

**Escola Superior de Ensino do Instituto Butantan  
Programa de Pós-graduação *Lato Sensu*  
Especialização em Biotecnologia para a Saúde - Vacinas e Biofármacos**

**Luiz Fernando da Silva Gomes**

**Transformação de amostras de *Escherichia coli* com plasmídeo contendo a  
proteína GFP**

**São Paulo**

**2024**

**Luiz Fernando da Silva Gomes**

**Transformação de amostras de *Escherichia coli* com plasmídeo contendo a  
proteína GFP**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Especialização em Biotecnologia para a Saúde - Vacinas e Biofármacos do Programa de Pós-graduação *Lato Sensu* da Escola Superior do Instituto Butantan como requisito básico para a obtenção do título de Especialista em Biotecnologia para a Saúde - Vacinas e Biofármacos

Orientador: Dr. Marcelo Palma Sircili

**São Paulo**

**2024**

## AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Luiz Fernando da Silva Gomes, aluno do Curso de Especialização em Vacinas e Biofármacos, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte. Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

- Imediato
- 06 meses
- 12 meses
- Outro prazo \_\_\_\_\_ Justifique:

São Paulo, 15 de janeiro de 2024

aluno: *Luiz Fernando S. Gomes*

De acordo: *Marcelo Palma S.C.*  
Orientador: Marcelo Palma Sircili

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, em primeiro lugar, ao meu orientador Marcelo Palma Sircili pela sua paciência durante os momentos em que duvidei da minha capacidade, e seu carinho fraternal com os alunos, que de certa forma nos impactou positivamente. Expresso minha gratidão a todos os membros da equipe do laboratório de Genética: Youko, Tatiane que foram essenciais ao suporte dos experimentos e na busca pelos materiais necessários.

Um agradecimento especial ao Rodrigo e à Noemi que gentilmente se dispuseram a partilhar seus conhecimentos, e aprofundar nosso entendimento sobre as práticas laboratoriais. Meus colegas de especialização, alunos de IC e estagiários que com eles adquiri valiosas aprendizagens e, compartilhamos momentos únicos nesse ano que se passou.

Por fim, estendo meus agradecimentos a toda equipe da ESIB, incluindo a secretária, orientadores, palestrantes, por tal devido empenho hoje todos nós alunos conseguimos chegar ao final desse ciclo.

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

Silva Gomes, Luiz Fernando da

Transformação de amostras de Escherichia coli com plasmídeo contendo a proteína GFP / Luiz Fernando da Silva Gomes ; orientador(a) Marcelo Palma Sircili - São Paulo, 2024.

34 p. : il.

Monografia (Especialização) - Escola Superior do Instituto Butantan, Especialização na Área da Saúde - Biotecnologia Para a Saúde - Vacinas e Biofármacos.

Versão corrigida final

1. Bioquímica 2. Enterobactéria. 3. Fluorescência. 4. Biofilme I. Sircili, Marcelo Palma . II. Instituto Butantan. III. Especialização na Área da Saúde - Biotecnologia Para a Saúde - Vacinas e Biofármacos. IV. Título.

Geração por Sistema Automatizado.  
Bibliotecária Bruna Marques CRB8-9303 - Responsável Técnica

“Ninguém chegou a ser sábio por acaso. O homem que sofre antes de ser necessário, sofre mais que o necessário.”

Sêneca

## RESUMO

GOMES, Luiz Fernando da Silva, **Transformação de amostras de *Escherichia coli* com plasmídeo contendo a proteína GFP**. 2024. 35 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Biotecnologia para Saúde - Vacinas e Biofármacos) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2024.

A microbiota intestinal possui grande diversidade de gêneros e espécies. Os estudos mais recentes evidenciam uma participação efetiva do microbioma não só na modulação e produção de fatores de virulência de bactérias presentes no intestino como na sinalização e comunicação entre os órgãos do corpo. Os modelos de estudo utilizados até o momento possuem limitações e não permitem um estudo eficaz de identificação e quantificação de populações distintas de espécies relacionadas. Os ensaios celulares utilizados para o estudo de formação de biofilme e adesão bacteriana são bastante eficazes para visualização de amostras, porém no caso de culturas mistas de espécies com características semelhantes não é possível a distinção. Neste estudo foi realizada a transformação bacteriana para a inserção do plasmídeo contendo o gene *green fluorescent protein* (GFP) conferindo às amostras a capacidade de emitir luz verde. Após a confirmação da transformação, as amostras foram utilizadas em ensaios de formação de biofilme e adesão bacteriana em tecidos epiteliais *in vitro* contendo mais de uma população bacteriana. Foi possível a visualização e identificação das diferentes amostras com a utilização de coloração e microscopia de fluorescência.

**Palavras-chave:** Transformação. *Escherichia coli*. *Green Fluorescent Protein* (GFP).

## ABSTRACT

GOMES, Luiz Fernando da Silva. **Transformation of *Escherichia coli* samples with plasmid containing GFP protein.** 2024 35 p. Monograph (Specialist in Biotechnology for Health - Vaccines and Biopharmaceuticals) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2024.

The gut microbiota has a great diversity of genera and species. The most recent studies show an effective participation of the microbiome not only in the modulation and production of virulence factors of bacteria present in the intestine, but also in the signaling and communication between the body's organs. The study models used so far have limitations and do not allow an effective study of identification and quantification of distinct populations of related species. The cellular assays used for the study of biofilm formation and bacterial adhesion are very effective for visualization of samples, but in the case of mixed cultures of species with similar characteristics it is not possible to distinguish. In this study, bacterial transformation was performed by inserting the plasmid containing the green fluorescent protein (GFP) gene, giving the samples the ability to emit green light. After confirmation of the transformation, the samples were used in biofilm formation and bacterial adhesion assays in *in vitro* epithelial tissues containing more than one bacterial population. It was possible to visualize and identify the different samples with the use of staining and fluorescence microscopy.

**Keywords:** Transformation. *Escherichia coli*. Green Fluorescent Protein (GFP).

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Mecanismo de transferência horizontal de genes.....	12
<b>Figura 2:</b> Amostras de plasmídeo extraídos sem digestão.....	22
<b>Figura 3:</b> Amostras de plasmídeos extraídos após digestão com EcoR1.....	22
<b>Figura 4:</b> Placas de Petri contendo colônias de <i>E.coli</i> transformadas com plasmídeo GFP visualizadas em aparelho transiluminador UV.....	23
<b>Figura 5:</b> Imagem de microscopia óptica de fluorescência identificando amostras bacterianas contendo a proteína GFP e emitindo fluorescência. aumento de 600X.....	24
<b>Figura 6:</b> Imagens de microscopia de fluorescência contendo amostras com GFP e sem GFP aderidas em lamínula de vidro. A) amostras sem GFP coradas em azul; B) amostras com GFP emitindo luz verde; C ) sobreposição das imagens. Aumento de 630 X .....	24
<b>Figura 7:</b> Imagens de microscopia de fluorescência de ensaios de adesão em células HeLa contendo amostras com GFP e sem GFP. A) amostras sem GFP e núcleos das células coradas em azul; B) amostras com GFP emitindo luz verde; C ) sobreposição das imagens. Aumento 630 X.....	25
<b>Figura 8</b> Ensaio de adesão de amostras de <i>E.coli</i> em células Caco 2. A) Citoesqueleto celular(faloídina); B) Amostras de <i>E.coli</i> BA 320 emitindo luz verde; C) Núcleo das células corado em azul;D)Sobreposição das imagem E) imagem tridimensional e ortogonal.....	26

