MIN JUNG YANG

**Efeito da fração de baixo peso molecular
do veneno de *Bothrops jararaca* em
Escherichia coli enteropatogênica atípica**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia

São Paulo – SP

2020

MIN JUNG YANG

**Efeito da fração de baixo peso molecular
do veneno de *Bothrops jararaca* em
Escherichia coli enteropatogênica atípica**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Palma Sircili

Versão Corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca no ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD).

São Paulo – SP

2020

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Yang, Min Jung
Efeito da fração de baixo peso molecular do
veneno de *Bothrops jararaca* em *Escherichia coli*
enteropatogênica atípica / Min Jung Yang; orientador
Prof. Dr. Marcelo Palma Sircili. -- São Paulo, 2020.
69 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. *Escherichia coli*. 2. EPEC. 3. Biofilme. 4.
Bothrops jararaca. 5. Veneno de origem animal. I.
Sircili, Prof. Dr. Marcelo Palma, orientador. II.
Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Min Jung Yang

Título da Tese: Efeito da fração de baixo peso molecular do veneno de *Bothrops jararaca* em *Escherichia coli* enteropatogênica atípica

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Palma Sircili

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() Aprovado(a) () Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **793/2016** referente ao projeto intitulado: ***"Efeito de componentes de baixo peso molecular do veneno Bothrops jararaca na interação de amostras de Escherichia coli enteropatogênica com células epiteliais in vitro"*** sob a responsabilidade de **Min Jung Yang** e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Rita de Cássia Stocco**, do Departamento de Biotecnologia, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pela **CEPSH** - Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 24 de fevereiro de 2016.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador CEUA ICB/USP

Prof. Dr. **Paolo M. A. Zanotto**
Coordenador CEPSH ICB/USP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências Biomédicas da USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEP.06.2020

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado de Isenção CEP nº **793/2016**, aprovado em 24/02/2016, e por solicitação do Prof. Dr. **Marcelo Palma Sircili**, do Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da USP, atual orientador, informamos que o título do projeto da aluna: **Min Jung Yan** foi alterado para: **"Efeito da fração de baixo peso molecular do veneno de *Bothrops jararaca* em *Escherichia coli* enteropatogênica atípica"**, visto melhor adequação do título ao estudo desenvolvido.

São Paulo, 15 de maio de 2020.

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA ICB/USP

Profa. Dra. **Camila Squarzon Dale**
Coordenadora CEP SH ICB/USP

Dedicando esse trabalho à Dona Naomi, quem Deus me privilegiou em ter como mãe,
e ao Dr. Marcelo Palma Sircili, a quem tive a honra de ter como orientador.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Senhor Jesus Cristo. Se não fosse pela graça Dele, eu não estaria aqui.

Ao Dr. Marcelo Palma Sircili, meu orientador, pela amizade e pelos ensinamentos, além de encorajamentos quando eu precisava. Por me guiar do começo ao fim nessa longa jornada acadêmica com toda paciência que qualquer pessoa provavelmente ia precisar pra me orientar. Seu orientar me trouxe até aqui.

À Dra. Vanessa Bueris, pela amizade e ensinamentos, tanto na ciência como em algumas importantes lições de vida. Toda pessoa na carreira acadêmica tem um início, e eu fui abençoada em tê-la como parte dele. Quem recebe, jamais esquece.

À Dra. Juliana Higa, pela amizade e por toda a ajuda dada desde o início inclusive o exame de ingresso no doutorado na Biotec. Você me disse que o seu trabalho não teria chegado ao fim com minha ajuda, mas foi graças à sua ajuda que consegui chegar ao ponto de partida.

Ao Dr. Hebert Fabricio Culler, pela amizade, pelos ensinamentos, e pelo apoio, e também pela ajuda com as partes dos experimentos que faltavam para fechar essa tese. Isso sem falar por toda a paciência pra tirar minhas dúvidas!

Ao Dr. Samuel Couto, pela amizade e pela paciência, sempre disponível para responder minhas dúvidas. Também pela força em alguns dos meus momentos mais difíceis, o que me ajudou a dar “bola pra frente”.

À Youko Yamamoto pela amizade e por todo o apoio técnico prestado. Os trabalhos de bancada teriam sido muito mais difíceis se não fosse pela sua ajuda, e saiba que sua ajuda é muito valorizada por todos nós.

À Ludmila Garcia pela amizade e pelo apoio técnico quando a Youko estava de férias. Sua ajuda fez toda a diferença.

Às colegas de bancada Ana Paula, Tamires e Ana Vitória por todo o apoio moral e pela paciência de me ouvirem quando eu precisava de ouvidos amigos. Tive a honra de ajudá-las aqui e ali com algumas coisas, mas saibam que aprendi muito com vocês.

Ao Dr. Álvaro Prieto do Laboratório de Genética principalmente com toda a ajuda nas últimas semanas, com a situação envolvendo a reforma do laboratório e a atual pandemia, que acabou dificultando as últimas etapas dos trabalhos para fechar a tese.

À Dra. Mari Viana do Laboratório de Genética com toda a ajuda e o tutorial com experimentos de qRT-PCR, e pela paciência em me explicar qualquer dúvida que foi surgindo, e à Aline Giardini do LEDS do Instituto Butantan por ajudar com o uso do equipamento de qRT-PCR.

Ao pessoal do Laboratório de Genética e do Laboratório de Bacteriologia por toda a ajuda quando necessário.

À Fábria e à Eliane da Secretaria de Biotecnologia, por toda sua ajuda ao longo deste doutorado, além de tirarem todas as minhas dúvidas (que não foram poucas). Com tantas questões burocráticas, eu estaria perdida sem a ajuda de vocês.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro.

À minha mãe pelo suporte incondicional que sempre me deu do começo ao fim, de todas as formas possíveis, de orações a questões práticas, além de palavras de encorajamento quando eu mais precisava.

À minha família e amigos por todo o apoio e encorajamento.

E a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram pra conclusão deste trabalho.

Muito obrigada!

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Genética do Instituto Butantan sob orientação do Dr. Marcelo Palma Sircili, com apoio financeiro do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (Processo **140264/2016-7**).

“A vitória no combate não depende do
número, mas da força que desce do céu.”
I Macabeus 3:19

RESUMO

YANG, M. J. **Efeito da fração de baixo peso molecular do veneno de *Bothrops jararaca* em *Escherichia coli* enteropatogênica atípica.** 2020. 71 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) é um micro-organismo de grande importância na saúde pública e uma das principais causas de diarreia em crianças nos países em desenvolvimento, com amostras atípicas se tornando mais prevalentes. Um dos mecanismos que regulam sua virulência é conhecido como *quorum sensing*, um mecanismo de sinalização dependente da densidade celular. Este mecanismo também está envolvido na formação de biofilmes, uma das possíveis causas de diarreias persistentes observadas em infecções com EPEC atípica. O veneno de *Bothrops jararaca* (BjV) é uma mistura complexa de diversos componentes com potencial efeito biológico, inclusive contra bactérias. Neste trabalho, fração do veneno de *B. jararaca* com 3 kDa ou menos (fBjV) foi utilizada para testar seu efeito em duas amostras diferentes de EPEC atípica, uma do sorotipo ONT:H25 e outra do sorotipo O55:H7. Em ensaios com cristal violeta para análise de formação de biofilme em poliestireno, ONT:H25 tratado com fBjV apresentou menor quantidade de biofilme inicialmente, mas por volta de seis horas de incubação a formação de biofilme aumentou. Após 24 horas, a quantidade de biofilme formada diminuiu e não apresentou diferença estatisticamente significativa com o teste controle. Testes fenotípicos envolvendo adesão a células HeLa, e outros envolvendo principais fatores envolvendo biofilme, como curli, celulose, e motilidade, não apresentaram diferenças significativas entre os testes realizados com fBjV e o controle em nenhum dos dois sorotipos. Ensaio analisando a transcrição gênica de ONT:H25 indicaram que a presença de fBjV afeta a transcrição de alguns dos principais genes envolvidos na síntese de elementos envolvidos com biofilme. Esses resultados demonstram a possível influência de fBjV em amostras de EPEC atípicas, além de demonstrar a heterogeneidade deste grupo de EPEC.

Palavras-chave: *Escherichia coli*. EPEC. Biofilme. *Bothrops jararaca*. Veneno de origem animal

ABSTRACT

YANG, M. J. **Effect of low molecular weight fraction of *Bothrops jararaca* venom in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*.** 2020. 71 p. Doctoral thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is a microorganism of great importance in public health and one of the main causes of diarrhea in children in developing countries, with atypical samples becoming more prevalent. One of the mechanisms that regulate its virulence is known as quorum sensing, a cell density-dependent signaling mechanism. This mechanism is also involved in the formation of biofilms, one of the possible causes of persistent diarrhea seen in infections with atypical EPEC. *Bothrops jararaca* venom (BjV) is a complex mixture of several components with potential biological effect, including against bacteria. In this work, a fraction of *B. jararaca* venom with 3 kDa or less (fBjV) was used to test its effect in two different samples of atypical EPEC, one of the ONT:H25 serotype and another of the O55:H7 serotype. In tests with crystal violet for analysis of biofilm formation in polystyrene, ONT:H25 treated with fBjV initially presented a lower amount of biofilm, but around six hours of incubation biofilm formation increased. After 24 hours, the amount of biofilm formed decreased and showed no statistically significant difference with the control test. Phenotypic tests involving adhesion to HeLa cells, and others involving main factors involving biofilm, such as curli, cellulose, and motility, did not show significant differences between the tests performed with fBjV and the control tests in neither serotype. Tests analyzing the gene transcription of ONT:H25 indicated that the presence of fBjV affects the transcription of some of the main genes involved in the synthesis of elements involved with biofilm. These results demonstrate the possible influence of fBjV in atypical EPEC samples, in addition to demonstrating the heterogeneity of this EPEC group.

Keywords: *Escherichia coli*. EPEC. Biofilm. *Bothrops jararaca*. Venom of animal origin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Principais padrões de adesão de EPEC.....	4
Figura 2 – Lesão <i>attaching and effacing</i> (A/E).....	5
Figura 3 – Região LEE (<i>locus of enterocyte effacement</i>).....	6
Figura 4 – RP-HPLC da fração menor que 3 kDa.....	28
Figura 5 – Curva de crescimento da amostra ONT:H25	29
Figura 6 – Curva de crescimento da amostra O55:H7	30
Figura 7 – Formação de biofilme em placas de poliestireno por ONT:H25 a 37 °C	32
Figura 8 – Formação de biofilme em placas de poliestireno por ONT:H25 a 26 °C	32
Figura 9 – Formação de biofilme em placas de poliestireno por O55:H7 a 37 °C	33
Figura 10 – Formação de biofilme em placas de poliestireno por O55:H7 a 26 °C	33
Figura 11 – Expressão da fímbria curli em ONT:H25 após 24 h a 26 °C	35
Figura 12 – Expressão da fímbria curli em ONT:H25 após 24 h a 37 °C	35
Figura 13 – Expressão da fímbria curli em O55:H7 após 24 h a 26 °C	36
Figura 14 – Expressão da fímbria curli em O55:H7 após 24 h a 37 °C	36
Figura 15 – Produção de celulose em ONT:H25 após 24 h.....	37
Figura 16 – Produção de celulose em O55:H7 após 24 h	38
Figura 17 – Ensaio de motilidade de ONT:H25 em ágar semi-sólido.....	39
Figura 18 – Ensaio de motilidade de O55:H7 em ágar semi-sólido	39
Figura 19 – Ensaio de adesão de ONT:H25 em células HeLa após 6 h de interação.....	41
Figura 20 – Ensaio de adesão de O55:H7 em células HeLa após 6 h de interação	41
Figura 21 – Representação quantitativa de bactérias aderidas às células HeLa	42
Figura 22 – Análise transcricional na amostra ONT:H25 de <i>csgD</i> , <i>bcsA</i> , <i>fimA</i> , e <i>ler</i>	43

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Iniciadores utilizados nas reações de qRT-PCR	27
---	-----------

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 <i>Escherichia coli</i>	1
1.1.1 <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica (EPEC)	2
1.1.2 <i>Quorum sensing</i>	7
1.1.3 Biofilme	10
1.2 <i>Bothrops jararaca</i>	16
1.3 Venenos de serpentes.....	17
2. OBJETIVO.....	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Amostras Bacterianas	20
3.2 Veneno de <i>Bothrops jararaca</i>	20
3.2.1 Amostra do veneno e fracionamento.....	20
3.2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa.....	21
3.3 Análises Fenotípicas	21
3.3.1 Curvas de crescimento.....	21
3.3.2 Ensaios de formação de biofilme com cristal violeta	22
3.3.3 Expressão da fímbria Curli	22
3.3.4 Produção de celulose.....	23
3.3.5 Ensaio de motilidade.....	23
3.3.6 Ensaios de adesão em células epiteliais <i>in vitro</i>	23
3.3.6.1 <i>Cultivo e preparo da linhagem celular HeLa</i>	23
3.3.6.2 <i>Ensaio de adesão em células HeLa</i>	24
3.3.6.3 <i>Quantificação das bactérias aderidas às células epiteliais</i>	25
3.4 Análise transcricional	25
3.4.1 Extração de RNA.....	25
3.4.2 PCR em Tempo Real.....	26
3.5 Análises estatísticas	27
4 RESULTADOS	28
4.1 Cromatograma de HPLC da fração < 3 kDa do veneno de <i>B. jararaca</i>	28
4.2 Curva de crescimento	29
4.3 Formação de biofilme em superfície abiótica – Ensaio com cristal violeta	30

4.3 Expressão de fímbria curli – Vermelho Congo	34
4.4 Produção de celulose - Calcofluor	37
4.5 Motilidade – Ensaio em ágar semi-sólido	38
4.5 Adesão bacteriana em células HeLa – Ensaio de adesão <i>in vitro</i>	40
4.6 Análise transcricional – qRT-PCR	42
5 DISCUSSÃO.....	44
6 CONCLUSÕES.....	54
REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

Doenças infecciosas são um dos grandes desafios atuais na área da saúde pública mundial (WHO, 2020). Dentre estas, infecções bacterianas de origem intestinal são responsáveis por milhões de mortes por ano. Existem diversos patógenos que podem causar este tipo de infecção, entre eles as *Escherichia coli* diarreiogênicas, responsáveis por diversos surtos de diarreia infecciosa.

1.1 *Escherichia coli*

Descrita pela primeira vez em 1885 pelo pediatra alemão Theodore Escherich, foi originalmente denominada *Bacterium coli commune*. Somente em 1919 foi renomeada *Escherichia coli*, em homenagem ao pesquisador que originalmente a descobriu, porém o reconhecimento oficial ocorreu em 1958 (SHULMAN; FRIEDMANN; SIMS, 2007). Hoje, *Escherichia coli* é um dos micro-organismos mais extensivamente estudados na área de microbiologia.

Pertencente à família Enterobacteriaceae, é um bacilo Gram-negativo, facultativo, e um dos micro-organismos mais estudados que fazem parte da microbiota intestinal de humanos e de alguns animais. É um dos primeiros a colonizarem o trato intestinal, podendo ser identificada já nos primeiros dias de vida do hospedeiro, e permanecem como parte da microbiota intestinal dele até o final de sua vida (PALMER et al., 2007).

Apesar de fazer parte da microbiota normal de hospedeiros saudáveis e geralmente não causar problemas, existem cepas de *E. coli* que, devido à aquisição de fatores de virulência através de transferência horizontal, se tornaram patogênicas e podem causar doenças, de leves a sérias, no hospedeiro quando infectado. As infecções podem ser extra-intestinais, como sepse, meningite, e infecções de trato urinário, ou intestinais, sendo estas causadas pelas cepas de *E. coli* diarreiogênicas (DEC) (NATARO; KAPER, 1998).

