

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia  
Área de Análises Clínicas

**ANÁLISE DO SISTEMA TOXINA-ANTITOXINA HipA/B NA INDUÇÃO DA  
PERSISTÊNCIA BACTERIANA DE CEPAS DE *Escherichia coli*  
EXTRAIESTINAL**

Thaís Mitsunari

Tese para obtenção do título de doutora  
Orientadora: Dra. Roxane Maria Fontes Piazza

São Paulo  
2021

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia  
Área de Análises Clínicas

**ANÁLISE DO SISTEMA TOXINA-ANTITOXINA HipA/B NA INDUÇÃO DA  
PERSISTÊNCIA BACTERIANA DE CEPAS DE *Escherichia coli*  
EXTRAIESTINAL**

Thaís Mitsunari

Versão Corrigida

Tese para obtenção do título de doutora  
Orientadora: Dra. Roxane Maria Fontes Piazza

São Paulo

2021

Thaís Mitsunari

ANÁLISE DO SISTEMA TOXINA-ANTITOXINA HipA/B NA INDUÇÃO DA  
PERSISTÊNCIA BACTERIANA DE CEPAS DE *Escherichia coli* EXTRAINTESTINAL

Comissão Julgadora

da

Tese para obtenção do título de DOUTORA

Dra. Roxane Maria Fontes Piazza  
orientadora/presidenta

Dra. Alessandra Alves de Souza

---

1º. examinadora

Dr. Alexandre Paulo Yague Lopes

---

2º. examinador

Dra. Carla Taddei

---

3º. examinadora

São Paulo, 27 de Agosto de 2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:  
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

M685a	Mitsunari, Thais ANÁLISE DO SISTEMA TOXINA-ANTITOXINA HipA/B NA INDUÇÃO DA PERSISTÊNCIA BACTERIANA DE CEPAS DE Escherichia coli EXTRAINTESTINAL / Thais Mitsunari. - São Paulo, 2021. 98 p.  Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas - Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas. Orientador: Piazza, Roxane Maria Fontes  1. Sistemas toxina-antitoxina. 2. E. coli Extraintestinal Patogênica. 3. Persistência bacteriana. 4. Sistema toxina-antitoxina do tipo II . 5. HipAB. I. T. II. Piazza, Roxane Maria Fontes, orientador.
-------	--

## RESUMO

MITSUNARI, T. **ANÁLISE DO SISTEMA TOXINA-ANTITOXINA HipA/B NA INDUÇÃO DA PERSISTÊNCIA BACTERIANA DE CEPAS DE *Escherichia coli* EXTRAINTestinal**. 2021. 98 fl. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

**Palavras-chave:** Sistemas toxina-antitoxina, *Escherichia coli* Extra intestinal Patogênicas, Persistência bacteriana, HipAB

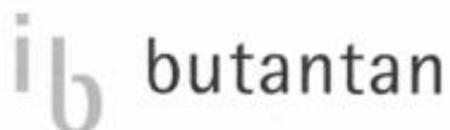
Os sistemas toxina-antitoxinas (TA) compreendem um conjunto de genes que são amplamente difundidos em procarionotos. No cromossomo, os sistemas podem estar envolvidos na indução de morte celular em resposta a condições estressantes, indução de persistência, formação de biofilme, colonização de novos nichos, manutenção da mobilidade bacteriana e virulência de bactérias patogênicas. Em *E. coli* K12, 36 sistemas TA foram descritos, dos quais o do tipo II é o mais abundante e estudado. Dentre as oito toxinas pesquisadas nesse trabalho, o gene da toxina HipA está presente em 76 das 100 cepas de ExPEC estudadas. Apesar da abundância de *hipA* em ExPEC e em diversos genomas bacterianos, a participação dos sistemas *hipA/B* na indução da persistência ainda não é clara. Portanto, o sistema *hipA/B* de duas cepas ExPEC isoladas de infecção sanguínea foi deletado, e estas foram avaliadas quando a indução da persistência bacteriana na presença de antibióticos, formação de biofilme, resistência ao soro e sobrevivência em macrófagos. O sistema TA *hipA/B* não influenciou no fenótipo de resistência ao soro humano e na sobrevivência intracelular em macrófagos, no entanto, participou da indução da persistência por ciprofloxacino em um isolado (EC182); e da formação de biofilme em superfície de vidro do isolado (EC273).

## ABSTRACT

MITSUNARI, T. **THE IMPORTANCE OF HipA/B TOXIN-ANTITOXIN SYSTEM IN EXTRAINTESTINAL *Escherichia coli* PERSISTENCE.** 2021. 98 pp. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

**Keywords:** Toxin-antitoxin system, *Extraintestinal Escherichia coli*, bacterial persistence, HipA/B

Toxin-antitoxin (TA) systems comprise a set of genes that are widespread in prokaryotes. On the chromosome, the systems may be involved in the induction of cell death in response to stressful conditions, persistence induction, biofilm formation, colonization of new niches, maintenance of bacterial mobility and virulence. In *E. coli* K12, 36 TA systems have been described, of which type II is the most abundant. Among the eight toxins searched in this work, *hipA* is present in 76 bacteria of the 100 ExPEC strains studied. Despite the abundance of *hipA* in ExPEC and in several bacterial genomes, the participation of *hipA/B* modules in the persistence is still unclear. Therefore, *hipA/B* system of two ExPEC strains isolated from blood infection was deleted and consequently evaluated in bacterial persistence induced by antibiotics, serum resistance and macrophage survival. Despite the fact that, the TA *hipA/B* system did not influence the phenotype of resistance to human serum and intracellular survival in macrophages. Herein, we described that *hipA/B* was important for persistence induction in one isolate (EC182); and may participate in the biofilm formation on the glass surface in the other studied strain (EC273).



butantan

*Comissão de Ética no  
Uso de Animais*

São Paulo, 25 de abril de 2018

TERMO DE COMPROMISSO

Eu, **Roxane Maria Fontes Piazza**, CPF 442.207.159-91, responsável pelo projeto intitulada: "Papel do sistema toxina-antitoxina (TA) na virulência e persistência de cepas ExPEC resistentes a múltiplas drogas", declaro que:

- a) Neste projeto não há utilização de animais vertebrados;
- b) Este estudo não é desnecessariamente duplicativo, possuindo mérito científico e a equipe participante deste projeto/plano de aula foi treinada e é competente para executar os procedimentos descritos neste protocolo.

Responsável: Roxane Maria Fontes Piazza

Assinatura:  Data: 25,04,18

Dedico este trabalho aos meus sobrinhos Enrico e Enzo, que alegam meus dias e me mostram como as pequenas descobertas podem ser fascinantes. E a toda minha família pelo amor e constante incentivo.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus familiares pelo amor e incentivo constante. Principalmente, aos meus pais e irmã pelo apoio nas horas em que surgiram as dúvidas, e por me incentivarem a seguir meus sonhos e por me guiarem no caminho da felicidade.

A Doutora Roxane Piazza pela orientação, paciência e confiança no decorrer dos últimos anos.

As amizades iniciadas durante a pós-graduação, especialmente a Camila, Daniela e Danielle pelo incentivo constante, ótimo convívio, pelas conversas esclarecedoras sobre todos os assuntos, pelos cafés e desabafos.

A todos os amigos do Laboratório de Bacteriologia, funcionários e alunos, pela ajuda e suporte.

Agradeço a doutora Rosa Maria Silva por ceder as cepas de *Escherichia coli* extraintestinal.

A doutora Tânia do Amaral e a Ana Carolina de Mello Santos pelo sequenciamento da cepa EC273, e discussões pertinentes a compreensão do genoma de EC182.

Agradeço aos doutores Jakob Jensen-Møller e Clare Kirkpatrick pela oportunidade de realizar o doutorado sanduiche na Universidade do Sul da Dinamarca. E a todos os colegas que me receberam tão bem.

Agradeço ao Emil pelas palavras de conforto e compreensão, pelo incentivo e por estar sempre presente mesmo que a distância.

Ao apoio financeiro da CAPES e FAPESP.

A todos o meu muito obrigada!

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, com estágio sanduiche no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade do Sul da Dinamarca (CAPES/PDSE). E financiado pela FAPESP (auxílio regular 2017/25406-0 e projeto temático 2017/14821-7)

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema dos sistemas TA dos tipos I ao VIII .....	24
Figura 2. Sistema <i>Lambda-Red</i> de recombinação por homologia.....	44
Figura 3. Distribuição dos sistemas TA em ExPEC.....	56
Figura 4. Análise filogenética de EC182 e EC273.....	59
Figura 5. Alinhamento múltiplo da toxina HipA.....	62
Figura 6. Amplificação do cassete de resistência <i>cat</i> com extremidades homólogas a <i>hipAB</i> .....	63
Figura 7. Retirada do cassete de resistência .....	64
Figura 8. Amplificação dos sistemas <i>hipAB</i> de EC182 e EC273 para construção do plasmídeo de complementação.....	65
Figura 9. PCR de colônia de <i>E. coli</i> TOP10 contendo pHipAB.....	66
Figura 10. Confirmação da complementação.....	67
Figura 11. Concentração mínima inibitória da cepa EC182 em meio LB .....	69
Figura 12. Concentração mínima inibitória da cepa EC182 em meio MOPS-glicose	70
Figura 13. Concentração mínima inibitória da cepa EC273 em meio LB .....	71
Figura 14. Concentração mínima inibitória da cepa EC273 em meio MOPS-glicose	72
Figura 15. Curva bifásicas de persistência da cepa EC182 .....	74
Figura 16. Gráfico das células persistentes EC182 recuperadas após 5 e 24 horas de exposição a ciprofloxacino .....	75
Figura 17. Curvas bifásicas de persistência da cepa EC273 .....	76
Figura 18. Formação de biofilme em vidro .....	77
Figura 19. Formação de biofilme em meio YESCA .....	78
Figura 20. Ensaio de resistência ao soro .....	79
Figura 21. Internalização de ExPEC por macrófago J744.A1 .....	80

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Função do sistema TA em <i>E. coli</i> patogênicas.....	30
Tabela 2. Comparação entre as atividades das toxinas do sistema TA com antibióticos .....	34
Tabela 3. Cepas bacterianas e plasmídeos utilizados nesse trabalho .....	40
Tabela 4. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores .....	42
Tabela 5 Distribuição das toxinas do sistema TA do tipo II em diferentes categorias de <i>E. coli</i> .....	55
Tabela 6. Dados resumidos da montagem e anotação dos genomas sequenciados	57
Tabela 7. Fatores de virulência de EC182 e EC273 .....	60
Tabela 8. Sistemas toxina-antitoxina presentes nas cepas EC182 e EC273 .....	61

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aEPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica atípica
APEC	<i>Escherichia coli</i> aviária
ATP	adenosina trifosfato
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
<i>ccd</i>	<i>couple cell division</i>
CG	citosina-guanina
ClpXP	<i>caseinolytic mitochondrial matrix peptidase chaperone subunit X protease</i>
CMY	Beta lactamase
<i>crp</i>	<i>cAmp receptor protein</i>
CTX-M	Beta lactamase de amplo espectro
DMEM	meio de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	ácido desoxirribonucleico
<i>dnaK</i>	chaperona DnaK
dNTPS	desoxirribonucleotídeos
DO	densidade ótica
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> extraintestinal
g	gramas
gDNA	DNA genômico
Gltx	glutamato tRNA ligase
h	horas
Hip	<i>high incidence of persistence</i>
ITU	infecção do trato urinário

kb	kilobase
kDa	kilodalton
kV	quilovolts
LB	Luria-Bertani
m/v	massa/volume
mg	miligramas
MIC	concentração mínima inibitória
mL	mililitros
mM	milimolar
MOI	multiplicidade de infecção
MOPS	ácido 3-(N-Morpholino) propanesulfônico
mRNA	RNA mensageiro
<i>mutS</i>	reparo do DNA
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NDM	metalo-betalactamase Nova Deli
NMEC	<i>Escherichia coli</i> associada a meningite
ng	nanograma
nM	nanomolar
<i>ompD</i>	porina de membrana externa D
ORF	quadro de leitura aberta
<i>oxyR</i>	regulador de genes induzidos por peróxido de hidrogênio
PBS	tampão salino-fosfato 1 mM pH ??????
PCR	reação em cadeia de polimerase
(p)ppGpp	pentafosfato de guanosina
PSK	morte pós segregacional
RNA	ácido ribonucleico
rpm	rotações por minuto
<i>rpoS</i>	fator sigma da RNA polimerase
SFB	soro fetal bovino

SEPEC	<i>Escherichia coli</i> associada a sepse
sRNAs	<i>small</i> RNA
ST	<i>sequence typing</i>
STEC	<i>Escherichia coli</i> produtora da toxina de Shiga
TA	toxina-antitoxina
TADB	<i>Toxin-Antitoxin Data Base</i>
tEPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica típica
<i>tolC</i>	proteína de membrana externa
tRNA	RNA transportador
U	unidade
UFC	unidade formadora de colônia
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatogênica
V	volts
x g	força g
<i>yhcB</i>	proteína de membrana interna YhcB
Δ	delta/mutante
μg	micrograma
μM	micromolar
μL	microlitro

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>18</b>
<b>1.1 Sistema TA em plasmídeos</b>	<b>19</b>
<b>1.2 Sistemas TA em cromossomos</b>	<b>20</b>
<b>1.3 Classificação dos sistemas TA</b>	<b>21</b>
<b>1.4 Sistema TA do tipo II</b>	<b>26</b>
1.4.1 Sistema HipAB	27
<b>1.5 Sistema TA em bactérias patogênicas</b>	<b>28</b>
<b>1.6 Persistência bacteriana induzida por antibióticos</b>	<b>31</b>
<b>1.7 Perspectivas e aplicabilidades para o sistema TA</b>	<b>33</b>
<b>1.8 <i>Escherichia coli</i></b>	<b>35</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	<b>37</b>
<b>3. OBJETIVO</b>	<b>38</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>39</b>
<b>4.1 Amostras bacterianas e plasmídeos</b>	<b>39</b>
<b>4.2 Detecção dos genes dos sistemas toxina-antitoxina do tipo II</b>	<b>41</b>
4.2.1 Preparo do DNA	41
4.2.2 Reações em Cadeia da Polimerase (PCR)	41
4.2.3 Eletroforese de DNA em gel de agarose	43
<b>4.3 Obtenção de mutantes em <i>hipAB</i> por recombinação homóloga</b>	<b>43</b>
4.3.1 Extração plasmidial	44
4.3.2 Amplificação, purificação e digestão do cassete de resistência	44
4.3.3 Obtenção de células eletrocompetentes	45
4.3.4 Eletrotransformação	46
4.3.5 Recombinação homóloga do sistema <i>hipAB</i>	46
4.3.6 Retirada do cassete de resistência	47
<b>4.4 Construção dos plasmídeos de complementação</b>	<b>47</b>
4.4.1 Ligação e quimiotransformaç�o	48
<b>4.5 Sequenciamento de genoma completo, montagem e anotação</b>	<b>49</b>
<b>4.6 Concentração mínima inibitória (CMI)</b>	<b>50</b>
<b>4.7 Ensaio de persistência induzida por antibióticos</b>	<b>50</b>
<b>4.8 Biofilme</b>	<b>51</b>
4.8.1 Cristal violeta	51
4.8.2 YESCA	52

<b>4.9 Ensaio de resistência ao soro</b>	<b>52</b>
<b>4.10 Cultivo dos macrófagos</b>	<b>53</b>
4.10.1 Ensaio de infecção dos macrófagos J744.A1	53
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>54</b>
<b>5.1 Identificação dos 8 sistemas TA do tipo II por PCR</b>	<b>54</b>
<b>5.2 Sequenciamento, montagem e anotação</b>	<b>56</b>
5.2.1 Análise compreensiva dos genomas	57
5.2.1.1 <i>Genes de resistência</i>	58
5.2.1.2 <i>Análise filogenética</i>	58
<b>5.3 Fatores de virulência</b>	<b>59</b>
<b>5.4 Sistemas TA identificados</b>	<b>60</b>
<b>5.5 Construção dos mutantes em <i>hipAB</i> pelo sistema <i>Lambda-Red</i></b>	<b>63</b>
<b>5.6 Ensaio fenotípicos</b>	<b>67</b>
5.6.1 Concentração mínima inibitória	67
5.6.2 Ensaio de persistência	72
5.6.3 Formação de biofilme	77
5.6.4 Ensaio de resistência ao soro humano	78
5.6.5 Internalização EC182 e EC273 por macrófagos J774.A1	79
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>81</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b>	<b>90</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>91</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os sistemas toxina-antitoxina (TA) são geralmente compostos por dois genes responsáveis pela produção de uma toxina estável e uma molécula instável, responsável pela inativação da primeira. Diferente das endotoxinas e exotoxinas produzidas por bactérias patogênicas, as toxinas dos sistemas TA são produzidas tanto por bactérias patogênicas quanto pelas não-patogênicas, e tem como alvo os mecanismos intrínsecos celulares, como: processos fisiológicos relacionados ao controle populacional, morte celular programada, regulação da formação de biofilme, proteção contra bacteriófagos e persistência induzida por estresse (WEN; BEHIELS; DEVREESE, 2014; GHAFOURIAN et al., 2014; PARK; SON; LEE, 2013).

Inicialmente, os sistemas TA foram descobertos a partir do estudo da viabilidade bacteriana que abrigavam plasmídeos de baixo número de cópias e posteriormente, foram descritos em cromossomos e elementos genéticos móveis (GOEDERS; MELDEREN, 2014; FOZO et al., 2010). Os sistemas são classificados de I a VIII conforme as características da antitoxina. De todos os sistemas, o do tipo II é provavelmente o mais abundante e tem sido extensamente estudado. De um modo geral, as toxinas desse grupo são endonucleases e possuem como alvo a replicação do DNA, mRNA, tRNA, ribossomo 30S, ribossomo 50S e proteínas do citoesqueleto (YAMAGUCHI; UNOYE, 2011; FERNÁNDEZ-GARCIA et al., 2016; GOEDERS; VAN MELDEREN, 2014).

## 1.1 Sistema TA em plasmídeos

Em 1983 ao estudar o quadro de leitura aberto (ORF) do plasmídeo F de *E. coli*, Karoui e colaboradores identificaram o que futuramente seria o primeiro sistema TA: o gene que codificava o polipeptídeo H e mutações supressoras em um gene adjacente, que codificava a proteína G. A atuação da proteína G foi associada a indução da resposta SOS, enquanto o polipeptídeo H foi responsável por suprimir sua atividade. No mesmo período, Ogura e Hiraga (1983) demonstraram que os dois genes eram capazes de inibir a divisão celular quando a replicação do plasmídeo era impedida. Os genes foram denominados de *ccdA* e *ccdB* (*coupled cell division*). O gene *ccdA* codificador do polipeptídeo H e *ccdB* o gene responsável pela produção da proteína G. Mais tarde, Jaffé e colaboradores (1985) propuseram o modelo de “segregação não viável” ao demonstrar que o *locus ccd* participava da redução da viabilidade celular nas células filhas não receptoras do plasmídeo F. Estudos subsequentes demonstraram que CcdB atua inibindo a ação da DNA girase, impedindo assim a replicação do DNA bacteriano (FRAIKIN; GOORMAGHTIGH; VAN MELDEREN, 2020; GOEDERS; VAN MELDEREN, 2014).

Sistemas análogos ao CcdA/B, foram identificados no decorrer dos anos, alguns exemplos são os genes *hok* (*host killing*) e *sok* (*supressor of killing*) que estabilizam o plasmídeo R1 (GERDES et al., 1986); os genes *kid* (*killer determinant*) e *kis* (*killer supressor*) que fazem a estabilização do mini plasmídeo R1 pKN1562 (LÓPEZ-VILLAREJO et al., 2012); os genes *pemK* e *pemI* que foram atribuídos a estabilidade herdada durante a divisão celular do plasmídeo R100 (TSUCHIMOTO; OHTSUBO; OHTSUBO, 1988); e o sistema ParD/E, responsável por estabilizar o plasmídeo RK2 (JIANG et al., 2002). O mecanismo pelo qual os sistemas TA plasmidiais induzem a morte celular é denominado de “morte pós-segregacional” (PSK), e ocorre devido a

redução da antitoxina nas células e consequente ativação da toxina. A manutenção e estabilidade dos plasmídeos acontece pela indução da morte de células filhas não receptoras. Nesse caso os sistemas TA também podem ser denominados de sistemas “viciantes” (FRAIKIN; GOORMAGHTIGH; VAN MELDEREN, 2020; LEHNHERR et al., 1993).