## SUMÁRIO

1	Introdução.....	11
1.1	Microbiota Humana.....	11
1.2	Escherichia coli.....	11
1.3	Patótipos de E.coli.....	12
1.4	E.coli Diarreio gênicas.....	12
2	Avanços na Biotecnologia.....	14
2.1	Mecanismos de adquirir Competência.....	14
2.2	Conjugação.....	15
2.3	Transformação.....	15
2.4	Transdução.....	16
3	GFP e seus usos.....	17
4	Objetivos.....	18
4.1	Objetivo Geral.....	18
4.2	Objetivos específicos.....	18
5	Materiais e métodos.....	19
5.1	Amostras Bacterianas.....	19
5.2	Pré-Inóculo.....	19
5.3	Extração de Plasmídeo.....	19
5.4	Leitura no Espectrofotômetro.....	20
5.5	Reação da Enzima ECOR1.....	20
5.6	Eletroforese em gel de agarose.....	20
5.7	Preparação das células competentes.....	20
5.8	Eletroporação.....	22
5.9	Plaqueamento.....	22
5.10	Formação de Biofilme em superfície abiótica: Análise em Microscopia Confocal.....	22
5.11	Teste de Adesão em células epiteliais.....	22
6	Resultados.....	23
6.1	Extração de e digestão do DNA plasmidial.....	23
6.2	Transformação bacteriana.....	24
6.3	Ensaio de Formação de Biofilme.....	25
6.4	Ensaio de adesão em células epiteliais in vitro.....	26
7	Discussão.....	29
8	Conclusão.....	31
	Referências.....	32

## 1 Introdução

### 1.1 Microbiota Humana

O trato gastrointestinal é o órgão mais densamente povoado, tanto por MO comensais ou simbióticos, em sua grande maioria bactérias, mas há também fungos, arqueobactérias, e vírus. (CAROLINA, *et al.* 2014). Cada ser humano apresenta uma microbiota diferente definida pelos seus atributos genéticos ou estímulos ambientais. Como a sua alimentação, idade e peso, gerando uma grande variação entre todos os indivíduos. (CAROLINA, *et al.* 2014). Em humanos, 90% dos filos encontrados são Firmicutes e Bacteroidetes. O restante são compostas pelo grupo taxonômico das Actinobactérias (família Bifidobacteriaceae) e Proteobactérias (família Enterobacteriaceae). A sequência que segue é os filos Synergistetes, Verrucomicrobia, Fusobacteria e Euryarchaeota em menor quantidade (CAROLINA, *et al.* 2014).

### 1.2 Escherichia coli

A descoberta da *Escherichia Coli* remete a 1885 pelo médico e bacteriologista Theodor Escherich ao analisar fezes de recém nascidos. (LEVISON 1936 *apud* FRIEDMANN 2014). Descrevendo o crescimento dessas bactérias em diferentes meios de cultura: ágar, sangue, batata, entre outros. Seu experimento inicial foi um pilar para a Biotecnologia e as enterobactérias continuam relevantes como organismos modelos em diferentes ensaios. (FRIEDMANN, 2014).

Apesar de toda sua importância, *E.coli* apresenta diferentes morfologias. Seu formato é de bacilo, medindo 1µm de comprimento por 0,35µm de largura, apresentando variações entre cepas e condições ambientais. Seu formato é tubular, e algumas podem apresentar flagelos para se locomover no meio ou fímbrias semelhantes, a pêlos que servem para aderir a superfícies ou outras células. (BRENNER e FARMER, 2007).

### 1.3 Patótipos de *E.coli*

Há patótipos de *E.coli* que adquiriram genes específicos permitindo se proliferar em outros ambientes dentro do hospedeiro e causar uma gama de doenças. Essas estruturas de virulência são na maioria das vezes codificadas em diferentes estirpes, assim criando novas combinações de elementos que eram móveis, mas que se adaptaram para se integrar ao DNA. Essas estruturas foram selecionadas, e as mais persistentes se tornaram patótipos de *E.coli* que tem a capacidade de infligir enfermidade. (NATARO, KAPER, MOBLEY 2004)

Três manifestações clínicas procedem da contaminação por essas bactérias: diarreia, infecção do trato urinário e sepse/meningite (NATARO, KAPER, MOBLEY, 2004). As ITU são as infecções extra intestinais mais frequentes e são causadas por *E.coli* uropatogênica (UPEC), o sorogrupo que causa meningite e sepse está ficando mais generalizado. As bactérias que causam infecções fora do trato gastrointestinal (TGI) são denominadas EXPEC. (RUSSO, JOHNSON, 2000)

A diarreia infecciosa é ainda considerada uma das principais causas de mortalidade infantil, principalmente nos países em desenvolvimento. As ECD atualmente são classificadas em 6 patótipos, considerando os mecanismo de virulência, padrões de adesão in vitro, sintomas clínicos e epidemiologia. Os seis patótipos são: *E.coli* Enteropatogênica (EPEC), *E.coli* Enterotoxigênica (ETEC), *E.coli* Enteroinvasora (EIEC), *E.coli* Enterohemorrágica (EHEC), *E.coli* Enteroagregativa (EAEC), e *E.coli* que adere difusamente ao epitélio (DAEC) (CULLER, 2010).

### 1.4 *E.coli* Diarreioagênicas

EPEC (*E.coli* Enteropatogênica): EPEC foi o primeiro sorogrupo de *E.coli* a ser descoberto. Bray, em 1945 descreveu um conjunto de diferentes de *E.coli* que foram isoladas de crianças no Reino Unido, mas não de crianças saudáveis. Embora os grandes surtos de diarreia infantil diminuíssem nos países industrializados, ela ainda é um risco para as crianças de países em desenvolvimento. (NATARO, KAPPER, MOBLEY 2004) Suas características são lesões no epitélio do tipo A/E (fixação e apagamento) na superfície do epitélio, diarreia frequente, febre, náusea, e vômitos seguidos por um quadro de

desidratação. Seus marcadores genéticos de virulência. São o LEE (lôcus de apagamento de enterócitos), intimina, pilus formador de feixe, apenas em tEPEC (típica), mas não em atípica aEPEC. (CROXEN e FINLAY, 2010). EHEC: Foi considerada como causadora de infecções humanas em 1982, a EHEC causa diarreia sanguinolenta, sem sangue e síndrome hemolítica uremica (SHU). O TGI de gado é o principal ambiente de proliferação e a doença foi associada ao consumo de hambúrguer mal passado. Outros alimentos foram associados ao surto, incluindo salsichas, leite não pasteurizado, alface, melão, sumo de maçã e rebentos de rabanete. Esse último foi o causador de uma epidemia resultando em 8000 casos no Japão. O que é facilitado pela baixa exposição (estimado em <100 unidades) (VARMA, 2003) Seu principal fator de virulência é a toxina Stx contendo dois subgrupos stx1 e stx2, é produzida no cólon em direção a corrente sanguínea até a via renal danificando as células endoteliais e bloqueia a vascularidade através da toxicidade direta e a ação local das quimiocinas e citocinas. (ANDREOLI, TRACHTMAN, ACHESON, 2002)