As DEC são classificadas principalmente em seis patótipos, de acordo com seu mecanismo de virulência, sintomas clínicos, características epidemiológicas, e os tipos

de interação *in vitro* com células hospedeiras. São eles: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* que adere de forma difusa (DAEC), e *E. coli* produtora de toxina de Shiga (STEC), sendo que esta última tem como um de seus sub-patótipos a *E. coli* enterohemorrágica (EHEC).

Apesar dessas classificações, devido a aquisições de diferentes fatores de virulência por transferência horizontal, enquadrar as diferentes cepas nestes grupos determinados de patótipos tem se tornado cada vez mais desafiador. Estudos identificaram dentro destas classificações cepas que diferem umas das outras, com fenótipos mais próximos de outros patótipos do que aquele no qual estão classificadas, o que indica a grande heterogeneidade destes organismos até mesmo dentro das classificações nas quais são enquadrados. Dessa forma, EPEC e EAEC, por exemplo, foram sub-divididas em típicas e atípicas, e *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) foi classificada como um sub-patótipo de STEC. Além desses principais patótipos descritos, outros foram descritos e sugerido em estudos posteriores, como *E. coli* adesiva-invasora (AIEC), envolvida com a doença de Crohn, e *E. coli* enteroagregativa produtora de toxina de Shiga (STEAEC), associada com o surto que ocorreu na Alemanha (CLEMENTS et al., 2012; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

1.1.1 *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)

Embora a patogenicidade intestinal de *E. coli* era algo sugerido já nas décadas finais do século 19, a ideia desta bactéria como um agente causador de diarreia infecciosa não era amplamente aceita até o artigo publicado em 1945 por Bray, onde ele identificou as cepas bacterianas de *E. coli* (então denominadas *Bacterium coli neopolitanum*) associadas com a diarreia infecciosa, analisando a capacidade da bactéria de fermentar diferentes tipos de sacarídeos (ROBINS-BROWNE, 1987).

Em 1955, Neter designou como “enteropatogênicas” as cepas de *E. coli* envolvidas epidemiologicamente com a diarreia infantil, e assim distinguí-las das *E. coli* normalmente presentes na microbiota intestinal. Esta definição foi revisada em 1995, e

foi determinado que amostras de EPEC seriam classificadas em dois subtipos, EPEC típica (tEPEC) e atípica (aEPEC), baseado na presença ou ausência do plasmídeo pEAF (*EPEC adherence factor*), respectivamente. Esta característica, em adição com a presença do gene *eae* (*attaching and effacing*), envolvido com a formação da lesão histopatológica *attaching and effacing* (A/E), e a ausência de expressão da toxina de Shiga (stx), faz parte dos critérios adotados atualmente para definir uma amostra de *E. coli* diarreiogênica como EPEC (CHEN; FRANKEL, 2005; NETER et al., 1955).

Tanto amostras de tEPEC como de aEPEC estão incluídas em diferentes sorogrupos, os chamados sorogrupos clássicos, além de outros patótipos de DEC (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002). Entretanto, um grande número de sorotipos diferentes dos clássicos podem ser detectados em amostras isoladas de aEPEC (DULGUER et al., 2003), e estudos epidemiológicos mostram a tendência de aumento do número de casos de infecção por aEPEC em comparação a tEPEC, indicando sua maior prevalência tanto em países em desenvolvimento como em países desenvolvidos (HU; TORRES, 2015).

Uma das principais características das amostras típicas de EPEC é um padrão de adesão localizada (padrão LA) em células hospedeiras, na qual se observa formação de microcolônias compactas em locais específicos da célula após três horas de contato (GIRÓN; HO; SCHOOLNIK, 1991). Já em amostras atípicas, pode-se observar um padrão de adesão conhecido como localizada-like (LAL – *localized adherence-like*), caracterizada também pela formação de microcolônias das bactérias sobre determinadas regiões da superfície celular do hospedeiro, porém com agrupamentos mais frouxos. Este padrão é observado após seis de interação com as células epiteliais, o dobro de tempo que leva para amostras típicas para sua adesão às células. Além do padrão LAL, EPEC atípica também pode apresentar padrões de adesão agregativa ou difusa, enquanto o padrão de adesão de algumas amostras é considerado indeterminado, e outras simplesmente não aderem às células (ABE et al., 2009; DULGUER et al., 2003; GOMES et al., 2004; NUNES et al., 2003; PELAYO et al., 1999; ROBINS-BROWNE et al., 2004; RODRIGUES et al., 1996; SCALETISKY et al., 1999; VIEIRA et al., 2001).

Figura 1 – Alguns dos principais padrões de adesão de EPEC em células epiteliais: localizada (LA), agregativa (AA), difusa (DA), localizada-like (LAL). Fonte: Trabulsi, Keller, Gomes, 2002.

O pEAF, cuja presença determina se uma amostra de EPEC é típica ou atípica, é um plasmídeo de aproximadamente 60 MDa e contém os genes envolvidos na biogênese de uma adesina fimbrial tipo IV denominada *bundle-forming pilus* (BFP), a qual promove ligações entre as bactérias que resulta na formação de microcolônias compactas características do padrão de adesão localizada (GIRÓN; HO; SCHOOLNIK, 1991) em amostras típicas. O plasmídeo também codifica um dos reguladores dos genes de virulência de EPEC, denominado Per (*plasmid-encoded regulator*), o qual possui três *open reading frames* (ORF), *perA*, *perB* e *perC*. PerA é responsável pela ativação da transcrição do operon *bfp*, e PerC está envolvido na ativação do *ler* (*LEE-encoded regulator*), regulador da região LEE (*locus of enterocyte effacement*), uma ilha de patogenicidade na qual estão localizados os genes responsáveis pela lesão A/E (MCDANIEL et al., 1995; MELLIES et al., 1999). Embora sua importância seja discutida devido à sua ausência em certos microorganismos capazes de formar a lesão A/E como a EHEC e a EPEC atípica (BUSTAMANTE et al., 2011), foi demonstrado que a

lesão A/E é estabelecida mais rapidamente em EPEC atípica quando esta é complementada com *per* (BUERIS et al., 2015).

A lesão A/E é caracterizada pela perda de microvilosidades intestinais e rearranjo dos componentes do citoesqueleto, resultando na formação de pedestais, nas quais ocorre adesão íntima da bactéria ao enterócito, com acúmulo de filamentos de actina nestas estruturas (FINLAY et al., 1992; KNUTTON et al., 1987; ROTHBAUM et al., 1982). A lesão foi originalmente descrita em 1983, que a partir de experimentos realizados em porcos e coelhos com amostras isoladas de humanos e de coelhos, observaram a capacidades destas cepas de causarem este tipo de lesão (MOON et al., 1983). Resultados similares haviam sido descritos previamente em experimentos como os de Polotsky et al. (1977), e Cravioto et al. (1979), que observaram que cepas de *E. coli* isoladas de surtos de diarreia apresentavam uma proporção mais elevada de adesão em células HEp-2, em comparação com outras cepas.

Figura 2 – Lesão *attaching and effacing* (A/E). Fonte: Pedroso et al., 1993.

A região LEE foi inicialmente classificada em cinco operons, denominados LEE1, LEE2, LEE3, LEE4 e LEE5. O gene que codifica a proteína reguladora Ler (*LEE-encoded regulator*) está localizado no operon LEE1, e é esse regulador que ativa todos os operons de LEE (MELLIES et al., 1999). O operon também possui, juntamente com LEE2 e LEE3, os genes que codificam as proteínas Esc (*EPEC secretion*) e Sep

(*secretion of EPEC proteins*), que constituem o sistema de secreção tipo III (TTSS), sistema pelo qual as proteínas envolvidas na infecção são translocadas e secretadas (CLEARY et al., 2004; KNUTTON et al., 1998; MELLIES et al., 1999). As proteínas produzidas e secretadas via TTSS, proteínas da família Esp (*EPEC-secreted proteins*), são codificadas pelos genes localizados em LEE4 (CLEARY et al., 2004; KNUTTON et al., 1998), e LEE5 contém o gene *eae*, o qual codifica a intimina, uma adesina que medeia a ligação íntima da bactéria à célula epitelial e o rearranjo dos feixes de actina na célula hospedeira, sob o local onde ocorre a adesão e a formação de pedestais (DONNENBERG; YU; KAPER, 1993; JERSE et al., 1990; JERSE; KAPER, 1991). O gene *tir* (*translocated intimin receptor*), que codifica a proteína que é translocada via TTSS da bactéria para a célula hospedeira, sendo inserida na membrana citoplasmática da célula e atuando como o receptor na intimina, também é localizado neste último operon (KENNY et al., 1997).

Figura 3 – Região LEE (*locus of enterocyte effacement*). Fonte: Hazen et al., 2017

Embora a classificação da região LEE em cinco operons seja a melhor conhecida e aceita, em estudos publicados por Yerushalmi et al. (2014) foi descrito, baseado em análises das regiões intergênicas dentro de LEE, um total de doze regiões com promotores ativos, contabilizado assim sete operons.

A ativação dos genes de LEE depende de diferentes fatores, como o regulador Per conforme mencionado anteriormente, e também do sistema de sinalização química conhecido como *quorum sensing*.

1.1.2 *Quorum sensing*

Diferente do que se acreditava antigamente, hoje sabe-se que as bactérias não se comportam como células individuais, mas sim como micro-organismos com capacidade de detectar sinalizações químicas originadas por bactérias nas comunidades em que se encontram e de outros organismos ao seu redor, indicando comunicação e interação entre elas.

Nealson, Platt e Hastings (1970) verificaram que a bactéria marinha bioluminescente *Vibrio fischeri* não apresentava bioluminosidade antes de atingir uma alta densidade celular. As bactérias produzem e secretam moléculas que são detectadas pelas próprias, e quando estas atingem uma determinada concentração decorrente do aumento da densidade da população bacteriana, inicia-se uma transdução de sinal em cascata, que leva à produção de luciferase, responsável pela bioluminiscência. A molécula secretada foi identificada posteriormente como uma molécula de acil homoserina lactona (AHL), e os genes envolvidos na sua produção e da produção da proteína à qual a molécula se liga foram identificados como *luxI* e *luxR*, respectivamente (FUQUA; WINANS; GREENBERG, 1994).

Este sistema de sinalização eventualmente foi denominado *quorum sensing* (QS), um sistema em que algumas bactérias têm a capacidade de produzir e secretar moléculas, às quais as próprias bactérias respondem quando chegam a uma certa densidade populacional (sendo assim denominadas *autoindutores*), com as moléculas produzidas atingindo uma concentração crítica, um nível de *quorum*, que resulta na ativação de fatores de transcrição que modulam a expressão das proteínas codificados pelos genes de interesse (KAPER; SPERANDIO, 2005). No caso de EPEC, Sircili et al. (2004) verificaram que QS está envolvido na modulação da patogenicidade de EPEC típicas, influenciando algumas de suas características principais como a formação de microcolônias, adesão em cultura de células epiteliais e regulação da expressão da fímbria tipo I e flagelo em amostras de EPEC típicas.

Hoje, sabe-se que esta comunicação bacteriana não está limitada entre as mesmas espécies de bactérias; de fato, bactérias conseguem responder a partir de

hormônios secretados pelo hospedeiro, com os quais os autoindutores apresentam funções parecidas (PARKER; SPERANDIO, 2009).

Atualmente pelo menos quatro sistemas de *quorum sensing* são reconhecidos: em bactérias gram-negativas, são encontrados sistemas utilizando autoindutor-1 (AI-1) e autoindutor-3 (AI-3), enquanto em bactérias gram-positivas é descrito um sistema de autoindução polipeptídica (AIP). O sistema utilizando autoindutor-2 (AI-2) é encontrado tanto em gram-negativas como em gram-positivas (PARKER; SPERANDIO, 2009).

O estudo realizado com *Vibrio fischeri* previamente mencionado descreve o sistema AI-1. O gene *luxI* controla a biossíntese de AHL, o autoindutor-1; sua síntese conta com a utilização de uma proteína carreadora de acil (ACP) e S-adenosilmetionina (SAM), que através da ação da enzima codificada por LuxI, produzem AHL e metil adenosina (SCHAEFER et al., 1996). Quando AHL atinge determinada concentração, a molécula é reconhecida e ligada à proteína LuxR, ativando a transcrição do gene alvo ligando-se ao promotor da luciferase (FUQUA; WINANS; GREENBERG, 1994). Este sistema está geralmente envolvido com a comunicação intraespécie (CURTIS; SPERANDIO, 2011; MILLER; BASSLER, 2001; PARKER; SPERANDIO, 2009), mas isso não significa que o sistema seja exclusivamente para esse tipo de comunicação, uma vez que bactérias como a *E. coli* codificam um homólogo de LuxR (SdiA, supressor da inibição da divisão) mas não uma AHL sintase (AHMER, 2004; SHANKAR et al., 2013; SMITH; AHMER, 2003; SOARES; AHMER, 2011; YAO et al., 2006), entretanto tem a capacidade de reconhecer AHLs de outras bactérias (AHMER, 2004; DYSZEL et al., 2010; JANSSENS et al., 2007).

A molécula SAM está envolvida também no sistema AI-2, servindo de precursor para a síntese do autoindutor-2 (SCHAUDER et al., 2001), uma molécula identificada como um furanosil borato diester em *Vibrio harveyi* (CHEN et al., 2002) e em bactérias como *E. coli* e *Salmonella*, uma furanona não boratada (referência). O gene envolvido na sua produção foi identificado como *luxS* (SURETTE; MILLER; BASSLER, 1999), cuja enzima codificada participa na clivagem do produto originado de SAM, que resulta na produção de AI-2. SAM age como doador de metil e é convertido ao intermediário S-adenosil homocisteína, uma molécula tóxica para a célula, que é hidrolisada em adenina e S-ribosil homocisteína (SRH) pela enzima Pfs. A proteína LuxS catalisa a

clivagem de SRH em homocisteína e 4,5-dihidroxi-2,3-pentanodiona (DPD), precursor instável de AI-2 (SCHAUDER et al., 2001; WALTERS; SIRCILI; SPERANDIO, 2006). Em *E. coli*, os genes responsáveis pela detecção de AI-2 são denominados *lsr* (*LuxS regulated*) (TAGA; SEMMELHACK; BASSLER, 2001). Autoindutores do tipo AI-2 possuem um papel na regulação de genes da região LEE envolvidos com a lesão A/E em EPEC e EHEC (SPERANDIO et al., 1999), e Sperandio et al. (2001) verificaram que *luxS* age como um regulador global em EHEC.

Em trabalho realizado por Sperandio et al. (2003) foi detectado uma molécula autoindutora distinta de AI-2, envolvida na transcrição de genes do sistema de secreção tipo III, mesmo na ausência de *luxS*. A molécula foi denominada autoindutor-3, e embora acreditava-se inicialmente que a síntese desta molécula estava associada a *luxS*, pois mutantes neste gene não eram capazes de produzir a molécula, estudos posteriores demonstraram que sua síntese não era dependente de *luxS* (WALTERS; SIRCILI; SPERANDIO, 2006).

O sistema AI-3, envolvido na transcrição de genes do sistema de secreção tipo III (TTSS), se destaca pela sua capacidade de reconhecer não somente as moléculas secretadas pelas bactérias, mas é também capaz de reconhecer e desencadear a transcrição gênica através das moléculas secretadas pelo hospedeiro, como adrenalina e noradrenalina. Estas moléculas são reconhecidas principalmente pelo sistema de dois componentes QseBC, no qual o gene *qseC* codifica um sensor histidina quinase que reconhece o autoindutor e as moléculas secretadas pela célula hospedeira, e ativa a transcrição do regulador *qseB*, resultando na transcrição de genes incluindo os de virulência, como é observado em EHEC (CLARKE et al., 2006; SPERANDIO; TORRES; KAPER, 2002).