## **1.2 Sistemas TA em cromossomos**

Sistemas TA também estão abundantemente presentes no cromossomo de diversas espécies bacterianas, em bacteriófagos e em elementos genéticos móveis (EGM) (NORTON; MULVEY, 2012; DÍAZ-OREJAS et al., 2017). TA cromossomais estão presentes em praticamente todas as bactérias de vida livre, e sua abundância e diversidade tem intrigado a comunidade científica, levantando questões sobre sua funcionalidade (HUANG et al., 2020).

Similarmente aos sistemas encontrados em plasmídeos, foi sugerido que os sistemas TA presentes nos cromossomos possuem um papel importante na estabilidade genética, principalmente de ilhas de patogenicidade e prófagos (FERNANDEZ-GARCIA et al., 2016). Ao passar dos anos, diversos sistemas têm sido identificados, especialmente após a consolidação e expansão de técnicas como o sequenciamento de genoma completo. Além da estabilização genética, outras hipóteses para explicar a presença e funcionalidade dos sistemas nos cromossomos bacterianos seriam a de sua participação na resposta a condições estressantes, formação de biofilme, resistência contra bacteriófagos, e persistência aos antimicrobianos (HUANG et al., 2020). Propôs-se que a resposta ao estresse se daria pela interferência no crescimento bacteriano e/ou pela morte celular altruística, ou seja, pela eliminação de uma parte da população em benefício geral da espécie (DÍAZ-OREJAS et al., 2017).

Adicionalmente, os sistemas TA contribuiriam para indução do estado de dormência, tornando as células metabolicamente inativas. Atualmente existe um corpo crescente de trabalhos que atribuem funções aos sistemas TA cromossomais em diferentes espécies bacterianas, porém o que se sabe é que os sistemas TA são sistemas pequenos, evolutivamente bem-sucedidos, abundantes e diversos, que fazem parte de forma acessória do genoma de procariotos, e se movem por transferência genética horizontal (HAYES; VAN MELDEREN, 2011; VAN MELDEREN; WOOD, 2017; DÍAZ-OREJAS et al., 2017; FRAIKIN; GOORMAGHTIGH; VAN MELDEREN, 2020).

### 1.3 Classificação dos sistemas TA

Oito sistemas TA já foram descritos e classificados de acordo com as características da antitoxina (**Figura 1**). Nos sistemas do tipo I e III a antitoxina é uma molécula pequena de RNA antisense (sRNA) de 50-200 nucleotídeos. A antitoxina do tipo I neutraliza a toxina sobrepondo-se ao seu mRNA, impedindo assim a tradução da toxina (WEN; BEHIELS; DEVREESE, 2014; GHAFOURIAN et al, 2014; BRANTL; JAHN, 2015; FOZO et al, 2010; SONG; WOOD, 2020). A antitoxina pertencente ao grupo III, inibe a ação da toxina pela formação de um complexo proteína-RNA. Os sistemas do tipo III mais estudados são: ToxI-ToxN, TenpI-TenpN e CptI-CptN. Esses sistemas parecem compartilhar o potencial inibidor da infecção por bacteriófagos (SHORT; MONSON; SALMOND, 2015; SONG; WOOD, 2020).

Nos sistemas do tipo II e IV ambas as antitoxinas são proteínas pequenas e instáveis. A inativação da toxina no sistema do tipo II se dá pela formação de um complexo proteico toxina-antitoxina (WEN; BEHIELS; DEVREESE, 2014; HAYES, 2003). Já no sistema do tipo IV a toxina não é diretamente inativada pela antitoxina. Nesse caso,

a antitoxina atua como um antagonista, ligando-se diretamente ao alvo de ação da toxina (SONG; WOOD, 2020).

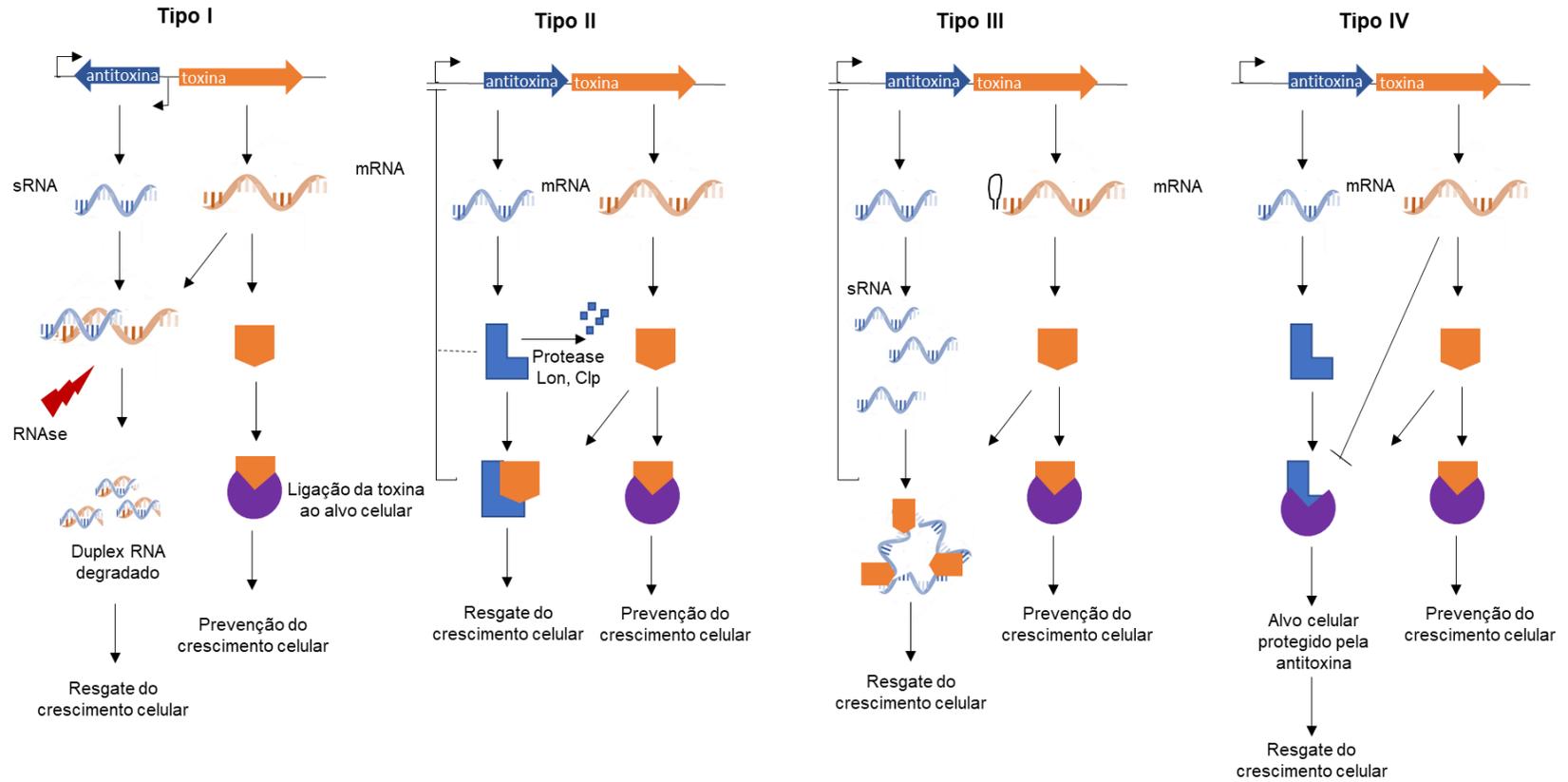
No sistema do tipo V e VII, as antitoxinas são enzimas. No primeiro grupo a antitoxina é uma RNase que degrada o mRNA da toxina. O sistema GhoS-GhoT é um representante do grupo V (WEN; BEHIELS; DEVREESE, 2014; MASUDA et al., 2012; WANG et al., 2012). A antitoxina do grupo VII inibe a toxina pela oxidação de seus resíduos de cisteína. O primeiro sistema do tipo VII a ser descrito foi o Hha/TomB. A expressão de Hha causou lise celular e redução da formação de biofilme, bem como, aumento da dispersão do biofilme (MARIMON et al., 2016).

No sistema do tipo VI, a antitoxina atua como um adaptador proteolítico que favorece a degradação da toxina pela protease endógena ClpXP. Em *Caulobacter*, o sistema do tipo VI SocA/B parece participar da adaptação da espécie em diferentes nichos (YANG; WALSH, 2017).

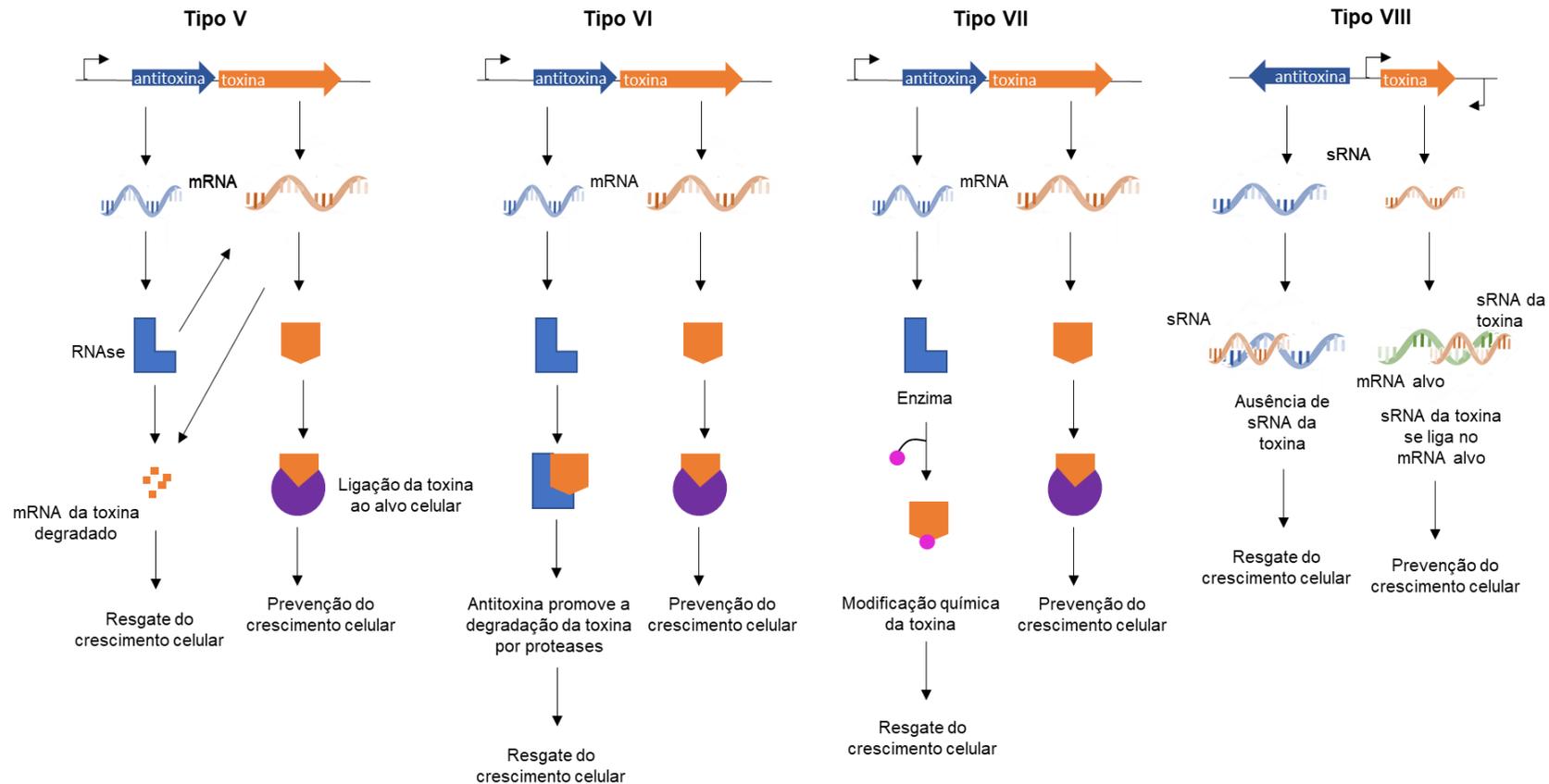
Recentemente, Song e Wood (2020), propuseram a classificação do sistema do tipo VIII. Pela primeira vez, a toxina foi descrita como uma pequena molécula de sRNA que se liga ao mRNA alvo. A antitoxina também é um sRNA que se liga ao sRNA da toxina, neutralizando sua atividade. A toxina SdsR (também conhecido como RyeB), faz parte do *regulon* RpoS, que, em *E. coli* é abundantemente expressa na fase estacionária. SdsR parece atuar reprimindo os genes *tolC* e *mutS* em *E. coli* e diversos outros genes em *Salmonella*, como por exemplo *ompD*, *crp*, *stpA* e *tolC*. A expressão ectópica de SdsR durante a fase exponencial causou morte e filamentação celular. SdsR parece induzir a morte celular pela repressão de *yhcB*, gene que codifica uma proteína de membrana interna. O mecanismo fisiológico da antitoxina RyeA ainda é desconhecido (CHOI et al., 2018).

Em comparação com os outros sistemas, os tipos I e II são os mais estudados, sendo o do tipo II o mais identificado em *loci* bacterianos. Até a presente data, foram listados ao total 6255 sistemas TA de diferentes espécies bacterianas no banco de dados TADB (*toxin-antitoxin data base*), os quais 99% pertencem ao sistema do tipo II. Em relação ao total dos sistemas listados aproximadamente 10% estão localizados em plasmídeos. Somente em *E. coli* estão depositados 220 sistemas TA, sendo 207 presentes em cromossomos e 13 presentes em plasmídeos (TU et al., 2020).

Figura 1. Esquema dos sistemas TA dos tipos I ao VIII



(continua)



Fonte: Adaptado de SRIVASTAVA et al., 2021. Esquema representativo dos 8 sistemas TA descritos na literatura. **Tipo I:** a tradução da toxina é inibida pela ligação do sRNA da antitoxina com o mRNA da toxina. **Tipo II:** o operon TA é transcrito e traduzido para produzir as toxina e antitoxina. A toxina pode ser neutralizada em um complexo, o que permite que a célula mantenha um estado normal de crescimento, ou a toxina pode existir como uma proteína livre e ativa na célula, o que leva a inibição do crescimento bacteriano. **Tipo III:** a antitoxina deste sistema é um sRNA que neutraliza a atividade da toxina pela formação de um complexo RNA-proteína. **Tipo IV:** toxina e antitoxina não interagem diretamente. A antitoxina age como uma molécula antagonista de receptor pois se liga ao alvo da toxina. **Tipo V:** antitoxina é uma RNase que atua clivando o mRNA da toxina, impedindo assim sua tradução. **Tipo VI:** antitoxina atua como um adaptador proteolítico, levando à degradação da toxina por proteases endógenas. **Tipo VII:** antitoxina é uma enzima que modifica quimicamente a toxina através de uma interação transitória, o que resulta na inativação da proteína tóxica. **Tipo VIII:** a toxina é um sRNA que atua se ligando ao mRNA alvo, impedindo sua tradução. A antitoxina também é um sRNA que atua se ligando ao sRNA da toxina, inibindo sua função. A antitoxina encontra-se ilustrada em azul, toxina em laranja, alvo celular em roxo, mRNA alvo em verde e em rosa a representação da alteração química. Os promotores são indicados pelas setas pretas em 90 graus.

#### 1.4 Sistema TA do tipo II

Os sistemas do tipo II podem ser compostos por dois ou três elementos genéticos, que codificam uma proteína estável tóxica e uma antitoxina instável responsável pela supressão da atividade da primeira (CHAN; ESPINOSA; YEO, 2016). Em condições estressantes a antitoxina é degradada por proteases endógenas, deixando a toxina livre para desempenhar sua atividade tóxica, impedindo o crescimento da população bacteriana ou causando a morte celular. A inibição da toxina se dá pela formação de um complexo toxina-antitoxina. A antitoxina sozinha e/ou o complexo TA são responsáveis pela regulação negativa do *operon* (GOEDERS; MELDEREN, 2014).

Esse sistema está abundantemente presente nos genomas bacterianos, representando até 3% do total de suas ORFs. A quantidade de sistemas independe do tamanho do cromossomo e alguns genomas podem conter até 90 sistemas TA do tipo II (GOEDERS; MELDEREN, 2014; GOORMAGHTIDH et al., 2018). Análises evolutivas indicaram que os sistemas TA são propensos a mover-se entre os genomas bacterianos por transferência genética horizontal, o que explicaria sua abundância em cromossomos de eubactérias e Archaea. A distribuição dos sistemas parece não ser homogênea, 66% das espécies bacterianas ancoram de 1 a 20 sistemas, enquanto 20% ancoram mais de 20 sistemas (ZHANG et al., 2020). Tipicamente, a antitoxina encontra-se localizada a montante ao gene da toxina. Porém o contrário é observado nos sistemas MqsR/MqsA, HicA/HicB, RnIA/RlnB e HigA/HigB. A antitoxina possui dois domínios, um responsável pela ligação com a toxina e outro ao DNA (responsável pela autorregulação do *operon*). A regulação do *operon* pode ocorrer de diferentes formas: (1) a transcrição dos genes é regulada por um mesmo promotor, (2) por dois promotores ou (3) pela relação estequiométrica das proteínas. Em (1), quando a antitoxina está localizada a montante, ela será primeiramente expressa, impedindo a

transcrição da toxina. A menor eficácia de tradução da toxina resulta em uma maior concentração molar da antitoxina. Em casos em que a toxina é primeiramente expressa (2), geralmente outro promotor é observado, garantindo assim a maior expressão da antitoxina. A cooperação condicional (3) funciona de acordo com a relação estequiométrica da toxina e antitoxina. Se a concentração do dímero de antitoxina for maior que a concentração da toxina, um complexo toxina-dímero é formado. Esse complexo inibe a transcrição da toxina. Nos casos em que a toxina é primeiramente expressa, não se forma um complexo toxina-dímero, e a antitoxina é responsável sozinha pela supressão do promotor da toxina (SRIVASTAVA et al., 2021).

Os sistemas do tipo II são considerados flexíveis pois a toxina de uma superfamília pode se ligar com a antitoxina de outra superfamília. Baseado na similaridade de suas sequências, 12 superfamílias de toxinas e 20 das antitoxinas foram classificadas (SRIVASTAVA et al., 2021). De acordo com a similaridade estrutural 9 superfamílias de toxinas foram descritas, são elas: (1) ParE - RelE, (2) MazF, (3) HicA, (4) VapC, (5) HipA, (6) FicT - Doc, (7) AtaT - TacT, (8) Zeta e (9) MbcT (ZHANG et al., 2020).

#### 1.4.1 Sistema HipAB

Em 1983, foi identificado o primeiro sistema TA associado ao fenótipo de persistência aos antibióticos (MOYED; BERTRAND, 1983). A análise genética de persistência levou ao isolamento de mutações no cromossomo de *E. coli* K-12, correspondente ao gene denominado *hip* (*high incidence of persistence*). Análise dos sequenciamentos de nucleotídeos demonstraram que o operon *hip* continha dois genes, *hipA* e *hipB* (BLACK; IRWIN; MOYED, 1994), no qual o alelo *hipA7* estava associado ao fenótipo de persistência observado. HipA7 é uma proteína não-tóxica

de 50 kDa que contém duas mutações: a substituição de glicina por serina na posição 22 (G22S), e de ácido aspártico por alanina na posição 291 (D291A) (KORCH; HENDERSON; HILL, 2003). Acredita-se que a substituição G22S em HipA7 amplifica a atividade de HipA por interferir na formação do complexo TA, impedindo sua neutralização (HUANG et al., 2020).

HipA é uma serina/treonina quinase que inativa Gltx (glutamato tRNA ligase) pela fosforilação de seu sítio de ligação a ATP, o que resulta na incapacidade de Gltx ligar o aminoácido glutamato ao RNA transportador (tRNA<sup>Glu</sup>). O acúmulo de tRNA não carregado é detectado pela proteína associada ao ribossomo RelA, que sintetiza a alarmona (p)ppGpp. A síntese da alarmona ativa a resposta estringente: (p)ppGpp liga-se a RNA polimerase e primase, regula negativamente a transcrição de macromoléculas, o que promove a indução do estado de dormência celular (KASPÝ et al., 2013). HipB é uma proteína de 10 kDa, que neutraliza a ação de HipA e regula a transcrição do *operon hipA/B* (BLACK; IRWIN; MOYED, 1994).