EPEC: A contaminação por EPEC causa diarreia aquosa leve a grave. Ainda é uma das principais causas em países em desenvolvimento e a principal para viajantes para países emergentes (NATARO, KAPPER 2004). Apresentam fatores de colonização para aderir as mucosas intestinais. Além de produzir uma ou ambas as classes de enterotoxinas (LT) termolábeis e (ST) termoestável. (SPRANGLER, 1992) EIEC: Assim, como a Shigella apresenta uma alta capacidade de invasão as células epiteliais, ao mudar a conformidade do citoesqueleto, seguido pelo rompimento do vacúolo endocítico adentrando no citoplasma e esse citoesqueleto confere, mobilidade o que permite depois infectar as células adjacentes. (PARSOT, 2005)

EAEC: A característica mais marcante é o seu padrão de adesão é observada em células in vitro lembrando tijolos empilhados. Sua manifestação clínica também causa diarreia aquosa, que pode evoluir para a sanguinolenta e apresenta um plasmídeo (pAA) que contém genes para as fímbrias de adesão agregativa. (CROXEN, *et al.* 2013)

DAEC: É chamada assim devido ao padrão de adesão sobre as superfícies das células de forma que as bactérias ficam difusas. Duas adesinas foram identificadas para este patótipo (Afa, Dr). Pode estar associada a colite ulcerativa e Doença de Crohn. (ELLIOTT; NATARO; 1995).

AIEC: Dentre as principais características está a adesão epitelial que se move através de flagelos ao encontrar um receptor nas células epiteliais (CEACAM 6) que estimula IFN  $\gamma$  e TNF (alfa) que acaba gerando a alta expressão do receptor epitelial. O segundo mecanismo é a invasão de macrófagos onde essas bactérias são fagocitadas, e se replicam no fagossomas sem lisar a célula, e estimula a secreção de TNF (alfa) o que causa a inflamação do Íleo, e está associado a Doença de Crohn (ELVIRA *et al.* 2016).

## **2.0 Avanços na Biotecnologia**

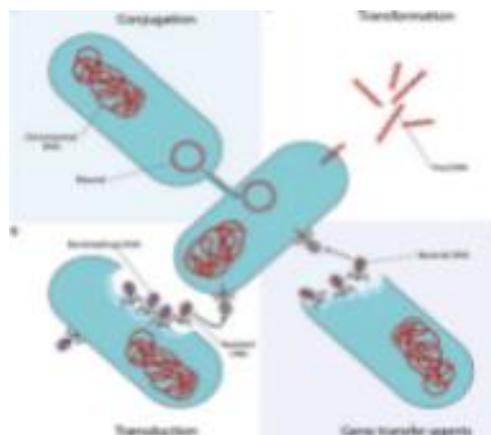
Na década de setenta houve grandes descobertas sobre a transferência de DNA por fagos (MANDEL e HIGA, 1970) e plasmídeo para *E.coli* e outras bactérias. (COHEN *et al.* 1972) Foi descoberto como induzir a competência bacteriana (tornar a membrana permeável), o que abriu o caminho para as técnicas de clonagem molecular e DNA recombinante. O que fez as enterobactérias serem cada vez mais estudadas em ensaios genéticos envolvendo vetores, como OMV (Vesícula de Membrana Externa) e DNA extracromossomal.

Alguns biofármacos foram criados a partir dessas técnicas, como a insulina recombinante, eritropoetina, hormônio do crescimento humano, fatores de coagulação do sangue, dentre outros (KAMIONKA, 2011, HUANG *et al.* 2012).

### **2.1 Mecanismos de adquirir Competência**

O mecanismo para adquirir DNA entre populações bacterianas é a transferência horizontal de genes (HGT) que contribui para a adaptação bacteriana a diferentes ambientes. Hoje se conhece três mecanismos de transferência: conjugação, transdução, e transformação (WINTERDORFF *et al.* 2016). A conjugação e a transdução dependem de aparatos específicos como pili conjugativos, e fagos respectivamente. A transformação é a capacidade da bactéria em adquirir competência para receber DNA extracelular que pode ocorrer na natureza ou ser induzida artificialmente. (LORENZ; WACKERNAGEL, 1994).

**Figura 1:** Mecanismo de transferência horizontal de genes



**Fonte:** Adaptado de Winterdorff e Nieckerk, 2016

## 2.2 Conjugação

A conjugação requer contato direto entre a bactéria doadora e a receptora através de pili ou adesinas, o que é facilitado pela maquinaria da bactéria que produz elementos conjugativos no próprio DNA cromossômico ou em plasmídeos que se replicam independentemente (WINTERSDORFF, PENDERS, 2016). Esse material genético é frequentemente transformado em fita simples para ser transferido para a bactéria receptora, e então a maquinaria de replicação integra esse elemento genético tornando o fita dupla. (WOZNIAK, WALDOR 2010)

## 2.3 Transformação

Em 1928, Griffith foi o primeiro a demonstrar a transferência de material genético em cepas de *Streptococcus Pneumoniae*. Certas bactérias demonstraram capacidade de absorver, integrar e expressar esses fragmentos livre de DNA, esse mecanismo foi chamado de transformação (natural). (GRIFFITH, 1928). Para que ocorra a transformação é preciso que duas situações ocorram: deve haver DNA em meio extracelular; a bactéria precisa estar em estado de competência; e esse material genético deve ser integrado por incorporação ao genoma ou em forma de DNA plasmidial. (THOMAS;

NIELSEN, 2005). Outras espécies de bactérias capazes só desenvolvem a competência na presença de autoindutores, estado nutricional e outras condições limitantes. (JHONSTON, *et al.* 2014)

Existem duas técnicas *in vitro* de transformação: química e física. A eletroporação é o método físico, onde a célula recebe um choque elétrico que abre os poros das membranas, facilitando a entrada de plasmídeos, e após isso é colocada em meio rico de cultivo. Possui alta eficiência em *E.coli* (NEUMANN, 1982). A transformação química ocorre através de um choque térmico, a amostra é mantida em uma solução contendo  $\text{CaCl}_2$  (cloreto de cálcio) e glicerol em temperatura de  $0^\circ \text{C}$ , e após isso é aquecida a  $42^\circ \text{C}$  por 2 minutos, o que faz a bactéria abrir seus canais iônicos, permitindo a entrada de DNA exógeno.

