100.000	-	
	Antitoxina	<i>prIF</i>	111	AbrB	AbrB-like_domain	-	99.099	-	
Contig 9	Toxina	<i>yhaV</i>	154	RelE	relE-like_domain	-	100.000	-	2
	Antitoxina	-	107	Xre	Xre-like_domain	-	100.000	-	
	Toxina	-	117	RelE	relE-like_domain	-	98.291	-	
	Antitoxina	-	230	-	-	pfam00392	-	18.47	
Contig 10	Toxina	<i>mdtD</i>	475	-	-	pfam12568	-	3.71	1
	Antitoxina	-	122	-	yeeU	-	92.623	-	
	Toxina	-	125	-	yeeV	-	88.000	-	

Contig 11	Antitoxina	-	73	PHD	PHD-like_domain	COG2161	79.452	5.80	2
	Toxina	-	125	Fic	Fic-like_domain	COG3654	80.165	19.35	
	Antitoxina	<i>ugpB</i>	438	-	-	TIGR01889	-	1.37	
	Toxina	-	125	-	-	COG3654	-	19.35	
Contig 19	Antitoxina	<i>mazE</i>	82	AbrB	AbrB-like_domain	smart00966	100.000	48.53	1
	Toxina	<i>mazF</i>	111	MazF	MazF-like_domain	PRK09812	100.000	24.43	
Contig 20	Antitoxina	-	55	YhfG	YhfG-like_domain	pfam10832	100.000	98.55	1
	Toxina	-	200	Fic	Fic-like_domain	PRK10347	99.500	98.19	
Contig 23	Antitoxina	-	151	Xre	Xre-like_domain	cd00093	66.667	1.75	1
	Toxina	-	96	RelE	relE-like_domain	COG4680	67.708	67.64	
Contig 24	Antitoxina	-	99	Xre	Xre-like_domain	-	32.653	-	1
	Toxina	-	337	PIN	PIN-like_domain	-	40.385	-	
Contig 27	Antitoxina	<i>yefM</i>	83	PHD	PHD-like_domain	COG2161	100.000	6.50	2
	Toxina	<i>yoeB</i>	84	RelE	relE-like_domain	COG4115	100.000	88.89	
	Antitoxina	-	101	-	yeeU	-	94.059	-	
	Toxina	<i>cbtA</i>	124	-	yeeU	-	100.000	-	
Contig 31	Antitoxina	-	203	HipA	HipA-like_domain	COG3550	97.368	33.44	1
	Toxina	<i>hipB</i>	88	Xre	Xre-like_domain	cd00093	98.864	1.89	
Contig 37	Antitoxina	-	94	Xre	Xre-like_domain	cd00093	100.000	1.31	1
	Toxina	-	92	RelE	relE-like_domain	COG3549	100.000	43.57	

Fonte: Próprio autor:

4.1.2. Localização dos sistemas analisados

Os sistemas TA CcdA-CcdB, MazE-MazF, PrIF-YhaV, YefM-YoeB e PasI-PasT, foram submetidos a análise para identificação da sua localização no genoma da cepa BA1250. Portanto, as sequências desses genes foram inseridas no BLAST na busca de similaridade com o genoma completo, com o plasmídeo montado pelo SCAPP e com os contigs classificados como cromossomais ou plasmidiais pelo PlasFlow (**Tabela 10**). Nesta análise, foi identificado a presença desses genes no genoma completo que era nosso controle da análise e nos contigs cromossomais classificados pelo PlasFlow. Os genes TA não foram encontrados na montagem do plasmídeo do SCAPP e também não foram encontrados nos contigs plasmidiais do PlasFlow. Dessa forma, de acordo com os métodos aqui aplicados, os genes *ccdA-ccdB*, *mazE-mazF*, *prIF-yhaV*, *yefM-yoeB* e *pasI-pasT* estão presentes no cromossomo da cepa BA1250.

Tabela 10 - Localização dos genes TA da cepa BA1250

Gene	Local do genoma	% Identidade	% Cobertura	Tamanho
DKEMMGOL_01301_Antitoxin_CcdA	NODE_4_length_299213chromosome.Proteobacteria	100	100	234
DKEMMGOL_01301_Antitoxin_CcdA	NODE_genoma_4_length_29921313.890316	100	100	234
DKEMMGOL_01302_Toxin_CcdB	NODE_4_length_299213chromosome.Proteobacteria	100	100	315
DKEMMGOL_01302_Toxin_CcdB	NODE_genoma_4_length_29921313.890316	100	100	315
DKEMMGOL_03466_Antitoxin_MazE	NODE_19_length_81781chromosome.Proteobacteria	100	100	249
DKEMMGOL_03466_Antitoxin_MazE	NODE_genoma_19_length_8178112.980002	100	100	249
DKEMMGOL_03465_Endoribonuclease_MazF	NODE_19_length_81781chromosome.Proteobacteria	100	100	336
DKEMMGOL_03465_Endoribonuclease_MazF	NODE_genoma_19_length_8178112.980002	100	100	336
DKEMMGOL_02083_Antitoxin_PrIF	NODE_7_length_217536chromosome.Proteobacteria	100	100	336
DKEMMGOL_02083_Antitoxin_PrIF	NODE_genoma_7_length_21753614.709897	100	100	336
DKEMMGOL_02082_Toxin_YhaV	NODE_7_length_217536chromosome.Proteobacteria	100	100	465
DKEMMGOL_02082_Toxin_YhaV	NODE_genoma_7_length_21753614.709897	100	100	465
DKEMMGOL_04029_Persistence_and_stress-resistance_antitoxin_PasI	NODE_29_length_54729chromosome.Proteobacteria	100	100	291
DKEMMGOL_04029_Persistence_and_stress-resistance_antitoxin_PasI	NODE_genoma_29_length_5472912.398136	100	100	291
DKEMMGOL_04030_Persistence_and_stress-resistance_toxin_PasT	NODE_29_length_54729chromosome.Proteobacteria	100	100	450
DKEMMGOL_04030_Persistence_and_stress-resistance_toxin_PasT	NODE_genoma_29_length_5472912.398136	100	100	450
DKEMMGOL_03940_Antitoxin_YefM	NODE_27_length_61737chromosome.Proteobacteria	100	100	252
DKEMMGOL_03940_Antitoxin_YefM	NODE_genoma_27_length_617379.594076	100	100	252
DKEMMGOL_03941_Toxin_YoeB	NODE_27_length_61737chromosome.Proteobacteria	100	100	255
DKEMMGOL_03941_Toxin_YoeB	NODE_genoma_27_length_617379.594076	100	100	255

Fonte: Próprio autor.

4.2. Análise qualitativa da transcrição dos sistemas TA

A partir dos dados obtidos na análise do genoma foram selecionados alguns sistemas TAs que foram preditos pela ferramenta TAFinder e na sequência montada pela ferramenta QCAST. Os sistemas TA selecionados para o desenho dos iniciadores foram CcdA-CcdB, MazE-MazF, PrfF-YhaV, YefM-YoeB e Psl- PasT que apresentavam somente uma cópia em seu genoma. Deste modo, para entendermos como é a expressão desses sistemas na bactéria em condições de estresse, iniciamos os ensaios em condições favoráveis para o cultivo bacteriano. No cultivo da cepa BA1250 na ausência de agentes estressantes (controle), observou-se a transcrição de todos os genes no PCR, como mostrado na **Figura 7**. Esses resultados sugerem que os genes dos sistemas TAs em condições sem estresse em fase logarítmica são expressos assim como descrito na literatura para formarem o complexo toxina-antitoxina.

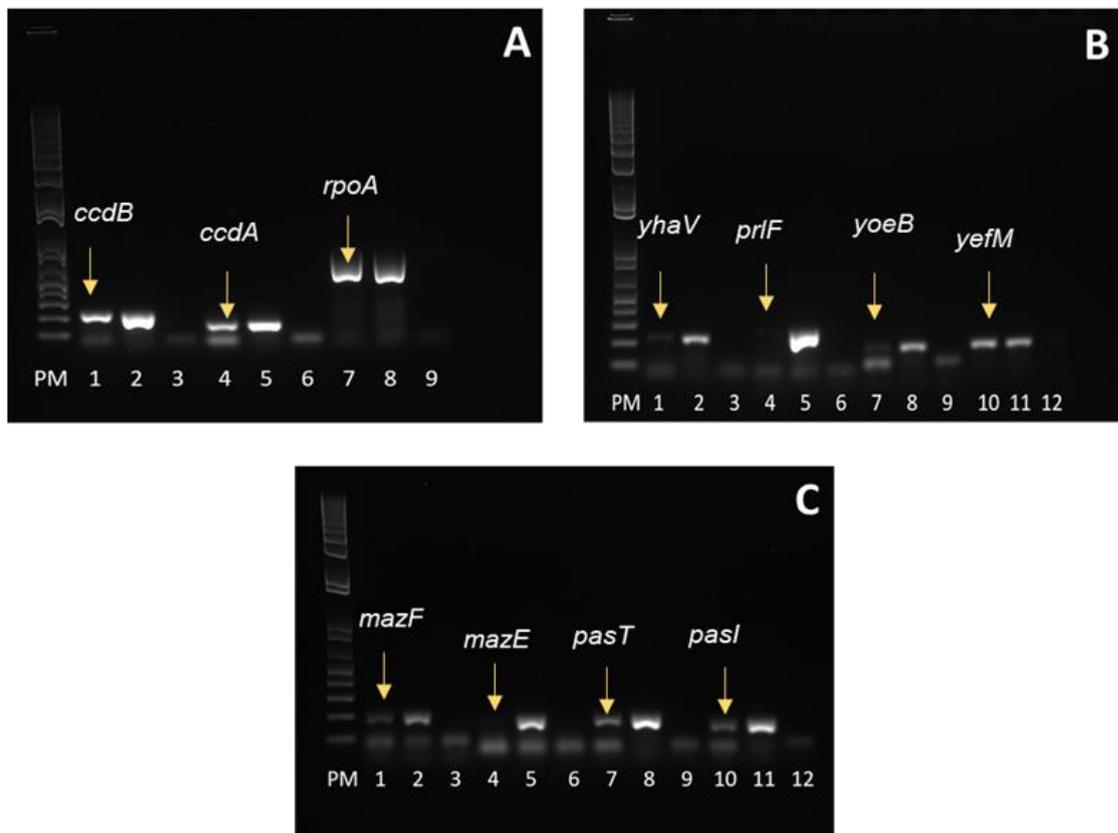


Figura 7 - RT-PCR do cDNA da cepa BA1250 na ausência de estresse bacteriano. A. RT-PCR do cDNA na ausência de estresse bacteriano para os genes *ccdB* e *ccdA*. PM) Padrão de peso molecular 1 Kb Plus; 1) cDNA – *ccdB*; 2) Controle positivo - *ccdB* (DNA); 3) Controle da reação – *ccdB*; 4) cDNA - *ccdA* ; 5) Controle positivo – *ccdA* (DNA) 6) Controle da reação - *ccdA*; 7) Controle do cDNA – *rpoA* ; 8) Controle positivo – *rpoA* (DNA); 9) Controle da reação – *rpoA*. B. RT-PCR do cDNA na ausência de estresse bacteriano para os genes *yhaV*, *prfF*, *yoeB* e *yefM*. PM) Padrão de peso molecular 1 Kb Plus; 1) cDNA – *yhaV*; 2) Controle positivo - *yhaV* (DNA); 3) Controle da reação – *yhaV*; 4) cDNA - *prfF* ; 5) Controle positivo – *prfF* (DNA) 6) Controle da reação- *prfF*; 7) cDNA – *yoeB* ; 8) Controle positivo – *yoeB* (DNA); 9) Controle da reação – *yoeB*; 10) cDNA – *yefM* ; 11) Controle positivo – *yefM* (DNA); 12) Controle da reação – *yefM*. C. RT-PCR do cDNA na ausência de estresse bacteriano para os genes *mazF*, *mazE*, *pasT* e *pasI*. PM) Padrão de peso molecular 1 Kb Plus; 1) cDNA – *mazF*; 2) Controle positivo - *mazF* (DNA); 3) Controle da reação – *mazF*; 4) cDNA - *mazE* ; 5) Controle positivo – *mazE* (DNA) 6) Controle da reação - *mazE*; 7) cDNA – *pasT* ; 8) Controle positivo – *pasT* (DNA); 9) Controle da reação – *pasT*; 10) cDNA – *pasI* ; 11) Controle positivo – *pasI* (DNA); 12) Controle da reação – *pasI*.

Fonte: Próprio autor.

A partir desses dados, as análises de transcrição em condição de estresse com escassez nutricional em fase logarítmica foram iniciadas e analisadas por RT-PCR, com o cultivo realizado em meio mínimo M9 modificado. Os resultados nos mostraram que os sistemas TA aqui analisados foram transcritos em um ambiente com escassez de nutrientes em cultivo até fase log, exceto o gene *yhaV* que apresentou uma amplificação mais fraca. Na **Figura 8** observa-se o produto de amplificação de todos os genes em destaque. Nesta análise de RT-PCR

observamos a transcrição de forma qualitativa, não há como afirmar se o módulo TA foi ativado, levando-nos às análises por RT-PCR quantitativo para melhor compreensão e avaliação quantitativa da expressão da toxina e da antitoxina e para confirmação da expressão gênica do gene *yhaV*.