### **1.5 Sistema TA em bactérias patogênicas**

A presença de fatores de virulência é considerada um fator determinante na classificação de uma bactéria como patogênica. Porém sabe-se atualmente que bactérias de vida livre podem carrear tantos fatores de virulência quanto as bactérias patogênicas. Estudo de genômica comparativa demonstrou que em alguns casos as bactérias patogênicas possuem genomas reduzidos e contém centenas de genes degradados. Portanto, a evolução das bactérias patogênicas consiste principalmente na perda de diversos genes, redução do conteúdo CG% e redução significativa de reguladores transcricionais (GEORGIADES; RAOULT, 2011).

Os sistemas TA não só parecem participar da regulação da fisiologia de *E. coli*, influenciando a formação de biofilme, a resposta ao estresse, *quorum-sensing*, adaptação a diferentes nichos, como parecem participar na virulência (**Tabela 1**), uma vez que as bactérias patogênicas possuíam significativamente mais sistemas TA do que as não patogênicas (FERNANDEZ-GARCIA et al., 2016; GEORGIADES; RAOULT, 2011).

Adicionalmente, os sistemas TA são encontrados em elementos genéticos móveis relacionados a resistências a antibióticos e em ilhas de patogenicidade. Os sistemas VapB/C e HigA/B são responsáveis pela estabilização de plasmídeos de virulência de *Shigella flexneri* e *Proteus vulgaris*, respectivamente. Em *Haemophilus influenzae* a deleção de VapB/C reduziu a capacidade da bactéria em causar otite em modelo animal. O sistema de três elementos  $\omega$ - $\epsilon$ - $\zeta$  identificado em *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis* e *E. faecium* parece contribuir para a virulência e estabilidade do plasmídeo de resistência a eritromicina e lincomicina (WEN et al., 2014).

Em *E. coli* uropatogênica (UPEC) os sistemas YefM-YoeB e YbaJ-Hha promoveram, de forma independente, a colonização da bexiga, e PasT-PasI foi importante para a sobrevivência do patógeno nos rins de modelo murino. Adicionalmente, PasT/I induziu a formação de persistência na presença de antibióticos e estresse oxidativo (NORTON; MULVEY, 2012).

Sistemas TA em *E. coli* patogênicas parecem impactar na virulência e sobrevivência das cepas em diferentes nichos, inclusive no hospedeiro (NORTON; MULVEY, 2012). Adicionalmente, a persistência parece garantir a sobrevivência bacteriana, atuando também de forma importante em infecções crônicas e na evolução da resistência (WINDELS et al., 2019).

**Tabela 1. Função do sistema TA em *E. coli* patogênicas**

<b>Sistemas TA</b>	<b>Tipo</b>	<b>Localização</b>	<b>Função</b>
PemI/K	II	Plasmídeo pEC302104	Manutenção plasmidial e resistência a $\beta$ -lactâmicos (ESBL $\beta$ -lactamase)
VagC/D	II	Plasmídeo pEC302104	Manutenção plasmidial e resistência a $\beta$ -lactâmicos (ESBL $\beta$ -lactamase)
CcdA/B	II	Plasmídeo pEC302104	Manutenção plasmidial e resistência a $\beta$ -lactâmicos (ESBL $\beta$ -lactamase)
Hok/Sok	I	Plasmídeo pEC302104	Manutenção plasmidial e resistência a $\beta$ -lactâmicos (ESBL $\beta$ -lactamase)
ParA/B	II	Plasmídeo pEC302104	Manutenção plasmidial e resistência a $\beta$ -lactâmicos (ESBL $\beta$ -lactamase)
PsiA/B	II	Plasmídeo pEC302104	Manutenção plasmidial e resistência a $\beta$ -lactâmicos (ESBL $\beta$ -lactamase)
TisB/IstR	I	Cromossomo	Regulação na resposta SOS
SymE/R	I	Cromossomo	Regulação na resposta SOS
MazE/F	II	Cromossomo	Persistência e formação de biofilme
RelB/E	II	Cromossomo	Persistência e formação de biofilme
YefM/YoeB	II	Cromossomo	Persistência e formação de biofilme
MqsR/A	II	Cromossomo	Influência na formação de biofilme e resposta global a estresse. Controla sistema GhoT/S Tolerância ao ácido biliar.
GhoT/S	V	Cromossomo	Persistência e formação de biofilme
Hha/TomB	VII	Cromossomo	Persistência, redução da formação de biofilme pela inibição da produção de fimbrias.
PasT/I	II	-	Persistência

Fonte: FERNANDEZ-GARCIA et al., 2016.

## **1.6 Persistência bacteriana induzida por antibióticos**

A persistência aos antibióticos foi um fenômeno observado por Bigger em 1944, ao notar que uma pequena parcela da população bacteriana sobreviveu ao tratamento intensivo com antibióticos bactericidas. Células persistentes são uma subpopulação de células quiescentes que toleram e sobrevivem a concentrações bactericidas de antibióticos (WU et al., 2015). Ao contrário do que é observado nas bactérias resistentes, as persistentes são genotipicamente idênticas às bactérias suscetíveis. A persistência desencadeada por um sinal de estresse, como a exposição a antibiótico, escassez nutricional, alta densidade populacional, estresse ácido, e exposição a células imunes, foi previamente denominado de persistência do tipo I. Nesse tipo de persistência, as bactérias tendem a se recuperar e crescer normalmente após remoção do agente estressor. Muito menos comum do que a persistência induzida por estresse, é a persistência espontânea, anteriormente denominada de persistência do tipo II. Nesse caso, a persistência pode ocorrer espontaneamente em uma cultura bacteriana de crescimento equilibrado e estável (BALABAN et al., 2019). Por ser a persistência induzida ou do tipo I o foco desse trabalho, a literatura revisada e os ensaios propostos abordam somente a persistência induzida por estresse causado por antibióticos e as defesas do hospedeiro.

Persistência é um caso especial de tolerância a antibióticos, em que uma subpopulação de células persistentes sobrevive ao tratamento com antibióticos, enquanto a maior parte da população tende a morrer, dando origem a curva bifásica de morte celular. Mecanismos ligados a tolerância a antibióticos como indução da dormência e redução do metabolismo de ATP tem sido identificados em células persistentes. Os dois principais mecanismos estudados na persistência são: o mecanismo molecular de redução do metabolismo que favorece a persistência e

tolerância aos antibióticos, e o mecanismo que gera a heterogeneidade populacional. Já o estado de dormência reflete o estado de uma bactéria metabolicamente inativa que não cresce, o termo também é utilizado para células que não crescem mesmo em condições viáveis de crescimento. Bactérias dormentes costumam ser tolerantes aos antibióticos por estarem metabolicamente inativas, no entanto tolerância e persistência podem surgir sem dormência (BALABAN et al., 2019).

A persistência induzida pode ser descrita como uma estratégia de autopreservação populacional frente as adversidades do ambiente. As células dormentes, temporariamente, sacrificam a replicação em troca de tolerância ao estresse (HUANG et al., 2020). Esse fenótipo parece desempenhar um papel importante na falha do tratamento de infecções persistente como tuberculose, infecção do trato urinário e infecções causadas por bactérias formadoras de biofilme (WU et al., 2015).

A indução da persistência foi inicialmente atribuída aos sistemas TA HipA/B e RelB/E, pois foi observado que a super expressão das toxinas HipA e RelE aumentou a taxa de células persistentes. Paralelamente, outras proteínas como DnaJ, PmrC e PhoU, não relacionadas aos sistemas TA, também induziram o desenvolvimento de persistência (LI; ZHANG, 2007). A persistência parece ser um fenômeno dinâmico e hierárquico, não fixo, que envolve diversos genes e vias, em tempos diferentes e “profundidades” (rasa, intermediária e profunda). Ao avaliar 21 genes relacionados a persistência Wu e colaboradores (2015), ranquearam os genes *oxyR* (via de estresse oxidativo), *dnaK*, *clpB* e *rpoS* (regulador global), *relA* (resposta estrigente), *sucB* (produção de energia), *mqsR* (toxina do modulo TA), e *recA* (reposta SOS) como os mais proeminentes para a indução da persistência.

A compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na persistência bacteriana aos antibióticos além de elucidar as vias e genes relacionados por si só, podem

orientar o desenvolvimento de drogas para o tratamento e prevenção de infecções persistentes.

### **1.7 Perspectivas e aplicabilidades para o sistema TA**

O acúmulo de toxina livre afeta processos fisiológicos importantes como por exemplo a replicação do DNA, síntese proteica e síntese de parede celular. Adicionalmente, muitas toxinas do sistema TA atuam de forma semelhante a alguns antibióticos (**Tabela 2**), apresentando atividade bactericida ou bacteriostática (WEN; BEHIELS; DEVREESE, 2014). Nesse sentido, algumas estratégias podem ser utilizadas para o desenvolvimento de novas drogas baseadas em sistema TA, como: (1) impedir a formação do complexo TA, (2) ativação das proteases endógenas, (3) inibir a transcrição ou tradução do sistema TA, (4) desenvolvimento de droga baseada na toxina e (5) bacteriófagos capazes de introduzir toxinas no interior celular (BRAVO et al., 2018; SRIVASTAVA et al., 2021; RÓWNICKI et al., 2020).

Além de atuar como antimicrobianos, o sistema TA possuem potencial antiviral e anticancerígeno. A atividade anticancerígena foi atribuída a capacidade de algumas toxinas como MazF e Kid de induzir apoptose em células eucarióticas. Aplicações biotecnológicas, como marca de seleção e manutenção genética, produção de proteínas, e morte direcionada de bactérias patogênicas na microbiota também são algumas das aplicabilidades do sistema TA (SRIVASTAVA et al., 2021).

**Tabela 2. Comparação entre as atividades das toxinas do sistema TA com antibióticos**

Processo celular	Alvo	Sistema TA	Processo celular	Classe de antibiótico
Replicação DNA	DNA girase	CcdA-CcdB ParD-ParE	Replicação DNA	Quinolonas
Síntese de RNAt	Síntese de glutamil- RNAt	HipA-HipB	Síntese de RNAm	Rifampicina
Síntese de macromoléculas	UDP-N-Acetilglucosamina	RelB-RelE Doc-Phd VapB-VapC MazE-MazF MqsA-MqsR	Síntese de macromoléculas	Macrolídeos, cloranfenicol e clindamicina Aminoglicosídeos e tetraciclina
Síntese de parede celular	Membrana interna	$\omega$ - $\epsilon$ - $\zeta$	Síntese de parede celular	Penicilinas, cefalosporinas, glicopeptídeos, carbapenem e monobactâmicos
Dano em membrana		Sok- hok TisB1stR	Metabolismo do ácido fólico	Sulfonamidas e trimetropina
Polimerização do citoesqueleto	MreB e FtsZ	CbtA-CbtE	Polimerização do citoesqueleto	---

Fonte: Modificado de WEN; BEHIELS; DEVREESE, 2014.

### **1.8 *Escherichia coli***

O vasto repertório de fatores de virulência adquiridos por *E. coli* pode originar uma variedade de manifestações clínicas, como infecções intestinais e extraintestinais (NATARO; KAPER, 1998; CROSSMAN et al., 2010). *E. coli* extraintestinal (ExPEC) pode ser classificada em subpatótipos com base no hospedeiro e local de infecção, manifestações clínicas e fatores de virulência. De acordo com esses critérios, ExPEC podem ser subdivididas em *E. coli* uropatogênica (UPEC), *E. coli* associada a meningite neonatal (NMEC), *E. coli* associada a sepse (SEPEC) e *E. coli* patogênica aviária (APEC) (JOHNSON et al., 2012).

UPEC é responsável por 70-95% das infecções do trato urinário (ITU) adquiridas na comunidade e cerca de 50% das hospitalares. Possuem um diversificado repertório de fatores de virulência para colonizar e infectar o trato urinário de forma ascendente (PITOUT, 2012; FOXMAN, 2010). Uma vez no interior do trato urinário, coloniza a bexiga causando cistite, mas também pode ascender através da uretra chegando aos rins. A capacidade de UPEC em aderir ao epitélio urinário é um dos principais fatores que permitem a infecção, uma vez que a adesão bem-sucedida permite que a bactéria suporte o fluxo urinário e seja capaz de invadir as células uroteliais. No interior celular, UPEC multiplica-se rapidamente formando um tipo de biofilme, tornando-se menos susceptíveis aos antibióticos (WILES; KULESUS; MULVEY, 2008). A capacidade de algumas ExPEC em acessar e se difundir na corrente sanguínea é especialmente problemática. Pacientes com bacteremia causada por ExPEC possuem perfil inflamatório exacerbado e conseqüentemente maior susceptibilidade ao óbito no decorrer da doença (BARBER; FLEMING; MULVEY, 2016; WILLIAMSON et al., 2014). A sobrevivência do paciente com sepse geralmente depende de um diagnóstico rápido e da administração oportuna de antibióticos

apropriados. Para cada hora que o tratamento é adiado, há um aumento de 7.6 % de morte. Mesmo com a terapia antimicrobiana adequada pode ser observadas complicações como edema, imunossupressão e problemas na coagulação (MARTINEZ et al., 2020).

Adicionalmente aos fatores de virulência, ExPEC tem sido constantemente relacionada a resistência e persistência aos antibióticos, pela aquisição de plasmídeos que codificam o fenótipo de resistência e através da indução de persistência e formação de biofilme (JOHNSON et al., 2012). Sugere-se que indiretamente o fenótipo de persistência possa levar a resistência, uma vez que as células persistentes sobrevivem aos tratamentos com antibióticos e são capazes de adquirir genes de resistência (DETER et al., 2017).

Antibióticos beta lactâmicos, principalmente os de terceira geração como as cefalosporinas, são amplamente utilizados em infecções causadas por *E. coli* patogênica na comunidade e em ambiente hospitalar. Betalactamases codificadas por plasmídeos como a Amp C betalactamase (por exemplo CMY), betalactamases de amplo espectro (como CTX-M) e carbapenemases, são amplamente identificadas em ExPEC. As CTX-M e Nova Deli metalo-betalactamase (NDM) são as principais betalactamases responsáveis pela resistência aos antibióticos em *E. coli*. Antibióticos como a colistina são uma alternativa para as *E. coli* produtoras de carbapenemases (PITOUT, 2012; LIVERMORE; WOODFORD, 2006).

Devido à limitada eficácia das drogas atuais no tratamento de bactérias resistentes, existe uma crescente demanda para a produção de conhecimento em relação a fisiopatologia dessas cepas, na busca por novos alvos terapêuticos. Neste sentido, compreender o sistema TA pode fornecer informações relevantes em relação a

participação dos sistemas na fisiopatologia de *E. coli* e favorecer o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos.

## 2. JUSTIFICATIVA

Em *E. coli* K 12 pelo menos 36 genes do sistema TA pertencentes aos tipos I, II, IV e V foram identificados. De todos, o sistema do tipo II é o mais abundante, as toxinas desse sistema são em grande parte endonucleases e pertencem a 12 superfamílias classificadas de acordo com a sequência de aminoácidos. As toxinas dos sistemas MazE/F, RelB/E, ChpBK/I, YafQ-DinJ, YoeB-YefM, HipA/B, YafN/O e MqsA/R, têm como alvo a replicação do DNA, mRNA, tRNA, ribossomo 30S, ribossomo 50S e proteínas do citoesqueleto, e por serem bem conhecidos e caracterizados foram selecionados para estudo de frequência em ExPEC (YAMAGUCHI; UNOUYE, 2011; FERNÁNDEZ-GARCIA et al., 2016; GOERDERS; VAN MELDEREN, 2014).

A investigação dos sistemas mencionados acima, em bactérias patogênicas, pode fornecer informações importantes em relação ao papel do sistema TA na virulência e persistência. Para o desenvolvimento desse trabalho inicialmente os oito sistemas TA do tipo II, foram identificados em cepas de *E. coli* patogênicas pertencentes as coleções bacterianas do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan e do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo. Após avaliar a presença dos sistemas, duas cepas ExPEC foram selecionadas para deleção dos genes *hipA/B*. Posteriormente, ensaios fenotípicos de persistência e virulência foram realizados, para que possamos compreender a participação do sistema TA HipA/B em ExPEC patogênica isolada de infecção sanguínea. Pois, apesar de estar presente em inúmeros genomas bacterianos filogeneticamente não relacionados, ainda não está claro se todos os sistemas HipA/B possuem alguma influência na persistência bacteriana (HUANG et al., 2020).

### 3. OBJETIVO

Analisar a presença dos oito sistemas TA do tipo II em *E. coli* extra intestinal e investigar a importância do sistema TA HipA/B em diversos fenótipos associados ao mecanismo de adaptação bacteriana, tais como a persistência bacteriana induzida por antibióticos, formação de biofilme, resistência ao soro e sobrevivência em macrófagos.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Amostras bacterianas e plasmídeos

Neste estudo foram inicialmente analisadas 319 cepas de *Escherichia coli* patogênicas, incluindo cepas de três categorias de *E. coli* diarreio gênicas (DEC) e extra intestinal (ExPEC). Sendo 57 cepas de *E. coli* produtora da toxina de Shiga (STEC), 90 *E. coli* enteroagregativa (EAEC), 72 *E. coli* enteropatogênica atípica (EPECa), e 100 *E. coli* extraintestinais (ExPEC). Como controle para a presença e ausência dos sistemas TA as bactérias *E. coli* K-12 MG1655 e *Serratia marcescens*, foram selecionadas, a primeira como controle positivo e a segunda negativo. As cepas de ExPEC EC182 e EC273 isoladas de infecção sanguínea de origem humana, gentilmente cedidas pela Prof. Dra. Rosa Maria da Silva da Universidade Federal de São Paulo, foram selecionadas para construção do mutante em *hipAB*. O vetor pKD46, responsável pela expressão das recombinases do sistema *Lamba-Red* ( $\lambda$ -red), os vetores pKD3, utilizado como molde para amplificação do gene de resistência a cloranfenicol, e pCP20 *helper* responsável pela eliminação do gene de resistência a antibiótico por indução da recombinase FLP, foram utilizados na construção dos mutantes. Para complementação das amostras mutantes foi utilizado o plasmídeo pTJK4, gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Jakob Møller-Jensen da Universidade do Sul da Dinamarca. As amostra e plasmídeos utilizados neste trabalho estão descritos na **Tabela 3**.

**Tabela 3. Cepas bacterianas e plasmídeos utilizados nesse trabalho**

<b>Bactérias</b>	<b>Descrição</b>	<b>Referência/Fonte</b>
EC182	Cepa selvagem ExPEC O16:H48 ST10	Dados não publicados
EC182 $\Delta$ hipAB	EC182 mutante em <i>hipAB</i>	Este estudo
EC182:hipAB	EC182 mutante em <i>hipAB</i> + pHipAB	Este estudo
EC273	Cepa selvagem ExPEC	Dados não publicados
EC273 $\Delta$ hipAB	EC273 mutante em <i>hipAB</i>	Este estudo
EC273:hipAB	EC273 mutante em <i>hipAB</i> + pHipAB	Este estudo
TOP10	<i>Escherichia coli</i> K-12 (propagação plasmidial)	Dinamarca
MG1655	<i>Escherichia coli</i> K-12 OR:H48: K-. Cepa laboratorial derivada de W1485	GUYER <i>et al.</i> , 1981
<i>Serratia marcescens</i>	Bactéria Gram-negativa, utilizada como controle negativo para os 8 sistemas TA do tipo 2 estudados neste trabalho	BIZIO, 1819
<b>Plasmídeos</b>		
pKD46	Plasmídeo utilizado para deleção cromossomal de genes com sítio FRT. Ancora genes <i>exo</i> , <i>bet</i> , <i>gam</i> do sistema <i>Lambda-red</i> . Marca de seleção: ampicilina ( <i>amp</i> )	DATSENKO, WANNER, 2000
pKD3	Plasmídeo utilizado como molde para amplificação do cassete de recombinação, sítio FRT e gene de resistência a cloranfenicol ( <i>cat</i> )	DATSENKO, WANNER, 2000
pCP20	Plasmídeo responsável pela expressão de FLP recombinase e consequente retirada do cassete de resistência. Marca de seleção: ampicilina ( <i>amp</i> )	DATSENKO, WANNER, 2000
pTJK4	Plasmídeo de baixo número de cópias utilizado para expressão constitutiva do sistema <i>hipAB</i> . Marca de seleção: Canamicina ( <i>kan</i> )	Dinamarca
pHipAB	Genes <i>hipAB</i> de EC182 clonado no vetor pTJK4	Este trabalho

FRT (*flanked by short direct repeats*) - FLP recognition target.