Em *Escherichia coli* o método mais eficiente disponível para a transferência de plasmídeos é a eletroporação. No caso da ampicilina atinge um sucesso de 80% em transferir o plasmídeo. (KUMAR 2019 *apud* SMITH 1990). A eletroporação danifica e altera a membrana, alterando a permeabilidade da membrana celular, normalmente 50 a 70% das bactérias expostas a alta intensidade elétrica morrem, devido ao tempo de tratamento e a intensidade da carga elétrica (VENDA e HAMILTON, 1967).

## 2.4 Transdução

Os bacteriófagos apresentam um papel chave para a comunidade bacteriana, em qualquer habitat. Podendo fazer a transferência de DNA de forma especializada (fragmento específico) ou generalista (qualquer fragmento), transferindo genes para seu hospedeiro o que garante a sua própria sobrevivência e dispersão. (MODI, *et al.* 2013). Os fagos transferem de material cromossômico a EGM (elementos genéticos móveis como plasmídeos, transposons, e ilhas genômicas (BROWN, JAQUE *et al.* 2015).

Os estudos atuais colhendo amostras de diferentes ambientes evidenciam que os fagos estão carregando genes de resistência a antibióticos, mostrando que eles desempenham uma função importante na disseminação de AGR (genes de resistência a antibióticos). (WINTERSDORFF, PENDERS, 2016). Através de

qPCR (COLLOMER-LLUCH, *et al.* 2011) detectou os  $\beta$ -lactâmicos  $bla_{tem}$ ,  $bla_{ctx-m}$  encontrados em amostras de esgoto tanto em rios e córregos. Além de que a clonagem do DNA de fago para o vetor *E.coli* suscetíveis à ampicilina gerou indivíduos modificados com os AGR  $bla_{tem}$ ,  $bla_{ctx-m}$  ou outro gene de resistência.

### 3.0 GFP e seus usos

Um dos genes mais utilizados nas técnicas de transformação bacteriana é o que codifica a proteína *Green Flourescent Protein* (GFP). Essa sequência específica foi isolada pela primeira em uma espécie de água-viva *Aequorea Victoria*. (SHIMOMURA, 1962). Essa proteína emite fluorescência quando exposta a comprimento de onda entre o espectro de 395 nm e 509 nm. A fluorescência pode ser usada para identificar padrões de adesão, contar colônias. (GARDNER, 2000).

*E.coli* com toda certeza hoje dentre todos os seres vivos que existem ou existiram é o mais estudado e compreendido do Planeta Terra. (BLOUNT, 2015). As pesquisas de Biologia Molecular e Genética mudaram a nossa visão, permitindo o desenvolvimento de técnicas de inserção de genes, amplificação, enzimas de restrição, dentre outros conceitos inovadores que a cada dia mudam a nossa realidade. (LEHMAN *et al.* 1968).

## 4 Objetivos

### 4.1 Objetivo Geral

Aplicar a técnicas de transformação bacteriana para inserir o plasmídeo contendo o gene GFP (Green Fluorescent Protein) em diferentes linhagens de *E.coli*

### 4.2 Objetivos específicos

- a) Extração e digestão com enzima de restrição do plasmídeo contendo GFP de amostra ATCC de referência;
- b) Preparação de células competentes de diferentes linhagens de *E.coli* diarrreio gênicas;
- c) Transformação do plasmídeo nas diferentes linhagens;
- d) Ensaios de interação de amostras contendo o plasmídeo.

## 5 Materiais e métodos

### 5.1 Amostras Bacterianas

Neste estudo serão utilizadas amostras de EPEC típicas da coleção do Laboratório de Genética do Instituto Butantan.

Amostras	Sorotipo	Patótipo Referências
<i>E.coli</i> Amostra ATCC 25922	O6	Comensal ATCC
<i>E.coli</i> Amostra E 2348/69	O127:H6	EPEC Levine <i>et al.</i> 1986 típica
<i>E.coli</i> Amostra BA 320	O55:H7	EPEC Bueris <i>et al.</i> atípica 2007, Abe <i>et al.</i> 2009

### 5.2 Pré-Inóculo

Para a seleção bacteriana foi aliqotado ampicilina na concentração de 100 µg/mL em 3 mL de meio LB e 30µl das cepas de *E.coli* ATCC GFP (25922) sob agitação constante a 180 RPM *overnight* na estufa a 37°C.

### 5.3 Extração de Plasmídeo

Modificado a partir do kit de purificação da DNA Wizard Plus da (Promega) com os pré-inóculos do dia anterior. 1300µl das amostras serão aliqotados em *ependorf* e submetidos a centrifugação de 8000 rpm por 10 minutos a

temperatura ambiente e o sobrenadante acabou descartado. Com o auxílio da pipeta ou vortex o substrato foi soerguido com 250µl da solução da *Cell Resuspension Solution* e 250µl *Cell Lysis Solution*. As soluções foram invertidas até deixar as amostras homogeneizadas e imediatamente adicionado 10µl da enzima *Alkaline Protease* e incubada por 5 minutos em temperatura ambiente, e depois foi colocado 350µl da solução de Neutralização o conteúdo foi novamente homogeneizado. As amostras foram centrifugadas a 12000 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente e 800µl da solução foram transferidas para a coluna de extração. Foi realizada nova centrifugação a 12000 RPM por 1 minuto a temperatura ambiente, e o sobrenadante foi descartado. Foram realizadas duas lavagens da coluna utilizando solução de lavagem do kit por centrifugação a 12000 rpm por 2 minutos. Após essa etapa, o DNA plasmidial foi ressuscitado em 30µL de água livre de nuclease e armazenado em freezer a -20°C.

#### **5.4 Leitura no Espectrofotômetro**

A concentração de DNA foi verificada no espectrofotômetro (Eppendorf Biophotometer PLUS®) em comprimento de 260/280. Uma alíquota de 4 µl do plasmídeo extraído foi utilizada para a medição da concentração de DNA e proteínas.

#### **5.5 Reação da Enzima ECOR1**

Antes de dar início a reação a enzima ficou 5 min a 37°C em estufa para atingir o seu ótimo. Foi pipetado nessa ordem: 2µl do tampão, 2µl da enzima e 16µl do plasmídeo, totalizando 24µl com 4µl do corante. Na amostra não digerida foi aliquotado em *ependorfs* o corante *BlueJuicer* (10X), 2µl do tampão de corrida (*1KB DNA PLUS*) na concentração (1:6) e 8µl de água livre de nuclease. A reação foi aplicada em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio e as bandas do plasmídeo foram visualizadas na câmara de UV.

## 5.6 Eletroforese em gel de agarose

Após a extração e digestão plasmidial foi realizada eletroforese em gel de agarose para confirmação da presença do plasmídeo de interesse.