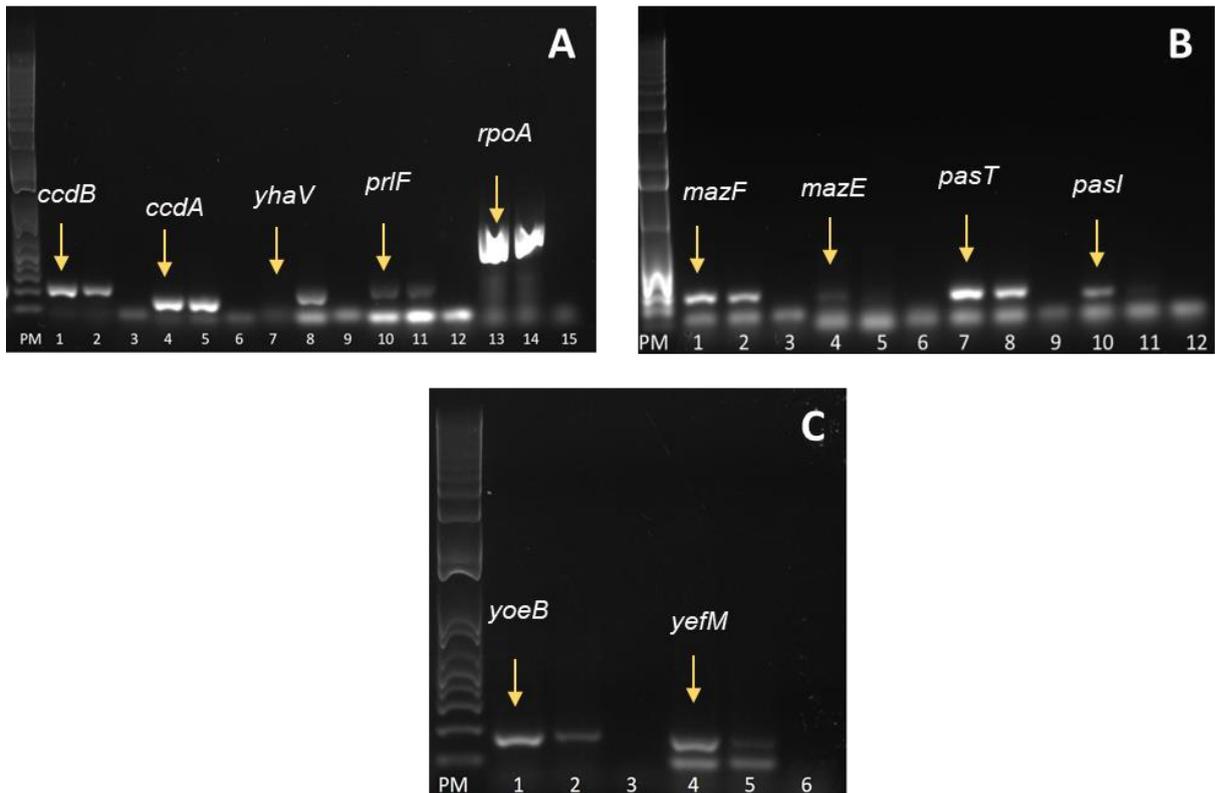


Figura 8 - RT-PCR do cDNA da cepa BA1250 em escassez nutricional. A. Análise da RT-PCR dos genes *ccdB*, *ccdA*, *yhaV* e *prfF* em escassez nutricional. PM) Padrão de peso molecular 1 Kb Plus; 1) cDNA – *ccdB*; 2) Controle positivo - *ccdB*; 3) Controle da reação – *ccdB*; 4) cDNA - *ccdA* ; 5) Controle positivo – *ccdA*; 6) Controle da reação - *ccdA*; 7) cDNA – *yhaV*; 8) Controle positivo - *yhaV*; 9) Controle da reação – *yhaV*; 10) cDNA - *prfF*; 11) Controle positivo – *prfF*; 12) Controle da reação – *prfF*; 13) Controle do cDNA – *rpoA*; 14) Controle positivo – *rpoA*; 15) Controle da reação – *rpoA*. B. Análise da RT-PCR dos genes *mazE*, *mazF*, *pasI* e *pasT* em escassez nutricional. PM) Padrão de peso molecular 1 Kb Plus; 1) cDNA – *mazF*; 2) Controle positivo - *mazF*; 3) Controle da reação – *mazF*; 4) cDNA - *mazE* ; 5) Controle positivo – *mazE*; 6) Controle da reação - *mazE*; 7) cDNA – *pasT*; 8) Controle positivo - *pasT*; 9) Controle da reação – *pasT*; 10) cDNA - *pasI*; 11) Controle positivo – *pasI*; 12) Controle da reação – *pasI*. C. Análise da RT-PCR dos genes *yefM* e *yoeB* em escassez nutricional. PM) Padrão de peso molecular 1 Kb Plus; 1) cDNA – *yefM*; 2) Controle positivo - *yefM*; 3) Controle da reação – *yefM*; 4) cDNA - *yoeB* ; 5) Controle positivo – *yoeB*; 6) Controle da reação – *yoeB*.

Fonte: Próprio autor.

4.3. Sobrevivência bacteriana dos cultivos em estresse

A contagem bacteriana por UFC de cada amostra foi realizada para controle

de nossas análises (**Figura 9**). A sobrevivência celular em fase logarítmica sob escassez nutricional e estresse oxidativo não foi afetada quando comparado ao cultivo controle em meio LB. Já no estresse ácido e osmótico a sobrevivência celular foi reduzida, no entanto somente no estresse osmótico houve uma redução significativa da população bacteriana (**Figura 9A**). A sobrevivência celular em fase estacionária mostrou que a diminuição da sobrevivência em estresse nutricional não foi significativa em comparação a condição sem estresse em meio LB, diferentemente do estresse oxidativo que a sobrevivência celular teve uma redução significativa, assim como no estresse ácido a redução teve significância estatística e por fim foi observado uma grande redução significativa no estresse osmótico em relação ao meio sem estresse (**Figura 9B**). Esses dados nos mostram que os estresses avaliados afetaram a sobrevivência celular bacteriana da cepa BA1250. E a avaliação da quantidade bacteriana coletada foi um controle para a extração de RNA e a análise por qPCR.

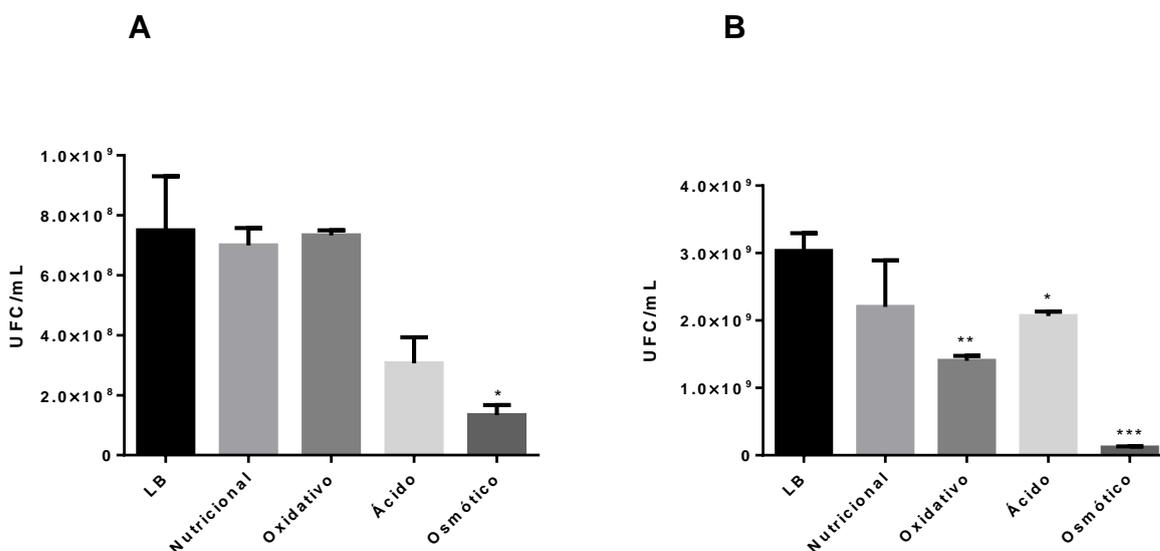


Figura 9 - Sobrevivência bacteriana sob diferentes cultivos em fase logarítmica e estacionária. Quantidade de UFC/mL da cepa BA1250 sob diferentes cultivos em fase logarítmica. B. Quantidade de UFC/mL da cepa BA1250 sob diferentes cultivos em fase estacionária. Análise estatística pelo teste T não paramétrico, valor de P < 0.05, em comparação ao meio LB. Fonte: Próprio autor.

4.4. Eficiência dos iniciadores para o qPCR

Para as análises do qPCR foi necessário a padronização da reação, teste de especificidade e de eficiência dos iniciadores oligonucleotídeos. Portanto, para

padronizarmos uma quantidade de DNA e iniciadores ideais para a reação foi realizado a amplificação de cDNA da cepa BA1250 em cultivo sem estresse em meio LB. Os valores de CTs de cada iniciador foram obtidos e os resultados mostraram que houve amplificação do cDNA na quantidade aplicada. A curva de dissociação de cada iniciador foi gerada no ensaio de eficiência (**Figuras 10 e 11**). O cálculo e a curva padrão da eficiência dos iniciadores foi feita de acordo com os valores de CTs obtidos deste ensaio (**Figuras 12 a 23**).

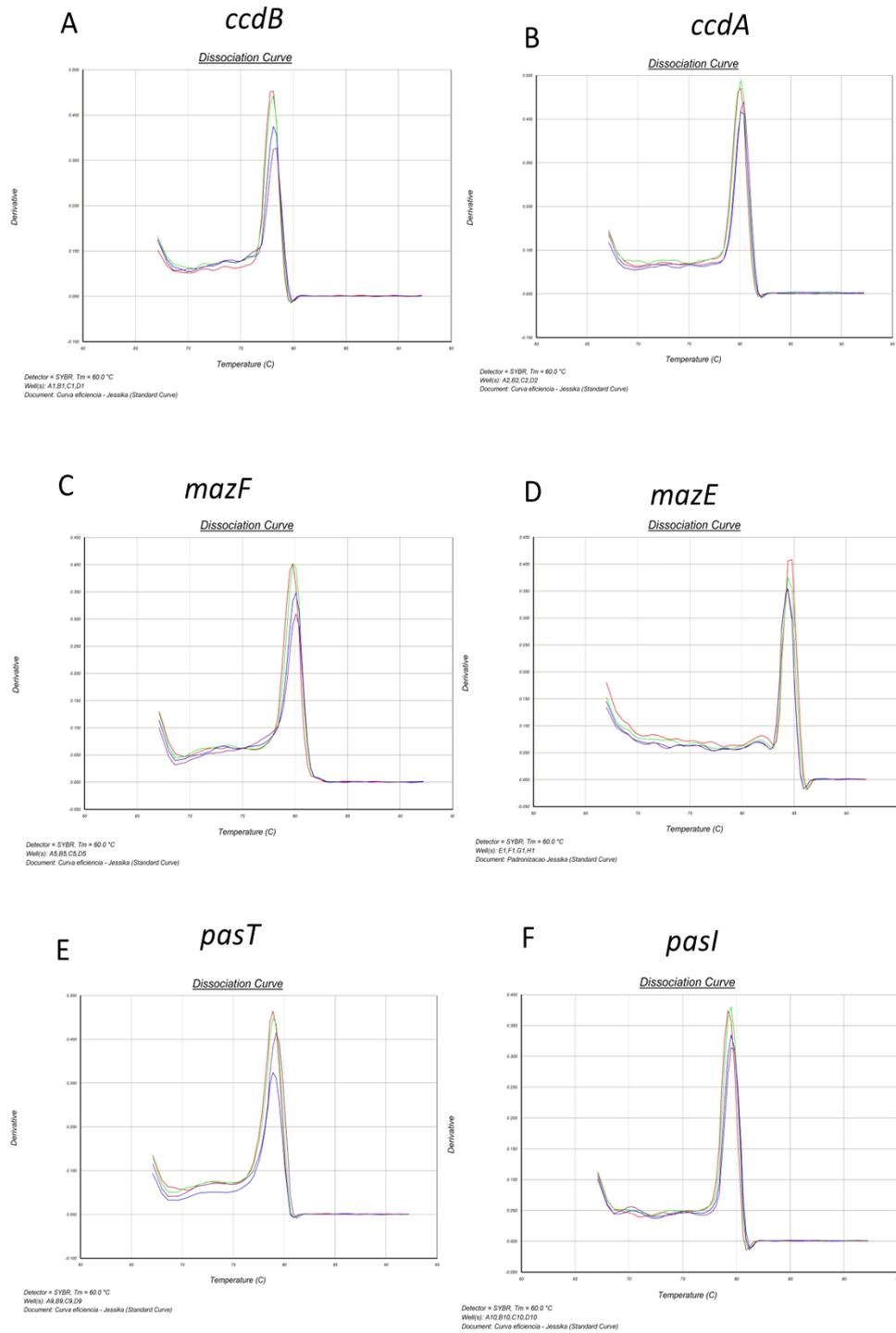


Figura 10 - Curva de dissociação do qPCR para o teste de eficiência dos iniciadores *ccdB*, *ccdA*, *mazF*, *mazE*, *pasT*, *pasI*. A. Curva de dissociação para o gene *ccdB*. B. Curva de dissociação para o gene *ccdA*. C. Curva de dissociação para o gene *mazF*. D. Curva de dissociação para o gene *mazE*. E. Curva de dissociação para o gene *pasT*. F. Curva de dissociação para o gene *pasI*. Fonte: Próprio autor.