Por anos acreditou-se que AI-3 fosse um composto aromático aminado semelhante aos hormônios adrenalina e noradrenalina (PARKER; SPERANDIO, 2009), pois em experimentos utilizando colunas C-18 com afinidade por catecolaminas hidrofóbicas que só podem ser eluídas com solventes orgânicos, apenas a fração eluída com 100% de metanol foi capaz de ativar a transcrição de LEE-1, assim como os hormônios adrenalina e noradrenalina. Entretanto, AI-3 não teve sua estrutura caracterizada por anos, até Kim et al. (2020) demonstrarem nos seus estudos que

análogos do autoindutor eram derivados de produtos originados de tironina desidrogenase (Tdh) e de reações “abortivas” de tRNA sintetase, as aminoacil-AMPs.

A ideia de causar interferência neste mecanismo de regulação, ou *quorum quenching*, tem emergido como uma possível estratégia para o controle da doença, visando inibir a virulência da bactéria sem necessariamente causar efeito bactericida (SANTHAKUMARI; RAVI, 2019). Os principais tipos de mecanismos de interferência na sinalização química incluem: competição pelo receptor, inibição da síntese de sinalização, degradação da molécula sinalizadora ou da proteína receptora, e inibição do sensor quinase. Esta estratégia oferece uma possível alternativa de terapia antimicrobiana ao uso de antibióticos, tendo como alvo apenas as funções essenciais à infecção tais como fatores de virulência, diminuindo assim, em teoria, a pressão seletiva bacteriana frequentemente observada em tratamentos envolvendo antibióticos. Essa proposta é também uma das ideias de como tratar infecções bacterianas mais persistentes, geralmente causadas devido à capacidade das bactérias de formarem comunidades que conferem proteção contra antibióticos, graças à formação de estruturas conhecidas como biofilmes.

1.1.3 Biofilme

Os micro-organismos raramente vivem como indivíduos isolados ou em culturas celulares puras como em laboratórios. No ambiente natural, grande parte deles são encontrados em comunidades de diversos micro-organismos aglomerados, formando estruturas conhecidas como biofilmes. Estas comunidades bacterianas são envoltas por uma matriz extracelular de exopolissacarídeos (EPS), e podem ser aderidas em quase qualquer tipo de superfície, sólida ou semi-sólida, abiótica ou biótica (COSTERTON, 1999; DONLAN; COSTERTON, 2002), permitindo assim que grande parte das bactérias em ambientes naturais sobrevivam nas diversas condições em que se encontram.

Embora uma única espécie bacteriana tenha a capacidade de produzir biofilmes, no ambiente biofilmes são raramente formados desta forma e geralmente são compostos por múltiplas espécies bacterianas (DAVEY; O'TOOLE, 2000), o que

confere a diversos micro-organismos que fazem parte da comunidade uma estratégia de sobrevivência no ambiente em condições adversas (COSTERTON et al., 1987).

O processo de formação do biofilme pode ser dividido em cinco etapas:

1. Bactérias planctônicas ou de vida livre, dispersas no meio, aderem a uma superfície aleatoriamente através de sua motilidade ou quimiotaxia. Para que a adesão bacteriana ocorra de fato, as forças de repulsão entre a sua superfície e a do substrato precisa ser superada. Esta aderência inicial, ainda reversível, é mantida por forças de Van der Waals, forças eletrostáticas, e interações hidrofóbicas (DUNNE, 2002; KUMAR; ANAND, 1998);
2. As bactérias começam a produzir adesinas específicas que interagem com a superfície, imobilizando os micro-organismos ao substrato e tornando a adesão bacteriana irreversível (KUMAR; ANAND, 1998);
3. Uma vez que a adesão da bactéria à superfície se torna irreversível, ela inicia o processo de desenvolver a arquitetura do biofilme. Neste estágio observa-se produção dos polímeros extracelulares que compõe a matriz de exopolissacarídeos (EPS), que irão envolver as células no interior do biofilme, provendo adesão e suporte estrutural (STOODLEY et al., 2002);
4. O biofilme maduro tem sua matriz com uma arquitetura mais complexa (biofilme maduro), composta por pilares de bactérias e rodeados por canais de água, que permitem que nutrientes e oxigênio alcancem o interior do biofilme, e que metabólitos excretados sejam eliminados. É também nesta etapa que o desenvolvimento de padrões específicos de crescimento é observado, além de diferenciação fisiológica e metabólica em comparação com células planctônicas (COSTERTON et al., 1995; WATNICK; KOLTER, 1999);
5. Finalmente, uma vez que o ambiente não é mais favorável para a manutenção do biofilme e este se torna insustentável, ocorre descolamento da superfície e as bactérias dispersas para o ambiente, reiniciando o ciclo. A dispersão pode ocorrer pela migração de células

individuais ou em agregados celulares (DAVEY; O'TOOLE, 2000; DONLAN; COSTERTON, 2002; DUNNE JR, 2002; STOODLEY et al., 2002).

A biomassa total do biofilme consiste aproximadamente de 90% de matriz de EPS, e apenas 10% desta biomassa é composta pelas células bacterianas (FLEMMING; WINGENDER, 2010), indicativo da relevância da EPS nesta estrutura. A principal importância da matriz de EPS é a proteção conferida às bactérias no biofilme, contra ações de antibióticos e outros agentes prejudiciais, além de permitir a coesão das células e a associação com outros micro-organismos (COSTERTON et al., 1994).

Biofilmes em bactérias entéricas como *E. coli* são compostos principalmente por amiloides, polissacarídeos, DNA, e outros componentes protéicos. No caso da *E. coli*, diversos trabalhos descreveram a importância da fímbria curli, celulose, fímbria tipo 1, e -motilidade na sua formação de biofilme.

A fímbria curli, uma proteína com estrutura amiloide e alto número de folhas beta-pragueadas em conformação terciária, é considerado o mais importante componente proteico do biofilme em *E. coli*. Sua presença pode ser visualizada utilizando o corante específico vermelho Congo, que possui afinidade por folhas beta-pragueadas (JONAS et al., 2007; ZOGAJ et al., 2001, 2003), e sua expressão pode ser detectada em laboratório quando a bactéria é crescida em condições de baixa temperatura em meio LB sem sal ou outros meios com baixo nível de nutrientes (OLSÉN et al., 1993).

Observada em *E. coli* em trabalhos como os de Chapman et al. (2002), esta proteína é uma das amiloides bacterianas mais estudadas e caracterizadas, sendo sua presença descrita também em outras enterobactérias. Em *E. coli*, esta proteína é responsável pelo desenvolvimento da arquitetura geral do biofilme, contribuindo para a formação da estrutura tridimensional com formato semelhante a um cogumelo, característica de biofilme maduro (COSTERTON et al., 1995; REISNER et al., 2003), a qual não é observada em *E. coli* com deficiência na expressão de curli.

Apesar de curli ser expressa *in vitro* em condições geralmente consideradas desfavoráveis a bactérias entéricas como a *E. coli*, há estudos que indicam que a

fímbria curli pode ser expressa *in vivo*. Por exemplo, em estudos realizados com isolados clínicos de *E. coli* uropatogênica de pacientes com infecções urinárias recorrentes, todas as cepas isoladas foram positivas para transcrição de *csgA*, cuja proteína codificada é uma das subunidades da fímbria curli (CORDEIRO et al., 2016). Curli também está associada a infecções sistêmicas, com a capacidade de ligar a proteínas do soro e da matriz extracelular eucariótica, como fibronectina, plasminogênio, e ativador deste último (HAMMAR et al., 1995; SJÖBRING; POHL; OLSÉN, 1994). O plasminogênio ativado degrada tecidos, o que sugere um mecanismo que facilita a disseminação da bactéria (CASTELLINO; PLOPLIS, 2005).

A síntese da fímbria curli é realizado pelas proteínas codificada pelos operons *csgDEFG* e *csgBAC* (*curli-specific gene*) (CHAPMAN et al., 2002). A proteína CsgD regula diretamente a ativação destes operons, e a transcrição de seu gene é regulado por reguladores globais como RpoS, OmpR, H-NS e IHF (*integration host factor*) (GERSTEL; PARK; RÖMLING, 2003). Embora o operon *csgDEFG* possa ser regulado por outros reguladores de transcrição incluindo os globais, CsgD possui um papel de grande importância na produção da fímbria; uma simples mutação pontual no gene *csgD* pode diminuir a produção da proteína em até três vezes (RÖMLING et al., 1998). A produção de CsgD também pode regular de forma indireta a produção de celulose, ativando o gene *yaiC*, cuja proteína codificada está envolvida na síntese do mensageiro secundário c-di-GMP (Bis-(3'-5')-monofosfato de guanossina cíclico), necessário para ativação máxima de *bcsA* (*bacterial cellulose synthesis*), que codifica um dos principais componentes para a síntese da celulose (BOEHM; VOGEL, 2012; SALDAÑA et al., 2009).

Geralmente identificada como o segundo maior componente da matriz do biofilme formado por Enterobacteriaceae (DA RE; GHIGO, 2006; FLEMMING; WINGENDER, 2010; ZOGAJ et al., 2003), a celulose é um polissacarídeo composto por unidades de D-glicopirranose ligadas umas às outras por ligações glicosídicas β -1 $\rightarrow$ 4 (RÖMLING, 2002), sintetizada e excretada por um complexo celulose-sintase inserido na membrana, consistindo de duas subunidades, BcsA e BcsB. As proteínas envolvidas são codificadas em dois operons, *yhjR-bcsQABZC* e *bcsEFG* (SERRA; RICHTER; HENGGE, 2013).

A celulose nos biofilmes de *E. coli* passa por um processo químico que modifica o polissacarídeo de forma a fortalecer o biofilme em sua estrutura e função (THONGSOMBOON et al., 2018). Essa celulose modificada gera filamentos que juntamente com a fímbria curli formam um complexo hidrofóbico que contém as bactérias de forma compacta em matrizes rígidas, tornando-as resistentes a condições de adversidades do meio externo (ZOGAJ et al., 2001). Estas estruturas formadas por curli e celulose tornam os biofilmes estáveis, contribuem na adesão a superfícies (SERRA; RICHTER; HENGGE, 2013), e também conferem elasticidade do biofilme (HUNG et al., 2013; THONGSOMBOON et al., 2018; ZOGAJ et al., 2003).

A celulose pode ser identificada cultivando as amostras em ágar contendo o corante calcofluor, que possui afinidade com β -glucanos, monômeros de D-glicose unidos por ligações β -glicosídicas (RÖMLING et al., 2003; SOLANO et al., 2002). O polissacarídeo também pode ser identificado em conjunto com a fímbria curli em ágar suplementado com os corantes vermelho Congo e Coomassie blue (BOKRANZ et al., 2005; RÖMLING, 2005; ZHOU et al., 2013). Bactérias que expressam tanto curli como celulose apresentam colônias com o morfotipo *rdar* (*red, dry, and rough*), de cor avermelhada e aparência rugosa. Bactérias que expressam apenas celulose apresentam colônias com morfotipo *pink, dry, and rough*, de cor rosada e aparência rugosa, enquanto bactérias que expressam apenas a fímbria curli produzem colônias de cor marrom e aparência rugosa (*brown, dry, and rough*). Bactérias duplo-mutantes incapazes de expressar curli ou celulose produzem colônias esbranquiçadas e com aparência lisa.

Em adição à fímbria curli e à celulose, outro fator considerado relevante à formação de biofilme em *E. coli* é a fímbria tipo 1, uma proteína filamentar encontrada na maior parte das cepas de *E. coli* e outras bactérias Enterobacteriaceae. A fímbria tipo 1 tipicamente está presente na superfície bacteriana em quantidades que podem variar entre 200 a 500 fímbrias, podendo chegar a até 1 μ m de comprimento (JONES et al., 1995; WRIGHT; SEED; HULTGREN, 2007).

A estrutura é composta principalmente pela subunidade proteica FimA, a qual serve como *scaffold* para a adesina FimH, localizada na ponta da fímbria (JONES et al., 1995). Esta adesina possui afinidade por manose, o que permite a interação bacteriana

a resíduos deste açúcar presentes nas células eucarióticas, facilitando assim, a infecção bacteriana (PRATT; KOLTER, 1998). Ela também é considerada por diferentes estudos como crítica para a formação de biofilme por *E. coli* em superfícies abióticas (COOKSON; COOLEY; WOODWARD, 2002; MOREIRA et al., 2003; PRATT; KOLTER, 1998), indicando que estas fímbrias auxiliam não apenas na adesão às células eucarióticas, mas também na adesão a superfícies abióticas (PRATT; KOLTER, 1998).

A relevância destas estruturas, no entanto, varia entre as diferentes amostras bacterianas, como demonstrado em estudos realizados por Sheikh et al. (2001), que observaram que estas fímbrias não foram tão importantes na formação do biofilme por EAEC tratadas com manose e anticorpo contra fímbria tipo 1, resultados contrários aos experimentos realizados com *E. coli* K-12 (MOREIRA et al., 2003; PRATT; KOLTER, 1998).

Outro fator levado em consideração quanto à relevância da formação de biofilmes, é a motilidade bacteriana. O flagelo bacteriano, apesar de não fazer parte da matriz do biofilme, geralmente é considerado estar envolvido na formação da estrutura, particularmente nas etapas iniciais de adesão e de dispersão da bactéria. Em *E. coli*, os flagelos são formados pelo filamentos polimerizados da subunidade proteica flagelina, a qual é codificada pelo gene *fliC* (FIELDS et al., 1997; MACNAB, 1992). A motilidade flagelar das bactérias gram-negativas contribui para a virulência bacteriana e pode ser controlada por sinalizações químicas via moléculas autoindutoras (FINLAY; FALKOW, 1997; PRATT; KOLTER, 1998; SPERANDIO; TORRES; KAPER, 2002). Apesar de ser um importante fator de virulência em EPEC e crítico para a formação de biofilme em *E. coli* K-12, especialmente na adesão inicial e colonização de áreas adjacentes à superfície onde a bactéria se adere, o flagelo não apresenta a mesma relevância em amostras de EAEC em experimentos realizados por Sheikh et al. (2001), uma vez que amostras mutantes em flagelina (deletadas em *fliC*) não tiveram a formação de biofilme alterada.

O biofilme pode ser um dos possíveis motivos para casos de diarreia persistentes causados por *E. coli*. Em *E. coli* diarreiogênicas (DEC), foi descrito anteriormente que EAEC produz biofilme regularmente (SHEIKH et al., 2001), fator que

é associado a infecções persistentes (CRAVIOTO et al., 1991). A formação de biofilme também foi descrita em outras amostras de DEC, e também em *E. coli* comensal (BISCOLA; ABE; GUTH, 2011; KUMAR; ANAND, 1998; PAWAR; ROSSMAN; CHEN, 2005; PRATT; KOLTER, 1998; REISNER et al., 2006; RYU; BEUCHAT, 2005; SHERLOCK et al., 2004; SHERLOCK; VEJBORG; KLEMM, 2005; VAN HOUTD; MICHELIS, 2005). No caso da EPEC, foi verificado por Moreira et al. (2006) a capacidade de formação de biofilme em superfícies abióticas como vidro e poliestireno, e também em superfícies bióticas como células pré-fixadas. Em 2010, Weiss-Muszkat et al. mostraram que amostras de EPEC atípica O55:H7 conseguem formar biofilmes em temperaturas mais baixas (26 °C) mas não a 37 °C. Já Culler et al. (2014) observaram a capacidade de amostras de EPEC atípica de formarem biofilme em superfícies abióticas ou celulares a 37 °C, demonstrando a heterogeneidade das amostras de EPEC atípica.

Devido ao biofilme oferecer um mecanismo de proteção física às bactérias graças ao EPS, mas também de permitir o desenvolvimento de diferenças fenotípicas à medida que o biofilme é desenvolvido (ITO et al., 2009), bactérias em biofilmes são mais resistentes a tratamentos com antibióticos, o que pode aumentar a pressão seletiva bacteriana, resultando em aumento de resistência bacteriana a esses tipos de tratamento. Portanto, a ideia de tratar os biofilmes é uma das propostas oferecidas como possibilidade de lidar com infecções bacterianas. Existem diferentes estudos já descritos de diferentes candidatos que apresentaram a capacidade de afetar biofilmes, estando entre eles diferentes produtos naturais extraídos de organismos como algas (HENTZER et al., 2002), e mais recentemente, de venenos de origem animal.