## 5.7 Preparação das células competentes

Um inóculo das amostras E2348/69 e da amostra BA320 foi preparado em 50ml de meio Luria Bertani (LB) em uma concentração de 1:100 (500µl). A cultura foi incubada na estufa a 37°C sob agitação constante. O crescimento foi acompanhado em biofotômetro (Biophotometer PLUS®) a cada 3 horas até que atingisse a fase *mid log* (OD 600 nm entre 0,4-0,6) de crescimento. A coleta foi realizada por meio de 4 tubos falcon de 15mL (12,5mL em cada), previamente resfriados no gelo. O conteúdo foi centrifugado a 7000 RPM por 5 min. Visando a redução do crescimento bacteriano e a formação de um sedimento. Esse substrato foi então ressuspendido com água mili gelada, e depois submetido a nova centrifugação por 5 min. O material resultante foi transferido para 2 tubos falcon e ressuspendido com 500µl de água miliQ gelada, obtendo uma solução com aproximadamente 10<sup>6</sup> células por ml e aliquoteado em 10 *ependorfs* contendo Glicerol 10%. As bactérias foram armazenadas em freezer -80°C.

## 5.8 Eletroporação

O eletroporador (*BIO-RAD E.coli Pulser*®) foi utilizado para a transfecção do plasmídeo, as cubetas e as amostras foram mantidas no gelo. Cada cubeta recebeu uma mistura das células competentes com o plasmídeo extraído, com uma concentração de 10ng/µl (5µl a 10µl). Após isso as cubetas foram inseridas no eletroporador. As amostras foram submetidas a um choque 2,5 kilovolts por 3,5 milissegundos e ressuspendidas com 1 ml de meio SOC, sendo transferidas para novos tubos *ependorf*. As amostras ficaram 1 hora na estufa a 37 °C e, em seguida, foi realizado plaqueamento em meio seletivo.

## 5.9 Plaqueamento

Foram preparados 200 ml de meio Luria Bertani Agar (LBA) e distribuídos em 10 placas de Petri. Posteriormente a ampicilina foi dispersa sobre a placa na concentração de 100mg/ml. Após isso com o auxílio da alça o substrato foi espalhado uniformemente sobre as placas, que foram então incubadas na estufa *overnight* a 37°C.

## 5.10 Formação de Biofilme em superfície abiótica: Análise em Microscopia Confocal

Para os testes de formação de biofilme através de microscopia confocal, após os períodos de incubação (3, 6, 12, 24,48,72). Os poços foram lavados 3 vezes com PBS 1x. Em seguida, as bactérias foram fixadas com p-formaldeído 4% em PBS 1x por 18 horas a 4°C. As células foram novamente lavadas com PBS 1x e permeabilizadas com Triton x-100 a 0,1% em PBS por 4 minutos. Após as lavagens com PBS, DAPI foi adicionado em uma concentração de 1:1000. As lamínulas foram incubadas por 45 minutos. As lâminas foram observadas no laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan, em aumento 620x utilizando o microscópio LSM 510 Meta (Zeiss, Alemanha).

## 5.11 Teste de Adesão em células epiteliais

As linhagens celulares Hela e Caco 2 foram cultivadas em meio MEM, enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB) em estufa de CO<sub>2</sub> 5% a 37 °C até a formação de monocamada. Esta monocamada foi lavada com PBS 1x e tripsinizada com 2ml de tripsina. Após isso foi ressuspensa em meio MEM para a contagem das células na câmara de Neubauer. Após isso, 1X 10<sup>5</sup> células/ml foram transferidas para placas de 24 poços e mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> 5%, a 37 °C em 48h. Após a semi confluência de 70%, as células foram lavadas 6 vezes com PBS 1X (200µL) em cada poço. Após isso foi adicionado 1 mL de MEM a placa. Na placa foram feitas inoculações de 20µl de amostras de *E.coli* com GFP e sem GFP e feita incubação por 3 horas em estufa a 37°C . Após esse período, as placas foram lavadas por 6 vezes com PBS 1x para retirar as

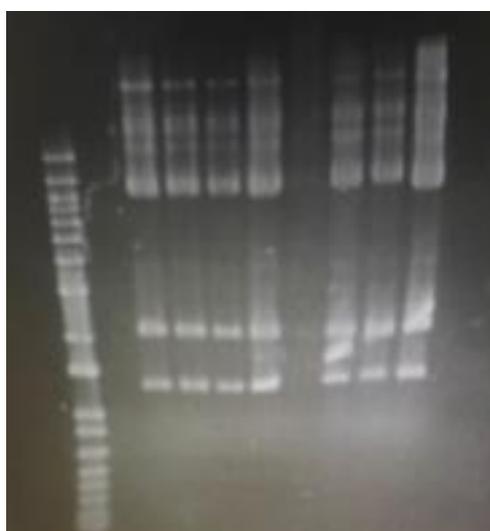
bactérias que não aderiram. Foi realizada uma fixação com paraformaldeído 4% e coloração com corantes fluorescentes, montagem das lâminas e observação em microscópio de óptico de Fluorescência e fotografadas

## 6 Resultados

### 6.1 Extração de e digestão do DNA plasmidial

Após a extração do DNA plasmidial foi feita a quantificação e verificação da pureza do material. as amostras que apresentaram quantidade e qualidade satisfatórias foram submetidas à digestão com enzima de restrição EcoR1 e submetidas a eletroforese em gel de agarose, como mostra a figura 2.

**Figura 2:** Amostra de plasmídeo extraído sem digestão: 1kb E23 320



**Fonte:** próprio autor, 2023

**Figura 3** Amostras de plasmídeos extraídos após digestão com enzima de restrição Eco R1



**Fonte:** próprio autor, 2023

## 6.2 Transformação bacteriana

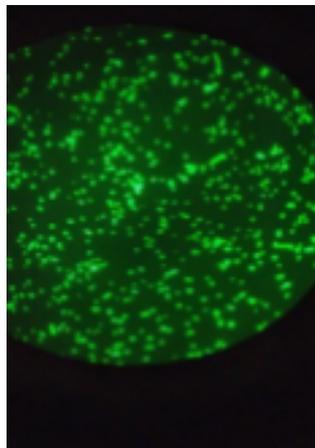
Após a obtenção do plasmídeo e das células competentes foi realizado o procedimento de eletroporação para a transformação das amostras com a inserção do plasmídeo contendo o gene da proteína GFP. A figura 4 mostra as colônias transformantes emitindo fluorescência em aparelho transiluminador UV e a figura 4 mostra imagens das bactérias emitindo luz verde em microscopia de fluorescência.

**Figura 4:** Placas de Petri contendo colônias de *E.coli* transformadas com plasmídeo GFP visualizadas em aparelho transiluminador UV.