## 4.2 Detecção dos genes dos sistemas toxina-antitoxina do tipo II

Para verificar a presença dos sistemas TA do tipo II MazE/F, RelB/E, ChpIK/B, DinJ/YafQ, YefM/YoeB, HipB/A, YafN/O e MqsR/A foi utilizada a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para detecção dos genes de cada uma das toxinas.

### 4.2.1 Preparo do DNA

Os lisados bacterianos foram preparados e utilizados diretamente como molde de DNA para a reação de PCR. A partir do estoque congelado, os isolados foram cultivados em meio não seletivo Luria Bertani (LB) (Tryptona 1%, Extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%) a 37 °C por 18 h. O DNA foi extraído por fervura, brevemente: uma alíquota de 1 mL da cultura foi centrifugada por 5 min a 10.000 x g, o sedimento formado foi lavado com 1 mL de água ultrapura estéril, novamente centrifugado e suspenso em 200 µL de água ultrapura estéril. Dois ciclos de fervura (100 °C) e banho de gelo (4 °C) foram realizados por 5 min. Por fim, as amostras foram centrifugadas e os sobrenadantes coletados e armazenados a – 20 °C.

### 4.2.2 Reações em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os iniciadores foram desenhados utilizando como base as sequências das toxinas dos oito sistemas TA da cepa laboratorial MG1655, depositadas no GeneBank (**Tabela 4**). As reações de PCR foram realizadas em volume final de 10 µL contendo 2,5 U de *Taq DNA Polymerase Recombinant* (Invitrogen), 0,2 mM de dNTP (Invitrogen), 0,5 µM de cada oligonucleotídeos iniciador (**Tabela 4**), 1 mM ou 1,5 mM de cloreto de magnésio (Invitrogen), tampão da enzima 1 X (Invitrogen) e lisado bacteriano. A amplificação dos genes de interesse foi realizada em termociclador Veriti™ 96-well Thermal Cycler (Applied Biosystems).

Tabela 4. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores

Iniciadores	Sequência (5'-3')	Fragmento (pb)	Ciclo de amplificação	Descrição	Acesso Genebank
<i>mazF</i>	F- ATGGTAAGCCGATACGTACC R- GAGTTGTAATTCCTCTGGGG	303			947252
<i>relE</i>	F- TTTCTGGATTTTGACGAGCG R- GCCTCGCTATATACTTCCGA	260			947549
<i>yoeB</i>	F- TATCTGTAAGGAGGAAAC R- ATGAGCAGTGAATCGTCCG	194			1450274
<i>yafO</i>	F- ACAAACCTATTTCGCCTGCA R- ACGCTTCTGCCATTTTCC	367	45 s 95 °C, 30 s 58 °C, 1 min 30 s 72 °C	Identificação dos sistemas TA do tipo II	944916
<i>hipA</i>	F- ACCTGTTACCCGATAGCC R- CGTTATCCAGTGCTGCTG	1029	(30x); 7 min 72 °C		946064
<i>mqsR</i>	F- CGCACACCACATACACGT R- CTCCTTAAACGAGACGATCAG	282			947500
<i>chpB</i>	F- AAAAGTGAATTTGAACGGGG R- TAATAACGCCTCTTCCACCAC	318			948747
<i>yafQ</i>	F- GGGATATTGAATACTCGGGAC R- TAAATCAGGATCCAGTCCGG	205			944911
<i>hipBcat-1</i> <i>hipAcat-2</i>	F- ATGCAATGAAACTGGTTCGTCAGCAAA ATGGCTGGACGCAGAGCGAGCTGGCGA AAAAATCGGCATTAAGCAGGCGATGTG TAGGCTGGAGCTGCTTCG R- CTCCGGAAAATCTGTCCGTAATGAAG TCTTACGTTATCCAGTGCTGCCGGAAT CATTCTGGCAAAGTCACTCAGGATTTCAT ATGAATATCCTCCTTAG	1514	30 s 95 °C, 1 min 50 °C, 1 min 45 s 68 °C; 7 min 68 °C	Mutação de <i>hipAB</i>	Não se aplica
<i>hipBext</i> <i>hipAext</i>	F- TGCTGTGGACGTATGACATG R- ATCTCACTTACTACCGTATTCTCG	1655* 339**	45 s 95 °C, 30 s 56 °C, 1 min 30 s 72 °C (30x); 7 min 72 °C	Confirmação da mutação	Não se aplica
<i>hipBBamHI</i> <i>hipAXhol</i>	F- NNGGATCCATGATGAGCTTTCAGAAGAT R- NNCTCGAGTCACTTACTACCGTATTCTC	1606	10 s 98 °C, 30 s 60 °C, 45 s 72 °C (30x); 5 min 72 °C	Clonagem/ complementação	Não se aplica
<i>hipBext</i> M13/pTJK4	F- TGCTGTGGACGTATGACATG R - TGTAACGACGCGCCAGT	1670	30 s 95 °C, 30 s 55 °C, 1 min 30 s 72 °C (30x); 5 min 72 °C	Confirmação da complementação	Não se aplica

\*A amplificação do sistema TA *hipAB* da cepa parental tem o tamanho de 1655 pb.

\*\* A amplificação do sistema dos isolados mutantes resultou em uma cicatriz do tamanho de 339 pb.

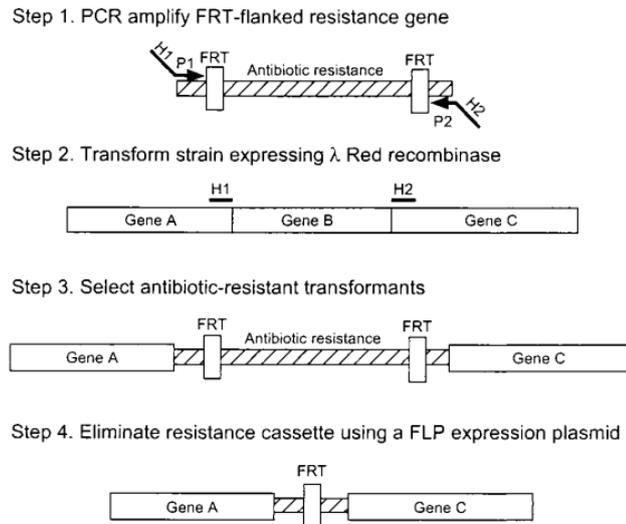
#### 4.2.3 Eletroforese de DNA em gel de agarose

Após amplificação, uma alíquota do produto de PCR foi homogeneizada ao tampão de amostra (Invitrogen) e analisado em gel de agarose 1% (m/v) preparado em tampão TAE (EDTA 1 mM; ácido acético 20 mM; Tris-base 40 mM), corados com *GelRed* (Uniscience). A corrida eletroforética foi realizada em uma cuba contendo tampão TAE, sob tensão de 80 V por aproximadamente 1 h. O gel foi fotografado pelo sistema de captação de imagem Alphamager™ 2200 (Alpha Innotech, EUA).

#### 4.3 Obtenção de mutantes em *hipAB* por recombinação homóloga

Os mutantes foram construídos segundo protocolo descrito por Datsenko e Wanner (2000), utilizando o sistema de recombinases codificadas pelo fago  $\lambda$  *Red* e fragmento linear de DNA. Brevemente, o fragmento linear de DNA contendo o gene de resistência mais a região de homologia foi amplificado por PCR, seguido inserção dos fragmentos nas cepas EC182 e EC273 previamente transformadas com plasmídeo pKD46, que alberga os genes das recombinases necessárias para a recombinação homóloga. A inserção do gene de resistência, gene *cat*, no cromossomo bacteriano foi avaliado pela expressão do fenótipo de resistência ao cloranfenicol e confirmada por PCR. Posteriormente, o gene *cat* foi retirado com auxílio do plasmídeo pCP2. A retirada do gene de resistência deixou uma “cicatriz”, que corresponde aos fragmentos de *hipB* e *hipA* utilizados para recombinação por homologia (**Figura 2**). Os tópicos seguintes foram realizados para recombinação homóloga utilizando o sistema *Lambda-Red*.

**Figura 2 Sistema *Lambda-Red* de recombinação por homologia**



Fonte: Datsenko e Wanner, 2000. Sistema *Lambda-Red* de recombinação por homologia. Em passo 1. O gene de resistência flanqueado ao genes FRT são amplificados utilizando iniciadores que contém a sequência de interesse para homologia, representados na figura como H1 e H2, e a sequência necessária para amplificar o gene de resistência. Em passo 2. O fragmento linear é inserido nas bactérias previamente transformadas pelo plasmídeo pKD46, que expressa as recombinases *Lambda-Red* necessárias para a recombinação. Em passo 3. As células transformantes são selecionadas pelo fenótipo de resistência ao antibiótico. Em passo 4. O gene de resistência é removido por plasmídeo que expressa FLP.

#### 4.3.1 Extração plasmidial

Os plasmídeos utilizados neste trabalho (**Tabela 3**) foram extraídos por lise alcalina utilizando o QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen), conforme orientação do fabricante.

#### 4.3.2 Amplificação, purificação e digestão do cassete de resistência

Para amplificação do cassete de resistência (fragmento linear de DNA), o vetor pKD3 foi utilizado como molde de DNA. Os iniciadores foram desenhados utilizando como molde o gene *hipAB* e o cassete de resistência (**Tabela 4**). Foram realizadas 10 reações de PCR com volume de 50  $\mu$ L cada, contendo 2,5 U *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Thermo Fisher Scientific), 0,2 mM de dNTP (Invitrogen), 1,25  $\mu$ M de cada oligonucleotídeos iniciador, 5 mM de cloreto de magnésio (Thermo Fisher Scientific), 1X de tampão da enzima (Thermo Fisher Scientific), 2  $\mu$ L do molde

de DNA. A amplificação do gene de interesse foi realizada em termociclador Veriti™ 96-well Thermal Cycler (Applied Biosystems®). Após serem separados por eletroforese em gel de agarose, os fragmentos foram recortados do gel e purificados segundo o protocolo do kit *Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Health). A quantificação do fragmento resultante da purificação foi realizada em *Nanodrop Lite* (Thermo Scientific) por leitura de absorvância em comprimento de onda de 260 nm. O fragmento purificado foi cortado pela enzima DpnI (Thermo Fisher Scientific) para remoção de DNA genômico metilado. Em uma reação com volume total de 100 µL, contendo tampão Tango 1X, 80 U da enzima, 7 µg do produto de amplificação e água ultrapura suficiente para 100 µL. Posteriormente, o fragmento foi novamente purificado e utilizado para transformação por eletroporação em células competentes de EC182 e EC273 previamente transformadas com o plasmídeo pKD46.

#### 4.3.3 Obtenção de células eletrocompetentes

As cepas EC182 e EC273 foram cultivadas em meio de cultura LB a 37 °C por 18 h sob agitação (250 rpm). O inóculo foi realizado na proporção de 1:100 e cultivado até a fase exponencial ( $DO_{600}$  0.6), seguido por incubação a 4 °C por 10 min. O cultivo foi centrifugado a 4 °C por 10 min a 8.000 x g. O sobrenadante foi descartado e o sedimento solubilizado com 1 mL de glicerol 10% gelado e estéril, e em seguida centrifugado a 4°C por 1,5 min a 8.000 x g. Este processo foi repetido e o sedimento final solubilizado em 100 µL de glicerol 10%. As células competentes resultantes foram separadas em alíquotas em microtubos contendo 50 µL e utilizadas imediatamente.

#### 4.3.4 Eletrotransformação

Para transformar as bactérias com o vetor de recombinação pKD46, 50 µL de células competentes foram incubadas com aproximadamente 150 ng do plasmídeo e inseridas em eletrocubetas de 0,2 cm (Bio-Rad). Um pulso elétrico foi aplicado no equipamento Gene Pulser II (Bio-Rad) com os seguintes parâmetros: 2,5 kV e 25 µF. Imediatamente após o pulso, as bactérias foram incubadas por 2 h em meio de cultura LB (1 mL) a 30 °C. Após o período de recuperação e expressão fenotípica, as células foram semeadas em meio sólido (Tryptona 1%, Extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%, Ágar 1,5%) contendo 100 µg/mL de ampicilina e incubadas a 30 °C por 18 h.

#### 4.3.5 Recombinação homóloga do sistema *hipAB*

As cepas transformantes carregando o plasmídeo *Red Helper* (pKD46) foram semeadas em meio LB com ampicilina 100 µg/mL a 30°C por 18 h. O inóculo na proporção de 1:100 foi cultivado em meio LB com ampicilina e 1 mM de L-arabinose a 30 °C sob agitação constante (250 rpm) até atingir a fase exponencial ( $DO_{600} \sim 0.6$ ). Em seguida, a cultura bacteriana foi incubada a 42 °C por 15 min e transferida para um recipiente contendo gelo. As culturas bacterianas foram preparadas para tornarem-se competentes, conforme descrito no item 3.3.3. Ao tubo contendo 50 µL das células competentes, aproximadamente 120 ng do DNA linear (produto de PCR) foi adicionado. As células foram transformadas por eletroporação, recuperadas e semeadas em meio LB sólido suplementado com cloranfenicol 25 µg/mL, e incubadas por 18 h a 37 °C. A mutação foi confirmada por PCR, e os produtos da PCR foram sequenciados por método de Sanger pelo Centro de Estudos do Genoma Humano na Universidade de São Paulo – CEGH/USP. As sequências obtidas foram alinhadas utilizando a ferramenta BLAST.

#### 4.3.6 Retirada do cassete de resistência

Após confirmação da mutação, o cassete de resistência foi removido das cepas mutantes pelo vetor termolábil pCP20. Mutantes em *hipAB* competentes foram transformados com o plasmídeo pCP20, incubados em meio LB por 1 h a 30 °C e semeados em meio sólido LB contendo ampicilina (100 µg/mL). Após 18 h, uma colônia foi cultivada em 5 mL de LB sem antibiótico a 43 °C por 18 h, para indução das recombinases FLP e perda do plasmídeo. Depois da incubação, as culturas bacterianas foram diluídas por 3 vezes sucessivas (100 µL em 9,9 mL de meio LB), e 50 µL de cada diluição foi semeada em LB ágar por 18 h a 37 °C. Dez colônias foram selecionadas e individualmente inoculadas em meio LB ágar sem e com os antibióticos ampicilina (100 µg/mL) e cloranfenicol (25 µg/mL) por 18 h a 37 °C. A retirada do cassete de resistência foi verificada pela sensibilidade ao cloranfenicol, e a retirada de pCP20 pela sensibilidade a ampicilina.

#### 4.4 Construção dos plasmídeos de complementação

Os sistemas *hipAB* foram amplificados utilizando o DNA genômico das cepas EC182 e EC273 utilizando os iniciadores *hipBBamHI/hipAXhoI* (**Tabela 2**). Quatro reações de PCR foram realizadas utilizando-se o volume de 50 µL em cada reação contendo 1 U Phusion™ High Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific), 0,2 mM de dNTP (Invitrogen), 0,5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1x tampão 5x *Phusion™ HF buffer* com cloreto de magnésio (Thermo Fisher Scientific) e 100 ng de DNA genômico. A amplificação dos genes de interesse foi realizada em termociclador Veriti™ 96-well *Thermal Cycler* (Applied Biosystems). O produto da PCR foi purificado pelo kit *GE GFX PCR DNA and GEL Band Purifications Kits*, seguindo as orientações do fabricante. O plasmídeo e o produto de PCR foram cortados pelas enzimas *FastDigest*

*BamHI* e *XhoI* (Thermo Fisher Scientific), seguindo as orientações do fabricante. Para cada reação de 20  $\mu\text{L}$ , foram utilizados 0,5 U de cada enzima, 1x do tampão 10x *FastDigest® buffer* e DNA. A concentração de DNA utilizada foi de até 1  $\mu\text{g}$  para os plasmídeos e até 0,2  $\mu\text{g}$  para o produto de PCR por reação. As reações enzimáticas foram incubadas a 37 °C por 30 min e as enzimas inativadas a 80 °C por 5 min.

#### 4.4.1 Ligação e quimiotransformaç o

O produto de PCR foi clonado no vetor utilizando a enzima T4 ligase (Invitrogen). Em uma reação final de 20  $\mu\text{L}$ , foram utilizados 4  $\mu\text{L}$  do tampão de ligação 4x, 10  $\mu\text{L}$  (~ 1  $\mu\text{g}$ ) de inserto, 5  $\mu\text{L}$  (250 ng) de vector e 1  $\mu\text{L}$  de enzima T4 ligase. A reação foi incubada por 1 hora em temperatura ambiente e mais 18 h a 16 °C.

As células foram preparadas quimicamente competentes da seguinte forma: 50  $\mu\text{L}$  da cultura bacteriana (semeada no dia anterior) foi inoculada em 10 mL de meio LB em um frasco do tipo Erlenmeyer com capacidade para 50 mL. A cultura foi incubada a 37 °C até atingir fase exponencial ( $\text{DO}_{600} = 0,4$ ). Então, 1 mL da cultura foi coletada e centrifugada por 5 min a 3.500 x g. O sobrenadante foi descartado e ao sedimento foi acrescentado 200  $\mu\text{L}$  da solução TSB (Tryptona 1%, Extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%, PEG 8000 10%,  $\text{MgCl}_2$  20 mM e DMSO 5%). Aos 50  $\mu\text{L}$  da solução de bactérias quimiocompetentes, 15  $\mu\text{L}$  da ligação foram adicionados e incubados por 30 min a 4 °C (gelo) seguido por 2 min a 42 °C. Ao fim do choque térmico, as bactérias foram recuperadas em 1 mL de meio LB por 2 - 3 h a 37 °C. As células em suspensão foram centrifugadas a 3.500 x g por 5 min, 750  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi descartado e o restante semeado em placa de LB  gar contendo 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de canamicina.

#### 4.5 Sequenciamento de genoma completo, montagem e anotação

O sequenciamento dos isolados foi realizado pelo Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade do Sul da Dinamarca. A biblioteca genômica foi construída no modelo *paired-end* com o kit *NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit for Illumina®* (New England Biolabs), de acordo com as recomendações do fabricante. Especificamente, o DNA genômico foi clivado enzimaticamente com a enzima Fragmentase (New England Biolabs) em fragmentos de aproximadamente 200 pb. Para cada amostra foram utilizados dois adaptadores compatíveis à plataforma Illumina de sequenciamento. Para sequenciamento da cepa EC182, a inserção dos adaptadores e a reação de PCR foram realizadas segundo orientação do fabricante utilizando o kit *NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina® (Dual Index Primers Set 1)* (New England Biolabs). Após análise da qualidade da biblioteca gerada, 50 pb de cada extremidade dos fragmentos foram sequenciadas com 25 milhões de leituras. Para sequenciamento da cepa EC273, a biblioteca foi montada utilizando o kit *Nextera XT Library Prep Kit* (Illumina), seguindo o protocolo modificado com a utilização de 2 ng de DNA. O sequenciamento *pair-end* (2x250 pb) foi realizado na plataforma Illumina com 521.600 *reads*.

Os adaptadores foram removidos utilizando o software Trimmomatic (0.30). A montagem do genoma e anotação foram realizadas utilizando ferramentas de bioinformática disponíveis na plataforma Galaxy (usegalaxy.org). As leituras (*reads*) geradas pelo sequenciamento foram montadas utilizando o software SPAdes com *k-mers* 21, 33, 55. Para identificação dos genes e anotação o software Prokka (*Prokaryotic Genome Annotation*) foi utilizado (SEEMANN, 2014).

#### **4.6 Concentração mínima inibitória (CMI)**

A concentração mínima inibitória (CMI) foi determinada conforme descrito por Hazan e colaboradores (2014), com pequenas modificações. Células armazenadas em freezer de - 80 °C foram inoculadas em meio MOPS e LB a 37 °C por 18 h sob agitação (200 rpm). Então, foram diluídas na proporção 1:1.000 no mesmo meio de cultura do dia anterior. Após diluição, 100 µL do inóculo foi adicionado em placas de 96 poços. Os estoques dos antibióticos foram preparados nas concentrações de 100 mg/mL de ampicilina, 10 mg/mL de ciprofloxacino e 100 mg/mL de gentamicina, e diluídos em meio de cultura na proporção de 1:1.000, 100 µL destas diluições foram adicionados na primeira coluna e serialmente diluídos em placa por 11 vezes. A última coluna da placa de 96 poços foi utilizada como controle positivo sem antibióticos. A placa foi incubada por 24 h a 37 °C. A absorbância foi medida no comprimento de onda 600 nm em leitor de placa. A MIC foi definida pela menor concentração de antibiótico que impediu o crescimento bacteriano.