1.2 *Bothrops jararaca*

Serpente pertencente à família Viperidae, sub-família Crotalinae, gênero *Bothrops*, *Bothrops jararaca* (*B. jararaca*) é encontrada em diferentes regiões da América do Sul, sendo concentrada da região Sudeste do Brasil e partes do Paraguai e da Argentina (CACCIALI et al., 2019). É considerada uma das espécies mais importantes do ponto de vista médico, fazendo parte do grupo responsável pela maioria

dos acidentes ofídicos no Brasil. Sua picada em vítimas pode resultar em edemas e sangramento, e em casos mais graves, pode levar a hemorragia em regiões vitais, além de infecção e necrose na região picada, e insuficiência renal (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Baseado em resultados da análise do transcrito das glândulas de veneno desta espécie, os principais componentes do veneno de *B. jararaca* (BjV) identificados foram as metaloproteases, serinoproteases, lectinas do tipo C, proteínas ricas em cisteína, fosfolipases A2, L-aminoácido oxidases, e peptídeos potencializadores de bradicinina, com outros componentes identificados incluindo traços de componentes geralmente identificados em gêneros diferentes de serpentes (CIDADE et al., 2006; NICOLAU et al., 2017).

1.3 Venenos de serpentes

Apesar dos riscos que pode representar devido aos seus efeitos tóxicos, os venenos de serpentes possuem um longo histórico de uso para fins terapêuticos, com relatos do uso na medicina Ayurvédica desde o século VII para prolongar vidas e tratar problemas como artrite e doenças gastrointestinais (GLENN KING, 2013), mas foi apenas pelos anos 70 que venenos de origem animal passaram a ser de interesse para desenvolvimento de fármacos, começando com o desenvolvimento de Captopril, um anti-hipertensivo desenvolvido a partir da mimetização de um peptídeo potencializador de bradicinina (BPP) isolada do veneno de *B. jararaca* (BjV) (FERREIRA, 1965; FERREIRA; BARTELT; GREENE, 1970).

Estudos realizados com venenos isolados de diferentes espécies de serpente já descreveram componentes com importantes efeitos terapêuticos (WAHEED; MOIN; CHOUDHARY, 2017). Em estudo realizado por Nicolau et al. (2018), foi inferido que componentes de BjV também possuem efeitos contra micro-organismos incluindo bactérias, consistente com resultados previamente apresentados em estudos como os de Ciscotto et al. (2009). Foi também descrito trabalhos como os de Klein et al. (2015), no qual se observou a capacidade de uma lectina do tipo C isolada de veneno de inibir

formação de biofilmes de *Staphylococcus aureus* sem afetar o crescimento bacteriano em si.

Embora um dos primeiros fármacos desenvolvidos a partir de um estudo envolvendo venenos de serpentes foi baseado em compostos de baixo peso molecular, como um BPP, por bastante tempo, grande parte dos trabalhos descritos em literatura envolvendo veneno de serpentes tem sido geralmente mais focada em compostos de alto peso molecular. Entretanto, nos anos recentes, as frações de baixo peso molecular começaram a receber mais atenção, como observado em estudos como os de Domingos et al. (2018) e Teerapo et al. (2019), nos quais componentes de baixo peso molecular presentes em venenos de origem animal apresentaram efeito contra biofilmes. Trabalhos como este fazem de venenos de serpentes candidatos de grande interesse em estudos envolvendo infecções bacterianas persistentes, possivelmente oferecendo ideias para alternativas futuras a tratamentos convencionais.

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi verificar a influência da fração de baixo peso molecular do veneno de *Bothrops jararaca* na virulência das amostras de *Escherichia coli* enteropatogênica atípica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras Bacterianas

Para este trabalho foram utilizadas as amostras de EPEC atípica BA 4157 (ONT:H25) e EPEC atípica BA 320 (O55:H7), originalmente isoladas de pacientes em Salvador e atualmente pertencentes à coleção do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan. Estudos anteriores caracterizaram ambas amostras como *eae+*/*EAF*-/*stx*-/*bfpA*- (BUERIS et al., 2007), com padrão de adesão agregativo para a amostra 4157 e com padrão de adesão localizado-like para a amostra 320 (ABE et al., 2009), e ambas amostras foram caracterizadas pela capacidade de formação de biofilme (CULLER et al., 2014).

As bactérias foram cultivadas a 37 °C em Caldo Lúria Bertani (LB). Os meios de cultura para o cultivo das amostras foram preparados conforme recomendações do fabricante. As culturas em meio líquido foram incubadas por 18 h em condições estáticas. A amostra foi mantida em estoques congelados a -20 °C em caldo LB acrescido de 40% (v/v) de glicerol.

3.2 Veneno de *Bothrops jararaca*

3.2.1 Amostra do veneno e fracionamento

As amostras liofilizadas de veneno de *Bothrops jararaca* foram gentilmente cedidas pela Central de Venenos do Instituto Butantan.

O fracionamento do veneno foi realizado via ultrafiltração, separando as diferentes partes do veneno segundo o seu peso molecular. A fração a ser selecionada foi a com peso molecular menor que 3 kDa, que apresentou resultados de interesse no trabalho anterior (YANG, 2015).

Inicialmente, o veneno bruto foi resuspenso em água, e esta amostra foi colocada em colunas para ultrafiltração (VivaSpin 6, GE Healthcare) com membrana de peso molecular de corte (*molecular weight cut-off* (MWCO)) de 3 kDa, e centrifugada

por 45 a 55 min a 8500 g e 4 °C. O processo foi repetido até toda a amostra ser filtrada, resuspendendo a parte retida em 1-2 mL de água destilada conforme necessário em cada repetição do processo. A amostra filtrada foi então liofilizada. Para a realização dos testes, com exceção da cromatografia, a amostra foi resuspendida em tampão PBS, de forma que a concentração final utilizada foi de 1000 ng/μL reação.

3.2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa

Para a definição do perfil da fração de interesse, foi realizada HPLC em fase reversa (*high-performance liquid chromatography* (RP-HPLC)). Uma alíquota de fração previamente liofilizada foi resuspendida em 1 mL de água destilada, e desta 50 μL foram aplicados em uma coluna C18 para RP-HPLC (Capcell Pak, Shiseido, Japão), para realização deste passo.

A coluna foi equilibrada com 0,1% ácido trifluoroacético (TFA) (solvente A) e eluída com um gradiente linear de concentração de acetonitrila mais 0,1% TFA (solvente B), de 10 a 40%, em velocidade de fluxo de 0,5 mL por minuto durante uma hora. Os perfis de eluição foram monitorados a 214 nm, 254 nm, e 280 nm utilizando-se um sistema cromatográfico ÄKTA (GE Healthcare).

3.3 Análises Fenotípicas

3.3.1 Curvas de crescimento

As curvas de crescimento das amostras foram obtidas a fim de verificar se a presença da fração do veneno causa alguma alteração no crescimento bacteriano que possa influenciar na leitura dos resultados dos testes fenotípicos realizados. As amostras foram cultivadas em caldo LB por 18 h a 37 °C e, em seguida, diluídas 1:100 em caldo LB e incubadas a 37 °C, sob agitação de 250 rpm, com ou sem adição da fração do veneno. A cada hora de crescimento foram realizadas medidas da DO_{600nm} até completar 6 a 7 horas de crescimento.

3.3.2 Ensaios de formação de biofilme com cristal violeta

A análise da formação de biofilme em superfície abiótica utilizando cristal violeta foi feita em placas de poliestireno, seguindo a metodologia descrita por Christensen e colaboradores (1985) e Sheikh e colaboradores (2001), com modificações. Os pré-inóculos foram cultivados por 18 horas a 37 °C em caldo LB em agitação, e em seguida diluídos 1:100 em placas de poliestireno de 96 poços (TPP, Suíça) em volume final de 200 µL, acrescidos da fração do veneno em diferentes períodos de tempo (45 min; 2 h 30 min; 6 h; 24 h). Para o controle negativo, as amostras foram incubadas com PBS.

Após os períodos de incubação, as placas foram lavadas com PBS três vezes para remoção de bactérias planctônicas. Em seguida o biofilme na placa foi pré-fixado com 200 µL de etanol a 75% por 10 minutos em temperatura ambiente. O fixador foi retirado e o biofilme foi corado com 200 µL de solução cristal violeta a 0,5% por 5 minutos. A placa foi lavada 4 vezes com PBS e colocada para secar em temperatura ambiente. Após secagem, o corante no biofilme foi solubilizado com etanol a 95% por 2 minutos em temperatura ambiente. Destes, 150 µL da solubilização de cada amostra foi colocada em uma nova placa, a qual foi utilizada para realização da leitura da absorbância a 595 nm em leitor de ELISA Multiskan® EX (ThermoFisher Scientific, EUA).

3.3.3 Expressão da fímbria Curli

Para o ensaio de produção de fímbria curli, as amostras bacterianas, crescidas na presença ou ausência da fração do veneno, foram plaqueadas em placas de ágar a 2% (1% ácido casamino; 0,15% extrato de levedura; 0,05% sulfato de magnésio), suplementadas com 40 µg/ml de Vermelho Congo (Merck, Alemanha) e 20 µg/ml de *Coomassie Brilliant Blue* G250 (Merck, Alemanha) a 26 °C e 37 °C a fim de identificar a expressão da fímbria curli através da observação das características de coloração das colônias bacterianas.

3.3.4 Produção de celulose

O ensaio de celulose foi realizado com plaqueamento das amostras bacterianas, crescidas em presença ou ausência da fração do veneno, em meio LB ágar sem sal suplementado com 100 µg/ml de Calcofluor (Sigma-Aldrich, EUA) a 26 °C e 37 °C. Produção de celulose foi identificada em uma luz ultra-violeta com comprimento de onda 366 nm.

3.3.5 Ensaio de motilidade

A motilidade das amostras foram verificadas de acordo com a metodologia descrita por Sperandio et. al (2002). As amostras foram crescidas previamente por 18 horas a 37 °C em LB, em presença ou ausência da fração do veneno, com diluição de 1:100. Com o auxílio de uma agulha, estas amostras foram inoculadas em placas de ágar semi-sólido (0,3% ágar bacteriológico, 0,25% NaCl e 1% triptona) e incubadas por 8 horas a 37 °C. Após esse período, os halos de crescimento observados nas placas foram medidos com o auxílio de uma fita métrica.

3.3.6 Ensaios de adesão em células epiteliais *in vitro*

3.3.6.1 Cultivo e preparo da linhagem celular HeLa

A linhagem celular HeLa foi cultivada em meio DMEM contendo antibiótico (Cultilab, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Brasil), em garrafas de 25 ml (TPP, Suíça), incubadas em estufa a 37 °C contendo 5% de CO₂ (CO₂ Water Jacketed Incubator, Forma Scientific Inc., EUA), durante 2 a 3 dias. Após esse período, o meio de cultivo foi removido e a monocamada celular lavada com 10 ml de PBS estéril (solução tampão salina-fosfato- cloreto de sódio 137 mM; cloreto de potássio 2,7 mM; fosfato de sódio dibásico 8,1 mM; fosfato de potássio monobásico 1,5 mM; pH 7,4). Essa solução foi desprezada, adicionando-se posteriormente 1 ml de Tripsina/EDTA (2,5g/L) estéril (Cultilab, Brasil) para o descolamento da monocamada

celular, a qual foi mantida em contato com a monocamada celular por 5 min em estufa de CO₂. Após esse período foram adicionados 3 ml de DMEM-SFB a 10% e a suspensão celular foi então ajustada através de contagem em câmara de Neubauer (Glastécnica) e diluída em DMEM-SFB a 10% de maneira a obter uma concentração final de 5×10^4 células/mL. Volumes de 1 mL foram transferidos para placas de poliestireno de 24 poços contendo lamínulas de vidro esterilizadas. As placas foram mantidas a 37 °C em estufa de CO₂ por 48 h, até atingir semi-confluência de crescimento celular.

3.3.6.2 *Ensaio de adesão em células HeLa*

O teste de adesão foi realizado segundo a metodologia descrita por Cravioto et al. (1979), utilizando-se monocamada semi-confluente de células dispostas em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro. Essas monocamadas semi-confluentes foram lavadas com PBS estéril pH 7,4 e, 960 µL de DMEM foram adicionados a cada poço da placa. Posteriormente, foram acrescentados 40 µL de cultura bacteriana mantida por 18h em caldo LB, acrescidos da fração do veneno. A preparação foi mantida em temperatura de 37 °C por um período de seis horas, sendo que em três horas as amostras foram lavadas com PBS estéril e foram adicionados 1 mL de meio DMEM.

Após esse período os poços foram lavados com PBS estéril e as células fixadas com metanol 100% por 30 min em temperatura ambiente ou overnight a 4 °C. Em seguida, as lamínulas foram coradas com solução May-Grünwald 0,2% (Merk, Alemanha) por 5 minutos, e por fim, com corante Giemsa (Merk, Alemanha) por 20 minutos após desprezar o corante anterior. As lamínulas de vidro foram enxaguadas em água corrente até a retirada do excesso do corante. Finalmente, após a secagem em temperatura ambiente e fixação das lamínulas de vidro com Entellan (Merk, Alemanha), a observação foi feita em microscópio óptico, em aumento de 400 vezes.

3.3.6.3 Quantificação das bactérias aderidas às células epiteliais

Para a contagem de unidades formadoras de colônia (ufc) para o aspecto quantitativo do ensaio, foi utilizado o protocolo adaptado de Letourneau et al. (2011), utilizando-se monocamada semi-confluyente de células em placas de 24 poços, sem lamínulas adicionadas nas placas. As células foram lavadas com PBS estéril pH 7,4 e, 960 μL de DMEM foram adicionados a cada poço da placa. Posteriormente, foram acrescentados 40 μL de cultura bacteriana mantida por 18h em caldo LB, acrescidos da fração de veneno. A preparação foi mantida em temperatura de 37 °C por um período de seis horas para ambas amostras, ONT:H25 e O55:H7.

Após incubação e subsequente lavagem com PBS, são adicionados 100 μL de 1% Triton X-100 em cada poço para lisar as células e soltar as bactérias aderidas. As células são incubadas em temperatura ambiente por 10 minutos, e esta suspensão é homogeneizada e diluída em série até chegar à ordem de grandeza necessária para obtenção de um número contável de ufc/cm².

3.4 Análise transcricional

3.4.1 Extração de RNA

Para a realização da análise da transcrição de genes de interesse, foi realizada a extração de RNA total das amostras bacterianas. O pré-inóculo foi cultivado inicialmente em 3 mL de LB a 37 °C por 18 horas. As amostras foram diluídas 1:100 em 10 mL de caldo LB com adição da fração de veneno e crescidas a a 37 °C sob agitação de 150 rpm. O crescimento foi monitorado por leitura da absorbância a 600 nm via espectrofotômetro (Biophotometer Plus, Eppendorf) até atingir a DO₆₀₀ entre 0,5 e 0,6. Após esse período o RNA das amostras foi extraído utilizando o PureLink™ RNA Mini Kit (ThermoFisher Scientific, EUA), seguindo o protocolo do fabricante, e tratado com duas unidades de DNase A para cada micrograma de RNA (New England Biolabs, Reino Unido) para remover o DNA contaminante. A quantificação do RNA foi realizada

em NanoDrop (Biophotometer Plus, Eppendorf) por leitura da absorbância em comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm.

3.4.2 PCR em Tempo Real

A análise transcricional foi realizada utilizando o sistema *Sybr Green* em uma reação de dois passos utilizando a plataforma *Applied Biosystems ABI 7500 Fast Real Time PCR system* (Applied Biosystems, EUA). Para o preparo da amostra, um micrograma do RNA previamente extraído foi convertido em cDNA utilizando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, EUA).