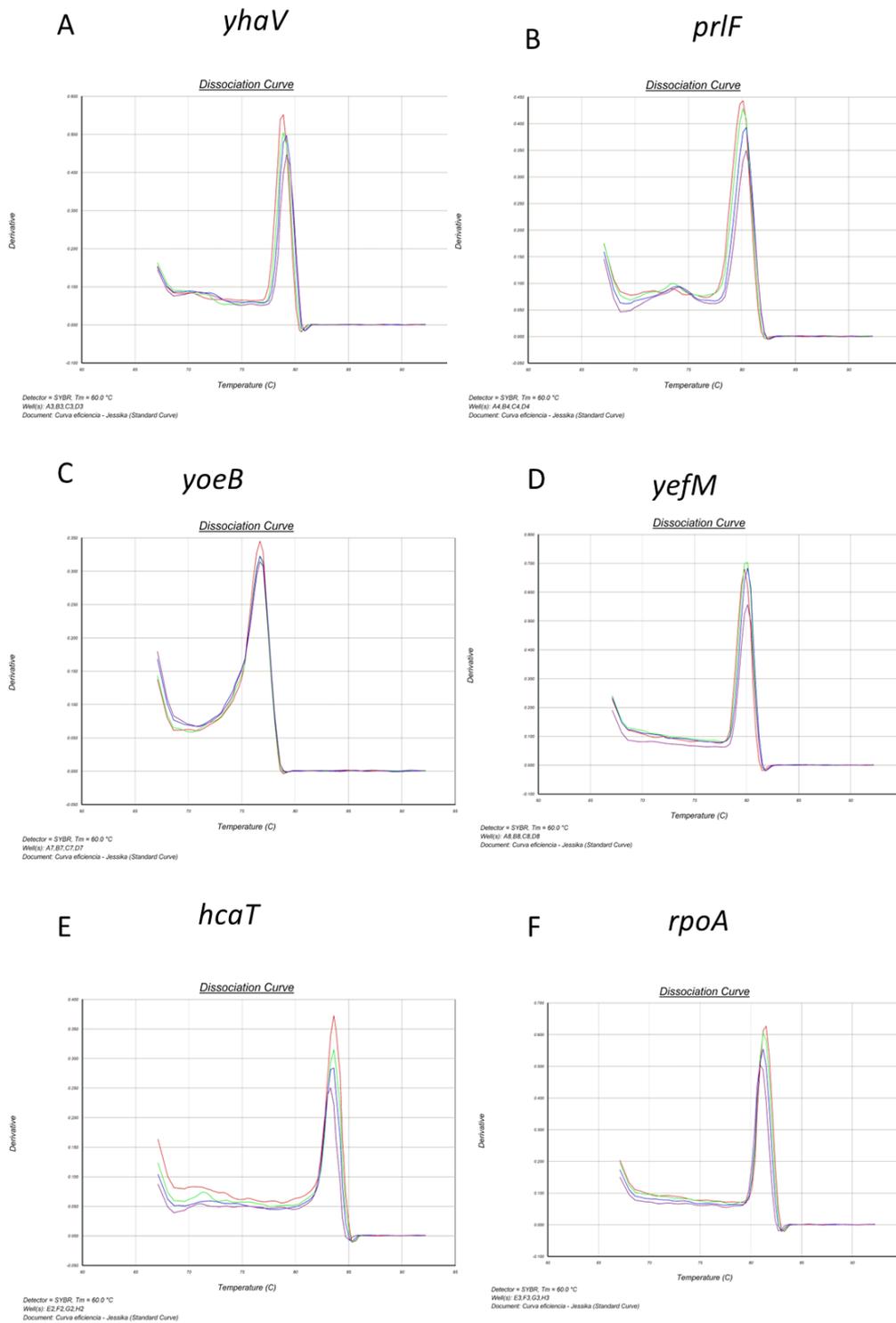


Figura 11 - Curva de dissociação do qPCR para o teste de eficiência dos iniciadores *yhaV*, *prfF*, *yoeB*, *yefM*, *hcaT* e *rpoA*. A. Curva de dissociação para o gene *yhaV*. B. Curva de dissociação para o gene *prfF*. C. Curva de dissociação para o gene *yoeB*. D. Curva de dissociação para o gene *yefM*. E. Curva de dissociação para o gene *hcaT*. F. Curva de dissociação para o gene *rpoA*. Fonte: Próprio autor.

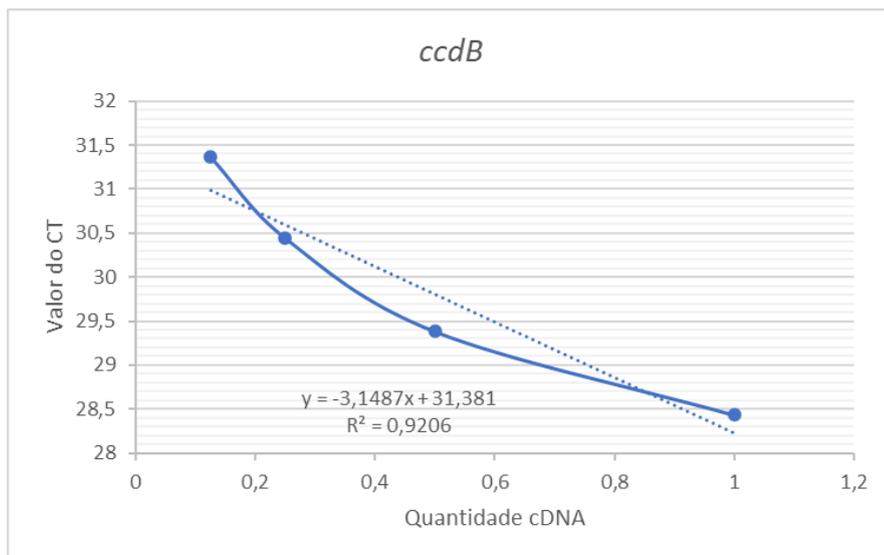


Figura 12 - Curva padrão do ensaio de eficiência de *ccdB*.

Fonte: Próprio autor.

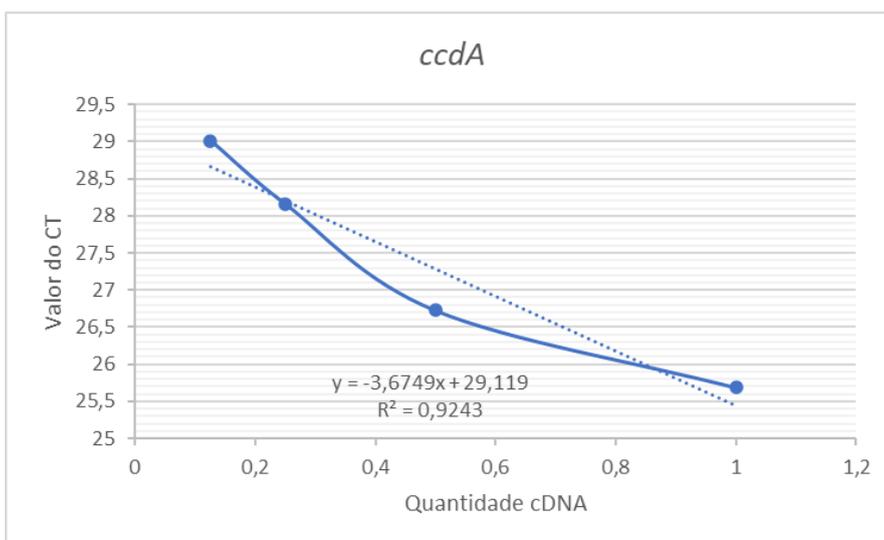


Figura 13 - Curva padrão do ensaio de eficiência de *ccdA*.

Fonte: Próprio autor.

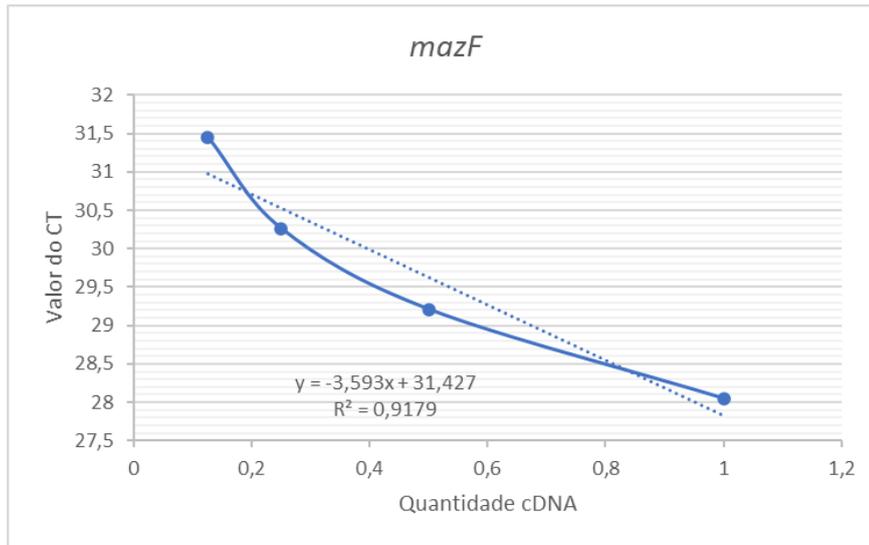


Figura 14 - Curva padrão do ensaio de eficiência de *mazF*.

Fonte: Próprio autor.

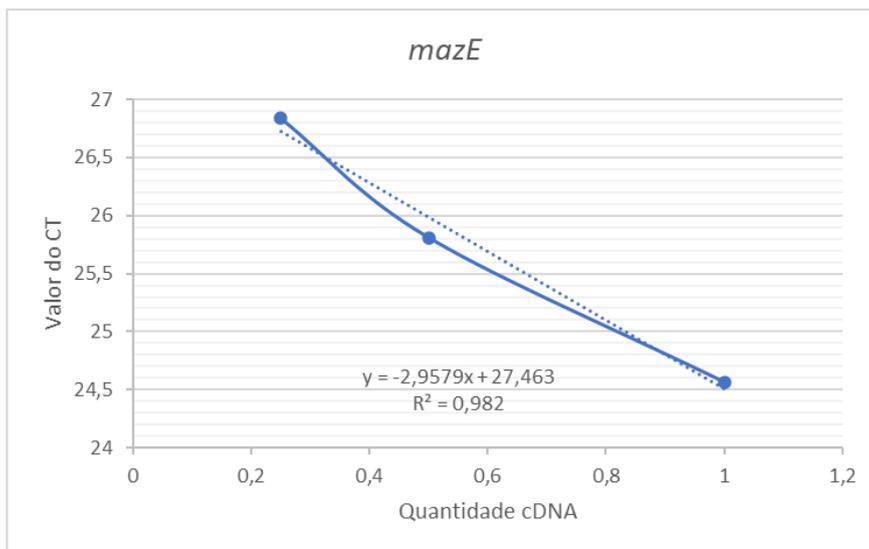


Figura 15 - Curva padrão do ensaio de eficiência de *mazE*.

Fonte: Próprio autor.

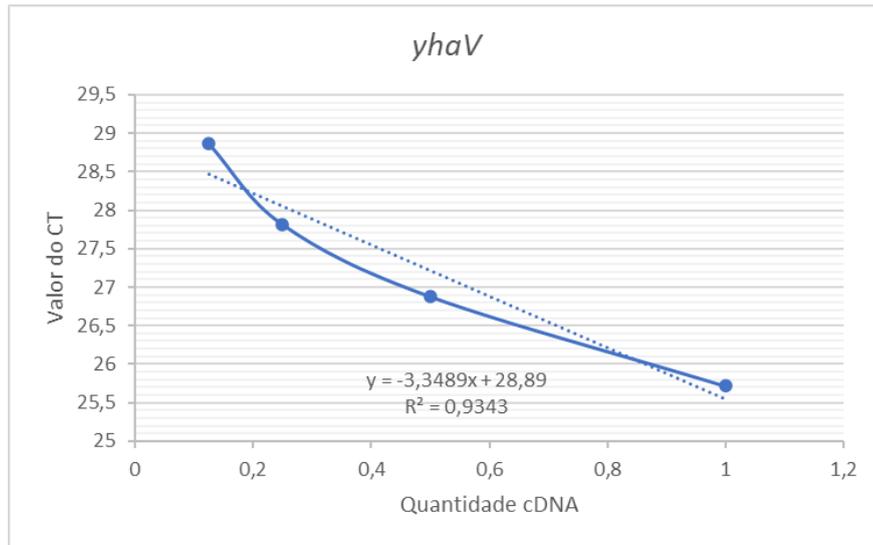


Figura 16 - Curva padrão do ensaio de eficiência de *yhaV*.

Fonte: Próprio autor.

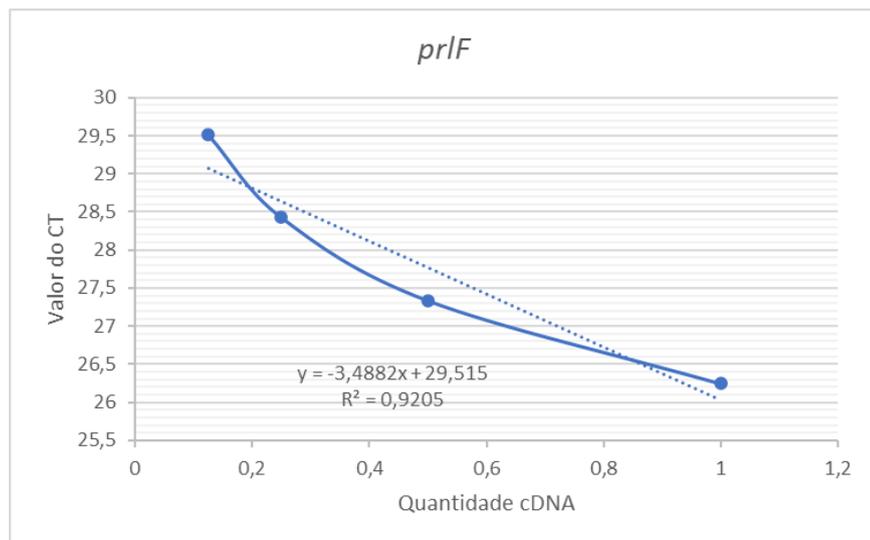


Figura 17. Curva padrão do ensaio de eficiência de *prfF*.

Fonte: Próprio autor.