#### **4.7 Ensaio de persistência induzida por antibióticos**

O ensaio de persistência foi realizado conforme descrito por Goormaghtigh e Van Melderen (2016), com pequenas modificações. Brevemente, uma colônia bacteriana previamente cultivada em LB ágar sem antibiótico, foi coletada e cultivada em 3 mL de meio MOPS-glicose sob agitação constante (250 rpm) por 18 h a 37 °C. Em frascos de 100 mL contendo 15 mL do meio MOPS previamente aquecido a 37 °C, as culturas iniciais foram diluídas até atingir a  $DO_{600}$  0,01. Os inóculos foram então incubados a 37 °C sobre agitação constante e aeração de 85-90%. Ao atingir a fase exponencial ( $DO_{600}$  0,5), os antibióticos ampicilina 100 µg/mL, ciprofloxacino 1 e 10 µg/mL e gentamicina 10 µg/mL foram incubados por até 48 h. Para todos os tempos, uma

alíquota de 100  $\mu$ L das amostras foi coletada, incluindo o tempo inicial sem adição de antibiótico, diluídas serialmente em tampão PBS e cultivadas em placas de LB ágar sem antibióticos, para posterior contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). Para acessar as células persistentes dos tempos 24 e 48 horas, 1 mL das amostras foram coletadas e centrifugadas (4.000 x g 5 min). O sedimento bacteriano resultante foi lavado 2 vezes e suspenso em 1mL de PBS. Após retirada dos antibióticos, 10  $\mu$ L da amostra, não diluída, foi inoculada para posterior contagem das UFC. A fração sobrevivente foi calculada pela razão da UFC/mL do tempo inicial por UFC/mL dos tempos de exposição aos antibióticos (1, 3, 5, 24 e 48 h).

## **4.8 Biofilme**

### 4.8.1 Cristal violeta

A avaliação quantitativa da formação de biofilme foi realizada de acordo com a técnica descrita por Christensen e colaboradores (1985) e adaptada por Stepanovic e colaboradores (2000). As amostras bacterianas foram inicialmente cultivadas em condições estáticas em meio TSB por 18 h a 37 °C. O cultivo inicial foi diluído na proporção de 1:100 e aplicado em placas de poliestireno de 96 poços estéril de fundo chato (Jet-Biofil), ou em placas de 24 poços com lamínula de vidro. As placas foram incubadas em condições estáticas por 24 h a 37 °C e lavada por 3 vezes com PBS, para remoção das células não aderentes. O biofilme foi pré-fixado com etanol 75% por 10 min a temperatura ambiente, e os poços foram posteriormente lavados 3 vezes com PBS. Após lavagem, o corante cristal violeta a 2% foi adicionado e incubado por 5 min a temperatura ambiente. Após remoção do corante e sucessivas lavagens (4 vezes), as placas foram secas em temperatura ambiente. O corante foi solubilizado pela adição e incubação de etanol 95% por 2 min em temperatura ambiente. A quantificação do biofilme foi realizada pela leitura da absorbância de

cada poço no comprimento de onda de 595 nm em leitor de ELISA *Multiskan FC* (Thermo Scientific).

#### 4.8.2 YESCA

O ensaio de biofilme em placas de Petri de 20 cm foi realizado em meio YESCA (12 g/L ácido casamínico, 1,2 g/L extrato de levedura e 22/L g ágar). Os cultivos bacterianos foram inoculados no dia anterior ao ensaio em meio LB em condições estáticas por 18 h a 37 °C. Ao centro das placas, contendo uma grossa camada do meio YESCA foram inoculados 10 µL de cada cultivo. As placas foram mantidas por 14 dias em temperatura ambiente (20 – 22 °C). E a formação do biofilme foi acompanhada e fotografada a cada três dias.

#### 4.9 Ensaio de resistência ao soro

O ensaio de resistência ao soro humano foi realizado conforme descrito por Samuelsen e colaboradores (2004), com modificações. No dia anterior ao experimento, os isolados bacterianos foram inoculados na proporção de 1:100 em 3 mL de meio LB sob agitação constante (250 rpm) por 18 h a 37 °C. Em frascos de 100 mL contendo 20 mL de meio LB as culturas iniciais foram diluídas na proporção de 1:100. Os inóculos foram então incubados a 37 °C sob agitação constante até atingir a fase exponencial ( $DO_{600}$  0,5 – 0,6). Em um tubo de 1,5 mL, foram adicionados 200 µL do soro humano ativado e inativado (56 °C 30 min), 180 µL de PBS (estéril e previamente aquecido a 36 °C) e 20 µL da cultura bacteriana. A solução foi incubada a 36 °C e alíquotas de 20 µL foram coletadas nos tempos 30 min e 1 h. As alíquotas foram serialmente diluídas em PBS estéril e semeadas em LB ágar para determinação da UFC/mL.

#### 4.10 Cultivo dos macrófagos

Os macrófagos murinos da linhagem J744.A1 (ATCC TIB-67) foram cultivados em meio RPMI 1640 (ThermoFisher) com suplementação de 10% de soro fetal bovino (ThermoFisher). Os macrófagos foram cultivados em garrafas de cultivo (Kasvi) até formação de monocamada. Para realização dos ensaios, as células foram removidas por raspagem, centrifugadas a 259 x g por 5 min a 4 °C. Em placas de 24 poços de fundo chato (Kasvi) contendo  $2 \times 10^5$  células, que foram distribuídas e incubadas por 24 h em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C.

##### 4.10.1 Ensaio de infecção dos macrófagos J744.A1

Posteriormente as 24 h de cultivo em placas de 24 poços, o meio de cultivo foi removido e as células foram infectadas na MOI (multiplicidade de infecção) 100. Para tal, as bactérias cultivadas no dia anterior em meio MOPS, foram diluídas em 300 µL de meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e incubadas com as células por 30 min. O cálculo do volume de bactérias utilizados foi:  $V = 2 \times 10^5 \times \text{MOI} / \text{UFC/mL} \times \text{DO}_{600}$ . Após período de infecção, o meio de cultura foi removido e os poços foram lavados 3 vezes com 500 µL de PBS estéril. As bactérias extracelulares foram eliminadas pela incubação de 500 µL meio RPMI suplementado por 100 µg/mL de gentamicina por 1 h a 37 °C. Os poços foram novamente lavados 3 vezes, e os macrófagos foram lisados pela adição e incubação por 10 min de 0,1% de Triton-X (Merck). Para a contagem do número de UFC/mL fagocitadas durante o ensaio de infecção, a solução proveniente da lise celular foi diluída serialmente em PBS e semeada em meio sólido LB.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Identificação dos 8 sistemas TA do tipo II por PCR

A distribuição dos sistemas TA do tipo II foi realizada pela detecção por PCR dos genes das toxinas: *mazF*, *relE*, *yoeB*, *yafO*, *hipA*, *mqsR*, *chpB* e *yafQ*. Inicialmente 10 cepas de cada patótipo de *E. coli* diarreiogênicas foram analisados quanto a presença das toxinas mencionadas acima. A distribuição dos genes por ordem de prevalência foi a seguinte, em aEPEC: *hipA* e *mazF* (90%), *yafQ* (70%), *chpB*, e *yoeB* (60%), *yafO* (50%), *relE* (20%) e *mqsR* (10%). Em STEC: *yafQ*, *chpB* e *mazF* (90%), *hipA* (80%), *yoeB* (70%), *relE* (50%), *yafO* (40%) e *mqsR* (10%). Em EAEC: *yafQ* e *mazF* (80%), *relE*, *hipA* e *yoeB* (60%), *mqsR*, *yafO* e *chpB* (50%) (**Tabela 5**). A análise inicial forneceu uma prévia da distribuição dos sistemas, chamando atenção para o gene *mqsR* (*motility quorum-sensing regulator*), presente em EAEC e pouco observado nas outras categorias de *E. coli*. A distribuição de *mqsR* foi então avaliada nos 319 cepas estudadas nesse trabalho, presente em: 4/57 STEC, 5/100 ExPEC, 13/72 EPECa e 59/90 EAEC. Como o sistema MqsR/A foi originalmente associada a regulação da motilidade, *quorum-sensing* e parece ter um papel importante na formação de biofilme, a presença da toxina e fenótipo da formação de biofilme foi avaliada em EAEC. Dos 90 isolados EAEC, 31 foram *mqsR* negativos e 59 positivos. Do total, 83 isolados são fortes formadores de biofilme, dentre eles 48 possuem o gene e 35 não o possuem. Por ser biofilme um fenótipo multifatorial, a associação presença do gene *mqsR* e formação de biofilme não é suficiente para estabelecer uma relação entre a presença do gene e o fenótipo de formação de biofilme.

**Tabela 5. Distribuição das toxinas do sistema TA do tipo II em diferentes categorias de *E. coli***

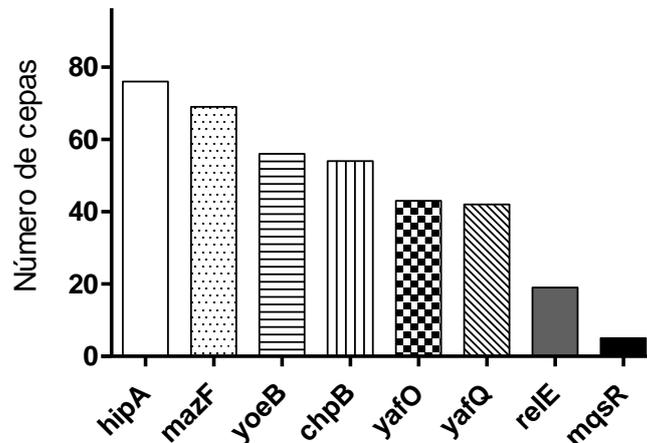
Sistema TA	Categoria de <i>E. coli</i>		
	aEPEC (%)	STEC (%)	EAEC (%)
<i>hipA</i>	90	80	60
<i>mazF</i>	90	90	80
<i>yafQ</i>	70	90	80
<i>chpB</i>	60	90	50
<i>yoeB</i>	60	70	60
<i>yafO</i>	50	40	50
<i>relE</i>	20	50	60
<i>mqsR</i>	10	10	50

Detecção de oito toxinas do sistema TA do tipo II em 10 isolados de *E. coli* enteropatogênica atípica (aEPEC), *E. coli* produtora da toxina de Shiga (STEC) e *E. coli* enteroagregativa (EAEC). As distribuições das toxinas estão demonstradas em porcentagem.

Em ExPEC as oito toxinas foram pesquisadas nas 100 cepas isoladas de infecção sanguínea. A distribuição dos sistemas foram as seguintes, em ordem de prevalência:

*hipA* (76%), *mazF* (69%), *yoeB* (56%), *chpB* (54%), *yafO* (43%), *yafQ* (42%), *relE* (19%) e *mqsR* (5%) (**Figura 3**).

**Figura 3. Distribuição dos sistemas TA em ExPEC**



Deteção de oito toxinas do sistema TA do tipo II em 100 isolados ExPEC. No eixo y número de cepas, e no eixo x as toxinas do sistema TA.

A presença de *hipA* foi observada em todas as categorias de *E. coli* aqui estudadas, principalmente em ExPEC. Como a toxina HipA tem sido associada a indução de persistência bacteriana em resposta a condições estressantes, dois isolados foram selecionados na tentativa de esclarecer sua função em isolados clínicos.

## 5.2 Sequenciamento, montagem e anotação

Os isolados clínicos provenientes de infecção sanguínea EC182 e EC273 foram selecionados de acordo com seus fatores de virulência, previamente detectados por sonda de hibridização pelo grupo da Dra. Rosa Maria da Silva da Universidade Federal de São Paulo, e quanto a presença dos sistemas toxina-antitoxina do tipo II aqui abordados. As bibliotecas para sequenciamento de nova geração (NGS) foram construídas e analisadas quanto a purificação e inserção dos *barcodes*. Após o sequenciamento de EC182 pela plataforma Illumina, montagem e anotação foi possível observar que o genoma montado possui 4.842.148 pb e a montagem resultou em 696 *contigs*, com um N50 de 155.702 bases e 5.055 regiões codificantes (CDS).

O genoma de EC273 possui 4,844,624 pb, e a montagem resultou em 110 *contigs* com um N50 de 119.175 bases e 4.762 CDS (**Tabela 6**).

**Tabela 6. Dados resumidos da montagem e anotação dos genomas sequenciados**

<b>Dados</b>	<b>EC182</b>	<b>EC273</b>
<i>Contigs</i>	696	110
Conteúdo GC (%)	50.71	50.55
<i>Contig</i> L50	12	16
<i>Contig</i> N50	155,702	119,175
Tamanho do Genoma (bp)	4,842,148	4,844,624
Sequências codificantes (CDS)	5,055	4,762
Proteínas hipotéticas	467	411
Proteínas com função atribuída	4588	4351
RNA transportador (tRNA)	73	84
RNA ribossomal (rRNA)	4	6

Resumo dos dados obtidos pela ferramenta de bioinformática PATRIC.

### 5.2.1 Análise abrangente dos genomas

A análise abrangente dos genomas fornece informações relevantes sobre a distribuição dos genes em subsistemas, genes de resistência a antimicrobianos, filogenia, dentre outros. Por essa análise, realizada na plataforma on-line PATRIC, pôde-se visualizar a distribuição dos genes em relação a função no organismo bacteriano.

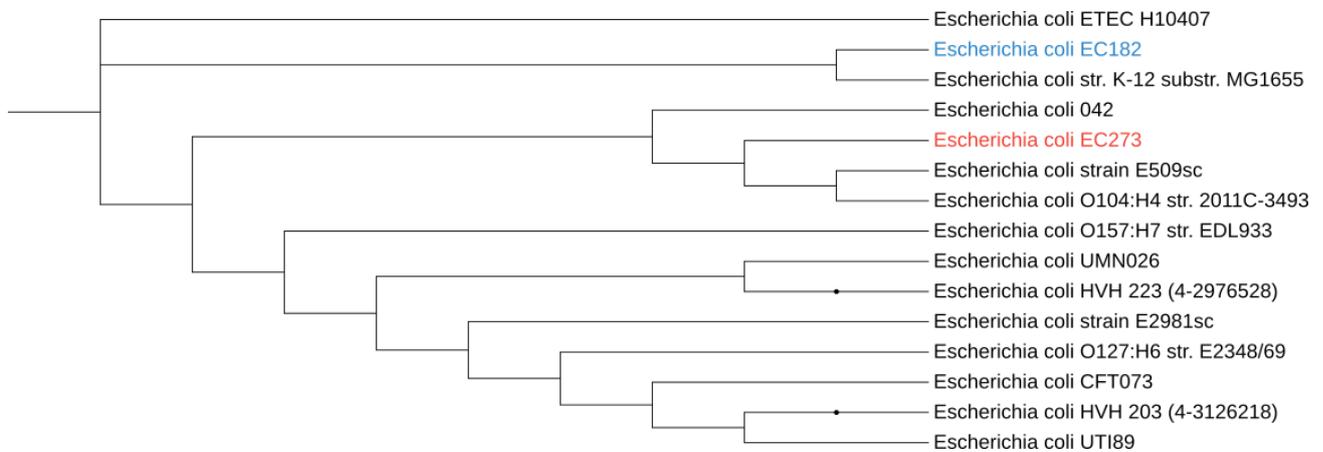
### 5.2.1.1 Genes de resistência

Foram identificados em EC182 as enzimas BlaeC e TEM, responsáveis pela inativação de antibióticos beta lactâmicos, e o gene responsável pela inativação do cloranfenicol, a família das cloranfenicol acetiltransferases *catA1/catA4*. Em EC273 também foi identificado a enzima BlaeC. Vale ressaltar que a presença do gene responsável pela produção das enzimas puramente não implique em fenótipo de resistência, sendo necessário a avaliação do fenótipo de resistência. Ambos EC182 e EC273 mostraram-se suscetíveis a diversos antibióticos, inclusive ampicilina, cloranfenicol e canamicina.

### 5.2.1.2 Análise filogenética

Para entender a relação filogenética das cepas EC182 e EC273 em relação as demais cepas de *E. coli* selecionadas para este estudo, análises filogenéticas foram realizadas. Para tanto, foram selecionadas como base os genomas de *E. coli* K-12 MG1655, cinco ExPEC [duas cepas de bacteremia e três de infecção urinária (UPEC)], uma EAEC, uma ETEC, uma EHEC, uma híbrida STEC/EAEC, uma EPEC típica (tEPEC) e duas EPEC atípicas (aEPEC). A árvore filogenética indicou que EC182 compartilha ancestral comum mais recente com a cepa laboratorial K-12 MG1655 (**Figura 4**). EC273 por sua vez, compartilha um ancestral comum mais recente com aEPEC e a cepa híbrida de STEC com EAEC a *E. coli* O104:H4.

**Figura 4. Análise filogenética de EC182 e EC273**



A árvore filogenética foi construída com duas cepas de ExPEC isoladas de bacteremia (HVH203 e HVH223), três cepas de UPEC (UTI89, CFT073 e UMN26), uma cepa de ETEC H10407, uma cepa de EHEC (O157:H7 str. EDL933), uma cepa de *E. coli* híbrida isolada de casos de síndrome hemolítica urêmica (O104:H4 str. 2011C3493), duas cepas de aEPEC (E209sc e E2981sc), uma cepa de tEPEC (E2348/69), uma cepa de EAEC (042), uma cepa laboratorial *E. coli* K-12 subst. MG1655, ExPEC EC182 (em azul) e EC273 (em vermelho).

### 5.3 Fatores de virulência

Os fatores de virulências de EC182 e EC273 foram identificados por sonda de hibridização pelo grupo da Dra. Rosa Maria da Silva da Universidade Federal de São Paulo. EC182 apresentou 7 fatores, sendo estes: adesinas, protectinas e invasinas e sistemas de captação de ferro. Já EC273 apresentou um total de 13 fatores de virulência pertencentes aos grupos de: adesinas, protectinas, invasinas e toxinas (**Tabela 7**). Análise *in silico* dos fatores de virulência de EC182 e EC273 identificaram a presença da toxina hemolisina/citolisina A.

**Tabela 7. Fatores de virulência de EC182 e EC273**

Fatores de virulência	EC182	EC273
Adesinas		
Protectinas e invasinas		
Sistema de aquisição de ferro		
Toxinas		

Fatores de virulência identificados por sonda de hibridização e confirmados pelo sequenciamento de genoma completo.

#### 5.4 Sistemas TA identificados

Na cepa EC182 foram detectados ao total 12 sistemas TA, sendo 11 do tipo II e 1 sistema do tipo V. No genoma da cepa EC273 foram detectados 17 sistemas TA, sendo 12 do tipo II, 4 do tipo IV e 1 do tipo V (**Tabela 8**). Foram encontradas duas cópias de *vapB/C* e 3 cópias do sistema *cbtA/cbeA*. As cópias da toxina e da antitoxina *vapB/C* não são idênticas, e apresentaram 75% de idênticas entre seus nucleotídeos. Uma das cópias de *vapC* apresentou identidade de 80,36% com *vapC* presente no gênero *Mycobacterium*. As três cópias da antitoxina *cbeA* apresentam similaridade variável de 91,88% a 94,04% na identidade entre si, enquanto as duas cópias de *cbtA* apresentaram 92,71% de identidade. Quando os sistemas genéticos TA da cepa EC182 foram alinhados contra os sistemas TA presentes em *Escherichia coli* K-12 MG1655, por análise de alinhamento local utilizando a ferramenta de bioinformática BLAST, vimos que os sistemas são relativamente conservados,

apresentando 100% de identidade, mas não os sistemas *higA/B* e *tabA*, pois, a antitoxina *higA* apresentou 99,76% de identidade e *tabA* com 99%. Já, os sistemas encontrados na cepa EC273 variaram entre 100 e 95,65% em identidade aos presentes em *E. coli*. O sistema *mazE/F* parece ser conservado também em *Salmonella sp.*, *Shigella boydii*, e *Shigella sonnei*.

**Tabela 8. Sistemas toxina-antitoxina presentes nos isolados EC182 e EC273**

Sistema TA	EC182	EC273
Tipo II		
<i>MqsA-MqsR</i>	1	1
<i>HigA-HigB</i>	1	2
<i>PrlF-YhaV</i>	1	1
<i>MazE-MazF</i>	1	1
<i>HicB-HicA</i>	1	1
<i>TabA</i>	1	1
<i>DinJ-YafQ</i>	1	1
<i>YafN-YafO</i>	1	-
<i>YefM-YoeB</i>	1	-
<i>HipB-HipA</i>	1	1
<i>RelB-RelE</i>	1	-
<i>VapB-VapC</i>	-	2
Antitoxina		1
<i>ParD1</i>		
Tipo IV		
<i>CbtA-CbeA</i>	-	3
Tipo V		
<i>Ghos-GhoT</i>	1	1

Os sistemas TA foram identificados por sequenciamento de genoma completo.