Para cada 25 µL de reação de amplificação foram utilizados 4 µL de cDNA, 12,5 uL de 2X SYBR® *Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, EUA), 0,75 uL de cada primer a 5 µM, completando o volume com água livre de nuclease. As condições de amplificação foram: um ciclo a 95 °C por 10 segundos, 45 ciclos a 95° C por 15 segundos e 60° C por 1 minuto.

Os oligonucleotídeos dos genes de interesse *ler*, *csgD*, *bcsA* e *fimA* foram obtidos do fabricante Invitrogen (Invitrogen, EUA), para o controle endógeno, foi selecionado o gene *rpoA*. As sequências dos iniciadores utilizados estão listados na **Tabela 1**. Os dados gerados foram analisados utilizando o *7500 software v2.0.5* (Applied Biosystems, EUA). Os dados foram normalizados com os níveis de transcrição do gene *rpoA* e os níveis transcricionais dos genes estudados foram quantificados pelo método de quantificação relativa, expressos como diferenças comparadas com os níveis da amostra utilizada como controle.

Tabela 1 – Iniciadores utilizados nas reações de qRT-PCR.

Iniciadores	Sequência (5' – 3')	Referência
bcsA_RT	F – AGCTCGGCTTCCGTGGC R – TCATTGTTGAGCCAAAGCCT	Culler et al., 2018
csgD_RT	F – GGTAACATATCGTTATAACAGCA R – TGCCCAGGAAACCGCTTG	Culler et al., 2018
fimA_RT	F – TGTCCCTCAGTTCTACAGCG R – TCCTAACTGAACGGTTTGATC	Sharma; Bearson; Bearson, 2010
ler_RT	F – CGACCAGGTCTGCCCTTCT R – GCGCGGAACATCATCGAAA	Walters; Sperandio, 2006
rpoA_RT	F – GCGCTCATCTTCTTCCGAAT R – CGCGGTCGTGGTTATGTG	Njoroge; Sperandio, 2012

3.5 Análises estatísticas

Análises estatísticas foram realizadas aplicando o *teste t de Student*, utilizando o software GraphPad Prism 6.0. Resultados com valores calculados de *p* menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Cromatograma de HPLC da fração menor que 3 kDa do veneno de *B. jararaca*

Após filtração do veneno, a fração obtida foi submetida ao processo de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa para observação do seu perfil. O cromatograma se encontra na **figura 4**. Para total eluição da fração, um gradiente de até 40% de acetonitrila foi suficiente para total eluição dos componentes, como pode ser observado no cromatograma apresentado.

Figura 4 – RP-HPLC da fração menor que 3 kDa. O perfil de eluição foi monitorado a 214 nm, 254 nm, e 280 nm.

4.2 Curva de crescimento

Para verificar se a presença de fração de veneno afeta o crescimento bacteriano, foi primeiramente realizada a análise das curvas de crescimento das amostras. Os resultados apresentados nas **figuras 5 e 6** indicam que não há diferença significativa nos crescimentos das amostras acrescidas de fração, em comparação com as amostras controle.

Figura 5 – Curva de crescimento da amostra ONT:H25 com ou sem adição de fração de veneno (fBjV) em caldo LB a 37 °C. A presença da fração não afetou o crescimento bacteriano em comparação com a amostra controle (sem fração adicionada).

Figura 6 – Curva de crescimento da amostra O55:H7 com ou sem adição de fração de veneno (fBjV) em caldo LB a 37 °C. A presença da fração não afetou o crescimento bacteriano em comparação com a amostra controle (sem fração adicionada).

4.3 Formação de biofilme em superfície abiótica – Ensaio com cristal violeta

Para análise de formação de biofilme em superfície abiótica, foi realizado ensaio colorimétrico com cristal violeta, que visa medir de forma indireta o número de células bacterianas aderidas em uma superfície, com base na coloração da camada de peptidoglicano. O ensaio foi realizado a 26 °C e a 37 °C em diferentes períodos de tempo para observar como a fração do veneno afeta a formação de biofilme em superfícies abióticas ao longo do tempo. Os resultados estão apresentados nas **figuras 7 a 10**.

No período inicial no qual a quantidade de biofilme formada foi analisada (45 minutos), na pouca quantidade absoluta de biofilme em todos os testes, as quantidades de biofilme variaram entre eles, embora as amostras com fração aparentavam ter uma quantidade maior de biofilme em comparação com as amostras controle.

As diferenças começaram a ser observadas de uma maneira mais nítida nos períodos seguintes nos quais a formação de biofilme foi analisada para a amostra ONT:H25. Após 2h e 30 minutos de inoculação, testes com a amostra ONT:H25 nos

quais a fração do veneno foi adicionada apresentaram uma média de quantidade de biofilme formado menor que em testes controle a 37 °C. Apesar de apresentar uma tendência parecida a 26 °C, a quantidade absoluta de biofilme formada a essa temperatura ainda era pouca, e a diferença entre os testes com fração e os testes controle não foi estatisticamente significativa. Já após 6 horas de inoculação, a quantidade de biofilme nas amostras inoculadas com a fração do veneno foi maior do que em testes com as amostras controle inoculadas durante o mesmo período de tempo para ambas temperaturas. Finalmente, após 24 horas de inoculação, não foi observado diferença estatisticamente significativa entre os testes controle e os testes tratados com fração, apesar dos testes com a fração apresentarem uma média menor de quantidade de biofilme.

No caso da amostra O55:H7, os resultados observados foram mais variados nos intervalos de tempo em que foi medida a DO_{595nm} da solubilização de cristal violeta usado para corar as inoculações. A maioria dos testes não apresentou diferença estatisticamente significativa em comparação com os testes com as amostras controle, e a DO_{595nm} ainda era baixa após o período total de 24 horas. As exceções com respeito às diferenças estatísticas foram os seguintes testes: incubação a 26 °C por 45 minutos, um intervalo de tempo muito curto para observar o efeito da fração na formação de biofilme; e incubação a 37 °C por 24 horas, mas o valor medido da DO_{595nm} é baixo.

Figura 7 – Formação de biofilme em placas de poliestireno pela amostra ONT:H25 ao longo do tempo em caldo LB a 37 °C (cinética), na presença ou ausência da fração de veneno (fBjV). Diferenças significativas ($p < 0,05$) de produção de biofilme foram observadas após períodos de incubação de 2,5 horas e de 6 horas.

Figura 8 – Formação de biofilme em placas de poliestireno pela amostra ONT:H25 ao longo do tempo em caldo LB a 26 °C (cinética), na presença ou ausência da fração de veneno (fBjV). Diferenças significativas ($p < 0,05$) de produção de biofilme foram observadas após período de incubação de 6 horas.

Figura 9 – Formação de biofilme em placas de poliestireno pela amostra O55:H7 ao longo do tempo em caldo LB a 37 °C (cinética), na presença ou ausência da fração de veneno (fBjV).

Figura 10 – Formação de biofilme em placas de poliestireno pela amostra O55:H7 ao longo do tempo em caldo LB a 26 °C (cinética), na presença ou ausência da fração de veneno (fBjV).

4.3 Expressão de fímbria curli – Vermelho Congo

Para verificar a expressão da fímbria curli, as amostras foram semeadas em placas de ágar contendo o corante vermelho congo. A fímbria curli é uma proteína filamentosa de estrutura amilóide e com alto número de folhas beta-pragueadas, as quais permitem a ligação ao corante vermelho congo. Neste ensaio, a expressão da fímbria curli é observada pela coloração vermelha da colônia. É também possível identificar a produção de celulose, que juntamente com a fímbria curli produzida resulta em um aspecto rugoso na colônia crescida no ágar utilizado para este tipo de ensaio. Para melhor contraste visual das colônias, o corante Coomassie Blue é utilizado em adição ao vermelho congo.

Após 24 horas de incubação a 26 °C, a amostra ONT:H25 apresentou o morfotipo *rdar* (*red, dry, and rough*) tanto nos testes com fração de veneno adicionada como nos testes controle, indicando a produção da fímbria curli e de celulose independentemente da presença ou ausência da fração do veneno, embora a amostra que teve a fração adicionada apresentou uma rugosidade menos acentuada na região interna da colônia exceto pela formação de um anel em volta do centro, em contraste com o teste controle onde observou-se uma rugosidade mais acentuada no centro (**Figura 11**). A 37 °C a amostra apresentou colônias lisas, com coloração avermelhada no centro e bordas esbranquiçadas, sem diferenças visuais entre os testes com fração e os testes controle (**Figura 12**).

A amostra O55:H7 também apresentou uma coloração avermelhada da colônia após incubação de 24 horas a 26 °C, e o morfotipo *rdar* foi observado na colônia como todo, embora a rugosidade estava mais acentuada na região mais externa da colônia, seguida por uma região mais lisa de crescimento (**Figura 13**). Não foi observado diferença visual significativa entre os testes realizados com fração de veneno em comparação com os testes controle. Quando incubada a 37 °C, as colônias apresentaram coloração avermelhada com bordas esbranquiçadas e sem rugosidade, tanto nos testes com fração de veneno como nos testes controle (**Figura 14**).

Figura 11 – Ensaio de expressão da fímbria curli na amostra ONT:H25 após 24 horas de incubação a 26 °C. Tanto a amostra controle (esquerda) como a amostra com fração de veneno adicionada (direita) apresentaram fenótipo *rdar* (*red, dry, and rough*), embora a amostra com a fração apresentou uma rugosidade menos acentuada na região mais interna da colônia.

Figura 12 – Ensaio de expressão da fímbria curli na amostra ONT:H25 após 24 horas de incubação a 37 °C. Tanto o teste controle (esquerda) como o teste com fração (direita) apresentaram colônias lisas com bordas esbranquiçadas.

Figura 13 – Ensaio de expressão da fímbria curli na amostra O55:H7 após 24 horas de incubação a 26 °C. Tanto o teste controle (esquerda) como o teste com a amostra com fração de veneno adicionada (direita) apresentaram fenótipo *rdar* (*red, dry, and rough*) mais acentuado na região mais externa da colônia, indicando a expressão da fímbria curli. Não foi observado diferença visual significativa entre os testes.

Figura 14 – Ensaio de expressão da fímbria curli na amostra O55:H7 após 24 horas de incubação a 37 °C. Tanto o teste controle (esquerda) como o teste com fração (direita) apresentaram colônias lisas com bordas esbranquiçadas.

4.4 Produção de celulose - Calcofluor

Para observar a produção de celulose, foi utilizado o corante calcofluor, o qual é específico para ligações glicosídicas β 1-4 de que consistem o polissacarídeo, permitindo assim a visualização da estrutura sob fluorescência a 366 nm (ZOGAJ et al., 2001). O teste foi realizado a 26 °C e a 37 °C, por um período total de 24 horas.

Os resultados do ensaio podem ser observados nas **figuras 15 e 16**. Todas as amostras apresentaram produção de celulose, e embora o teste seja de aspecto qualitativo, a presença de celulose foi visualmente mais intensa nos testes incubados a 37 °C do que em testes realizados a 26 °C, com O55:H7 apresentando produção mais intensa. A presença da fração de veneno no teste não pareceu afetar a produção de celulose, uma vez que os resultados dos testes foram parecidos em comparação com os testes controle.

Figura 15 – Ensaio de produção de celulose na amostra ONT:H25 após 24 horas de incubação, sob luz de fluorescência. A produção de celulose foi visualmente menos intensa a 26 °C (esquerda) que a 37 °C (direita), e a presença da fração do veneno não aparentou afetar a produção de celulose.

Figura 16 – Ensaio de produção de celulose na amostra O55:H7 após 24 horas de incubação, sob luz de fluorescência. A produção de celulose foi visualmente menos intensa a 26 °C (esquerda) que a 37 °C (direita), e a presença da fração do veneno não aparentou afetar a produção de celulose.

4.5 Motilidade – Ensaio em ágar semi-sólido

Para observar se a presença da fração de veneno afeta a motilidade da amostra, foi realizado o ensaio de motilidade em ágar semi-sólido. A capacidade de migração da amostra promovida pela movimentação flagelar da bactéria corresponde ao diâmetro medido do halo formado no ágar semi-sólido após incubação.

Os resultados do ensaio estão apresentados nas **figuras 17 e 18**. A presença da fração do veneno nos testes não aparentaram afetar a motilidade da bactéria, tanto na amostra ONT:H25 como na amostra O55:H7.

Figura 17 – Ensaio de motilidade de ONT:H25 em ágar semi-sólido. O halo produzido (esquedra) corresponde à capacidade de migração da amostra, promovida pela movimentação flagelar. Os valores médios dos diâmetros medidos a partir dos halos indicam que a presença da fração do veneno (fBjV) não afeta a motilidade da amostra, conforme indicado no gráfico (direita).

Figura 18 – Ensaio de motilidade de O55:H7 em ágar semi-sólido. O halo produzido (esquedra) corresponde à capacidade de migração da amostra, promovida pela movimentação flagelar. Os valores médios dos diâmetros medidos a partir dos halos indicam que a presença da fração do veneno (fBjV) não afeta a motilidade da amostra, conforme indicado no gráfico (direita).

4.5 Adesão bacteriana em células HeLa – Ensaio de adesão *in vitro*

Sabendo-se que a amostra ONT:H25 possui um padrão de adesão agregativa e a amostra O55:H7 um padrão de adesão localizada-like em células epiteliais *in vitro*, foi realizado o ensaio em células HeLa para observar como a presença da fração do veneno pode afetar a adesão bacteriana.

As **figuras 19 e 20** correspondem aos resultados da interação entre as células e as amostras ONT:H25 e O55:H7, respectivamente. Como pode ser observado nas figuras, a presença da fração do veneno não aparenta afetar de maneira significativa os padrões de adesão, com cada amostra formando suas respectivas adesões, agregativa para a amostra ONT:H25 e localizada-like para a amostra O55:H7 após incubação por 6 horas.

Os resultados dos testes realizados para análise do aspecto quantitativo corroboraram com estas observações. As amostras que tiveram a fração do veneno adicionada aos testes apresentaram uma média levemente maior de unidades formadoras de colônia (ufc) em comparação com os testes controle, mas a diferença entre elas não foi estatisticamente significativa (**Figura 21**).

Figura 19 – Ensaio de adesão de ONT:H25 em células HeLa após 6 h de interação, observados em microscopia óptica em aumento de 400x. O padrão de adesão agregativa, característica da amostra, nos testes realizados com fração de veneno adicionada (direita) não foi afetado de forma significativa em comparação com os testes controle (esquerda).

Figura 20 – Ensaio de adesão de O55:H7 em células HeLa após 6 h de interação, observados em microscopia óptica em aumento de 400x. O padrão de adesão localizada-*like*, característica da amostra, nos testes realizados com fração de veneno adicionada (direita) não foi afetado de forma significativa em comparação com os testes controle (esquerda).

Figura 21 – Representação quantitativa de bactérias aderidas às células HeLa. A diferença da média do número de unidades formadoras de colônia (ufc) contadas nos testes não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

4.6 Análise transcricional – qRT-PCR

O próximo passo foi a análise da transcrição dos genes envolvidos nas características fenotípicas analisadas. Como a diferença de resultados fenotípicos foi observada apenas na amostra ONT:H25, a análise transcricional foi focada nela.

Para o teste de qRT-PCR, foram escolhidos os genes *csgD*, *bcsA*, e *fimA*, envolvidos respectivamente com a produção de fímbria curli, celulose e fímbria tipo I e também relacionados com a formação de biofilme. Foi também analisada a transcrição do *ler*, apesar de fenotipicamente não ter sua influência observada na amostra ONT:H25 (não forma a lesão A/E, e os genes envolvidos são codificados na região LEE, regulada por Ler). A amostra foi crescida em meio LB com ou sem adição de fração até atingir a DO_{600nm} 0,6 para a extração do RNA total. Os resultados estão apresentados na **figura 22**. A presença da fração diminuiu em quase metade a transcrição dos genes *csgD* (0,586), *bcsA* (0,541), e *ler* (0,566), enquanto a transcrição de *fimA* (0,948) foi pouco afetada.