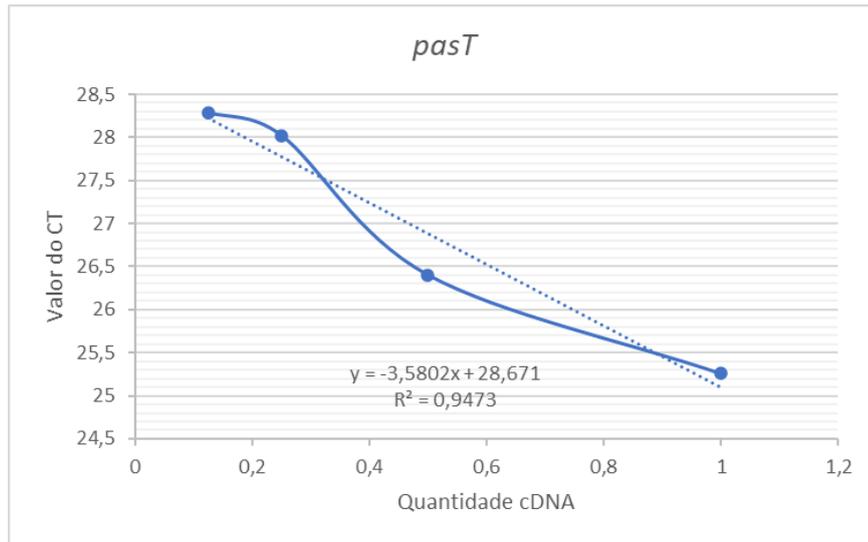


Figura 18 - Curva padrão do ensaio de eficiência de *pasT*.

Fonte: Próprio autor.

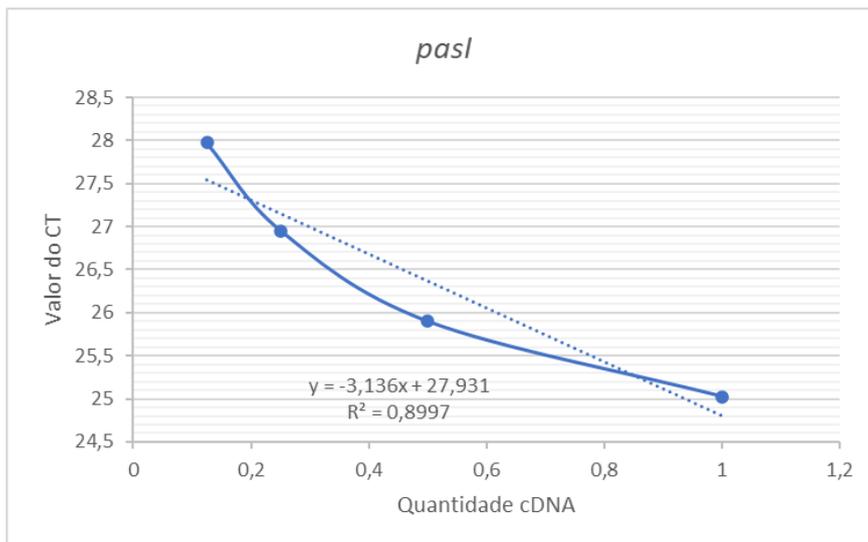


Figura 19 - Curva padrão do ensaio de eficiência de *pasI*.

Fonte: Próprio autor.

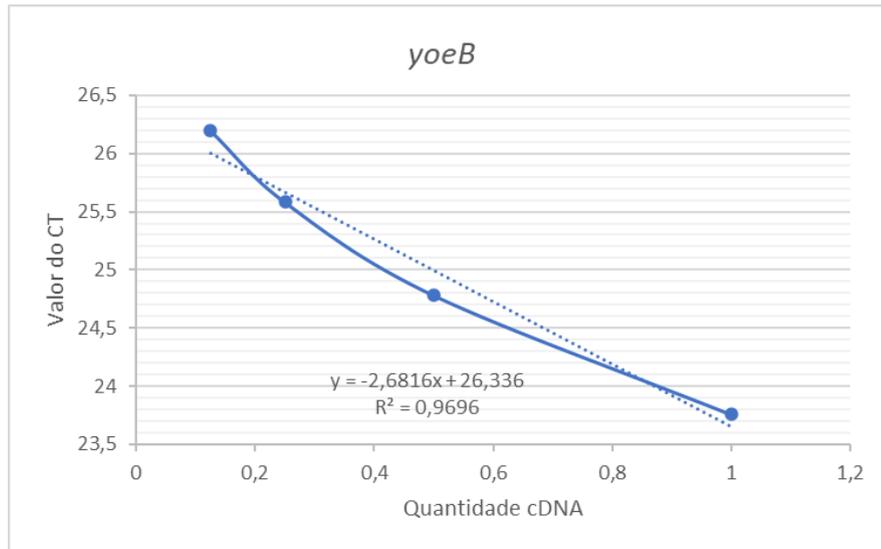


Figura 20 - Curva padrão do ensaio de eficiência de *yoeB*.

Fonte: Próprio autor.

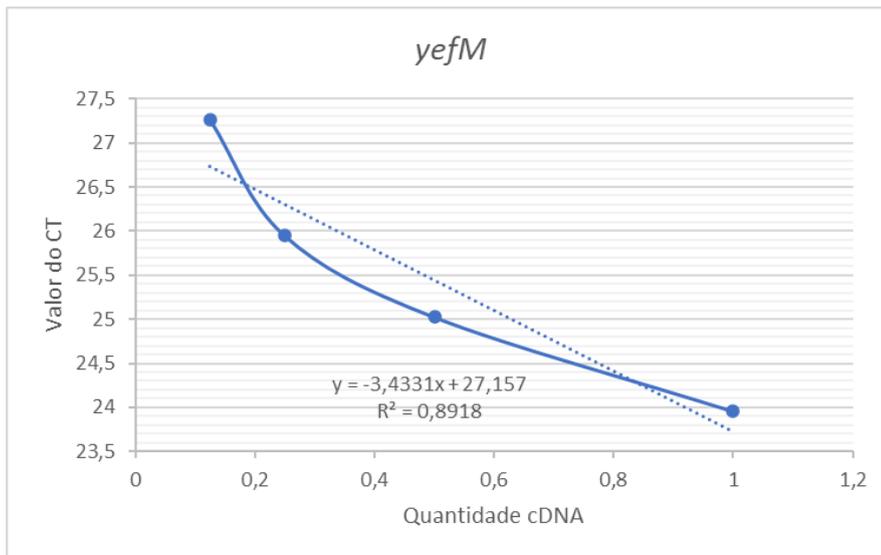


Figura 21 - Curva padrão do ensaio de eficiência de *yefM*.

Fonte: Próprio autor.

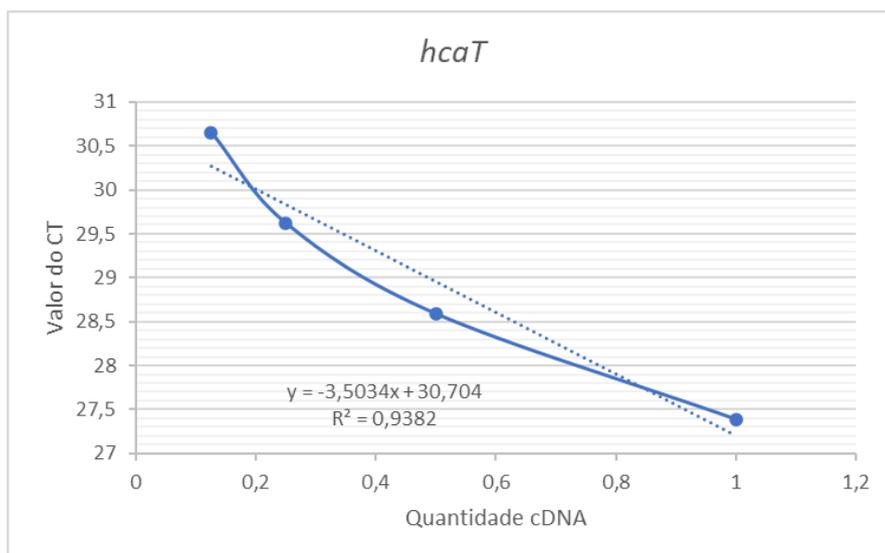


Figura 22 - Curva padrão do ensaio de eficiência de *hcaT*.

Fonte: Próprio autor.

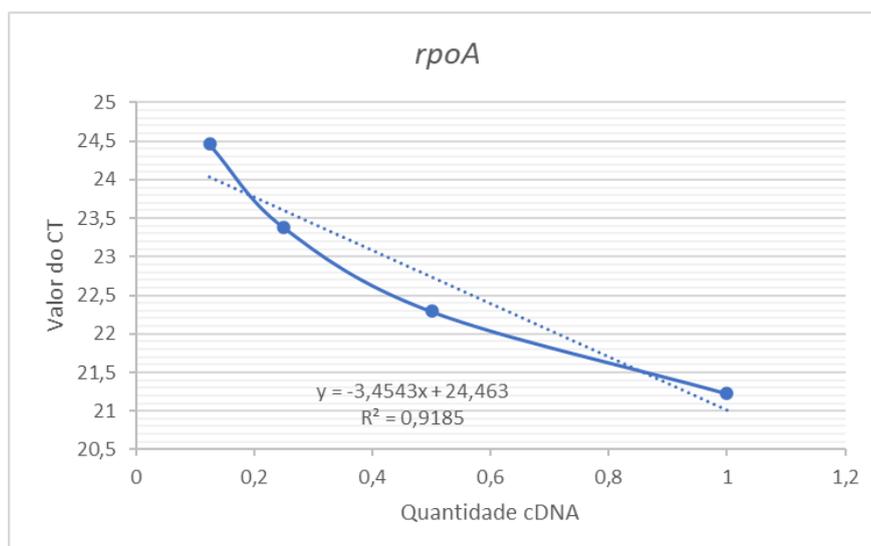


Figura 23 - Curva padrão do ensaio de eficiência de *rpoA*.

Fonte: Próprio autor.

De acordo com os resultados obtidos da curva padrão de cada gene analisado, os valores foram inseridos na ferramenta qPCR Efficiency Calculator ThermoFisher e os valores de eficiência foram gerados (**Tabela 11**). Os valores de eficiência dos iniciadores dos genes analisados, apresentaram valores próximos ou dentro do esperado, de acordo com os estudos de análises de qPCR, um iniciador deve ter uma eficiência próxima de 90% e 100% (THORTON *et al.*, 2011). Por tanto,

os iniciadores foram utilizados nos ensaios de qPCR.

Tabela 11 - Valores de eficiência dos iniciadores

Iniciadores	Eficiência
<i>ccdA</i>	85,70%
<i>ccdB</i>	108,13%
<i>mazE</i>	117,19%
<i>mazF</i>	88,04%
<i>pasI</i>	109,53%
<i>pasT</i>	92,25%
<i>prIF</i>	94%
<i>yhaV</i>	99,13%
<i>yefM</i>	94,97%
<i>yoeB</i>	136%
<i>hcaT</i>	95,67%
<i>rpoA</i>	96,51%

Fonte: Próprio autor.

4.5. Análise de transcrição pelo PCR quantitativo em tempo real

As análises de transcrição dos sistemas TA por qPCR na cepa BA1250 nas condições de estresse de escassez nutricional, estresse oxidativo, estresse osmótico e choque ácido foram realizadas.

4.5.1. Análise de transcrição do sistema CcdB-CcdA

Após a síntese de cDNA das amostras coletadas dos cultivos em estresse, o cDNA obtido foi submetido à reação de qPCR e os dados foram analisados. Os resultados mostram a relação da toxina CcdB com sua antitoxina CcdA, assim podemos avaliar a diferença da transcrição deste módulo em diversas situações de estresse (**Figuras 24A e B**). Quando observamos os estresses estudados em fase

logarítmica, não houve diferenças significativas de expressão comparando a expressão do gene da toxina com o gene da antitoxina. No entanto, é observado um aumento do gene da toxina *ccdB* de pelo menos duas vezes do *fold change* em relação ao gene da antitoxina *ccdA* no estresse osmótico. E no estresse nutricional, observa-se um aumento de pelo menos 2 vezes do *fold change* significativamente diferente em relação ao controle em meio LB. Já nos estresses oxidativo e ácido, não foi observado alterações de expressão significativas dos genes TA. Analisando a expressão do sistema em fase estacionária na **Figura 24B**, foi possível observar um aumento na expressão do gene da toxina de CcdB no estresse nutricional e uma regulação negativa do gene da antitoxina CcdA, resultando em uma diferença significativa de expressão entre os dois genes e uma diferença significativa da expressão de *ccdB* em relação ao controle LB. Nos estresses ácido, osmótico e oxidativo não houve diferença significativa da expressão entre os genes *ccdB* e *ccdA* em fase estacionária. No entanto, observamos um aumento significativo da expressão do gene da antitoxina *ccdA* sob estresse ácido em comparação com a expressão de *ccdA* em meio LB (**Figura 24B**). Esses dados sugerem que o sistema TA CcdB-CcdA pode estar envolvido na resposta ao estresse nutricional em fase estacionária.