Com a ferramenta ClustalO (1.2.4) *Multiple Sequence Alignment*, alinhamos a sequência proteica de HipA das cepas EC182 e EC273 com a sequência de MG1655 (*GenBank*: AAC74580.1). EC182 não apresentou nenhuma substituição quando comparada com MG1655, enquanto EC273 possui oito modificações (I104L, D107N, V110I, H112R, N227R, A242T, K290R e S424T) (**Figura 5**).

## Figura 5. Alinhamento múltiplo da toxina HipA

Alinhamento múltiplo realizado com a ferramenta ClustalO (1.2.4) da sequência da toxina HipA de

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

EC182      MPKLVTWNNQRVGELTKLANGAHTFKYAPEWLASRYARPLSLSLPLQRGNITSDAVNFF      60
MG1655     MPKLVTWNNQRVGELTKLANGAHTFKYAPEWLASRYARPLSLSLPLQRGNITSDAVNFF      60
EC273      MPKLVTWNNQRVGELTKLANGAHTFKYAPEWLASRYARPLSLSLPLQRGNITSDAVNFF      60
*****

EC182      FDNLLPDSPIVRDRIVKRYHAKSRQPFDLLSEIGRDSVAVTLIPEDETVTHPIMAWKEL      120
MG1655     FDNLLPDSPIVRDRIVKRYHAKSRQPFDLLSEIGRDSVAVTLIPEDETVTHPIMAWKEL      120
EC273      FDNLLPDSPIVRDRIVKRYHAKSRQPFDLLSEIGRDSVAVTLIPEDETVTHPIMAWKEL      120
*****

EC182      TEARLEEVLTAYKADIPLGMIREENDFRISVAGAQEKALLRIGNDWCIPKGITPTTHII      180
MG1655     TEARLEEVLTAYKADIPLGMIREENDFRISVAGAQEKALLRIGNDWCIPKGITPTTHII      180
EC273      TEARLEEVLTAYKADIPLGMIREENDFRISVAGAQEKALLRIGNDWCIPKGITPTTHII      180
*****

EC182      KLPIGEIRQPNATLDSQSVNEYCYLLLAKEELGLNVPDAEIIKAGNVRALAVERFDRRW      240
MG1655     KLPIGEIRQPNATLDSQSVNEYCYLLLAKEELGLNVPDAEIIKAGNVRALAVERFDRRW      240
EC273      KLPIGEIRQPNATLDSQSVNEYCYLLLAKEELGLNVPDAEIIKAGNVRALAVERFDRRW      240
*****

EC182      NAERTVLLRRLPQEDMCQTFGLPSSVKYESDGGPGIARIMAFIMGSSSEALKDRYDFMKFQV      300
MG1655     NAERTVLLRRLPQEDMCQTFGLPSSVKYESDGGPGIARIMAFIMGSSSEALKDRYDFMKFQV      300
EC273      NTERTVLLRRLPQEDMCQTFGLPSSVKYESDGGPGIARIMAFIMGSSSEALRDYDFMKFQV      300
*****

EC182      FQWLIGATDGHAKNFSVFIQAGGSYRLTPFYDIISAFPVLGGTGIHISDLKLAMGLNASK      360
MG1655     FQWLIGATDGHAKNFSVFIQAGGSYRLTPFYDIISAFPVLGGTGIHISDLKLAMGLNASK      360
EC273      FQWLIGATDGHAKNFSVFIQAGGSYRLTPFYDIISAFPVLGGTGIHISDLKLAMGLNASK      360
*****

EC182      GKKTAIDKIYPRHFLATAKVLRFPEVQMHEILSDFARMIPAALDNVKTSLPTDFPENVVT      420
MG1655     GKKTAIDKIYPRHFLATAKVLRFPEVQMHEILSDFARMIPAALDNVKTSLPTDFPENVVT      420
EC273      GKKTAIDKIYPRHFLATAKVLRFPEVQMHEILSDFARMIPAALDNVKTSLPTDFPENVVT      420
*****

EC182      AVESNVLRLHGRLSREYGSK      440
MG1655     AVESNVLRLHGRLSREYGSK      440
EC273      AVETNVLRLHGRLSREYGSK      440
*****