Figura 22 – Análise transcricional na amostra ONT:H25 de *csgD*, *bcsA*, e *fimA*, genes envolvidos na formação de biofilme, e de *ler*, regulador da região LEE.

5 DISCUSSÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde, as doenças infecciosas continuam a matar milhões de pessoas, e são consideradas uma das maiores ameaças globais na área da saúde a serem enfrentadas nesta década (WHO, 2020). Infecções provenientes de bactérias representam um desafio particular na área da saúde pública devido ao aumento de cepas cada vez mais resistentes a tratamentos convencionais com antibióticos. Um possível fator que contribui para o aumento de resistência bacteriana é a sua capacidade de formar biofilmes, que podem conferir à bactéria mudanças fenotípicas que permitem maior resistência a situações adversas no ambiente externo, do que quando em forma planctônica (ITO et al., 2009), além de mais oportunidades de transferência horizontal de material genético de outros micro-organismos presentes na comunidade, e proteção oferecida pela própria estrutura do biofilme (FLEMMING; WINGENDER, 2010). No caso de EPEC, sabe-se que estas são capazes de formar biofilme em diferentes condições, e isso pode ser uma explicação para os casos de diarreia persistente.

Uma das maneiras de como biofilmes controlam sua população é através do processo de sinalização química, o *quorum sensing* (QS), no qual as bactérias produzem e secretam moléculas autoindutoras (DAVIES et al., 1998). Estas são detectadas pelos receptores na bactéria quando elas atingem uma concentração crítica resultante do aumento da densidade populacional, desencadeando uma série de reações que ativam ou reprimem os genes alvo. Este mecanismo de regulação permite que as bactérias respondam de forma que a comunidade bacteriana mantenha sua densidade populacional em níveis sustentáveis (NADELL et al., 2008), além de contribuir na modulação da virulência de bactérias como a EPEC (SIRCILI et al., 2004).

A ideia de causar interferência em QS para afetar a virulência da bactéria em oposição a causar efeito bactericida tem sido proposta na ciência como uma possível alternativa a tratamentos convencionais com antibióticos. A aplicação de tal estratégia poderia não apenas diminuir a pressão seletiva causada por antibióticos, mas também proteger o hospedeiro de riscos mais graves caso fosse tratado de forma convencional. Existem diferentes formas pelas quais QS pode ser afetado, de inibição da síntese do

autoindutor e bloqueios das cascatas de transdução de sinais, à inibição ou degradação enzimática da molécula sinalizadora, e até mesmo competições com outras moléculas análogas podem contribuir na interferência deste mecanismo de sinalização (PALUCH et al., 2020).

Como a formação de biofilmes representa um importante fator de virulência para as bactérias, a ideia de desenvolver tratamentos com efeito contra biofilmes é de grande interesse atualmente. Diversos candidatos já foram estudados e descritos em literaturas, e nos anos recentes, venenos de origem animal têm recebido cada vez mais interesse por possuir uma variedade de componentes com efeitos biológicos inclusive contra micro-organismos. Frações de baixa massa molecular, em particular, têm nos anos recentes recebido maior atenção, com trabalhos descritos nos quais essas frações afetaram negativamente a formação de biofilmes sem causar efeito bactericida (DOMINGOS et al., 2018; TEERAPO et al., 2019). Estas frações podem ser de interesse quanto ao seu possível efeito em biofilmes do ponto de vista de sistemas de regulação como QS, com a possibilidade de seus componentes serem potenciais candidatos a competirem com as moléculas autoindutoras da bactéria ou de interferir de alguma outra forma a sinalização química que regula o mecanismo de virulência.

Tendo isso em vista, o objetivo desse estudo foi de observar os efeitos da fração de baixo peso molecular do veneno de *Bothrops jararaca* em duas amostras de EPEC atípicas e ver se há possível interferência em seu fator de virulência como formação de biofilme e aderência em células epiteliais, além de testes fenotípicos e análise transcricional dos principais genes envolvidos na estrutura do biofilme.

Com base no estudo previamente realizado (YANG, 2015), onde tanto a fração maior que 3 kDa como a menor que 3 kDa foram testadas em ensaios de adesão de EPEC com células hospedeiras, foi selecionado para este estudo a fração menor, que apresentou resultados de interesse nestes testes fenotípicos como a adesão bacteriana às células HEp-2 (YANG, 2015). Trabalhos como os de Sciani et al. (2017) indicam que na fração selecionada, as diferentes frações observadas (“picos”) via RP-HPLC e analisadas via espectrometria de massa, é observada a presença de componentes de baixa massa molecular (< 1 kDa), como peptídeos potencializadores de bradicinina, por exemplo. Estes componentes, portanto, apresentam potencial para possível

competição com moléculas autoindutoras bacterianas (também caracterizadas pela sua baixa massa molecular), podendo assim interferir no mecanismo de virulência da bactéria sem necessariamente causar pressão seletiva geralmente observada em tratamentos com antibióticos.

Para uma rápida obtenção da fração, foi aplicado o método de ultrafiltração utilizando membranas de corte com MWCO (*molecular weight cut-off*) de 3 kDa. Apesar de sua praticidade em obter uma fração de veneno dentro da faixa de peso molecular desejado, poucos trabalhos em literatura descrevem o uso desta metodologia. Uma possível explicação para isso são relatos de que utilizando este método de filtração não apresentou resultados satisfatórios quanto a obter frações de interesse. Entretanto, a análise do cromatograma da fração obtida neste estudo via RP-HPLC mostrou a presença de diferentes frações nela, e o perfil observado corrobora com trabalhos anteriores que utilizou a mesma técnica para obtenção da fração de interesse (SCIANI et al., 2017), indicando que a aplicação de uso de membranas de ultrafiltração é uma metodologia viável para estudos como este.

O primeiro passo após obtenção da fração do veneno foi de verificar o possível efeito da fração no crescimento da bactéria. No trabalho anterior, foi realizado ensaio colorimétrico utilizando resazurina para determinar se a fração possui algum efeito bactericida (YANG, 2015), possível de se observar baseado na redução do reagente (mudança de cor azul para vermelho/cor-de-rosa). Feito originalmente em amostras de EPEC típicas, os resultados indicaram que a fração não possui efeito bactericida, então este ensaio não foi repetido no atual estudo. Entretanto, é importante verificar que qualquer efeito que a fração possa apresentar não seja derivado de interferência no crescimento bacteriano, o que poderia influenciar a leitura dos resultados dos outros testes. Como pode-se observar nas **figuras 4 e 5**, nenhuma das amostras que foram crescidas na presença da fração do veneno apresentou diferença quando em comparação com as amostras em teste controle, então foi possível concluir que a fração do veneno não afeta o crescimento bacteriano e resultados de outros testes não são influenciados por esse fator.

Após confirmação de que a fração do veneno não afeta o crescimento, o próximo passo foi verificar a influência da fração na formação de biofilme. Para isso, foi

realizado o ensaio colorimétrico utilizando cristal violeta, que permite uma quantificação indireta da biomassa presente no biofilme formado pelas amostras. As amostras ONT:H25, caracterizadas pela sua grande capacidade de formar biofilmes (CULLER et al., 2014), foram visivelmente mais afetadas que as amostras O55:H7 (**figuras 6 e 7**). Em análise da quantidade de biomassa do biofilme formado, após 2 horas e meia desde inoculação, a fração do veneno aparentava afetar negativamente a formação do biofilme, entretanto após seis horas de incubação, a quantidade de biomassa do biofilmes das amostras com fração foi maior em comparação com o controle. Eventualmente, após 24 horas de incubação, a biomassa calculada do biofilme de amostras com fração foi menor em comparação com seis horas, entretanto a diferença entre esta e a do teste controle não foi estatisticamente significativo, corroborando com experimentos iniciais realizados neste projeto, onde testes realizados por 24 horas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre as amostras com fração e o controle (dados não mostrados).

Esses resultados indicam que a fração do veneno possivelmente modula a formação de biofilme em ONT:H25, de forma aparentemente temporária. Sabendo-se que QS é um dos mecanismos utilizados pela bactéria quanto à formação de biofilme, existem diferentes possibilidades de como a presença da fração afeta a bactéria. Uma poderia ser a existência de diferentes componentes dentro desta fração que afetam a bactéria de formas diferentes, já que o experimento foi realizado com uma fração separada por massa molecular, e não com isolados mais específicos. Outra hipótese seria que a fração do veneno ao todo inicialmente afeta a bactéria negativamente, uma vez que os componentes dela são diferentes dos autoindutores bacterianos e poderiam afetar a ação das moléculas sinalizadoras da bactéria ou até competir com elas (PALUCH et al., 2020). Entretanto, *E. coli* tem uma alta capacidade de se adaptar às mudanças em seu ambiente externo (VAN ELSAS et al., 2011), além de possuir receptores em seu mecanismo de regulação com a capacidade de usar moléculas provenientes de outras bactérias e até hormônios secretados por hospedeiros (AHMER, 2004; DYSZEL et al., 2010; JANSSENS et al., 2007; SPERANDIO et al., 2003; WALTERS; SPERANDIO, 2006), o que poderia explicar o aumento da quantidade de biofilme da amostra poucas horas depois.

Em O55:H7 os resultados foram mais variados, com uma quantidade baixa de biofilme, dificultando uma comparação entre os testes. Estes testes por sua vez, quando comparados entre si nos períodos em que tiveram a biomassa do biofilme calculada, a maior parte não apresentou diferenças estatisticamente significativas. Embora os resultados aparentem contradizer os de Weiss-Muszkat et al. (2010), é importante ressaltar que a formação robusta de biofilme observada nos experimentos desse estudo foi observada após um período de tempo maior que 24 horas.

Apesar de ser um dos ensaios mais aplicados para a análise de formação de biofilme para cálculo de biomassa, o ensaio colorimétrico com cristal violeta possui certas limitações devido à grande variação de resultado para resultado. É importante que outros testes, como contagem de unidades formadoras de colônia (ufc) das bactérias viáveis, seja levado em consideração para estudos futuros visando corroborar os resultados iniciais deste trabalho. Outro ensaio que pode ser relevante é de visualizar, através de microscopia confocal a laser, a formação de biofilme em lamínulas de vidro, incubadas em placas e subsequentemente tratadas e coradas conforme protocolo mencionado por Culler et al. (2018).

Verificado efeito da fração do veneno na formação de biofilmes, a etapa seguinte foi de observar sua influência nas estruturas que compõem a matriz do biofilme, considerando a importância destas mencionada em diversos estudos e revisões, como a fímbria curli, celulose, fímbria tipo 1, e motilidade.

Para análise da fímbria curli e da celulose, foram realizados ensaios utilizando placas com ágar contendo o corante vermelho Congo ou o corante calcofluor nos testes fenotípicos, e para a análise transcricional foram selecionados os genes *csgD* e *bcsA*, respectivamente. Para a fímbria tipo 1 foi realizada análise transcricional selecionando o gene *fimA*, e a motilidade foi observada com ensaio fenotípico utilizando ágar semi-sólido. A parte transcricional foi focada na amostra ONT:H25, que apresentou resultados com diferenças estatisticamente significativas no ensaio colorimétrico com cristal violeta.

A fímbria curli, considerado o componente proteico mais importante da matriz do biofilme, é uma proteína filamentosa de estrutura amiloide rica em folhas beta-pragueadas, e sua presença pode ser identificada utilizando-se o corante vermelho

Congo, com o qual possui afinidade (HAMMAR et al., 1995; OLSÉN et al., 2002; SALDAÑA et al., 2009). Os resultados dos ensaios realizados para verificação da produção da fímbria curli e se a presença da fração de veneno afeta a bactéria de alguma forma estão apresentados nas figuras **10** a **13**. De uma maneira geral, todas as amostras, independentemente de ter a fração do veneno adicionada, apresentaram o morfotipo de coloração avermelhada e aparência rugosa (*rdar*) após 24 horas a 26 °C, indicando a capacidade de ambas amostras de produzirem a fímbria curli e também a celulose, cuja presença também pode ser detectada neste ensaio (**figuras 10 e 12**). As amostras incubadas a 37 °C não apresentaram o morfotipo *rdar*, apresentando colônias com bordas esbranquiçadas e de aparência lisa (**figuras 11 e 13**), corroborando as observações descritas em literatura (BOKRANZ et al., 2005; RÖMLING, 2005; ZHOU et al., 2013).

Em ONT:H25 (**figura 10**), foi observado que na parte mais interna da colônia, a rugosidade estava menos acentuada em comparação com a amostra controle, com a formação de um anel no centro da macrocolônia. Embora ao todo a característica da presença de curli mais celulose está presente como observado na amostra controle, pode-se especular que sua produção não é completamente inafetada pela presença da fração do veneno. A análise transcricional mostrou que a presença da fração do veneno afetou negativamente mas não inibiu completamente a transcrição de *csgD*, cuja proteína codificada é responsável pela regulação direta dos operons envolvidos na produção da fímbria curli (GERSTEL; PARK; RÖMLING, 2003). Os resultados observados no ensaio aparentemente corroboraram com este resultado.

Essa característica não é observada em O55:H7 (**figura 12**), que apresentaram virtualmente o mesmo fenótipo para todos os testes realizados a 26 °C. Lembrando que essa amostra leva um tempo maior para a produção de biofilme (WEISS-MUSZKAT et al., 2010), é possível que o tempo que esta leva para a formação da fímbria curli seja muito longa em comparação com o tempo em que a fração do veneno possa apresentar efeito. Considerando que a quantificação de biomassa dos biofilmes formados não apresentaram diferença significativa após 24 horas ou a quantidade de biofilme formado foi baixa, é possível se especular que seria mais difícil observar os

efeitos da fração do veneno em amostras que precisam de mais tempo para observar resultados fenotípicos.

Para analisar a produção de celulose nas amostras, considerado o segundo fator mais importante da matriz do biofilme, foi utilizado o corante calcofluor, devido à sua afinidade com beta-glucanos que constituem esse polissacarídeo (RÖMLING, 2002). Os resultados estão apresentados nas **figuras 14 e 15**. Em nenhum dos testes foi observado diferença significativa entre os testes com fração adicionada e os testes controle. No entanto, na análise transcricional de *bcsA*, gene que codifica uma das subunidades envolvidas com a síntese da celulose, observa-se que sua transcrição foi afetada negativamente na presença da fração do veneno quando comparado com o controle, embora sua transcrição não foi inibida. O ensaio com calcofluor para observação da produção de celulose, além de ser de caráter qualitativo, tem seus resultados geralmente analisados após pelo menos 24 horas de incubação, um intervalo de tempo bem maior que o período de 2,5 horas, tempo para amostras bacterianas atingirem D.O.₆₀₀ de aproximadamente 0,6 (fase *mid-log* do crescimento bacteriano), quando seu RNA total é extraído. Tendo isso em vista, o ensaio com calcofluor sozinho não é suficiente para determinar se a produção de celulose foi em algum momento afetada ou não.

A fímbria tipo 1 e a motilidade são considerados também fatores importantes envolvidos na formação de biofilme, estando envolvidas principalmente nos processos iniciais da adesão bacteriana a substratos e também da dispensão da bactéria (PRATT; KOLTER, 1998).

Os resultados da análise transcricional de *fimA*, subunidade que compõe a fímbria tipo 1, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre as amostras tratadas com a fração e as amostras controle, e ensaios de motilidade observada em ágar semi-sólido também não apresentaram resultados significativos. Comparando estes resultados com aqueles do ensaio colorimétrico para quantificação de biomassa do biofilme, pode-se inferir que a probabilidade de que a fração do veneno tenha efeito nessas estruturas é baixa. Entretanto, é importante lembrar que para este trabalho, devido às limitações como disponibilidade de material, foi selecionado apenas alguns dos genes relevantes; no caso da análise da fímbria tipo 1, foi selecionado o

gene *fimA*. Isso não descarta a possibilidade de que a fração do veneno não afete algum outro gene envolvido nesta estrutura. Já no caso da motilidade, apesar do resultado final fenotípico não apresentar diferença significativa, os resultados são qualitativos e não mostram se houve alguma interferência no meio. Para uma observação mais adequada, seria relevante a realização de uma análise transcricional, como por exemplo do gene *fliC*, que faltou neste trabalho devido a problemas com o primer.