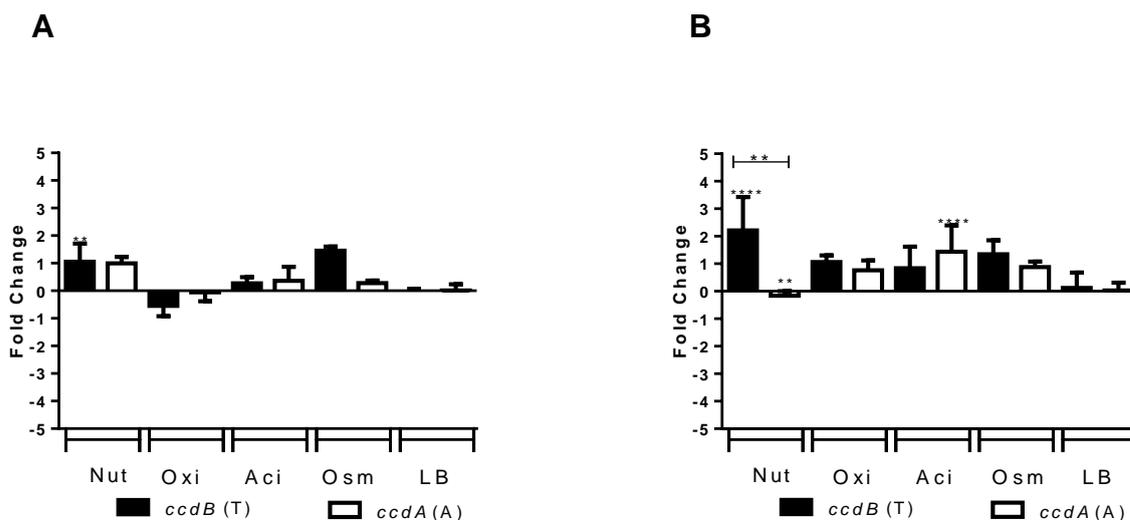


Figura 24 - Análise do qPCR dos transcritos dos genes *ccdB* e *ccdA* sob condições de estresse. A. Gráfico de log₂ do *fold change* > 1 ou < 1, expressão relativa dos genes *ccdB* e *ccdA* nas condições de estresse em fase logarítmica, escassez nutricional (Nut), estresse oxidativo (Oxi), choque ácido (Aci), estresse osmótico (Osm) e condição sem estresse em meio LB. B. Gráfico de log₂ do *fold change* > 1 ou < 1, expressão relativa dos genes *ccdB* e *ccdA* nas condições de estresse em fase estacionária, escassez nutricional (Nut), estresse oxidativo (Oxi), choque ácido (Aci), estresse osmótico (Osm) e condição sem estresse em meio LB. Análise estatística Teste F entre os genes TA, diferenças significativas valor P <0,05 *. Asterisco sobre a barra, diferença significativa entre o gene em condição em estresse e o gene em condição sem estresse (LB). Asterisco entre os dois genes dos sistemas TA, diferença significativa observada pelo teste F. Toxina (T) e antitoxina (A).

Fonte: Próprio autor.

4.5.2. Análise de transcrição do sistema MazF-MazE

O sistema MazF-MazE foi avaliado quanto a expressão gênica sob as situações de estresse descritas anteriormente. Em nossas análises não foram observadas diferenças significativas na expressão relativa entre a toxina MazF e antitoxina MazE em fase log (**Figura 25A**), observa-se uma regulação negativa da expressão do gene da toxina e do gene da antitoxina em todas as condições de estresse avaliadas. Ao avaliar a transcrição deste sistema em fase estacionária (**Figura 25B**), sob o cultivo bacteriano em escassez nutricional, os genes *mazF* e *mazE* foram regulados negativamente. Este resultado também foi observado em sob estresse ácido em fase estacionária. Nos estresses oxidativo e osmótico, a expressão foi baixa para ambos os genes TA e não houve alterações significativas. Este sistema apresentou uma expressão baixa e semelhante para ambas toxina e antitoxina, indicando que para as condições de estresse avaliadas o sistema MazF-MazE não foi ativado.

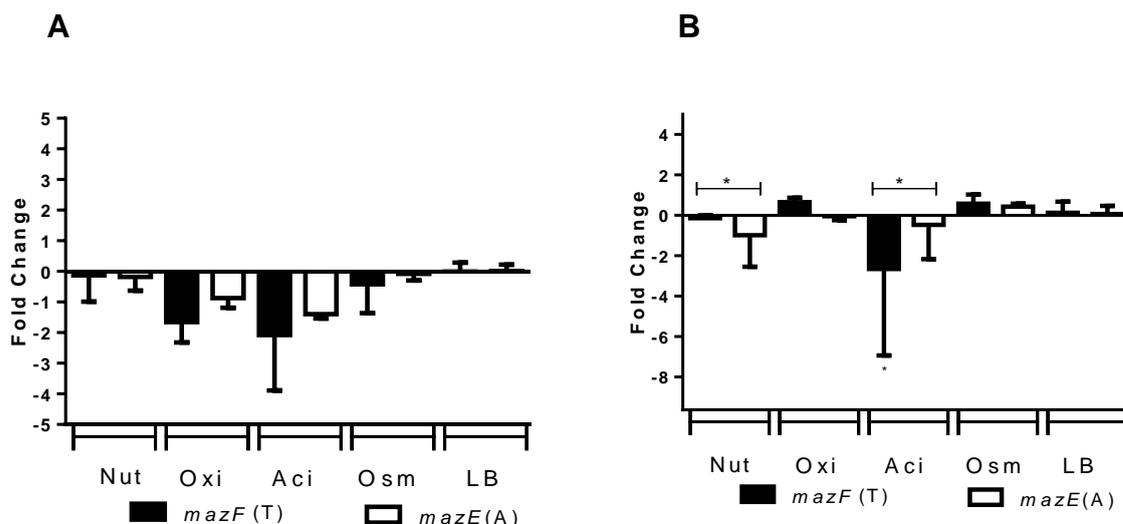


Figura 25 - Análise do qPCR dos transcritos *mazF* e *mazE* sob condições de estresse. A. Gráfico de \log_2 do *fold change* > 1 ou < 1, expressão relativa dos genes *mazF* e *mazE* nas condições de estresse em fase logarítmica, escassez nutricional (Nut), estresse oxidativo (Oxi), choque ácido (Aci), estresse osmótico (Osm) e condição sem estresse em meio LB. B. Gráfico de \log_2 do *fold change* > 1 ou < 1, expressão relativa dos genes *mazF* e *mazE* nas condições de estresse em fase estacionária, escassez nutricional (Nut), estresse oxidativo (Oxi), choque ácido (Aci), estresse osmótico (Osm) e condição sem estresse em meio LB. Análise estatística Teste F entre os genes TA, diferenças significativas valor $P < 0,05$ *. Asterisco sobre a barra, diferença significativa entre o gene em condição em estresse e o gene em condição sem estresse (LB). Asterisco entre os dois genes dos sistemas TA, diferença significativa observada pelo teste F. Toxina (T) e antitoxina (A).

Fonte: Próprio autor.

4.5.3. Análise de transcrição do sistema PasT-PasI

A expressão gênica do sistema PasT-PasI na cepa BA1250 também foi analisada por qPCR, na **Figura 26A** observa-se os transcritos em fase log. A expressão dos genes *pasT* e *pasI* não apresentaram diferenças significativas, ambos foram expressos em todas as condições de estresses em quantidades baixas. Porém, na fase estacionária (**Figura 26B**) no estresse nutricional há um aumento significativo da expressão dos genes *pasI* e *pasT*. Observa-se sob estresse ácido também na fase estacionária um aumento significativo da transcrição do gene da toxina em relação ao gene da antitoxina. E nos estresses oxidativo e osmótico a expressão gênica foi baixa e semelhante na fase estacionária. De acordo com esses dados, o sistema PasT-PasI é mais expresso sob o estresse nutricional na fase estacionária e no estresse ácido, mas somente na expressão sob choque ácido houve uma diferença significativa de expressão entre a toxina e antitoxina.

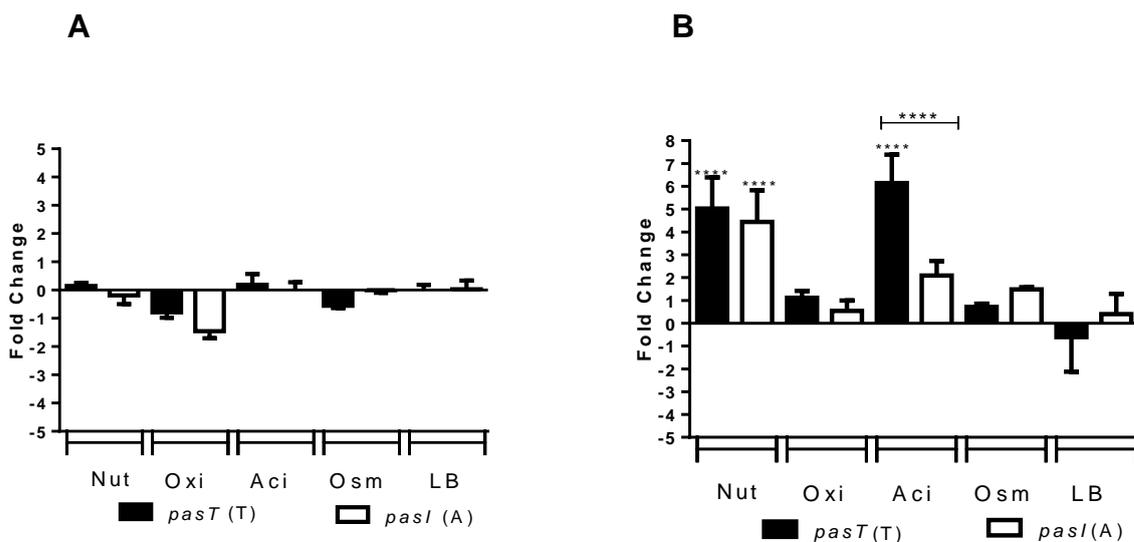


Figura 26 - Análise do qPCR dos transcritos *pasT* e *pasI* sob condições de estresse. A. Gráfico de log 2 do *fold change* > 1 ou < 1, expressão relativa dos genes *pasT* e *pasI* nas condições de estresse em fase logarítmica, escassez nutricional (Nut), estresse oxidativo (Oxi), choque ácido (Aci), estresse osmótico (Osm) e condição sem estresse em meio LB. B. Gráfico de log 2 do *fold change* > 1 ou < 1, expressão relativa dos genes *pasT* e *pasI* nas condições de estresse em fase estacionária, escassez nutricional (Nut), estresse oxidativo (Oxi), choque ácido (Aci), estresse osmótico (Osm) e condição sem estresse em meio LB. Análise estatística Teste F entre os genes TA, diferenças significativas valor P <0,05 *. Asterisco sobre a barra, diferença significativa entre o gene em condição em estresse e o gene em condição sem estresse (LB). Asterisco entre os dois genes dos sistemas TA, diferença significativa observada pelo teste F. Toxina (T) e antitoxina (A).

Fonte: Próprio autor.

4.5.4. Análise de transcrição do sistema YhaV-PrIF

A expressão do sistema YhaV-PrIF na BA1250 foi observado na fase logarítmica e na fase estacionária. Na **Figura 27A** é possível observar que não houve diferença significativa da transcrição do gene da toxina *yhaV* com o gene da antitoxina *prIF* em fase log, ambos continuam sendo expressos em quantidades semelhantes nas condições de estresse avaliados. Em contraste, na análise da transcrição deste sistema em fase estacionária (**Figura 27B**), houve um aumento da expressão do gene *yhaV* em escassez nutricional, uma diferença significativa em relação a expressão do gene *prIF*, um indicativo que o sistema é ativado em situações de escassez de nutrientes. No estresse oxidativo não observou-se diferença significativa da expressão deste sistema, a expressão foi baixa e semelhante para ambos os genes TA, indicando que nestas condições o sistema pode não ser ativado em fase estacionária. No estresse ácido, um aumento de expressão do gene da toxina e uma diferença significativa em relação a expressão

do gene da antitoxina foi notada. Sob o estresse osmótico em fase estacionária a expressão dos genes da toxina e antitoxina foi baixa e semelhante. Esses dados sugerem que o gene *yhaV* é mais expresso nos estresses nutricional e ácido.

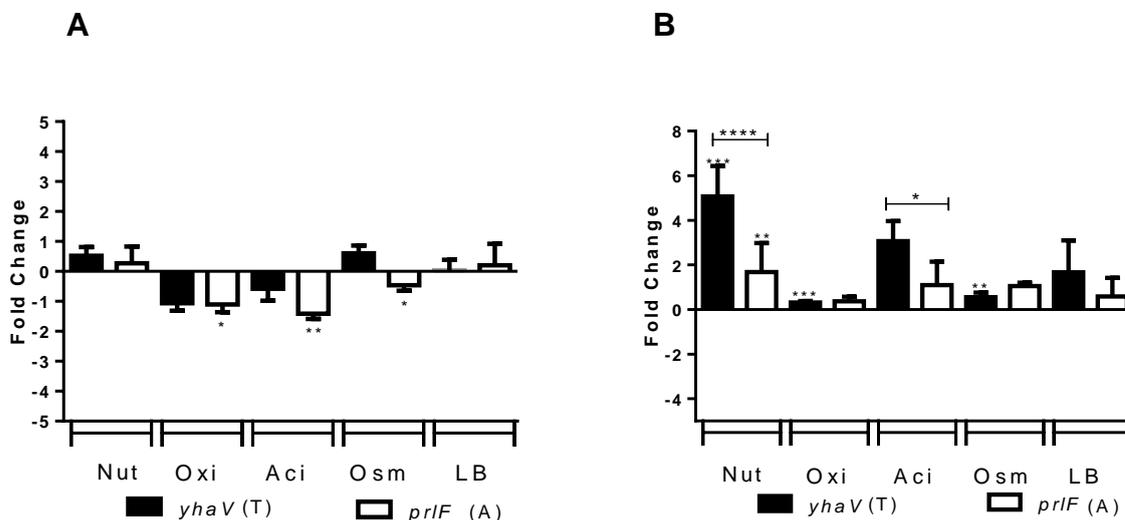


Figura 27 - Análise do qPCR dos transcritos dos genes *yhaV* e *prfF* sob condições de estresse. A. Gráfico de log₂ do *fold change* > 1 ou < 1, expressão relativa dos genes *yhaV* e *prfF* nas condições de estresse em fase logarítmica, escassez nutricional (Nut), estresse oxidativo (Oxi), choque ácido (Aci), estresse osmótico (Osm) e condição sem estresse em meio LB. B. Gráfico de log₂ do *fold change* > 1 ou < 1, expressão relativa dos genes *yhaV* e *prfF* nas condições de estresse em fase estacionária, escassez nutricional (Nut), estresse oxidativo (Oxi), choque ácido (Aci), estresse osmótico (Osm) e condição sem estresse em meio LB. Análise estatística Teste F entre os genes TA, diferenças significativas valor P < 0,05 *. Asterisco sobre a barra, diferença significativa entre o gene em condição em estresse e o gene em condição sem estresse (LB). Asterisco entre os dois genes dos sistemas TA, diferença significativa observada pelo teste F. Toxina (T) e antitoxina (A).
Fonte: Próprio autor.