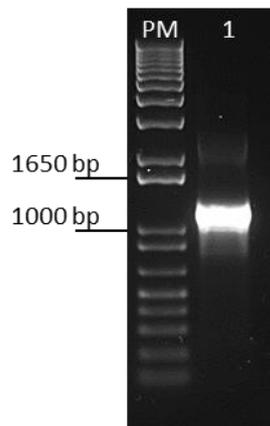
```

EC182, EC273, MG1655 (*GenBank*: AAC74580.1). As setas pretas indicam as substituições de aminoácidos. Em vermelho aminoácidos pequenos e hidrofóbicos (inclui aromáticos), em azul ácidos, em magenta básicos, em verde hidroxil, sulfidril, amina. As setas representam grupos de propriedades fortemente semelhantes, “espaço” lacuna ou incompatibilidade.

### 5.5 Construção dos mutantes em *hipAB* pelo sistema *Lambda-Red*

O sistema TA *hipAB* foi deletado das cepas EC182 e EC273, utilizando o sistema *Lambda-Red* de mutação por homologia. O fragmento linear de DNA (cassete de resistência mais *hipAB*) com 1514 pb foi amplificado (**Figura 6**), purificado e inserido nos isolados previamente transformados com o plasmídeo pKD46.

**Figura 6. Amplificação do cassete de resistência *cat* com extremidades homólogas a *hipAB***

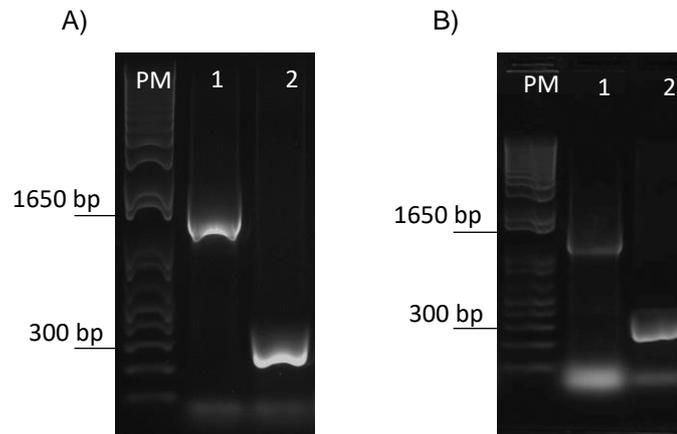


Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de amplificação de 1514 pb do gene *hipAB* mais o cassete de resistência a cloranfenicol (1) após coloração com *gel red* 10 000x. PM: 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Para confirmação da inserção do cassete de resistência em EC182 e EC273, foram utilizados os iniciadores externos a *hipAB*. O fragmento amplificado foi sequenciado por método de Sanger, e o gene de resistência *cat* identificado. Na cepa EC273 observou-se 100% de cobertura e 99,2 % de identidade com o gene de resistência ao cloranfenicol. Na cepa EC182 foi observado uma cobertura de 30% e 88,78% de identidade com a sequência de *cat*. Ambos os clones mutantes apresentaram expressão fenotípica e consequente resistência ao cloranfenicol, efeito esse revertido pela retirada do gene com a utilização do plasmídeo pCP20. A retirada do gene *cat*

deixou uma “cicatriz” no genoma bacteriano de aproximadamente 300 pb (**Figura 7**), e propiciou a volta da sensibilidade a cloranfenicol.

### Figura 7. Retirada do cassete de resistência

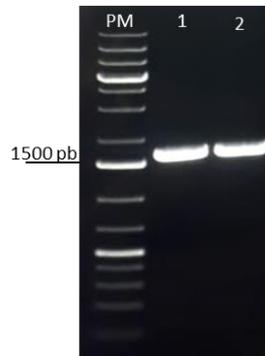


Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de amplificação do gene *hipAB* (1) e “cicatriz” da remoção do gene *cat* 339 pb após coloração com *gel red* 10 000x. **A)** PM: 1 *Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen), 1: EC182 WT, 2: EC182 $\Delta$ *hipAB*. **B)** PM: 1 *Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen), 1: EC273 WT, 2: EC273 $\Delta$ *hipAB*.

#### 5.5.1 Construção das cepas do complementas com os genes *hipA* e *hipB*

Para a complementação, o sistema TA de cada isolado foi amplificado dando origem a um fragmento de 1606 pb (**Figura 8**). Os fragmentos de DNA foram ligados ao plasmídeo pTJK4 e transformados em *E. coli* TOP10.

**Figura 8. Amplificação dos sistemas *hipAB* de EC182 e EC273 para construção do plasmídeo de complementação**



Eletoforese em gel de agarose 1% do produto de amplificação de 1606 pb do gene *hipAB* (1) após coloração com brometo de etídio. **A)** PM: *GeneRuler™ 1 Kb Plus DNA Ladder* (Thermo Scientific), 1: EC182 WT e 2: EC273 WT.

Células TOP10 transformantes foram submetidas a PCR de colônia, e dos clones selecionados, apenas 2 foram positivos para presença de *hipAB* (**Figura 9**). Os plasmídeos contendo o sistema *hipAB* foram enviados para sequenciamento, e em ambos o gene da toxina *hipA* foram identificados com aproximadamente 99% de identidade e cobertura de 43%. Não foi possível confirmar a clonagem do sistema genético proveniente da cepa EC273 em pTJK4. Portanto, ambas as cepas mutantes foram complementadas com o plasmídeo *pHipAB182*, uma vez que esse sistema é relativamente conservado em *E. coli*.

**Figura 9. PCR de colônia de *E. coli* TOP10 contendo pHipAB**

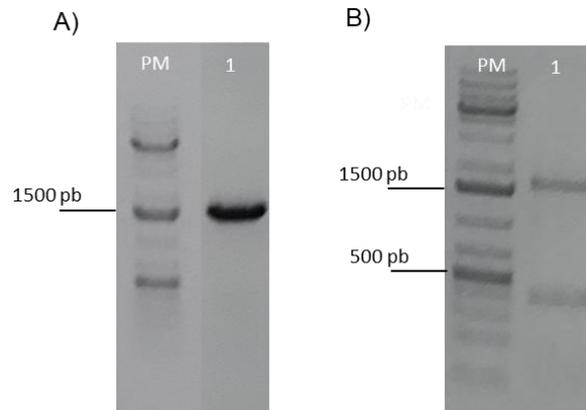


Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de amplificação de 1670 pb do gene *hipAB*, utilizando os iniciadores *hipB* e M13 após coloração com brometo de etídio. PM: *GeneRuler™ 1 Kb Plus DNA Ladder* (Thermo Scientific), 1-10: colônias transformantes contendo pTK4\_*hipAB*, 11: controle negativo (pTJK4 vazio).

A transformação de EC182Δ*hipAB* com plasmídeo pHipAB182 foi efetiva com 200 ng de DNA, e para EC273Δ*hipAB* foram necessários 300 ng de DNA total. Ambas as cepas foram transformadas por eletroporação e em seguida realizado PCR de colônia para confirmação da complementação. As cepas complementadas com os genes *hipAB* foram denominadas de EC182:*hipAB* e E273:*hipAB*. Por eletroforese em gel de agarose foi possível observar um fragmento amplificado de aproximadamente 1500 pb (**Figura 10A**), e outro de aproximadamente 400 pb apenas em EC273:*hipAB* (**Figura 10B**). Possivelmente fruto de inespecificidade. Os clones complementados foram então denominados de EC182:*hipAB* e EC273:*hipAB*.

Posteriormente a obtenção dos clones mutantes e complementados, todos incluindo as cepas parentais foram submetidas aos testes fenotípicos de persistência, formação de biofilme, resistência ao soro humano e infecção de macrófagos.

## Figura 10. Confirmação da complementação



Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de amplificação de 1670 pb do gene *hipAB* (1) após coloração com brometo de etídio. PM: *GeneRuler™ 1 Kb Plus DNA Ladder* (Thermo Scientific), A) 1: PCR de colônia de EC182:*hipAB* e B) 1: PCR de colônia de EC273:*hipAB*.

## 5.6 Ensaios fenotípicos

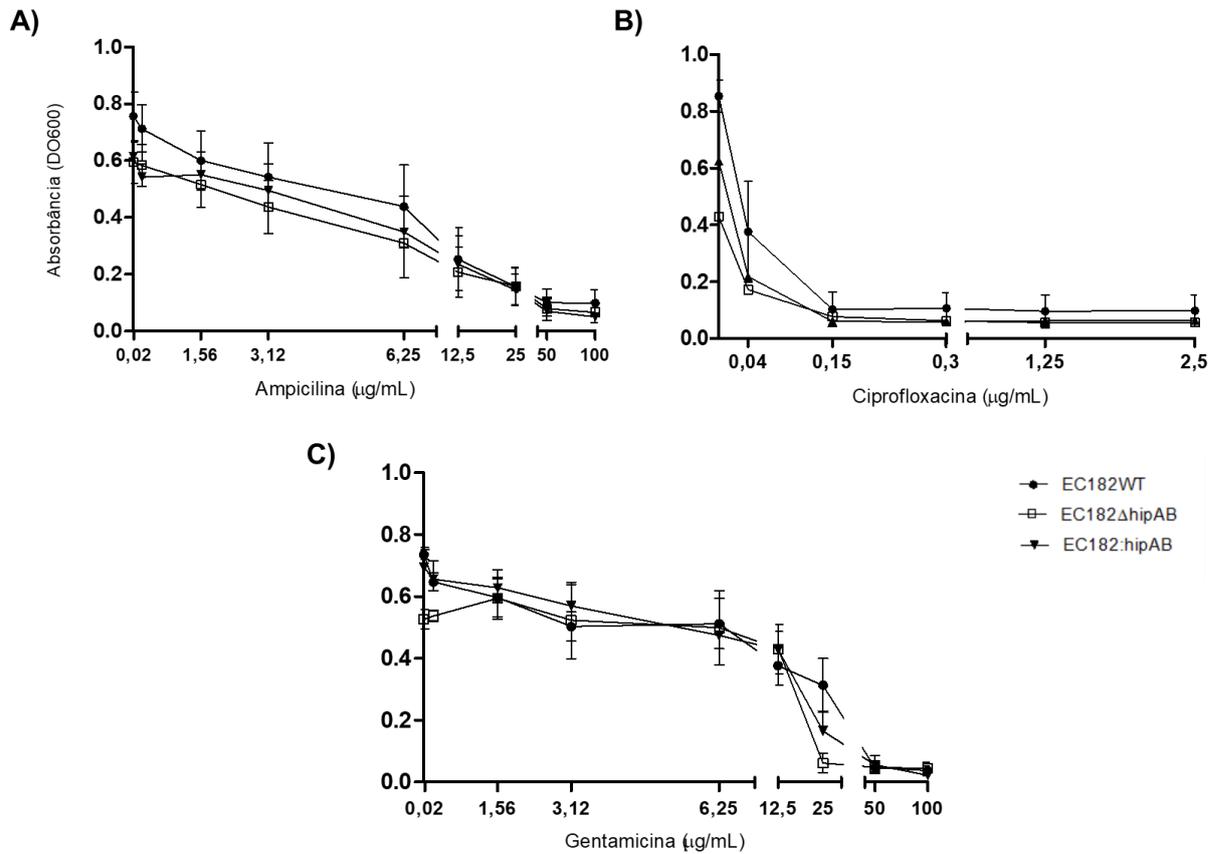
As análises fenotípicas foram realizadas com as cepas parentais, mutantes e complementadas.

### 5.6.1 Concentração mínima inibitória

A fim de verificar a concentração mínima inibitória (CMI) dos antibióticos ampicilina, ciprofloxacino e gentamicina, a metodologia proposta por Hazan e colaboradores (2014) foi empregada e avaliada em meio de cultura LB e meio mínimo MOPS contendo glicose. Ao comparar o meio LB ao meio MOPS, foi possível observar uma inibição acentuada do crescimento bacteriano, sobretudo devido as condições estáticas de crescimento e a característica intrínseca do meio. Quando a cepa parental EC182, EC182 $\Delta$ *hipAB* e EC182:*hipAB* foram cultivadas em LB, as CMI foram 50  $\mu$ g/mL de ampicilina (**Figura 11A**) e 0,15  $\mu$ g/mL de ciprofloxacino (**Figura 11B**) para todas as cepas. Já quando expostas a gentamicina a cepa mutante apresentou

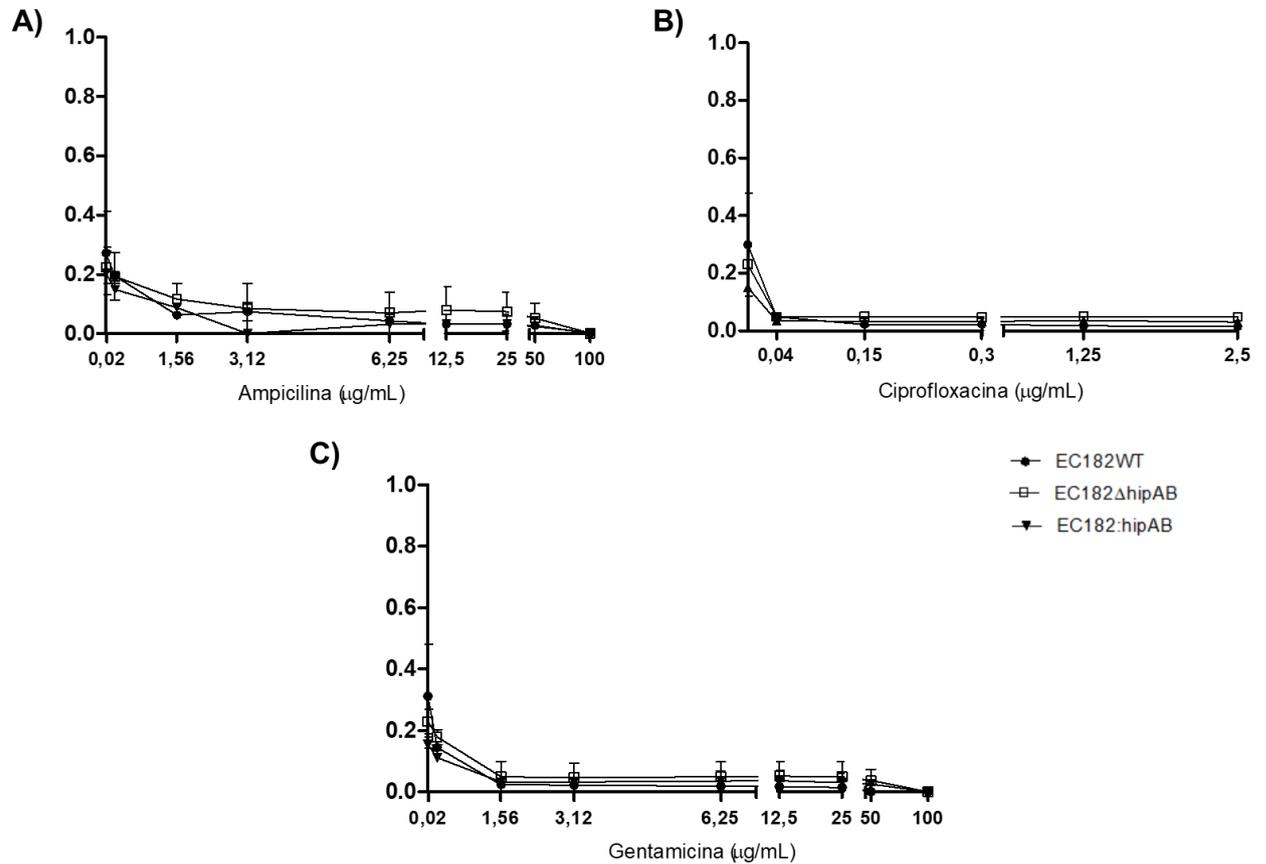
uma CMI de 25 µg/mL de gentamicina, enquanto a cepa parental e complementado apresentaram uma CMI de 50 µg/mL de gentamicina (**Figura 11C**). As mesmas cepas bacterianas apresentaram CMI de 3,12 µg/mL de ampicilina (**Figura 12A**), 0,04 µg/mL ciprofloxacino (**Figura 12B**) e 1,56 µg/mL de gentamicina (**Figura 12C**) quando cultivadas em meio MOPS. Já na cepa parental EC273, EC273 $\Delta$ *hipAB* e EC273:*hipAB* quando cultivadas em LB apresentaram CMI de 50 µg/mL de ampicilina (**Figura 13A**), 0,04 µg/mL de ciprofloxacino (**Figura 13B**) e 25 µg/mL de gentamicina (**Figura 13C**). Ao serem cultivadas em meio MOPS as CMI observadas foram de 12,6 µg/mL de ampicilina (**Figura 14. A**), 0,04 µg/mL de ciprofloxacino (**Figura 14B**) e 1,56 µg/mL de gentamicina (**Figura 14C**). Devido à baixa taxa de crescimento bacteriano em meio MOPS a inibição de todas as amostras EC273 na presença dos antibióticos ampicilina e ciprofloxacino não foi clara.

**Figura 11. Concentração mínima inibitória da cepa EC182 em meio LB**



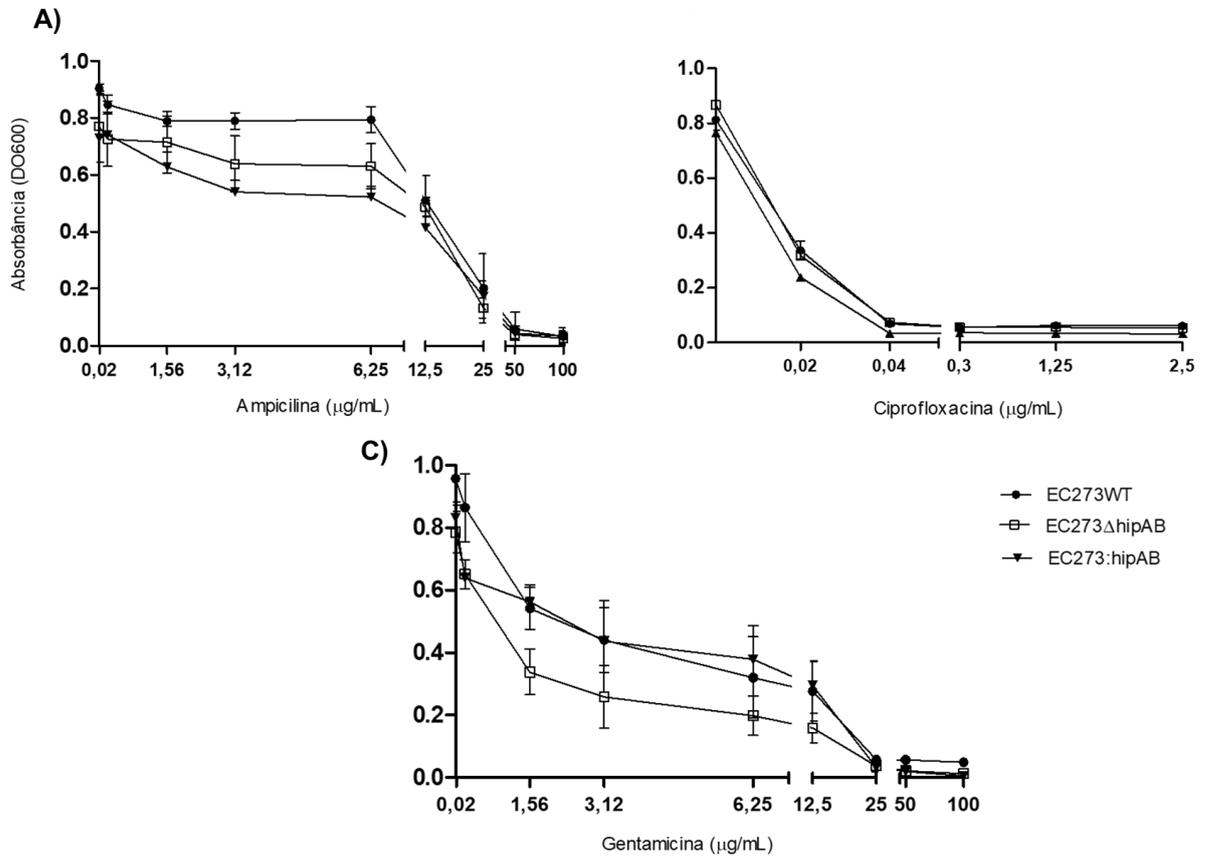
Curva da concentração mínima inibitória da cepa EC182 em meio LB na presença de antibióticos. Os gráficos correspondem aos isolados cultivados em meio LB por 24 h a 37 °C em condições estáticas. (A) na presença de ampicilina, (B) ciprofloxacino e (C) gentamicina. No eixo x concentrações de antibióticos em µg/mL. No eixo y leitura da absorbância na DO<sub>600</sub>. No gráfico o quadrado preenchido refere-se a EC182 parental, quadrado vazado mutante em HipAB e complementado é representado por triângulo preto invertido. O ensaio foi realizado em pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata.

**Figura 12. Concentração mínima inibitória da cepa EC182 em meio MOPS-glicose**



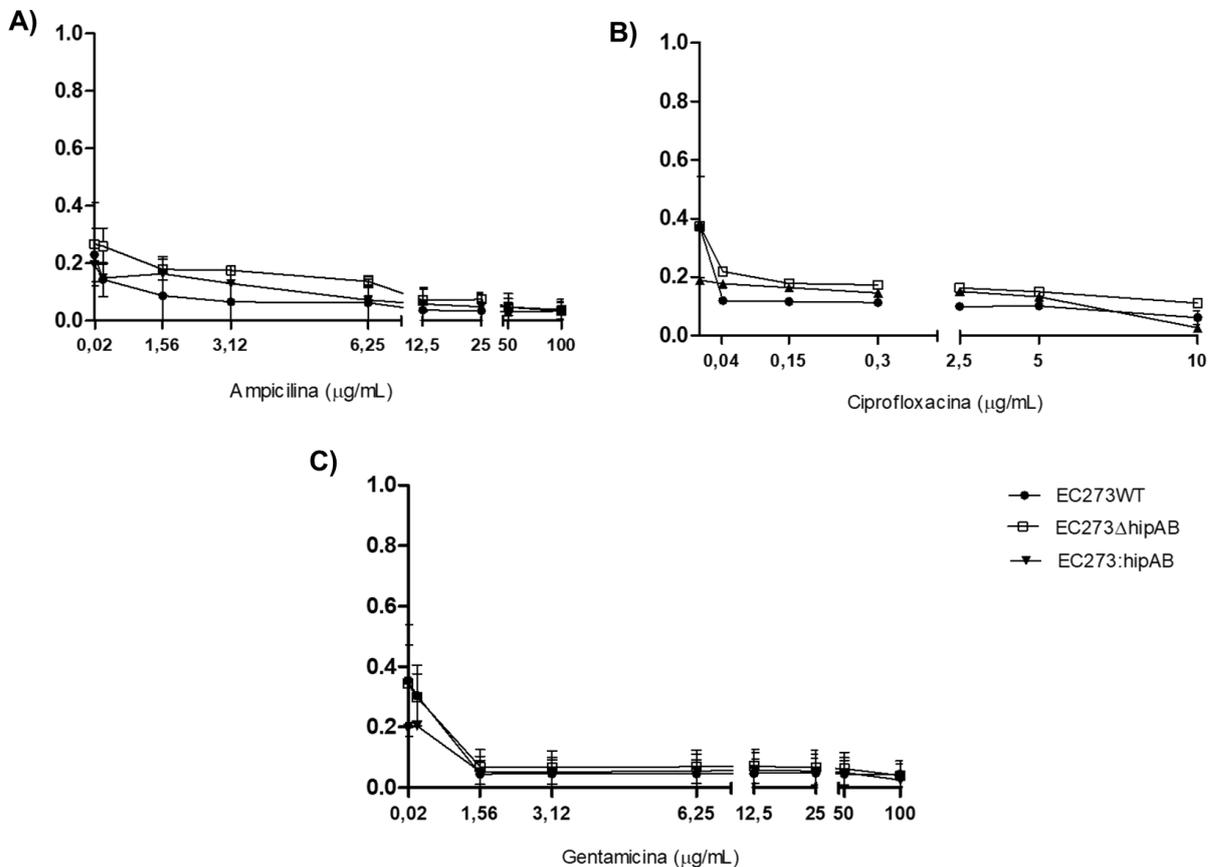
Curva da concentração mínima inibitória da cepa EC182 em meio MOPS-glicose na presença de antibióticos. Os gráficos correspondem aos isolados cultivados em meio MOPS-glicose por 24 h a 37 °C em condições estáticas. (A) na presença de ampicilina, (B) ciprofloxacino e (C) gentamicina. No eixo x concentrações de antibióticos em µg/mL. No eixo y leitura da absorbância na DO<sub>600</sub>. No gráfico o quadrado preenchido refere-se a EC182 parental, quadrado vazado mutante em HipAB e complementado é representado por triângulo preto invertido. O ensaio foi realizado em pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata.

**Figura 13. Concentração mínima inibitória da cepa EC273 em meio LB**



Curva da concentração mínima inibitória da cepa EC273 em meio LB na presença de antibióticos. Os gráficos correspondem aos isolados cultivados em meio LB por 24 h a 37 °C em condições estáticas. (A) na presença de ampicilina, (B) ciprofloxacino e (C) gentamicina. No eixo x concentrações de antibióticos em  $\mu\text{g/mL}$ . No eixo y leitura da absorbância na  $\text{DO}_{600}$ . No gráfico o quadrado preenchido refere-se a EC273 parental, quadrado vazado mutante em HipAB e complementado é representado por triângulo preto invertido. O ensaio foi realizado em pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata.

**Figura 11. Concentração mínima inibitória da cepa EC273 em meio MOPS-glicose**



Curva da concentração mínima inibitória da cepa EC273 em meio MOPS-glicose na presença de antibióticos. Os gráficos correspondem aos isolados cultivados em meio MOPS-glicose por 24 h a 37 °C em condições estáticas. (A) na presença de ampicilina, (B) ciprofloxacina e (C) gentamicina. No eixo x concentrações de antibióticos em µg/mL. No eixo y leitura da absorbância na DO<sub>600</sub>. No gráfico o quadrado preenchido refere-se a EC273 parental, quadrado vazado mutante em HipAB e complementado é representado por triângulo preto invertido. O ensaio foi realizado em pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata.

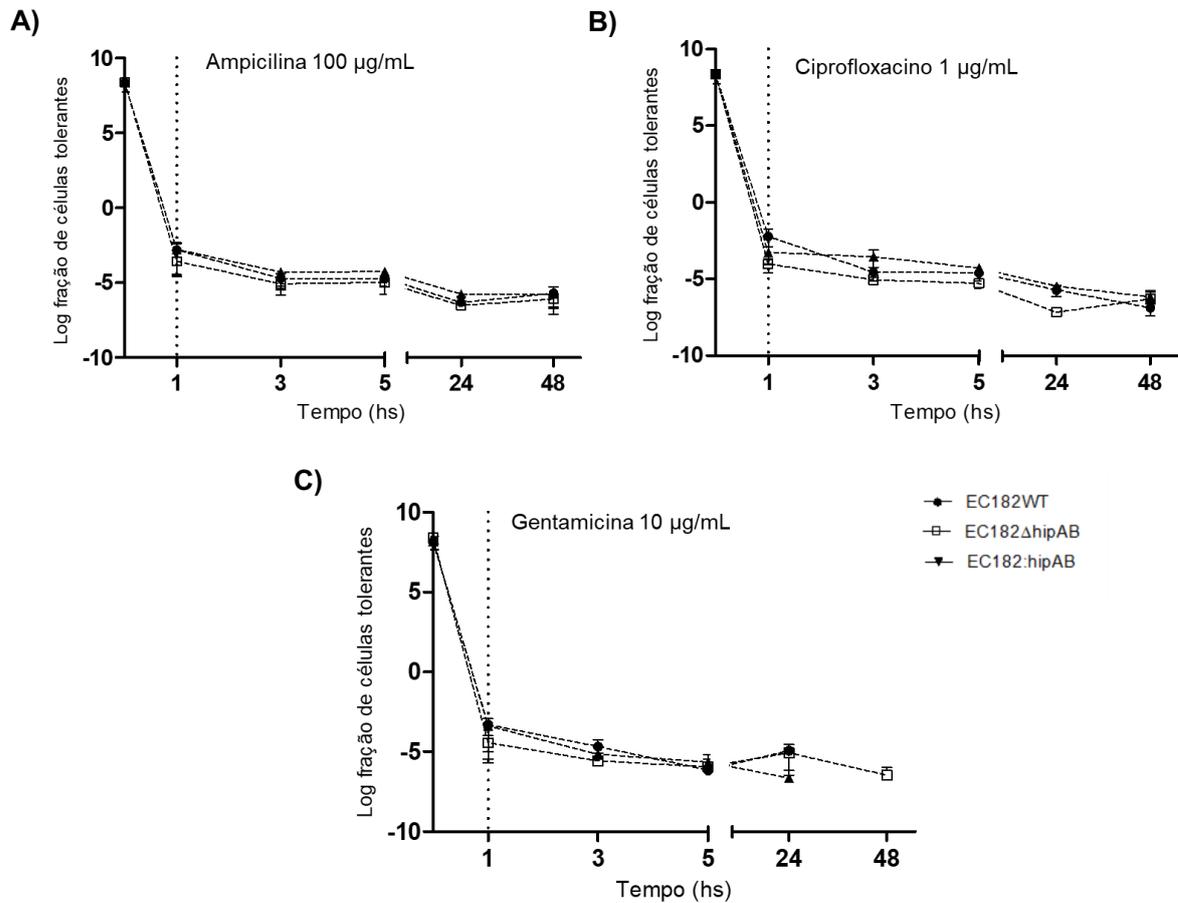
### 5.6.2 Ensaio de persistência

A fim de avaliar se o sistema TA *hipAB* induziria a persistência em ExPEC patogênicas, o ensaio de persistência foi realizado. Para tanto, pelo menos 10 vezes a CMI dos antibióticos, exceto para as cepas de EC273 na presença de ampicilina, foram utilizados. A curva bifásica de morte bacteriana geralmente é utilizada para representar dados provenientes de ensaios de indução de persistência por

antibióticos. Após tratamento com antibiótico espera-se que uma grande parcela da população bacteriana morra nas primeiras horas, esta taxa de mortalidade tende a cair entre 3 h e 5 h. A fração de bactérias que sobrevivem após 5 h de exposição são geralmente denominadas bactérias persistentes (Goormaghtigh; Van Melderen, 2016).

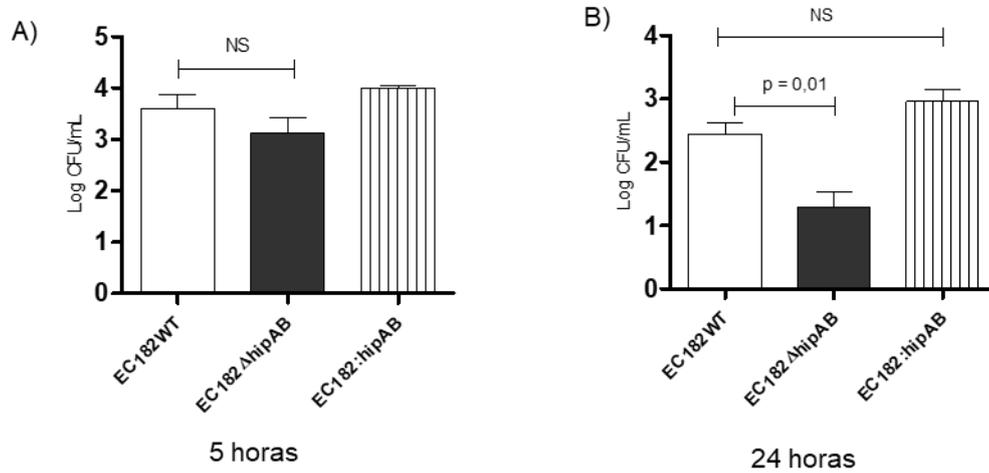
Para construção da curva bifásica foram coletadas amostras nos tempos 0, 1 h, 3 h, 5 h, 24 h e 48 h de exposição. As amostras coletadas foram posteriormente diluídas serialmente e plaqueadas para contagem de UFC/mL. O *log* da fração de taxas tolerantes refere-se à divisão das UFC/mL do tempo 0 pelas UFC/mL dos tempos seguintes. A cepa EC182 parental, EC182s e EC182:*hipAB* não apresentaram diferença significativa em nenhum dos tempos de incubação com ampicilina e gentamicina (**Figura 15**). Já ao serem incubadas com 1 µg/mL de ciprofloxacino, observou-se diferença significativa entre a indução da persistência e morte de EC182 cepa parental e EC182Δ*hipAB* após de 24 h de incubação (**Figura 16B**). Não houve diferença significativa em relação a indução de persistência comparando os cultivos das cepas EC273 parental, EC273Δ*hipAB* e EC273:*hipAB* na presença dos antibióticos testados (**Figura 17**).

## 12. Curvas bifásicas de persistência da cepa EC182



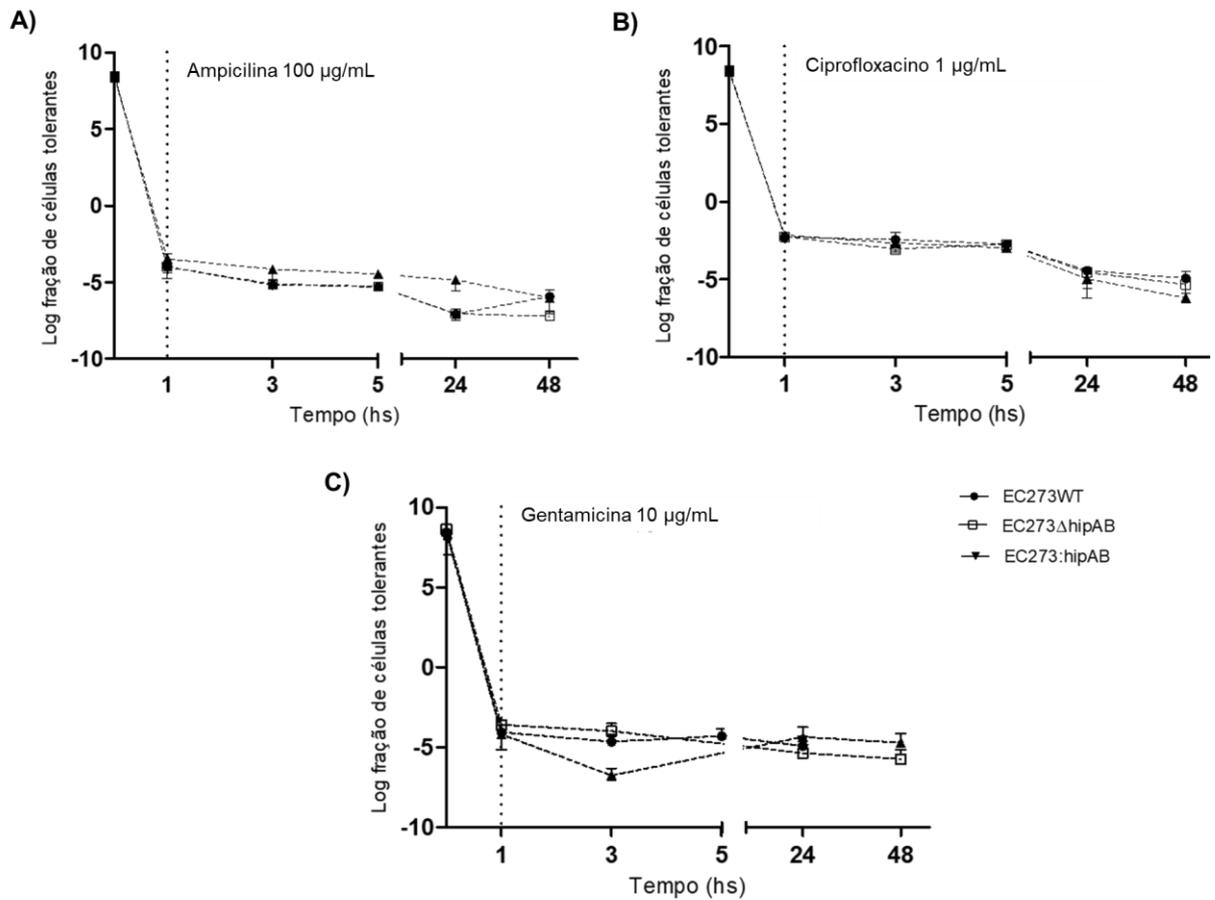
Curva bifásica representa a fração bacteriana que sobreviveu à presença de antibióticos. Uma fração dos cultivos das cepas EC182 foram coletadas para contagem de UFC/mL após exposição aos antibióticos por 1 h, 3 h, 5 h, 24 h e 48 h. (A) adição de ampicilina 100 µg/mL, (B) ciprofloxacino 1 µg/mL e (C) gentamicina 10 µg/mL. A fração bacteriana persistente demonstrada nos gráficos foram obtidas pela divisão do número de UFC/mL do tempo zero aos depois tempos testados. No gráfico o quadrado preenchido refere-se a EC182 parental, quadrado vazado mutante em HipA/B e complementado é representado por triângulo preto invertido. O ensaio foi realizado em meio MOPS, em triplicata biológica e triplicata experimental para cada cepa.