Outro fator com respeito à virulência de EPEC envolve a interação da bactéria com células hospedeiras, baseado em avaliação dos padrões de adesão formados pelas amostras bacterianas em interação *in vitro* com células como HeLa ou HEp-2 (SCALETSKY; SILVA; TRABULSI, 1984). Os resultados estão apresentados nas **figuras 18 e 19**, resultados obtidos após 6 horas de interação entre as amostras bacterianas com células HeLa. Não foi observado grande diferença visualmente quanto ao padrão de adesão das amostras, com ONT:H25 apresentando padrão de adesão agregativo, e O55:H7 com padrão localizado-*like*, conforme já descritos em estudos prévios (ABE et al., 2009; CULLER et al., 2014). Os resultados quantitativos calculados baseado na contagem de unidades formadoras de colônia (ufc) (**figura 20**) corroboram com as observações, com as amostras que foram inoculadas com fração apresentando um número um pouco maior de ufc's em comparação com os testes controle apesar de não apresentarem diferenças estatisticamente significativas.

Estes resultados não parecem corroborar com o trabalho realizado previamente em amostras de EPEC típica, onde resultados indicaram possível diminuição de adesão bacteriana em células HEp-2 (YANG, 2015). Uma possível explicação sobre a aparente discrepância dos resultados pode ser dada observando a análise transcricional de *ler* realizado no estudo atual com a amostra ONT:H25, que apesar de não formar a lesão A/E (regulada por *ler*) pode oferecer uma possível ideia com respeito aos resultados. Resultados de PCR em tempo real mostraram que a transcrição de *ler* é afetada negativamente na presença da fração de veneno apesar dela não ser completamente inibida.

A EPEC típica leva em torno de três horas para a aderência às células (SCALETSKY; SILVA; TRABULSI, 1984), um período de tempo aproximado no qual a

bactéria se encontra na fase mid-log de crescimento, tempo no qual o RNA total da bactéria geralmente é extraído para análise transcricional. Em comparação, os experimentos deste estudo precisam de 6 horas para observar a adesão bacteriana às células, e por volta deste período de tempo, em ensaios colorimétricos de biofilme, por exemplo, a fração não apresentou efeito negativo à bactéria quanto à sua capacidade de formação de biofilme.

Apesar destas possibilidades, resultados indicam que a fração do veneno não afeta de forma significativa a adesão bacteriana às células segundo resultados quantitativos, inclusive os do trabalho anterior, onde testes quantitativos foram realizados posteriormente e não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (dados não mostrados). Baseado nas informações, é possível que a influência da fração do veneno retarde inicialmente a adesão da bactéria às células, mas não suficientemente para inibir ou sequer diminuir a aderência bacteriana.

Resultados deste estudo mostram que a fração de baixo peso molecular do veneno de *Bothrops jararaca* possui certo efeito biológico contra amostras de EPEC atípica. As diferenças de resultados observados nas duas amostras de EPEC, seja pelo efeito visual causado pela fração do veneno, seja pelo tempo que leva para a formação de biofilme da amostra, reiteram estudos como os de Culler et al. (2014) sobre a heterogeneidade das amostras de EPEC atípicas, mesmo pertencendo a um grupo comum baseado nos critérios que as classificam como EPEC.

Em adição aos diferentes resultados nas duas amostras, o efeito da fração do veneno aparenta ser de caráter limitado, uma vez que eles foram observados apenas em uma das duas amostras, e em curtos prazos de tempo (2,5 horas e 6 horas em ensaios colorimétricos para cálculo de biomassa do biofilme). Além disso, estes testes requeriram altas doses de fração, com uma concentração máxima de 1000 ng/μL reação, para então resultados serem observados, e apenas em testes de cinética. Por essa razão, acreditou-se inicialmente que a fração do veneno de *Bothrops jararaca* não apresentava nenhum resultado relevante, já que a maior parte dos ensaios analisam resultados apenas ao final do experimento.

Parte da razão da dificuldade de observar resultados é provavelmente a grande capacidade de *E. coli* de se adaptar às condições do ambiente no qual se encontra

(VAN ELSAS et al., 2011). Nos estudos realizados com a aplicação de venenos e suas frações contra bactérias, mesmo com estes apresentando resultados promissores contra diferentes aspectos de patogenicidade incluindo ação contra biofilmes, a *E. coli* sempre foi um dos candidatos a apresentarem os menores resultados, quando estes eram existentes (CISCOTTO et al., 2009; KLEIN et al., 2015).

A limitação de resultados observados neste estudo, portanto, não significa que o veneno de *Bothrops jararaca* e suas frações não tenham relevância. Ao contrário, o fato de que foi possível observar uma influência em uma amostra de EPEC atípica que se caracteriza pela sua alta capacidade de formar biofilmes (CULLER et al., 2014), indica que frações deste veneno oferecem possíveis candidatos de interesse para futuros estudos envolvendo infecções bacterianas e seus fatores de virulência.

6 CONCLUSÕES

- ✓ A fração do veneno de *Bothrops jararaca* com massa molecular menor que 3 kDa não afeta de maneira significativa o crescimento da bactéria.
- ✓ Testes fenotípicos analisando os componentes envolvidos com a formação de biofilme e de adesão em células epiteliais não apresentaram diferenças significativas
- ✓ A fração do veneno de *Bothrops jararaca* com massa molecular menor que 3 kDa possui efeito modulador na formação de biofilme em ONT:H25, diminuindo a produção de biofilme em pelo menos 2,5 horas de incubação mas aumentando ao longo do tempo, apresentando uma quantidade maior de biomassa de biofilme após 6 horas de incubação. A quantidade de biofilme produzido diminui após 24 horas, porém não teve diferença estatisticamente significativa quando comparada com o teste controle.
- ✓ Resultados da análise transcricional de ONT:H25 indicam que a fração do veneno interfere negativamente na transcrição dos principais genes envolvidos na formação de biofilme, pelo menos na fase mid-log de crescimento da bactéria, que confere com o período do tempo onde a formação de biofilme da amostra na presença de fração foi menor em comparação com o teste controle.

REFERÊNCIAS¹

ABE, C. M. et al. Virulence features of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* identified by the eae(+) EAF-negative stx(-) genetic profile. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 64, n. 4, p. 357–365, ago. 2009.

AHMER, B. M. M. Cell-to-cell signalling in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. **Molecular Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 933–945, 1 maio 2004.

BISCOLA, F. T.; ABE, C. M.; GUTH, B. E. C. Determination of adhesin gene sequences in, and biofilm formation by, O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from different sources. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 7, p. 2201–2208, abr. 2011.

BOEHM, A.; VOGEL, J. The csgD mRNA as a hub for signal integration via multiple small RNAs. **Molecular microbiology**, v. 84, n. 1, p. 1–5, abr. 2012.

BOKRANZ, W. et al. Expression of cellulose and curli fimbriae by *Escherichia coli* isolated from the gastrointestinal tract. **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, n. 12, p. 1171–1182, 2005.

BUERIS, V. et al. Late establishment of the attaching and effacing lesion caused by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* depends on protein expression regulated by Per. **Infection and immunity**, v. 83, n. 1, p. 379–388, jan. 2015.

CACCIALI, P. et al. *Bothrops jararaca*. **The IUCN Red List of Threatened Species 2019**: e.T15203324A15203411. 2019.

¹ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14724**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2011.

CASTELLINO, F. J.; PLOPLIS, V. A. Structure and function of the plasminogen/plasmin system. **Thrombosis and haemostasis**, v. 93, n. 4, p. 647–654, abr. 2005.

CHAPMAN, M. R. et al. Role of Escherichia coli Curli Operons in Directing Amyloid Fiber Formation. **Science**, v. 295, n. 5556, p. 851 LP – 855, 1 fev. 2002.

CHEN, H. D.; FRANKEL, G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. **FEMS microbiology reviews**, v. 29, n. 1, p. 83–98, jan. 2005.

CHEN, X. et al. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. **Nature**, v. 415, n. 6871, p. 545–549, jan. 2002.

CIDADE, D. A. P. et al. Bothrops jararaca venom gland transcriptome: Analysis of the gene expression pattern. **Toxicon**, v. 48, n. 4, p. 437–461, 2006.

CISCOTTO, P. et al. Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an l-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 53, n. 3, p. 330–341, mar. 2009.

CLARKE, M. B. et al. The QseC sensor kinase: a bacterial adrenergic receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 27, p. 10420–10425, jul. 2006.

CLEARY, J. et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. **Microbiology (Reading, England)**, v. 150, n. Pt 3, p. 527–538, mar. 2004.

CLEMENTS, A. et al. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Gut microbes**, v. 3, n. 2, p. 71–87, 2012.

COOKSON, A. L.; COOLEY, W. A.; WOODWARD, M. J. The role of type 1 and curli fimbriae of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in adherence to abiotic surfaces. **International journal of medical microbiology : IJMM**, v. 292, n. 3–4, p. 195–205, set. 2002.

CORDEIRO, M. A. et al. Curli fimbria: an *Escherichia coli* adhesin associated with human cystitis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 414–416, 2016.

COSTERTON, J. W. et al. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annual review of microbiology**, v. 41, p. 435–464, 1987.

COSTERTON, J. W. et al. Biofilms, the customized microniche. **Journal of bacteriology**, v. 176, n. 8, p. 2137–2142, abr. 1994.

COSTERTON, J. W. et al. MICROBIAL BIOFILMS. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 711–745, 1 out. 1995.

COSTERTON, J. W. Introduction to biofilm. **International journal of antimicrobial agents**, v. 11, n. 3–4, p. 217–219, maio 1999.

CRAVIOTO, A. et al. Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea. **Lancet (London, England)**, v. 337, n. 8736, p. 262–264, fev. 1991.

CULLER, H. F. et al. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains form biofilm on abiotic surfaces regardless of their adherence pattern on cultured epithelial cells. **BioMed research international**, v. 2014, p. 845147, 2014.

CULLER, H. F. et al. Role of SdiA on Biofilm Formation by Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Genes (Basel)**, v. 9, n. 5, 253, 2018.

CURTIS, M. M.; SPERANDIO, V. A complex relationship: the interaction among symbiotic microbes, invading pathogens, and their mammalian host. **Mucosal immunology**, v. 4, n. 2, p. 133–138, mar. 2011.

DA RE, S.; GHIGO, J.-M. A CsgD-independent pathway for cellulose production and biofilm formation in *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, v. 188, n. 8, p. 3073–3087, abr. 2006.

DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G. A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 64, n. 4, p. 847–867, dez. 2000.

DAVIES, D. G. et al. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. **Science (New York, N.Y.)**, v. 280, n. 5361, p. 295–298, abr. 1998.

DE OLIVEIRA DOMINGOS, M. et al. The potential of *Loxosceles gaucho* spider venom to regulate *Pseudomonas aeruginosa* mechanisms of virulence. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 152, p. 78–83, set. 2018.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 2, p. 167–193, abr. 2002.

DONNENBERG, M. S.; YU, J.; KAPER, J. B. A second chromosomal gene necessary for intimate attachment of enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells. **Journal of bacteriology**, v. 175, n. 15, p. 4670–4680, ago. 1993.

DULGUER, M. V et al. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains: phenotypic and genetic profiling reveals a strong association between enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin and diarrhea. **The Journal of infectious diseases**, v. 188, n. 11, p. 1685–1694, dez. 2003.

DUNNE JR, W. M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? **Clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 2, p. 155–166, abr. 2002.

DYSZEL, J. L. et al. E. coli K-12 and EHEC Genes Regulated by SdiA. **PLOS ONE**, v. 5, n. 1, p. e8946, 28 jan. 2010.

FERREIRA, S. H. A BRADYKININ-POTENTIATING FACTOR (BPF) PRESENT IN THE VENOM OF BOTHROPS JARARACA. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 24, n. 1, p. 163–169, 1 fev. 1965.

FERREIRA, S. H.; BARTELT, D. C.; GREENE, L. J. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from Bothrops jararaca venom. **Biochemistry**, v. 9, n. 13, p. 2583–2593, 1 jun. 1970.

FIELDS, P. I. et al. Molecular characterization of the gene encoding H antigen in Escherichia coli and development of a PCR-restriction fragment length polymorphism test for identification of E. coli O157:H7 and O157:NM. **Journal of clinical microbiology**, v. 35, n. 5, p. 1066–1070, maio 1997.

FINLAY, B. B. et al. Cytoskeletal composition of attaching and effacing lesions associated with enteropathogenic Escherichia coli adherence to HeLa cells. **Infection and immunity**, v. 60, n. 6, p. 2541–2543, jun. 1992.

FINLAY, B. B.; FALKOW, S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 61, n. 2, p. 136–169, jun. 1997.

FLEMMING, H.-C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623–633, 2010.

FUQUA, W. C.; WINANS, S. C.; GREENBERG, E. P. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. **Journal of bacteriology**, v. 176, n. 2, p. 269–275, jan. 1994.

GERSTEL, U.; PARK, C.; RÖMLING, U. Complex regulation of csgD promoter activity by global regulatory proteins. **Molecular Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 639–654, 1 ago. 2003.

GIRÓN, J. A.; HO, A. S.; SCHOOLNIK, G. K. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic Escherichia coli. **Science (New York, N.Y.)**, v. 254, n. 5032, p. 710–713, nov. 1991.

GLENN KING. Venoms to Drugs: Translating Venom Peptides into Therapeutics. **Australian Biochemist**, v. 44, n. 3, p. 13–16, 2013.

GOMES, T. A. T. et al. Emerging enteropathogenic Escherichia coli strains? **Emerging infectious diseases**, v. 10, n. 10, p. 1851–1855, 2004.

HAMMAR, M. et al. Expression of two csg operons is required for production of fibronectin- and Congo red-binding curli polymers in Escherichia coli K-12. **Molecular Microbiology**, v. 18, n. 4, p. 661–670, 1 nov. 1995.

HENTZER, M. et al. Inhibition of quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. **Microbiology (Reading, England)**, v. 148, n. Pt 1, p. 87–102, jan. 2002.

HU, J.; TORRES, A. G. Enteropathogenic Escherichia coli: foe or innocent bystander? **Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 21, n. 8, p. 729–734, ago. 2015.

HUNG, C. et al. Escherichia coli Biofilms Have an Organized and Complex Extracellular Matrix Structure. **mBio**, v. 4, n. 5, p. e00645-13, 1 nov. 2013.

ITO, A. et al. Increased Antibiotic Resistance of Escherichia coli in Mature Biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 12, p. 4093 LP – 4100, 15 jun. 2009.

JANSSENS, J. C. A. et al. Synthesis of N-acyl homoserine lactone analogues reveals strong activators of SdiA, the Salmonella enterica serovar Typhimurium LuxR homologue. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 2, p. 535–544, jan. 2007.

JERSE, A. E. et al. A genetic locus of enteropathogenic Escherichia coli necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 20, p. 7839–7843, out. 1990.

JERSE, A. E.; KAPER, J. B. The eae gene of enteropathogenic Escherichia coli encodes a 94-kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid. **Infection and immunity**, v. 59, n. 12, p. 4302–4309, dez. 1991.

JONAS, K. et al. Roles of curli, cellulose and BapA in Salmonella biofilm morphology studied by atomic force microscopy. **BMC Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 70, 2007.

JONES, C. H. et al. FimH adhesin of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the Enterobacteriaceae. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 6, p. 2081–2085, 14 mar. 1995.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic Escherichia coli. **Nature reviews. Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123–40, fev. 2004.