4.5.5. Análise de transcrição do sistema YoeB-YefM

A transcrição do sistema YoeB-YefM na cepa BA1250 sob condições estressantes também foi analisada. Na **Figura 28A** observa-se uma regulação positiva na expressão dos genes *yoeB* e *yefM* em fase log, nesta análise, o cultivo sob escassez de nutrientes apresentou um aumento significativo de expressão do gene da toxina. Porém, podemos ver que neste caso é provável que o sistema não tenha sido ativado, pois a antitoxina também foi expressa em proporções semelhantes que a toxina. Nos estresses oxidativo, ácido e osmótico, observamos uma regulação negativa de ambos os genes, nenhuma diferença significativa entre os genes TA, indicando que o sistema também não foi ativado.

Já na **Figura 28B** é possível observar uma diferença significativa entre a

expressão gênica da toxina e antitoxina no estresse nutricional em fase estacionária. O gene *yoeB* é mais expresso do que o gene da sua antitoxina e apresentou um aumento significativo em relação ao controle LB, neste caso é provável que ocorreu a ativação deste sistema sob escassez de nutrientes. No estresse ácido também observa-se uma diferença significativa entre a expressão da toxina e da antitoxina, resultando em maior expressão gênica da toxina. Nos estresses oxidativo e osmótico, não observou-se diferenças significativas de expressão, bem como uma regulação negativa de ambos os genes. Neste sistema temos então um indicativo que são ativados pelo estresse nutricional e pelo estresse ácido.

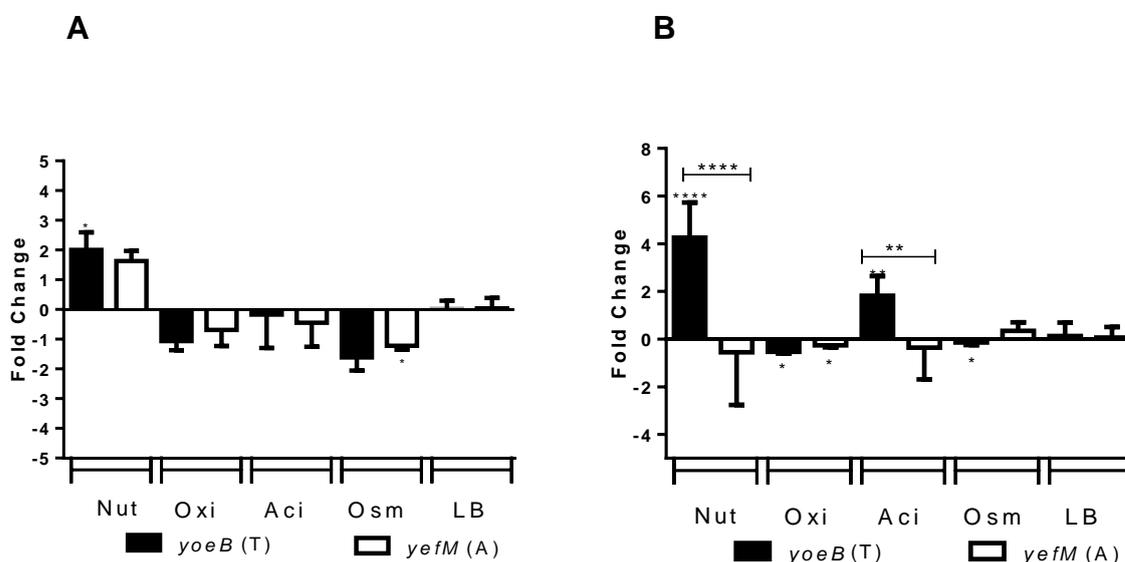


Figura 28 - Análise do qPCR dos transcritos *yoeB* e *yefM* sob condições de estresse. A. Gráfico de log 2 do *fold change* > 1 ou < 1, expressão relativa dos genes *yoeB* e *yefM* nas condições de estresse em fase logarítmica, escassez nutricional (Nut), estresse oxidativo (Oxi), choque ácido (Aci), estresse osmótico (Osm) e condição sem estresse em meio LB. B. Gráfico de log 2 do *fold change* > 1 ou < 1, expressão relativa dos genes *yoeB* e *yefM* nas condições de estresse em fase estacionária, escassez nutricional (Nut), estresse oxidativo (Oxi), choque ácido (Aci), estresse osmótico (Osm) e condição sem estresse em meio LB. Análise estatística Teste F entre os genes TA, diferenças significativas valor P <0,05 *. Asterisco sobre a barra, diferença significativa entre o gene em condição em estresse e o gene em condição sem estresse (LB). Asterisco entre os dois genes dos sistemas TA, diferença significativa observada pelo teste F. Toxina (T) e antitoxina (A).

Fonte: Próprio autor.

5. DISCUSSÃO

Os sistemas TA são evolutivamente bem-sucedidos, amplamente distribuídos em cromossomos bacterianos, plasmídeos e arqueias. Atualmente oito tipos de sistemas TA foram descritos e atuam de diferentes maneiras na célula bacteriana (SRIVASTAVA *et al.*, 2021). Inicialmente os sistemas TA encontrados em plasmídeos foram relacionados a manutenção estável plasmidial e morte celular pós-segregacional (OGURA & HIRAGA, 1983; JAFFÉ, OGURA & HIRAGA, 1985). Quanto a sua função no cromossomo bacteriano ainda há um extenso debate na literatura sobre esse tema; alguns sistemas vêm sendo descritos como participantes da patogênese de algumas bactérias, mas esses mesmos sistemas parecem não ter qualquer função, seja na patogênese ou na fisiologia de outras bactérias (VAN MELDEREN & SAAVEDRA DE BAST, 2009; GHAFOURIAN, *et al.*, 2014).

Para avançarmos na busca de uma resposta para o papel dos sistemas TA no cromossomo bacteriano de uma cepa patogênica, precisamos entender como esses sistemas se comportam em diferentes situações que uma bactéria pode enfrentar durante a infecção ao hospedeiro. Por tanto, neste estudo analisamos a expressão gênica de alguns sistemas TA tipo II em uma cepa híbrida (aEPEC/ExPEC), a BA1250, em diferentes condições de estresse.

Quando se trata dos sistemas TA em genomas bacterianos, podemos observar que estão distribuídos em diferentes isolados, tanto patogênicos quanto não patogênicos (PANDEY & GERDES, 2005), algumas vezes sendo relatados mais de um sistema no genoma, somente em *E. coli* K-12 foram encontrados 36 genes de sistemas TA dos tipos I, II, III e IV (YAMAGUCHI & INOUE, 2011). E esses sistemas vem sendo cada vez mais descritos em cepas que causam patogenicidade, Sala, Bordes e Genevoux (2014) descreveram mais de 70 tipos de sistemas TA em *Mycobacterium tuberculosis*. Em outro estudo com 174 isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*, os genes TA *relBE* e *higAB* foram encontrados em 100% dos isolados (SAVARI *et al.*, 2016). Em *E. coli*, um estudo avaliou 150 isolados clínicos e observou que 80%, 85%, 70%, 91% e 82% dos isolados possuíam os genes TA *mazEF*, *relBE*, *hipBA*, *ccdAB* e *mqsRA* respectivamente (KARIMI *et al.*, 2015). Esses achados apontam que os sistemas TA podem ser encontrados em muitos isolados clínicos, e para sabermos se a cepa híbrida BA1250 aqui estudada apresentava algum sistema TA, análises do genoma

foram aplicadas. Nessas análises identificamos 21 *locus* dos sistemas TA do tipo II, destes sistemas, cinco foram identificados com localização cromossomal, são eles: CcdB-CcdA, MazF-MazE, PasT-PasI, YhaV-PrIF e YoeB-YefM. Diante desses resultados e os relatos descritos na literatura, nos levou ao seguinte questionamento: por quê um isolado patogênico manteria em seu genoma tantos genes TA? Existiria alguma vantagem durante o processo infeccioso? Para entendermos a relação desses sistemas TA com o processo de infecção, análises de expressão gênica em diferentes situações de estresse foram empregados.

Os sistemas TA estão descritos como envolvidos a respostas ao estresse, como: estresse na presença antibiótico (persistência), escassez de nutrientes, estresse oxidativo, estresse ácido e outros, que são estresses que podem ser comuns para bactérias patogênicas ao enfrentarem o organismo do hospedeiro. Sabemos que uma bactéria como a cepa híbrida BA1250 que coloniza o trato gastrointestinal e utiliza seu arsenal para tornar-se sistêmica, pode enfrentar algumas situações de estresse no percurso de colonização e disseminação. Somente no trato gastrointestinal ela enfrenta várias adversidades, como, alterações do conteúdo dos nutrientes, tensão de oxigênio e pH baixo do estômago e alcalino no intestino (GACA *et al.*, 2019). Em outros nichos do hospedeiro que esta cepa pode colonizar também alguns ambientes hostis, no trato urinário observamos alta osmolaridade, radicais de oxigênio, alterações da disponibilidade de oxigênio e nutrientes (SUBASHCHANDRABOSE & MOBLEY, 2015; BOWER *et al.*, 2009). Pensando nessas circunstâncias, os estresses foram selecionados de acordo com as adversidades que uma bactéria patogênica enfrentaria no organismo do ser humano. Dessa forma, os cultivos em estresses de escassez nutricional, estresse oxidativo, estresse osmótico e choque ácido foram aplicados à cepa BA1250, para análise da expressão gênica dos sistemas TA tipo II, CcdB-CcdA, MazF-MazE, PasT-PasI, YhaV-PrIF e YoeB-YefM.

A relação do estresse nutricional com os sistemas TA já foram relatados anteriormente, Christensen-Dalsgaard e colaboradores (2010) avaliaram a expressão de três *locus* TA de *E. coli* K-12 que têm como alvo celular a mRNA interferase, a expressão foi avaliada em até 60 min de tratamento e os três sistemas foram ativados em forte escassez nutricional, mas quando avaliados o estresse com leve escassez nutricional apenas dois sistemas foram ativados. Nossos resultados

corroboram com este estudo, em nossas análises os sistemas CcdB-CcdA, MazF-MazE, PasT-PasI, YhaV-PrIF e YoeB-YefM também responderam de formas diferentes, observamos um aumento de expressão gênica relativa na fase estacionária para os sistemas CcdB-CcdA, PasT-PasI, YhaV-PrIF e YoeB-YefM, já para o sistema MazF-MazE não foi observada qualquer alteração da expressão gênica tanto em fase log quanto em fase estacionária. Esse aumento de expressão na fase estacionária sob estresse nutricional também foi observado por Bergholz *et al.* (2007), onde foi demonstrado uma superexpressão do sistema CcdB-CcdA em uma análise de transcrição global em *E. coli*.

A expressão dos sistemas TA sob estresse oxidativo também foi avaliada, no entanto não observamos um aumento da expressão gênica dos sistemas CcdB-CcdA, MazF-MazE, PasT-PasI, YhaV-PrIF e YoeB-YefM. Este dado foi bastante surpreendente, pois em um estudo realizado por Hazan *et al.* (2004) foi relatado que MazF-MazE mediou a morte celular em um cultivo em fase logarítmica sob estresse oxidativo, esperávamos um resultado com uma expressão elevada diante dessa informação, no entanto, tivemos uma expressão baixa da toxina e da antitoxina em nossa cepa estudada. Mas ainda não há conclusões exatas a respeito dos módulos TA, é possível que haja diferenças na expressão dos sistemas TA em diferentes bactérias. No entanto, nossos resultados foram semelhantes ao estudo de Narimisa e colaboradores (2020), esses autores demonstraram que a expressão gênica dos sistemas TA tipo II RelBE, MazEF, VapBC, HipAB e Phd/Doc de uma cepa de *Klebsiella pneumoniae* foi reduzida sob o estresse oxidativo. Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram os relatos da literatura demonstrando que nem todos os sistemas TA podem responder ao estresse oxidativo.

Os sistemas TA aqui avaliados parecem estar relacionados a resposta ao choque ácido em meio M9 pH4, pois, observamos um aumento da expressão gênica dos genes das toxinas *yoeB*, *pasT* e *yhaV* durante a fase estacionária do cultivo. Esses três sistemas que foram induzidos sob o estresse ácido, atuam na tradução celular e síntese de proteínas, a toxina PasT tem como alvo a subunidade ribossômica 50S e as toxinas YoeB e YhaV tem o mRNA como alvo celular, ou seja, a ativação desses sistemas pode influenciar na diminuição da síntese de proteínas na célula durante o estresse ácido (SCHIMIDT *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2011; CHRISTENSEN *et al.*, 2004). Um dado semelhante foi observado por Krugel *et al.*

(2015), ao analisar a expressão gênica do sistema TA YoeB-YefM em três cepas de *Lactobacillus rhamnosus* em condições de estresse ácido, a expressão do sistema foi induzida em uma das cepas sob estresse e a transcrição durante a fase estacionária foi elevada.

No estresse osmótico observou-se um resultado diferente dos outros tipos de estresses aqui analisados, pois, esse foi o único estresse que não apresentou diferenças significativas de expressão entre os sistemas TA. No entanto, observou-se aumento de 2 vezes do fold change na expressão gênica do gene da toxina *ccdB* em fase logarítmica e fase estacionária, porém esse aumento não apresentou significância estatística. Os outros sistemas TA não apresentaram alterações na expressão gênica. Um dado semelhante foi observado por Krugel *et al.* (2015) em sua análise da expressão gênica do sistema TA YoeB-YefM em três cepas de *Lactobacillus rhamnosus* sob o cultivo com adição de NaCl, a toxina YoeB também não apresentou um aumento de transcrição.