**Fonte:** próprio autor, 2023

**Figura 5:** Imagem de microscopia óptica de fluorescência. identificando amostras bactérias contendo a proteína GFP e emitindo fluorescência. aumento de 600X

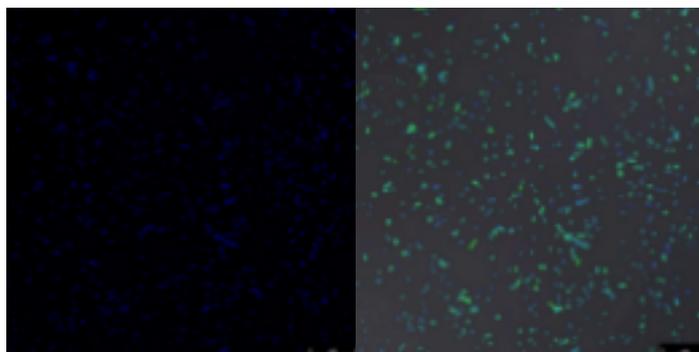


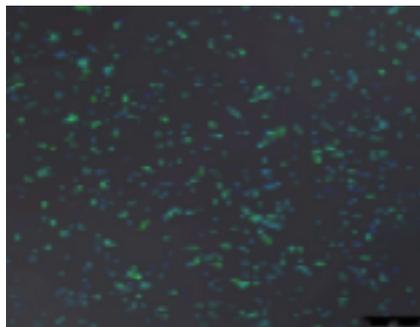
**Fonte:** próprio autor, 2023

### 6.3 Ensaio de Formação de Biofilme

Após a confirmação de amostras transformantes foram realizados ensaios de interação de amostras contendo o gene GFP e amostras sem esse gene, com o objetivo de poder identificar diferentes populações bacterianas, como mostra a figura 5.

**Figura 6:** Imagens de microscopia de fluorescência contendo amostras com GFP e sem GFP aderidas em lamínulas de vidro A) Amostras sem GFP coradas em azul B) amostras com GFP emitindo luz verde; C) sobreposição das imagens. Aumento de 630 X





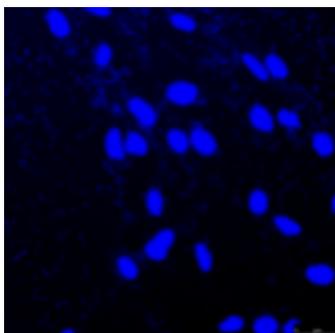
Fonte: próprio autor, 2023

#### 6.4 Ensaios de adesão em células epiteliais *in vitro*

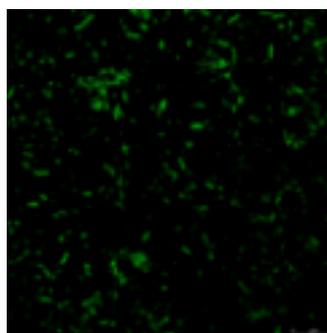
Também foram realizados ensaios de interação entre amostras bacterianas contendo plasmídeo com o gene GFP em diferentes tipos celulares cultivados *in vitro*. A figura 6 mostra imagens de microscopia de fluorescência de ensaios de adesão em células HeLa e a figura 7 mostra imagens de microscopia confocal de ensaio de adesão em células Caco 2.

**Figura 7:** Imagens de microscopia de fluorescência de ensaios de adesão em células HeLa contendo amostras com GFP e sem GFP. A) amostras sem GFP e núcleos das células coradas em azul; B) amostras com GFP emitindo luz verde; C) sobreposição das imagens. Aumento 630 X

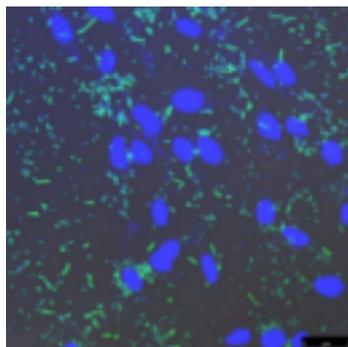
A)



B)



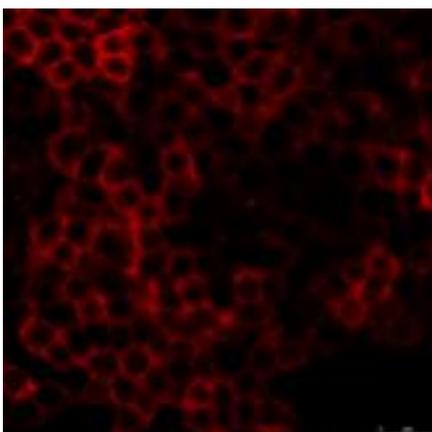
C)



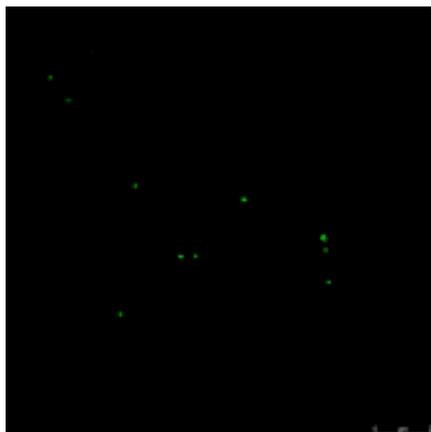
Fonte: próprio autor, 2023

**Figura 8:** Ensaio de adesão de amostras de *E.coli* em células Caco 2. A) Citoesqueleto celular(faloidina); B) Amostras de *E.coli* BA 320 emitindo luz verde; C) Núcleo das células corado em azul; D) Sobreposição das imagens

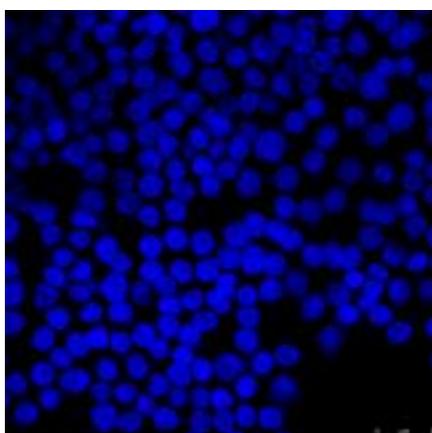
A)



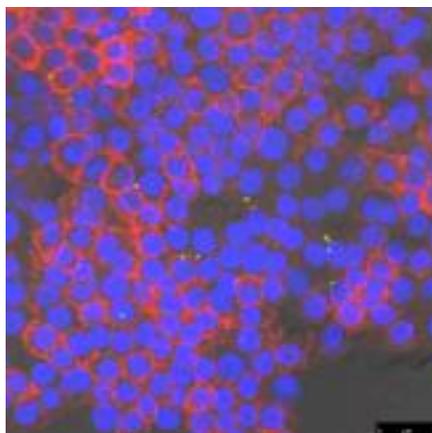
B)



C)



D)



Fonte: AGUIAR, 2023

## 7 Discussão

O estudo das interações de populações bacterianas e de interações entre bactéria e hospedeiro tem se desenvolvido muito nos últimos anos. O conceito de comportamento coordenado de amostras bacterianas já está bem estabelecido e diversos grupos de pesquisa estão utilizando seus recursos para um melhor entendimento dos mecanismos de comunicação e sinalização celular. Apesar desse recente aumento de interesse na área, existem algumas limitações técnicas para esse tipo de estudo. Os modelos animais, por exemplo, possuem muitas limitações e não refletem com fidelidade os mecanismos de interação que existem entre as populações bacterianas no hospedeiro. Em outros casos, como no caso de amostras enteropatogênicas, não existe um modelo animal adequado para o estudo, pois as espécies que têm a capacidade de desenvolver a infecção em humanos possuem características distintas daquelas que podem causar infecções em animais. Outro ponto que deve ser destacado é que a maior parte dos estudos analisa os efeitos de espécies isoladas e infelizmente isso é muito pouco comum na vida real. Na imensa maioria das vezes, existem populações polimicrobianas, compondo um vasto microbioma que regula sua transcrição gênica de acordo com os sinais existentes no ambiente. No caso do trato gastrointestinal, humano, existe uma grande diversidade populacional, com diferentes espécies e também com diversidade entre as espécies, existindo a possibilidade de sub espécies e patótipos muito semelhantes e que são difíceis de distinguir com as técnicas que são utilizadas atualmente.