KAPER, J. B.; SPERANDIO, V. Bacterial Cell-to-Cell Signaling in the Gastrointestinal Tract. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 6, p. 3197 LP – 3209, 1 jun. 2005.

KENNY, B. et al. Enteropathogenic E. coli (EPEC) Transfers Its Receptor for Intimate Adherence into Mammalian Cells. **Cell**, v. 91, n. 4, p. 511–520, 14 nov. 1997.

KIM, C. S. et al. Characterization of Autoinducer-3 Structure and Biosynthesis in E. coli. **ACS Central Science**, v. 6, n. 2, p. 197-206, 2020.

KLEIN, R. C. et al. A C-Type Lectin from Bothrops jararacussu Venom Disrupts Staphylococcal Biofilms. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0120514, 26 mar. 2015.

KNUTTON, S. et al. Role of plasmid-encoded adherence factors in adhesion of enteropathogenic Escherichia coli to HEp-2 cells. **Infection and immunity**, v. 55, n. 1, p. 78–85, jan. 1987.

KNUTTON, S. et al. A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic Escherichia coli involved in protein translocation into epithelial cells. **The EMBO journal**, v. 17, n. 8, p. 2166–2176, abr. 1998.

KUMAR, C. G.; ANAND, S. K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 9–27, 1998.

MACNAB, R. M. Genetics and biogenesis of bacterial flagella. **Annual review of genetics**, v. 26, p. 131–158, 1992.

MCDANIEL, T. K. et al. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 5, p. 1664–1668, fev. 1995.

MELLIES, J. L. et al. The Per regulon of enteropathogenic Escherichia coli: identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of

enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler). **Molecular microbiology**, v. 33, n. 2, p. 296–306, jul. 1999.

MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. Quorum sensing in bacteria. **Annual review of microbiology**, v. 55, p. 165–199, 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Acidentes por animais peçonhentos - Serpentes**. 2017. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/acidentes-por-animais-peconhentos-serpentes>>

MOON, H. W. et al. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. **Infection and immunity**, v. 41, n. 3, p. 1340–1351, set. 1983.

MOREIRA, C. G. et al. Role of type I fimbriae in the aggregative adhesion pattern of enteroaggregative *Escherichia coli*. **FEMS microbiology letters**, v. 226, n. 1, p. 79–85, set. 2003.

NADELL, C. D. et al. The evolution of quorum sensing in bacterial biofilms. **PLoS biology**, v. 6, n. 1, p. e14–e14, jan. 2008.

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

NEALSON, K. H.; PLATT, T.; HASTINGS, J. W. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. **Journal of bacteriology**, v. 104, n. 1, p. 313–322, out. 1970.

NETER, E. et al. Demonstration of antibodies against enteropathogenic *Escherichia coli* in sera of children of various ages. **Pediatrics**, v. 16, n. 6, p. 801–808, dez. 1955.

NICOLAU, C. A. et al. An in-depth snake venom proteopeptidome characterization: Benchmarking Bothrops jararaca. **Journal of Proteomics**, v. 151, p. 214–231, 2017.

NUNES, E. B. et al. Genotypic and phenotypic characterization of attaching and effacing Escherichia coli (AEEC) isolated from children with and without diarrhoea in Londrina, Brazil. **Journal of medical microbiology**, v. 52, n. Pt 6, p. 499–504, jun. 2003.

OLSÉN, A. et al. Environmental regulation of curli production in Escherichia coli. **Infectious agents and disease**, v. 2, n. 4, p. 272–274, ago. 1993.

OLSÉN, A. et al. Identification of two protein-binding and functional regions of curli, a surface organelle and virulence determinant of Escherichia coli. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 37, p. 34568–34572, set. 2002.

PALMER, C. et al. Development of the human infant intestinal microbiota. **PLoS biology**, v. 5, n. 7, p. e177–e177, jul. 2007.

PALUCH, E. et al. Prevention of biofilm formation by quorum quenching. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 5, p. 1871–1881, 2020.

PARKER, C. T.; SPERANDIO, V. Cell-to-cell signalling during pathogenesis. **Cellular microbiology**, v. 11, n. 3, p. 363–369, mar. 2009.

PAWAR, D. M.; ROSSMAN, M. L.; CHEN, J. Role of curli fimbriae in mediating the cells of enterohaemorrhagic Escherichia coli to attach to abiotic surfaces. **Journal of applied microbiology**, v. 99, n. 2, p. 418–425, 2005.

PELAYO, J. S. et al. Virulence properties of atypical EPEC strains. **Journal of medical microbiology**, v. 48, n. 1, p. 41–49, jan. 1999.

PRATT, L. A.; KOLTER, R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. **Molecular microbiology**, v. 30, n. 2, p. 285–293, out. 1998.

REISNER, A. et al. Development and maturation of *Escherichia coli* K-12 biofilms. **Molecular Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 933–946, 1 maio 2003.

REISNER, A. et al. In vitro biofilm formation of commensal and pathogenic *Escherichia coli* strains: impact of environmental and genetic factors. **Journal of bacteriology**, v. 188, n. 10, p. 3572–3581, maio 2006.

ROBINS-BROWNE, R. M. Traditional enteropathogenic *Escherichia coli* of infantile diarrhea. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 28–53, 1987.

ROBINS-BROWNE, R. M. et al. *Escherichia coli* and community-acquired gastroenteritis, Melbourne, Australia. **Emerging infectious diseases**, v. 10, n. 10, p. 1797–1805, out. 2004.

RODRIGUES, J. et al. Clonal structure and virulence factors in strains of *Escherichia coli* of the classic serogroup O55. **Infection and immunity**, v. 64, n. 7, p. 2680–2686, jul. 1996.

RÖMLING, U. et al. Curli fibers are highly conserved between *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* with respect to operon structure and regulation. **Journal of bacteriology**, v. 180, n. 3, p. 722–731, fev. 1998.

RÖMLING, U. Molecular biology of cellulose production in bacteria. **Research in Microbiology**, v. 153, n. 4, p. 205–212, 2002.

RÖMLING, U. et al. Occurrence and regulation of the multicellular morphotype in *Salmonella* serovars important in human disease. **International journal of medical microbiology : IJMM**, v. 293, n. 4, p. 273–285, ago. 2003.

RÖMLING, U. Characterization of the rdar morphotype, a multicellular behaviour in Enterobacteriaceae. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 62, n. 11, p. 1234–1246, 2005.

ROTHBAUM, R. et al. A clinicopathologic study of enterocyte-adherent Escherichia coli: a cause of protracted diarrhea in infants. **Gastroenterology**, v. 83, n. 2, p. 441–454, ago. 1982.

RYU, J.-H.; BEUCHAT, L. R. Biofilm formation by Escherichia coli O157:H7 on stainless steel: effect of exopolysaccharide and Curli production on its resistance to chlorine. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 1, p. 247–254, jan. 2005.

SALDAÑA, Z. et al. Synergistic role of curli and cellulose in cell adherence and biofilm formation of attaching and effacing Escherichia coli and identification of Fis as a negative regulator of curli. **Environmental microbiology**, v. 11, n. 4, p. 992–1006, abr. 2009.

SANTHAKUMARI, S.; RAVI, A. V. Targeting quorum sensing mechanism: An alternative anti-virulent strategy for the treatment of bacterial infections. **South African Journal of Botany**, v. 120, p. 81–86, 2019.

SCALETISKY, I. C. et al. A localized adherence-like pattern as a second pattern of adherence of classic enteropathogenic Escherichia coli to HEp-2 cells that is associated with infantile diarrhea. **Infection and immunity**, v. 67, n. 7, p. 3410–3415, jul. 1999.

SCALETISKY, I. C.; SILVA, M. L.; TRABULSI, L. R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic Escherichia coli to HeLa cells. **Infection and immunity**, v. 45, n. 2, p. 534–536, ago. 1984.

SCHAEFER, A. L. et al. Generation of cell-to-cell signals in quorum sensing: acyl homoserine lactone synthase activity of a purified *Vibrio fischeri* LuxI protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 18, p. 9505–9509, set. 1996.

SCHAUDER, S. et al. The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. **Molecular Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 463–476, 1 jul. 2001.

SCIANI, J. M. et al. An unexpected cell-penetrating peptide from *Bothrops jararaca* venom identified through a novel size exclusion chromatography screening. **Journal of Peptide Science**, v. 23, n. 1, p. 68–76, 1 jan. 2017.

SERRA, D. O.; RICHTER, A. M.; HENGGE, R. Cellulose as an Architectural Element in Spatially Structured *Escherichia coli* Biofilms. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 24, p. 5540 LP – 5554, 15 dez. 2013.

SHANKAR, M. et al. Inactivation of the transcriptional regulator-encoding gene *sdiA* enhances rice root colonization and biofilm formation in *Enterobacter cloacae* GS1. **Journal of bacteriology**, v. 195, n. 1, p. 39–45, jan. 2013.

SHEIKH, J. et al. Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. **Molecular microbiology**, v. 41, n. 5, p. 983–997, set. 2001.

SHERLOCK, O. et al. Novel Roles for the AIDA Adhesin from Diarrheagenic *Escherichia coli*: Cell Aggregation and Biofilm Formation. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 23, p. 8058 LP – 8065, 1 dez. 2004.

SHERLOCK, O.; VEJBORG, R. M.; KLEMM, P. The TibA adhesin/invasin from enterotoxigenic *Escherichia coli* is self recognizing and induces bacterial aggregation

and biofilm formation. **Infection and immunity**, v. 73, n. 4, p. 1954–1963, abr. 2005.

SHULMAN, S. T.; FRIEDMANN, H. C.; SIMS, R. H. Theodor Escherich: The First Pediatric Infectious Diseases Physician? **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. 8, p. 1025–1029, 2007.

SIRCILI, M. P. et al. Modulation of Enteropathogenic Escherichia coli Virulence by Quorum Sensing. **Society**, v. 72, n. 4, p. 2329–2337, 2004.

SJÖBRING, U.; POHL, G.; OLSÉN, A. Plasminogen, absorbed by Escherichia coli expressing curli or by Salmonella enteritidis expressing thin aggregative fimbriae, can be activated by simultaneously captured tissue-type plasminogen activator (t-PA). **Molecular Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 443–452, 1 nov. 1994.

SMITH, J. N.; AHMER, B. M. M. Detection of other microbial species by Salmonella: expression of the SdiA regulon. **Journal of bacteriology**, v. 185, n. 4, p. 1357–1366, fev. 2003.

SOARES, J. A.; AHMER, B. M. M. Detection of acyl-homoserine lactones by Escherichia and Salmonella. **Current opinion in microbiology**, v. 14, n. 2, p. 188–193, abr. 2011.

SOLANO, C. et al. Genetic analysis of Salmonella enteritidis biofilm formation: critical role of cellulose. **Molecular microbiology**, v. 43, n. 3, p. 793–808, fev. 2002.

SPERANDIO, V. et al. Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic Escherichia coli. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 26, p. 15196 LP – 15201, 21 dez. 1999.

SPERANDIO, V. et al. Bacteria–host communication: The language of hormones. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 15, p. 8951 LP – 8956,

22 jul. 2003.

SPERANDIO, V.; TORRES, A. G.; KAPER, J. B. Quorum sensing Escherichia coli regulators B and C (QseBC): a novel two-component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by quorum sensing in E. coli. **Molecular microbiology**, v. 43, n. 3, p. 809–821, fev. 2002.

STOODLEY, P. et al. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual review of microbiology**, v. 56, p. 187–209, 2002.

SURETTE, M. G.; MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. Quorum sensing in Escherichia coli, Salmonella typhimurium, and Vibrio harveyi: a new family of genes responsible for autoinducer production. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 4, p. 1639–1644, fev. 1999.

TAGA, M. E.; SEMMELHACK, J. L.; BASSLER, B. L. The LuxS-dependent autoinducer AI-2 controls the expression of an ABC transporter that functions in AI-2 uptake in Salmonella typhimurium. **Molecular microbiology**, v. 42, n. 3, p. 777–793, nov. 2001.

TEERAPO, K. et al. A scorpion venom peptide derivative BmKn-22 with potent antibiofilm activity against Pseudomonas aeruginosa. **PloS one**, v. 14, n. 6, p. e0218479, 2019.

THONGSOMBOON, W. et al. Phosphoethanolamine cellulose: A naturally produced chemically modified cellulose. **Science**, v. 359, n. 6373, p. 334 LP – 338, 19 jan. 2018.

TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; TARDELLI GOMES, T. A. Typical and atypical enteropathogenic Escherichia coli. **Emerging infectious diseases**, v. 8, n. 5, p. 508–513, maio 2002.

VAN ELSAS, J. D. et al. Survival of Escherichia coli in the environment: fundamental and public health aspects. **The ISME journal**, v. 5, n. 2, p. 173–183, fev. 2011.

VAN HOUDT, R.; MICHIELS, C. W. Role of bacterial cell surface structures in Escherichia coli biofilm formation. **Research in microbiology**, v. 156, n. 5–6, p. 626–633, 2005.

VIEIRA, M. A. et al. Phenotypic and genotypic characteristics of Escherichia coli strains of non-enteropathogenic E. coli (EPEC) serogroups that carry EAE and lack the EPEC adherence factor and Shiga toxin DNA probe sequences. **The Journal of infectious diseases**, v. 183, n. 5, p. 762–772, mar. 2001.

WAHEED, H.; MOIN, S. F.; CHOUDHARY, M. I. Snake Venom: From Deadly Toxins to Life-saving Therapeutics. **Current Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 17, p. 1874–1891, 2017.

WALTERS, M.; SIRCILI, M. P.; SPERANDIO, V. AI-3 synthesis is not dependent on luxS in Escherichia coli. **Journal of bacteriology**, v. 188, n. 16, p. 5668–81, ago. 2006.

WALTERS, M.; SPERANDIO, V. Quorum sensing in Escherichia coli and Salmonella. **International journal of medical microbiology : IJMM**, v. 296, n. 2–3, p. 125–31, abr. 2006.

WATNICK, P. I.; KOLTER, R. Steps in the development of a Vibrio cholerae El Tor biofilm. **Molecular microbiology**, v. 34, n. 3, p. 586–595, nov. 1999.

WEISS-MUSZKAT, M. et al. Biofilm formation by and multicellular behavior of Escherichia coli O55:H7, an atypical enteropathogenic strain. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 5, p. 1545–1554, mar. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Newsroom. **Urgent health challenges for the next decade.** Photo Story. Geneva, 2020. Disponível em:

<<https://www.who.int/news-room/photo-story/photo-story-detail/urgent-health-challenges-for-the-next-decade>>.

WRIGHT, K. J.; SEED, P. C.; HULTGREN, S. J. Development of intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* depends on type 1 pili. **Cellular microbiology**, v. 9, n. 9, p. 2230–2241, 2007.

YERUSHALMI, G. et al. Dynamics of Expression and Maturation of the Type III Secretion System of Enteropathogenic *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 196, p. 2798-2806, 2014.

YANG, Min Jung. **Efeito das frações do veneno de Bothrops jararaca na interação bactéria-hospedeiro in vitro entre Escherichia coli enteropatogênica e células epiteliais**. 2015. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

YAO, Y. et al. Structure of the *Escherichia coli* quorum sensing protein SdiA: activation of the folding switch by acyl homoserine lactones. **Journal of molecular biology**, v. 355, n. 2, p. 262–273, jan. 2006.

ZHOU, Y. et al. Experimental Manipulation of the Microbial Functional Amyloid Called Curli. In: DELCOUR, A. H. (Ed.). . **Bacterial Cell Surfaces: Methods and Protocols**. Totowa, NJ: Humana Press, 2013. p. 53–75.

ZOGAJ, X. et al. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. **Molecular Microbiology**, v. 39, n. 6, p. 1452–1463, 1 mar. 2001.

ZOGAJ, X. et al. Production of Cellulose and Curli Fimbriae by Members of the Family Enterobacteriaceae Isolated from the Human Gastrointestinal Tract. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 7, p. 4151 LP – 4158, 1 jul. 2003.