A autorregulação transcricional dos sistemas TA utiliza um mecanismo de cooperação condicional, ou seja, quando há um equilíbrio na célula de toxina e antitoxina, a toxina atua como um co-repressor dentro do complexo TA e o complexo TA reprime a transcrição fortemente. E quando há maiores quantidades de antitoxina, a antitoxina atua como um repressor de transcrição mais fraco. Já em condições desfavoráveis para a bactéria, ou seja, condições que proteases vão degradar a antitoxina, e a toxina esteja em maiores quantidades na célula, ocorre então a repressão negativa da transcrição do módulo TA (OVERGAARD *et al.*, 2008; GELENS *et al.*, 2013). Isso apoia a hipótese de que os sistemas TA aqui analisados estão relacionados com a resposta ao estresse, dado que houve um aumento de transcrição da toxina, indicando que o complexo TA pode ter sido ativado.

Ao analisar os alvos celulares desses sistemas já descritos na literatura (**Tabela 1**) isso nos leva a hipótese de que a ativação destes sistemas por estresse nutricional, ácido e osmótico poderia levar a diminuição da tradução celular diante da ativação das toxinas YhaV, YoeB e PasT, e a ativação de CcdB levaria a uma diminuição da replicação celular, para tentar reduzir os efeitos prejudiciais do ambiente desfavorável para a bactéria e assim diminuir o crescimento bacteriano.

Em um quadro de infecção, a cepa BA1250 enfrentaria alguns ambientes desfavoráveis como o estresse nutricional e ácido e após esses sistemas aqui

avaliados serem ativados, a tradução celular e a replicação celular poderiam ser reduzidas. Nossos achados indicam que os sistemas TA podem estar envolvidos na fisiologia bacteriana da cepa híbrida BA1250, auxiliando na resposta ao estresse de alguns ambientes desfavoráveis.

Essa relação dos sistemas TA com cepas patogênicas já foi descrita em alguns estudos, Ramage *et al.* (2009) descreveu que sistemas TA foram induzidos sob estresse em *M. tuberculosis*, esses autores observaram que, durante a transição do ambiente para hipóxia, os sistemas TA eram ativados, auxiliando a adaptação da bactéria para baixas condições de oxigênio. Em outro estudo, Norton & Mulvey (2012), observaram que os sistemas TA apresentaram grande relação com a patogenicidade de uma cepa de *E. coli* uropatogênica, esses sistemas tiveram grande importância na colonização do nicho e da resposta ao estresse, foi descrito que durante o processo infeccioso do trato urinário em um modelo de camundongo, o sistema PasT-PasI promoveu a colonização e persistência da bactéria nos rins, já os sistemas TA YefM-YoeB e YbaJ-Hha promoveram um aumento da colonização na bexiga. Esses dados corroboram com nossos achados, ainda que em nossas análises a sobrevivência e colonização em hospedeiro não foram avaliadas, esse aumento da expressão gênica das toxinas e repressão da antitoxina em diferentes estresses que a bactéria pode sofrer durante o processo infeccioso, ilustram o papel desses sistemas na fisiologia e a possibilidade de haver um papel na patogênese bacteriana da cepa híbrida BA1250. Nossos achados também mostram que nem todos os sistemas TA presentes no cromossomo podem desempenhar a mesma função na célula, já que responderam de diferentes formas para os estresses estudados. No entanto, ainda são necessários mais estudos para compreender se os sistemas TA desempenham alguma função na patogênese da cepa BA1250, estudos que envolvam a colonização, persistência e sobrevivência celular nos diferentes nichos que a bactéria pode colonizar são importantes para compreender este processo. E dessa forma elucidar o papel dos sistemas TA no cromossomo bacteriano de uma cepa patogênica.

6. CONCLUSÃO

No presente trabalho mostramos como as condições em estresse nutricional e ácido modularam a expressão gênica dos sistemas TA YoeB-YefM, PasT-PasI, CcdB-CcdA e YhaV-PrIF. Dessa forma, esses sistemas parecem estar envolvidos na resposta ao estresse da cepa híbrida BA1250, pois os estresses nutricional e ácido em fase estacionária do cultivo bacteriano induziram o aumento da expressão dos genes das toxinas *yoeB*, *pasT*, *ccdB* e *yhaV*.

REFERÊNCIAS

AAKRE, C.D.; PHUNG, T.N; HUANG, D.; LAUB, M.T. A bacterial toxin inhibits DNA replication elongation through a direct interaction with the β sliding clamp. **Mol Cell**. v. 52, n. 5, p. 617-28, 2013.

ABE, C. M. TRABULSI, L.R.; BLANCO, J.; BLANCO, M.; DAHBI, G.; BLANCO, J.E.; MORA, A.; FRANZOLIN, M.R.; TADDEI, C.R.; MARTINEZ, M.B.; PIAZZA, R.M.; ELIAS, W.P. Virulence features of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* identified by the eae+ EAF-negative stx-genetic profile. **Diag. Microbiol. Infect. Dis**. v.64, n. 4, p. 357-365, 2009.

AFIF, H.; ALLALI, N.; COUTURIER, M.; VAN MELDEREN, L. The ratio between CcdA and CcdB modulates the transcriptional repression of the ccd poison-antidote system. **Mol Microbiol**. v. 41, n. 1, p. 73-82, 2001.

AMITAI, S.; YASSIN, Y.; ENGELBERG-KULKA, H. MazF-mediated cell death in *Escherichia coli*: a point of no return. **J Bacteriol**. v.186, n.24, 8295-8300, 2004.

BERGHOLZ, T.M.; WICK, L.M.; QI, W.; RIORDAN, J.T.; OUELLETTE, L.M.; WHITTAM, T.S. Global transcriptional response of *Escherichia coli* O157:H7 to growth transitions in glucose minimal medium. **BMC Microbiol**. v. 7, p. 97, 2007.

BERNARD, P.; COUTURIER, M. Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. **J Mol Biol**. v.5;226, n.3, p. 735-745, 1992.

BOWER, J.M.; GORDON-RAAGAS, H.B.; MULVEY, M.A. Conditioning of uropathogenic *Escherichia coli* for enhanced colonization of host. **Infect Immun**. v. 77, n.5, p. 2104-12, 2009.

BRANTL, S. Bacterial type I toxin-antitoxin systems. **RNA Biol**. v. 9, n. 12, p. 1488-90, 2012.

BUERIS, V.; SIRCILI, M.P.; TADDEI, C.R.; DOS SANTOS, M.F.; FRANZOLIN, M.R.; MARTINEZ, M.B.; FERRER, S.R.; BARRETO, M.L.; TRABULSI, L.R. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 102, n.7, p. 839-44, 2007.

CHAN, W. T.; ESPINOSA, M.; YEO, C. C. Keeping the wolves at bay: antitoxins of

prokaryotic type II toxin-antitoxin systems. **Frontiers in molecular biosciences**. v. 3,n. 9, p. 1- 14, 2016.

CHOI, J.S.; KIM, W.; SUK, S.; PARK, H.; BAK, G.; YOON, J.; LEE, Y. The small RNA, SdsR, acts as a novel type of toxin in *Escherichia coli*. **RNA Biol**. v. 15, n. 10, p. 1319-1335, 2018.

CHOI, W.; YAMAGUCHI, Y.; LEE, J.W.; JANG, K.M.; INOUE, M.; KIM, S.G.; YOON, M.H.; PARK, J.H. Translation-dependent mRNA cleavage by YhaV in *Escherichia coli*. **FEBS Lett**. v. 591, n.13, p. 1853-1861, 2017.

CHRISTENSEN, S.K.; PEDERSEN, K.; HANSEN, F.G.; GERDES, K. Toxin-antitoxin loci as stress-response-elements: ChpAK/MazF and ChpBK cleave translated RNAs and are counteracted by tmRNA. **J Mol Biol**. v. 26, n.332(4), p. 809-19, 2003.

CHRISTENSEN, S.K.; MAENHAUT-MICHEL. G.; MINE, N.; GOTTESMAN, S.; GERDES, K.; VAN MELDEREN, L. Overproduction of the Lon protease triggers inhibition of translation in *Escherichia coli*: involvement of the yefM-yoeB toxin-antitoxin system. **Mol Microbiol**. v. 51, n.6, p.1705-17, 2004.

CHRISTENSEN-DALSGAAR, M.; JORGENSEN, M.G.; GERDES, K. Three new RelE-homologous mRNA interferases of *Escherichia coli* differentially induced by environmental stresses. **Mol Microbiol**. v. 75, n. 2, p. 333-48, 2010.

CROXEN, M.A.; LAW, R.J.; SCHOLZ, R.; KEENEY, K.M.; WLODARSKA, M.; FINLAY, B.B. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clin Microbiol Rev**. v. 26, n. 4, p. 822-80, 2013.

CROXEN, M.A.; FINLAY, B.B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nat Rev Microbiol**. v. 8, n.1, p. 26-38, 2010. Published erratum appears in *Nat Rev Microbiol*. v. 11, n. 2, p.141, 2013.

DUTTA, S.; PAZHANI, G.P.; NATARO, J.P.; RAMAMURTHY, T. Heterogenic virulence in a diarrheagenic *Escherichia coli*: evidence for an EPEC expressing heat-labile toxin of ETEC. **Int J Med Microbiol**. v. 305, n. 1, p. 47-54, 2015.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, L.; BLASCO, L.; LOPEZ, M.; BOU, G.; GARCÍA-CONTRERAS, R.; WOOD, T.; TOMAS, M. Toxin-Antitoxin Systems in Clinical Pathogens. **Toxins (Basel)**. v. 8, n. 7, p.227, 2016.

FOXMAN, B. The epidemiology of urinary tract infection. **Nat Rev Urol.** v. 7, p. 653–660, 2010.

FOZO, E.M.; MAKAROVA, K.S.; SHABALINA, S.A.; YUTIN, N.; KOONIN, E.V.; STORZ, G. Abundance of type I toxin-antitoxin systems in bacteria: searches for new candidates and discovery of novel families. **Nucleic Acids Res.** v. 38, n. 11, p. 3743–59, 2010.

FRAIKIN, N.; ROUSSEAU, C.J.; GOEDERS, N.; VAN MELDEREN, L. Reassessing the Role of the Type II MqsRA Toxin-Antitoxin System in Stress Response and Biofilm Formation: mqsA Is Transcriptionally Uncoupled from mqsR. **mBio.** v. 10, n. 6, e02678-19, 2019.

FRAIKIN, N.; GOORMAGHTIGH, F.; VAN MELDEREN, L. Type II Toxin-Antitoxin Systems: Evolution and Revolutions. **J Bacteriol.** V. 202, n.7, e00763-19, 2020.

GACA, A.O.; LEMOS, J.A. Adaptation to Adversity: the Intermingling of Stress Tolerance and Pathogenesis in Enterococci. **Microbiol Mol Biol Rev.** V. 83, n. 3, p. e00008-19, 2019.

GELENS, L.; HILL, L.; VANDERVELDE, A.; DANCKAERT, J.; LORIS, R. A general model for toxin-antitoxin module dynamics can explain persister cell formation in *E. coli*. **PLoS Comput Biol.** v. 9, n.8, e1003190, 2013.

GIRÓN, J.A.; HO, A.S.; SCHOOLNIK, G.K. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Science.** v. 1;254, n. 5032, p. 710-713, 1991.

GHAFOURIAN, S.; RFTARI, M.; SADEGHIFARD, N.; SEKAWI, Z. Toxin-antitoxin Systems: Classification, Biological Function and Application in Biotechnology. **Curr. Issues Mol. Biol.** v. 16, p. 9-14, 2014.

GOEDERS, N.; VAN MELDEREN, L. Toxin-antitoxin systems as multilevel interaction systems. **Toxins (Basel).** v. 6, n. 1, p. 304-324, 2014.

GOMES, T.A.; ELIAS, W.P.; GUTH, B.E.; RODRIGUES J.F.; PIAZZA, R.M.; FERREIRA, L.C.; MARTINEZ, M.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Braz J Microbiol.** v.47, p. 3-30, 2016.

HARMS, A.; BRODERSEN, D.E.; MITARAI, N.; GERDES, K. Toxins, Targets, and Triggers: An Overview of Toxin-Antitoxin Biology. **Mol Cell.** v. 70, n. 5, p. 768-

784, 2018.

HAYES, F.; KEDZIERSKA, B. Regulating toxin-antitoxin expression: controlled detonation of intracellular molecular timebombs. **Toxins (Basel)**. v. 6, n.1, p. 337-358, 2014.

HAZAN, R.; SAT, B.; ENGELBERG-KULKA, H. *Escherichia coli* mazEF-mediated cell death is triggered by various stressful conditions. **J Bacteriol**. v. 186, n.11, p. 3663-9, 2004.

HERNANDEZ-ARRIAGA, A.M.; CHAN, W.T.; ESPINOSA, M.; DIAZ-OREIAS, R. Condicional A ativação de toxina - antitoxina Sistemas: Killing Postsegregational and Beyond. **Microbiol Spectr**. v. 2, n. 5, 2014.

HUCKER, S.M.; SIMON, S.; SCHERER, S.; NEUHAUS, K. Transcriptional and translational regulation by RNA thermometers, ribos witches and the sRNA DsrA in *Escherichia coli* O157:H7 Sakai under combined cold and osmotic stress adaptation. **FEMS Microbiol Lett**. v. 364, n. 2, 2017.

IGARASHI, K.; FUJITA, N.; ISHIHAMA, A. Identification of a subunit assembly domain in the alpha subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. **J Mol Biol**. v. 5, n. 218(1), p. 1-6, 1991.

JAFFÉ, A.; OGURA, T.; HIRAGA, S. Effects of the ccd function of the F plasmid on bacterial growth. **J Bacteriol**. v. 163, n. 3, p. 841-9, 1985.

KAMADA, K.; HANAOKA, F. Conformational change in the catalytic site of the ribonuclease YoeB toxin by YefM antitoxin. **Mol Cell**. v.19, n. 19(4), p. 497-509, 2005.