No caso da *E.coli* diarreioagênica, existem alguns ensaios celulares que permitem entender um pouco melhor a patogenicidade desses grupos de amostras, como o ensaio de adesão descrito por Craviotto *et al.* 1991 que permite a identificação de padrões de adesão de diferentes patótipos em cultivos celulares e também, a técnica descrita por Knutton *et al.* 1989 que permite a identificação de um tipo específico de lesão no enterócito caracterizado pela destruição das microvilosidades, rearranjo do citoesqueleto e acúmulo de actina no sítio de adesão da bactéria, no,meda de lesão “attaching and effacing”.(Moon *et al.* 1983) . Como já foi dito anteriormente, a maioria dos trabalhos na literatura estuda de forma isolada os patótipos e tem dificuldades para tentar reproduzir as condições existentes nos hospedeiros. Uma das dificuldades encontradas para o estudo de populações mistas é a identificação das amostras envolvidas no processo.

Os estudos costumam falhar na quantificação das populações presentes porque são em alguns casos, da mesma espécie, possuem morfologia idêntica, também possuem muitas características genéticas semelhantes, e com isso dificultam a caracterização genética morfologia, que poderia auxiliar muito no entendimento das interações.

Com o intuito de desenvolver uma metodologia que auxilie a identificação e quantificação das amostras bacterianas nós propusemos uma transformação que possibilita a identificação de amostras nos testes de interação com cultivos celulares *in vitro*.

Com a realização da transformação de amostras específicas com plasmídeo contendo gene GFP, é possível que através de microscopia de fluorescência e de citometria de fluxo, diferentes populações bacterianas possam ser identificadas e quantificadas.

Neste estudo foi possível confirmar que a transformação foi realizada com sucesso e a aquisição do plasmídeo conferiu às amostras a capacidade de emissão de luz verde.

Graças à aquisição deste fenótipo, foi possível a identificação de diferentes populações bacterianas nos testes de formação de biofilme em superfícies abióticas e de adesão bacteriana em cultivo de células epiteliais. Outra possibilidade que não foi contemplada neste estudo, mas que pode contribuir muito para a quantificação de bactérias e a contagem através de citometria de fluxo que pode ser realizada com a utilização de fluorescência.

Nosso estudo foi realizado apenas com a proteína GFP como marcador que confere luz verde, mas existem outras proteínas que conferem capacidade de emissão de luz em diferentes comprimentos de onda, como por exemplo, amarelo ou vermelho que também podem ser transformadas em bactérias competentes e proporcionar testes com uma diversidade ainda maior de espécies de bactérias envolvidas na interação e proporcionar um melhor entendimento do comportamento coordenado entre as espécies.

## **8 Conclusão**

Foi possível a obtenção e transformação do plasmídeo contendo GFP em amostras de *E.coli* diarreiogênica. Os ensaios de formação de biofilme e testes de adesão com amostras contendo GFP permitiram a identificação de mais de uma espécie presente.

REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

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. F.; ELIAS, W. P. **Virulence features of atypical enteropathogenic Escherichia coli identified by the eae+ EAF-negative stx- genetic profile.** *Diag. Microbiol. Infec. Dis.*, v. 64, p. 357-365, 2009.

ANDREOLI SP, TRACHTMAN, H. ACHESON, DW *et all.* **Síndrome hemolítico-urêmica: epidemiologia, fisiopatologia e terapia.** *Pediatr. Nefrol.* 17 , 293–298 (2002).

BLOUNT, ZD. **O Potencial Inesgotável da E.coli.** *Elife.* vol: 4 ed: 0586, 2015. Disponível em: <<https://elifesciences.org/articles/5826>> Acesso em 20 de set de 2023

BRENNER, DJ, FARMER JJ (2007) **Manual de Bacteriologia Sistemática de Bergey** 587-850, Vol 2, Nova York. Springer, the proteobacteria, part B: the Gammaproteobacteria

BROWN-JAQUE, M., CALERO-CÁCERES, W. e MUNIESA, M. **Transferência de genes de resistência a antibióticos através de elementos móveis relacionados a fagos.** *Plasmid* vol 79, 2015 pg 1-7

BUERIS, V.; SIRCILI, M. P.; TADDEI, C. R.; SANTOS, M. F.; FRANZOLIN, M. R.; MARTINEZ, M. B.; FERRER, S. R.; BARRETO, M. L.; TRABULSI, L. R. **Detection of 101 diarrheagenic Escherichia coli from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brasil.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 102, p. 839-44, 2007.

COLOMER-LLUCH, M., JOFRE, J. e MUNIESA, M. **Genes de resistência a antibióticos na fração de DNA de bacteriófagos de amostras ambientais.** *Plos One* vol 6, 2011, pg 3

CRAVIOTO, A.; TELLO, A.; NAVARRO, A.; RUIZ, J.; VILLAFAN, H.; URIBE, F.; ESLAVA, C., **Association of Escherichia coli HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea.** *The Lancet*, v. 337, p. 262-264, 1991.

CROXEN, M.A. FINLAY, B.B. **Molecular mechanisms of Escherichia coli pathogenicity.** *Nat. Rev. Microbiol.* 2010, 8, 26–38.

CROXEN, M.A. LAW, R.J. SCHOLZ R *et al.* **Avanços Recentes na Compreensão da Escherichia Coli Entérica.** *Clin Microbiol Rev* (2013); ed 26 822-80

CULLER, Hebert Fabricio. **Formação de biofilme por Escherichia coli enteropatogênica atípica.** 2010. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010. Disponível em: <<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/87/87131/tde-17082010-122633/pt-br.ph.p>> Acesso em: 29 set. 2023.

<sup>1</sup>ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** Informação e documentação - referências - elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2018.