KANG, S.M.; KIM, D.H.; JIN, C.; LEE, B.J. A Systematic Overview of Type II and III Toxin-Antitoxin Systems with a Focus on Druggability. **Toxins (Basel)**. v. 10, n. 12, 2018.

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews**. v. 2, p. 123 – 140, 2004.

KARIMI, S.; GHAFOURIAN, S.; TAHERI KALANI, M.; AZIZI JALILIAN, F.; HEMATI, S.; SADEGHIFARD, N. Association between toxin-antitoxin systems and biofilm formation. **Jundishapur J Microbiol**. v. 8, n. 1, e14540, 2014.

KEDZIERSKA, B.; HAYES, F. Emerging Roles of Toxin-Antitoxin Modules in Bacterial Pathogenesis. **Molecules**. v. 21, n. 6, 2016.

KESSLER, R.; NISA, S.; HAZEN, T.H.; HORNEMAN, A.; AMOROSO, A.; RASKO, D.A.; DONNENBERG, M.S. Diarrhea, bacteremia and multiorgan dysfunction due to an extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strain with enteropathogenic *E. coli* genes. **Pathog Dis**. v. 73, n. 8, 2015.

KRUGEL, H.; KLIMINA, K.M.; MROTZEK, G.; TRETYAKOV, A.; SCHOFEL, G.; SALUZ, H.P.; BRANTL, S.; POLUEKTOVA, E.U.; DANILENKO, V.N. Expression of the toxin-antitoxin genes *yefM(Lrh)*, *yoeB(Lrh)* in human *Lactobacillus rhamnosus* isolates. **J Basic Microbiol**. v. 55, n. 8, p. 982-91, 2015.

LAUPLAND, K.B. Incidence of bloodstream infection: a review of population-based studies. **Clin Microbiol Infect**. v.19, n.6, p. 492-500, 2013.

LEE, K.Y.; LEE, B.J. Structure, Biology, and Therapeutic Application of Toxin-Antitoxin Systems in Pathogenic Bacteria. v. 8, n. 10, 2016.

LEIMBACH, A.; HACKER, J.; DOBRINDT, U. *E. coli* as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity. **Curr Top Microbiol Immunol**. v. 358, p. 3-32, 2013.

LEPLAE, R.; GEERAERTS, D.; HALLEZ, R.; GUGLIELMINI, J.; DREZE, P.; VAN MELDEREN, L. Diversity of bacterial type II toxin-antitoxin systems: a comprehensive search and functional analysis of novel families. **Nucleic Acids Res**. v. 39, n. 13, p. 5513- 25, 2011.

LEROUX, M.; CULVINER, P.H.; LIU, Y.J.; LITTLEHALE, M.L.; LAUB, M.T. Stress Can Induce Transcription of Toxin-Antitoxin Systems without Activating Toxin. **Mol Cell**. v. 79, n. 2, p. 280-292.e8, 2020.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**. v. 25, n.4, p. 402-8, 2001.

MASUDA, H.; TAN, Q.; AWANO, N.; WU, K.P.; INOUE, M. YeeU enhances the bundling of cytoskeletal polymers of MreB and FtsZ, antagonizing the CbtA (YeeV) toxicity in *Escherichia coli*. **Mol Microbiol**. v. 84, n. 5, p. 979-89, 2012.

MARIMON, O.; TEIXEIRA, J.M.; CORDEIRO, T.N.; SOO, V.W.; WOOD, T.L.; MAYZEL, M.; AMATA, I.; GARCÍA, J.; MORERA, A.; GAY, M.; VILASECA, M.; OREKHOV, V.Y.; WOOD, T.K.; PONS, M. An oxygen-sensitive toxin-antitoxin system.

Nat Commun. v. 7, p. 13634, 2016.

MUNHOZ, D.D.; NARA, J.M.; FREITAS, N.C.; MORAES, C.T.P.; NUNES, K.O.; YAMAMOTO, B.B.; VASCONCELLOS, F.M.; MARTÍNEZ-LAGUNAM, Y.; GIRÓN, J.A.; MARTINS, F.H.; ABE, C.M.; ELIAS, W.P.; PIAZZA, R.M.F. Distribution of Major Pilin Subunit Genes Among Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* and Influence of Growth Media on Expression of the ecp Operon. **Front Microbiol.** v. 15, n.9, p. 942, 2018.

MUNHOZ, D.D.; SANTOS, F.F.; MITSUNARI, T.; SCHUROFF, P.A.; ELIAS, W.P.; CARVALHO, E.; PIAZZA, R.M.F. Hybrid Atypical Enteropathogenic and Extraintestinal *Escherichia coli* (aEPEC/ExPEC) ;A1250 Strain: A Draft Genome. **Pathogens.** v. 14, n. 10(4), p. 475, 2021.

NARA, J.M.; CIANCIARULLO, A.M.; CULLER, H.F.; BUERIS, V. HORTON, D.S.; MENEZES, M.A.; FRANZOLIN, M.R.; ELIAS, W.P.; PIAZZA, R.M. Differentiation of typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* using colony immunoblot for detection of bundle-forming pilus expression. **J Appl Microbiol.** v. 9, n.1, p. 35-43, 2010.

NARIMISA, N.; AMRAEI, F.; KALANI, B.S.; MOHAMMADZADEH, R.; JAZI, F.M. Effects of sub-inhibitory concentrations of antibiotics and oxidative stress on the expression of type II toxin-antitoxin system genes in *Klebsiella pneumoniae*. **J Glob Antimicrob Resist.** v. 21, p. 51-56, 2020.

NIKOLIC, N.; BERGMILLER, T.; VANDERVELDE, A.; ALBANESE, T.G.; GELENS, L.; MOLL, I. Autoregulation of mazEF expression underlies growth heterogeneity in bacterial populations. **Nucleic Acids Res.** v. 6, n. 46(6), p. 2918-2931, 2018.

NORTON, J.P.; MULVEY, M.A. Toxin-antitoxin systems are important for niche-specific colonization and stress resistance of uropathogenic *Escherichia coli*. **PLoS Pathog.** v. 8, n. 10, 2012.

OCHOA, T.J.; CONTRERAS, C.A. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) infection in children. **Current Opinion in Infectious Diseases.** v. 24, n. 5, p. 478-483, 2011.

OGURA, T.; HIRAGA, S. Mini-F plasmid genes that couple host cell division to plasmid proliferation. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 80, n. 15, p. 4784-8, 1983.

OVERGAARD, M.; BORCH, J.; JORGENSEN, M.G.; GERDES, K. Messenger RNA interferase RelE controls relBE transcription by conditional cooperativity. **Mol Microbiol.** v. 69, n. 4, p. 841-57, 2008.

PANDEY, D.P.; GERDES, K. Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. **Nucleic Acids Res.** v. 33, n. 3, p. 966-76, 2005.

PITOUT, J.D. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: an update on antimicrobial resistance, laboratory diagnosis and treatment. **Expert Rev Anti Infect Ther.** v. 1, n. 10, p. 1165-76, 2012.

RAMAGE, H.R.; CONNOLLY, L.E.; COX, J.S. Comprehensive functional analysis of *Mycobacterium tuberculosis* toxin-antitoxin systems: implications for pathogenesis, stress responses, and evolution. **PLoS Genet.** v. 5, n.12, e1000767, 2009.

SALA, A.; BORDES, P.; GENEVAUX, P. Multiple toxin-antitoxin systems in *Mycobacterium tuberculosis*. **Toxins (Basel).** v. 6, n. 3, p. 1002-1020, 2014.

SANTOS, A.C.M.; SANTOS, F.F.; SILVA, R.M.; GOMES, T.A.T. Diversity of Hybrid- and Hetero-Pathogenic *Escherichia coli* and Their Potential Implication in More Severe Diseases. **Front Cell Infect Microbiol.** v. 10, p. 339, 2020.

SAVARI, M.; ROSTAMI, S.; EKRAMI, A.; BAHADOR, A. Characterization of Toxin-Antitoxin (TA) Systems in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates in Iran. **Jundishapur J Microbiol.** v. 9, n. 1, e26627, 2016.

SCHIMIDT, O.; SCHUENEMANN, V.J.; HAND, N.J.; SILHAVY, T.J.; MARTIN, J.; LUPAS, A.N.; DJURANOVIC, S. *prfF* and *yhaV* encode a new toxin-antitoxin system in *Escherichia coli*. **J Mol Biol.** v. 28, n. 372(4), p. 894-905, 2007.

SHORT, F.L.; AKUSOBI, C.; BROADHURST, W.R.; SALMOND, G.P.C. The bacterial Type III toxin-antitoxin system, ToxIN, is a dynamic protein-RNA complex with stability-dependent antiviral abortive infection activity. **Sci Rep.** v. 8, n. 1, 2018.

SINGH, G.; YADAV, M.; GHOSH, C.; RATHORE, J.S. Bacterial toxin-antitoxin modules: classification, functions, and association with persistence. **Curr Res Microb Sci.** v. 2, p. 100047, 2021.

Srivastava, A.; Pati, S.; Kaushik, H.; Singh, S.; Garg, L.C. Toxin-antitoxin systems and their medical applications: current status and future perspective. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 105, n. 5, p. 1803-1821, 2021.

SUBASHCHANDRABOSE, S.; MOBLEY, H.L.T. Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic *Escherichia coli*. **Microbiol Spectr.** v. 3, n.4, 2015.

TAN, Q.; AWANO, N.; INOUYE, M. YeeV is an *Escherichia coli* toxin that inhibits cell division by targeting the cytoskeleton proteins, FtsZ and MreB. **Mol Microbiol.** v. 79, n. 1, p. 109-18, 2011.

THORTON, B.; BASU, C. Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. **Biochem Mol Biol Educ.** n. 2, p. 145-54, 2011.

TRABULSI, L.R.; KELLER, R.; GOMES, T.A. Typical and Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerg Infect Dis.** v. 8, n. 5, p. 508–513, 2002.

TIWARI, P.; ARORA, G.; SINGH, M.; KIDWAI, S.; NARAYAN, O.P.; SINGH, R. MazF ribonucleases promote *Mycobacterium tuberculosis* drug tolerance and virulence in guinea pigs. **Nat Commun.** v. 22, n. 6, p. 6059, 2015.

VAN DER MEE-MARQUET, N.L.; BLANC, D.S.; GBAGUIDI-HAORE, H.; DOS SANTOS BORGES, S.; VIBOUD, Q.; BERTRAND, X.; QUENTIN, R. Marked increase in incidence for bloodstream infections due to *Escherichia coli*, a side effect of previous antibiotic therapy in the elderly. **Front Microbiol.** v. 30, n. 6, p. 646, 2015.

VAN MELDEREN, L.; SAAVEDRA DE BAST, M. Bacterial toxin-antitoxin systems: more than selfish entities?. **PLoS Genet.** v. 5, n. 3, 2009.

WALKER, C.L.F.; ARYEE, M.J.; BOSCHI-PINTO, C.; BLACK, R.E. Estimating Diarrhea Mortality among Young Children in Low and Middle Income Countries. **PLoS ONE.** v. 7, n. 1, p. e29151, 2012.

WANG, X.; LORD, D.M.; CHENG, H.Y.; OSBOURNE, D.O.; HONG, S.H.; SANCHEZ-TORRES, V.; QUIROGA, C.; ZHENG, K.; HERRMANN, T.; PETI, W.; BENEDIK, M.J.; PAGE, R.; WOOD, T.K. A new type V toxin-antitoxin system where mRNA for toxin GhoT is cleaved by antitoxin GhoS. **Nat Chem Biol.** v. 8, n. 10, p. 855-61, 2012.

WANG, X.; YAO, J.; SUN, Y.C.; WOOD, T.K. Type VII Toxin/Antitoxin Classification System for Antitoxins that Enzymatically Neutralize Toxins. **Trends Microbiol.** 2020.

WEN, J.; FOZO, E.M. sRNA antitoxins: more than one way to repress a toxin. **Toxins (Basel).** v. 6, n. 8, p. 2310-35, 2014.

WEN, Y.; BEHIELS, E.; DEVREESE, B. Toxin-Antitoxin systems: their role in persistence, biofilm formation, and pathogenicity. **Pathog Dis.** v. 70, n. 3, p. 240-9, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Diarrhoeal disease. Mar. 2017. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>> Acesso em: 05 Ago. 2022.

World Health Organization (WHO).; The United Nations Children's Fund (UNICEF). Diarrhoea: why children are still dying and what can be done. **WHO Press.** 2009. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/9789241598415>> Acesso em: 05 Ago. 2022.

XIE, Y.; WEI, Y.; SHEN, Y.; LI, X.; ZHOU, H.; TAI, C.; DENG, Z.; OU, H.Y. TADB 2.0: an updated database of bacterial type II toxin-antitoxin loci. **Nucleic Acids Res.**v. 46, n. D1, p. D749-D753, 2018.

YAMAGUCHI, Y.; INOUE, M. Regulation of growth and death in *Escherichia coli* by toxin-antitoxin systems. **Nature Reviews.** v. 9, p. 779-790, 2011.

YANG, Q.E.; WALSH, T.R. Toxin-antitoxin systems and their role disseminating and maintaining antimicrobial resistance. v. 41, n.3, p. 343-353, 2017.

ZHOU, K.; ZHOU, L.; LIM, Q.; ZOU, R.; STEPHANOPOULOS, G.; TOO, H.P. Novel reference genes for quantifying transcriptional responses of *Escherichia coli* to protein overexpression by quantitative PCR. **BMC Mol Biol.** v. 23, n. 12, p. 18, 2011.

ZHANG, Y.; ZHANG, J.; HOEFLICH, K.P.; IKURA, M.; QING, G.; INOUE, M. MazF cleaves cellular mRNAs specifically at ACA to block protein synthesis in *Escherichia coli*. **Mol Cell.**v. 12, n.4, p. 913-23, 2003.

ZHANG, Y.; INOUE, M. RatA (YfjG), an *Escherichia coli* toxin, inhibits 70S ribosome association to block translation initiation. **Mol Microbiol.** v. 79, n. 6, p. 1418-29, 2011.