E. NEUMANN , M. SCHAEFFER RIFFLER , W. WANG, *et al.* **Transferência gênica em células de lipoma de camundongo por eletroporação em campos elétricos elevados.** O Jornal EMBO (1) pg 7 ( 1982 ) 841-845. Disponível em: <<https://www.embopress.org/doi/abs/10.1002/j.1460-2075.1982.tb01257.x>> Acesso em: 18 de Set. 2023

ELLIOTT, S. NATARO, J.P. **Enteroaggregative and diffusely adherent Escherichia Coli.** Rev Med Microbiol. v 6 pg 196-206 (1995)

FARFAN-GARCIA, ELVIRA A *et al.* **Mecanismos de virulência de Escherichia coli enteropatogênica.** Rev. infectol., Santiago, v. 4, pág. 438-450, agosto de 2016. Disponível em:<[http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0716-101820160004000\\_09&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-101820160004000_09&lng=en&nrm=iso)> Acesso em: 30 out. 2023

FRIEDMANN, Herbert. **Escherich e Escherichia.** vol 6. n1. 9 de maio de 2014. EcosalPlus. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/ecosalplus.esp-0025-2013>> Acesso em: 18 de set. 2023

GARDNER TS, CANTOR CR, COLLINS JJ. **Construção de uma chave seletora genética em Escherichia coli.** Nature ed 403, 2000 pg 339–342. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/35002131>> Acesso em 19 de set. 2023

KAMIONKA, Mariusz. **Engineering of therapeutic proteins production in Escherichia coli.** Current pharmaceutical biotechnology, v. 12, n. 2, p. 268-274, 2011.

KAPER, J. NATARO, J MOBLEY, H. **Escherichia coli Patogênica** (123-140) Vol 2 2004. Nature Reviews Microbiology

KNUTTON, S.; DALDWIN, T.; WILLIAMS, P. H.; McNEISH, A. S. **Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohaemorrhagic Escherichia coli.** Infect. Immun., v. 57, p. 1290-1298, 1989.

KUMAR P , NAGARAJAN A , UCHIL PD. 2019. **Transfecção de DNA por eletroporação.** Protocolo Cold Spring Harb

LEHMAN, *et al.* Síntese enzimática de ácido desoxirribonucléico. I. **Preparação de substratos e purificação parcial de uma enzima de Escherichia coli** Jornal de Química Biológica 233, 1958 :163–170.

LEVISON, A. 1936. **Pioneiros da Pediatria** . Froben Press, Nova York.

LORENZ, MICHAEL G *et al* **Transferência de Genes Bacterianos por Transformação Genética Natural** Bacterial. Microbiological reviews, v. 58, n. 3, p. 563-602, 1994.

MANDEL, M. HIGA, A. (1970). **Calcium-dependent bacteriophage DNA infection.** J. Mol. Biol. 53, 159–162.

MODI SR, LEE, HH, SPINA, CS e COLLINS, J. **O tratamento com antibióticos expande o reservatório de resistência e a rede ecológica do metagenoma do fago.** Nature 499, 2013 219–222.

MOON, H. W.; WHIPP, S. C.; ARGENZIO, R. A.; LEVINE, M. M.; GIANNELLA, R. A. **Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic Escherichia coli in pig and rabbit intestines.** Infect. Immun., v. 41, p. 1340-1351, 1983.

MORAES, ACF; SILVA IT; PITITTO, BA et all. **Microbiota intestinal e risco cardiometabólico: mecanismo e modulação dietética.** Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia (4) Junho de 2014.

PARSOT, C.; **Shigella spp. and enteroinvasive Escherichia coli pathogenicity factors.**FEMS. Microbiol. Lett., v. 252, p. 11-18, 2005.

**PROMEGA Biotecnologia do Brasil.** 2023. Wizard Plus SV Minipreps DNA purification system. Disponível em: <https://www.promega.com.br/products/nucleic-acid-extraction/plasmid-purification/wizard-plus-sv-minipreps-dna-purification-systems/?catNum=A1330> Acesso 22 de Set. 2023

**PROMEGA Biotecnologia do Brasil.** 2023.Assembly of Restriction Enzyme Digestions Disponível em: <<https://www.promega.com.br/products/cloning-and-dna-markers/restriction-enzymes/ecori/?catNum=R6011>> Acesso 22 de Set. 2023

RUSSO, T.A, JOHNSON, J.R. **Proposta para uma nova designação inclusiva para isolados patogênicos extraintestinais de Escherichia Coli: Expec** The Journal of Infectious Diseases, vol 181, ed 5. Março de 2000 (1753-1754)

S. COHEN, A. CHANG, L. Hsu. **Resistência a antibióticos não cromossômicos em bactérias.** Processo. Nacional. Acad. Ciência. EUA , 69 ( 1972 ) , pg 2110-2114.Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.69.8.2110>> Acesso em: 18 Set. 2023

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual.** New York, 1989.

SHEIKH, J.; HICKS, S.; DALL'AGNOL, M.; PHILLIPS, A. D.; NATARO, J. P. **Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative Escherichia coli.** Mol Microbiol., v. 41, p. 983-97, 2001.

SHIMOMURA O, JHONSON FH, SAIGA Y. 1962 **Extração, purificação e propriedades da aequorina, uma proteína bioluminescente do hidromedusano 35 luminoso, Aequorea.** Jornal de Fisiologia Celular e Comparativa Vol 59 ed 3: pg 223–239.

SMITH M, JESEE J, LANDERS T, JORDAN J. 1990. **Eletroporação bacteriana de alta eficiência 1×10<sup>10</sup> transformantes de E. coli por micrograma.** Focus vol 12 ed2 pg: 38 – 40.

SPANGLER, BD. **Estrutura e função da toxina da cólera e da enterotoxina termolábil relacionada de Escherichia coli.** Microbiol. Rev. 56 , 622–647 (1992).

Thermo Fisher Scientific. 2023 **1Kb DNA plus Ladder.** Disponível em: <[https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2F1Kb\\_Plus\\_DNA\\_ladder\\_man.pdf](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2F1Kb_Plus_DNA_ladder_man.pdf)>

THOMAS, CM. Nielsen, KM. **Mecanismo e Barreiras à transferência horizontal de genes em bactérias.** Nature Rev. Microbiol ed 3 711-721. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrmicro1234>> Acesso em 20 out. 2023

VARMA JK, GREENE KD, RELLER ME *et al.* **Um surto de infecção por Escherichia Coli 0157** após exposição a um edifício contaminado 2003. JAMA, vol 290 ed 20 (2709-2712) 12

VENDA, AJH. HAMILTON, WA.1967. **Efeitos de altos campos elétricos em microrganismos: Eliminação de bactérias e leveduras** . Biochim Biophys Acta (BBA) vol: 148 ed 3 pg:781-788 . Acesso em 19 de Setembro de 2023

WINTERSDORFF, CRISTHIAN JH Von, et all. Disseminação da resistência antimicrobiana em ecossistemas microbianos através da transferência horizontal de genes. Fronteiras em Microbiologia, vol 7 ed 173. Disponível em:<<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.00173/full>>] Acesso em 22 set 2023

WINTERSDORFF, J.H.C; NIEKERK, J.M. **Mecanismos de Transferência Horizontal de Genes.** Frontiers, vol (7) ed 173, 2016.

WOZNIAK, RA; WALDOR, MK (2010). **Elementos integrativos e conjugativos: elementos genéticos móveis em mosaico que permitem o fluxo gênico lateral dinâmico.** Nat. Rev. Microbiol. 8, 552–563 GRIFFITH, F. A importância do tipos pneumocócicos. J.Hyg (Londres) ed 27 pg113-159 1928