**Figura 13. Gráfico das células persistentes EC182 recuperadas após 5 e 24 horas de exposição a ciprofloxacino**



Ensaio de persistência a ciprofloxacino da cepa EC182. Em (A) bactérias sobreviventes após 5 h de exposição ao ciprofloxacino (1  $\mu$ g/mL). Em (B) após 24 h. Em branco cepa parental, em preto mutante no sistema HipAB e as barras com listras verticais refere-se cepa complementada. As contagem das UFC/mL referem-se à média de três experimentos independentes realizados em duplicata. A significância estatística foi determina pelo teste *t student* entre as cepas parental e mutante ( $p=0,01$ ), parental e complementada (não significante – NS).

Figura 14. Curvas bifásicas de persistência da cepa EC273

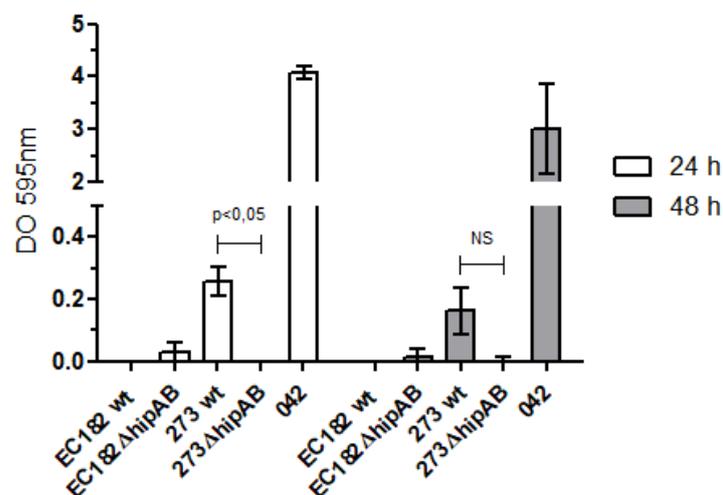


Curva bifásica representa a fração bacteriana que sobreviveu à presença de antibióticos. Uma fração dos cultivos das cepas EC273 foram coletadas para contagem de UFC/mL após exposição aos antibióticos por 1 h, 3 h, 5 h, 24 h e 48 h. (A) adição de ampicilina 100 µg/mL, (B) ciprofloxacino 1 µg/mL e (C) gentamicina 10 µg/mL. A fração bacteriana persistente demonstrada nos gráficos foram obtidas pela divisão do número de UFC/mL do tempo zero aos depois tempos testados. No gráfico o quadrado preenchido refere-se a EC273 parental, quadrado vazado mutante em HipA/B e complementado é representado por triângulo preto invertido. O ensaio foi realizado em meio MOPS, em triplicata biológica e triplicata experimental para cada cepa.

### 5.6.3 Formação de biofilme

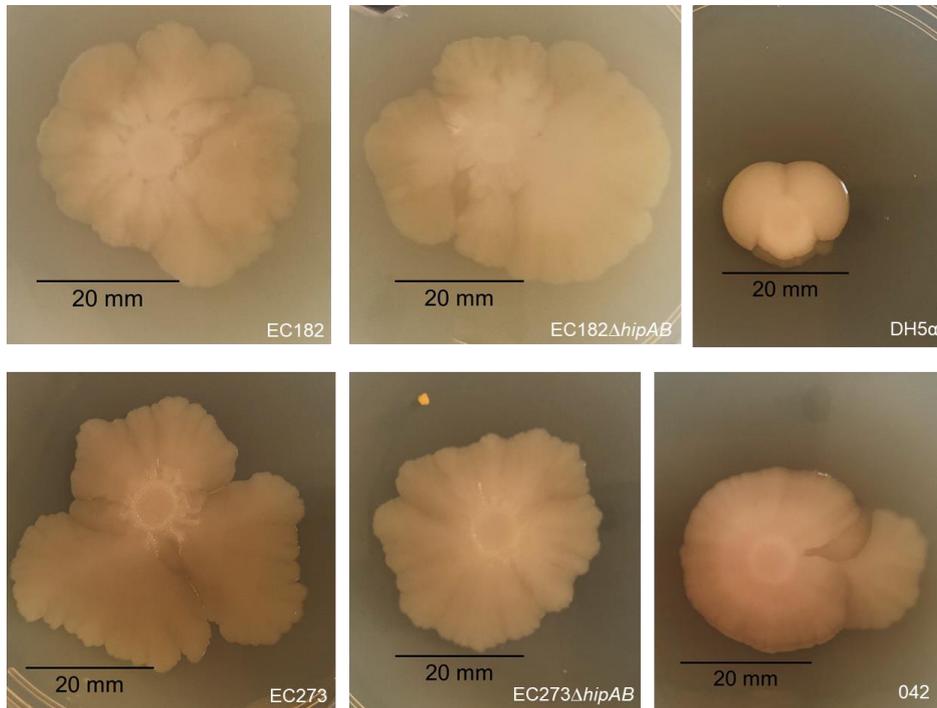
A fim de avaliar se *hipA/B* alteraria o fenótipo de formação de biofilme e a arquitetura estrutural da colônia, todas as cepas foram avaliadas quanto a formação de biofilme em superfícies abióticas (poliestireno e vidro) e em placas de cultura contendo uma grossa camada de meio YESCA. Em poliestireno, nenhuma das cepas testadas foram capazes de formar o biofilme. Porém em vidro, uma das cepas (EC273) não só formou biofilme, como foi possível observar uma diminuição estatística da formação do biofilme da cepa EC273 $\Delta$ *hipAB* em relação a cepa selvagem nas primeiras 24 horas de incubação (**Figura 18**). A arquitetura das colônias de ExPEC foram distintas e irregulares, quando comparadas as bordas regulares dos controles 042 e DH5 $\alpha$  (**Figura 19**). O sistema *hipA/B* parece não alterar a arquitetura de ExPEC, uma vez que as colônias das cepas selvagens e mutantes apresentaram a mesma arquitetura. Em relação a formação do biofilme em meio YESCA, houve uma diminuição de aproximadamente 10 mm do diâmetro da colônia da EC273 $\Delta$ *hipAB*, quando comparada em relação a cepa selvagem (**Figura 19**).

**Figura 15. Formação de biofilme em vidro**



Ensaio de formação de biofilme em lâminas de vidro das cepas ExPEC após 24 h (em branco) e 48 h (em cinza) de incubação em TSB a 37 °C. Os valores correspondem a média de três triplicatas, mais ou menos o desvio padrão. *E. coli* enteroagregativa 042 foi utilizada como controle positivo da formação de biofilme. A significância estatística foi determinada pelo teste t *student* entre as cepas EC273 parental e mutante ( $p > 0,05$ ). NS = não significativa.

**Figura 16. Formação de biofilme em meio YESCA**

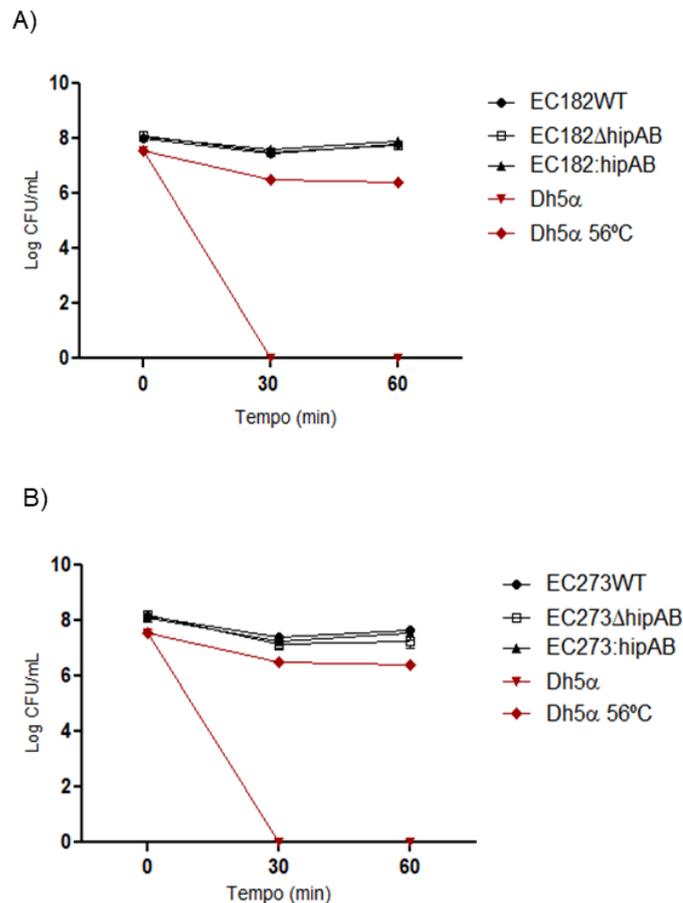


Formação de biofilme em meio YESCA, 10  $\mu$ L do cultivo bacteriana de cada cepa foi inoculado no centro das placas de Petri e incubadas a temperatura ambiente por 14 dias. *E. coli* enteroagregativa 042 foi utilizada como controle positivo e *E. coli* DH5 $\alpha$  como controle negativo da formação de biofilme. As fotos apresentadas foram retiradas no 14<sup>o</sup> dia do ensaio. As imagens são a representação de duas replicatas biológicas.

#### 5.6.4 Ensaio de resistência ao soro humano

O ensaio de resistência foi realizado a fim de avaliar se as amostras bacterianas seriam persistentes aos peptídeos inibitórios da via clássica do complemento presente no soro humano. A cepa parental EC182, EC182 $\Delta$ *hipAB* e EC182:*hipAB* (**Figura 20A**) foram capazes de sobreviver igualmente ao sistema complemento a 37 °C por 30 min e 1 h. Igualmente, as amostras EC273 parental, EC273 $\Delta$ *hipAB* e EC273:*hipAb* sobrevivem (**Figura 20B**) à exposição ao soro humano, evidenciando que sistema *hipAB* não oferece nenhuma vantagem ou desvantagem em relação aos peptídeos inibitórios presentes no soro humano. A cepa DH5 $\alpha$ , por sua vez, não foi capaz de sobreviver ao sistema complemento ativado em nenhum dos tempos testados.

**Figura 17. Ensaio de resistência ao soro**



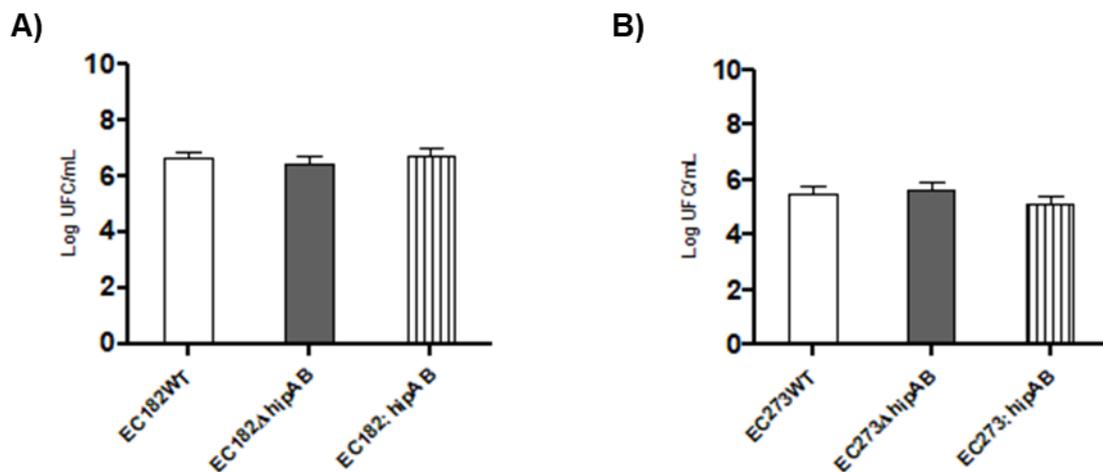
Ensaio de resistência ao soro humano. As bactérias foram recuperadas após incubação por 30 min e 1 h com o soro humano ativo e inativado a 56 °C. Em (A) EC182 e em (B) EC273. O círculo preto representa a cepa parental, quadro vazado cepa mutante em *HipAB*, e triângulo preto a cepa complementada. O triângulo vermelho virado para baixo refere-se a DH5α incubada com soro ativado, e o losango vermelho DH5α incubada com soro inativo a 56 °C. As contagens referem-se a três experimentos independentes realizados em duplicata.

### 5.6.5 Internalização EC182 e EC273 por macrófagos J774.A1

Macrófagos fazem parte da primeira linha de defesa do sistema imune, e são responsáveis pela fagocitose de células ou partículas estranhas ao corpo. Para avaliar a taxa de internalização das ExPEC por macrófagos, as células J774.A1 foram infectadas com as cepas EC182, EC182Δ*hipAB*, EC182:*hipAB* (**Figura 21A**), EC273, EC273Δ*hipAB* e EC273:*hipAB* (**Figura 21B**) no MOI 100, durante 30 min. Após

infecção as células foram incubadas com concentrações inibitórias de gentamicina para eliminar as bactérias extracelulares. Após determinação da UFC/mL observou-se todas as cepas apresentaram perfil similar de internalização por fagocitose, o que sugere que *hipAB* não favoreça o escape aos macrófagos ou a sobrevivência no interior celular.

**Figura 18. Internalização de ExPEC por macrófago J744.A1**



ExPEC internalizada por macrófagos J744.A1. Os macrófagos foram infectados durante 30 min no MOI 100, bactérias extracelulares foram eliminadas pela incubação de 100 µg/mL de gentamicina por 2 h e a UFC/mL foi determinada ao fim do experimento. Em (A) cepas EC182 e em (B) EC273. Em branco cepa parental, em preto mutante no sistema HipAB e as barras com listras verticais refere-se aos complementados. As contagem referem-se à média de três experimentos independentes realizados em duplicata.

## 6 DISCUSSÃO

Os sistemas toxina-antitoxina são genes amplamente difundidos em procariotos, em *Mycobacterium tuberculosis* mais de 80 sistemas TA foram encontrados, dos quais apenas 30 deles são funcionais (CHAN; ESPINOSA; YEO., 2016). Em *E. coli* K12, 36 possíveis sistemas foram descritos, dos quais os sistemas do tipo II mais estudados e caracterizados são: MazF/E, ChpB/S, YafQ/Dinj, YoeB/YefM, HipA/B e MqsR/A (YAMAGUCHI; INOUE, 2011). O sistema TA parece não ser essencial para o desenvolvimento celular, mas sim estar associado ao estilo de vida das bactérias, e sua diversidade pode estar relacionada à multiplicidade de função em bactérias. As possíveis funções relacionadas ao sistema TA são: resposta ao estresse, indução de persistência, proteção contra bacteriófagos e biofilme (CHAN; ESPINOSA; YEO, 2016).

Alguns sistemas já foram associados a determinados fenômenos, como por exemplo, o gene *mqsR* que codifica a toxina do sistema TA MqsR/A, originalmente conexo a regulação da motilidade, *quorum-sensing* e a um importante papel na formação de biofilme pela resposta ao autoindutor-2 (AI-2). Em um trabalho realizado por Brown e colaboradores (2009), a expressão de MqsR induziu a parada do crescimento bacteriano, no entanto, a co-expressão de MqsR e MqsA normalizou esse crescimento, e como esperado a deleção de *mqsA* foi letal para a cultura bacteriana. Soo e Wood (2013), demonstraram que MqsA e o complexo MqsR/A regulam negativamente a expressão de *rpoS*, um fator sigma de resposta geral a estresse, e também CsgD, um regulador de formação de biofilme. Ainda foi visto que, *mqsR* é um gene altamente regulado em *E. coli* que apresenta o fenótipo de persistência e parece desempenhar um papel essencial na sinalização celular. Dando suporte ao trabalho anterior, Wu e colaboradores (2015), ranquearam 21 genes candidatos de associação

ao fenótipo de persistência bacteriana na presença de diferentes antibióticos. Neste trabalho, seis sistemas TA do tipo II foram analisados, dentre eles, as deleções de *mqsR* e *relE* demonstraram redução da persistência bacteriana na presença de três antibióticos, os outros quatro (*hipA*, *tisAB*, *lon* e *dinJ*) apresentaram deficiência na formação de persistência na presença de um ou de dois antibióticos (WU et al., 2015).

Em ExPEC poucas cepas foram *mqsR* positivas, demonstrando que a persistência nessa categoria pode estar associada a outros fatores. Os sistemas TA encontrados com maior frequência nas cepas de ExPEC estudadas foram MazE/F e HipA/B. O primeiro é fortemente associado a morte celular programada e proteção contra bacteriófagos, já *hip* foi o primeiro gene associado a persistência e sua expressão ectópica levou ao aumento da persistência em até 10.000 vezes em *E. coli* (MOYED; BERTRAND, 1983; KORCH; HILL., 2006). Neste sentido, o sistema HipA/B de dois isolados clínicos de ExPEC foram deletados. A deleção foi confirmada pela inserção do cassete de resistência a cloranfenicol. A retirada do cassete de resistência reestabeleceu o fenótipo de resistência e deixou uma “cicatriz” de aproximadamente 300 pb. Para complementação, os mutantes foram transformados com plasmídeos responsáveis pela expressão constitutiva de HipA/B. Apesar de não ter sido verificada a produção das proteínas HipA e HipB por não dispormos de anticorpos contra elas; com as construções dos mutantes e seus complementados obtidas no presente trabalho foi possível a realização de testes fenotípicos de persistência bacteriana frente a diferentes antibióticos, formação de biofilme, resistência ao soro e sobrevivência em macrófagos.

Ao deletar *hipA/B* nos dois isolados clínicos, observamos que a taxa de persistência frente a diferentes antibióticos foi a mesma tanto para a cepa parental EC273 quanto para a mutante. Black e colaboradores (1994), também observaram que as deleções

de HipA ou HipA/B, proporcionaram um fenótipo similar de persistência entre cepas parental e mutante. Isso se deve tanto por mecanismos redundantes de indução da persistência ou porque HipA não atua de forma importante em persistência, no entanto, ao expor a cepa EC182 ao ciprofloxacino, observamos uma diferença na formação de persistência após 24 h de tratamento que foi estatisticamente significativa. Também, Schumacher e colaboradores (2015) ao examinar a correlação entre a expressão de *hipA/B* e a formação de persistência em célula única, observaram que a expressão do sistema favoreceu a sobrevivência de bactérias expostas a ofloxacina, demonstrando que *hipA* contribui para formação de persistência em *E. coli*. Adicionalmente, Keren e colaboradores (2004), observaram que a exposição do mutante em *hipA/B* a fluoroquinolonas e mitomicina C, na fase estacionária, levou a uma redução da taxa de formação de persistência de 10 a 100 vezes. Porém nenhuma diferença estatisticamente significativa entre a cepa parental e mutante foi observada durante fase logarítmica.

A deleção de *hipA/B* parece não interferir no fenótipo de persistência em todas as fases do cultivo bacteriano, porém, o sistema parece ser o principal determinante na indução de persistência na fase estacionária (KEREN et al., 2004). Corroborando com o que foi observado em EC182 entre as cepas parental e mutante, na indução de persistência após 24 h de exposição ao antibiótico da classe das quinolonas.

A redundância dos sistemas nos cromossomos bacterianos dificulta o entendimento da contribuição individual dos sistemas TA na persistência, porém sabe-se que os sistemas TA possuem um papel importante na indução de persistência a condições estressantes, incluindo a exposição aos antibióticos (KEDZIERSKA; HAYES, 2017). Análise do transcriptoma de uma fração persistente de *E. coli* exposta a ampicilina demonstrou aumento significativo da expressão de genes relacionados a resposta

SOS (*recA*, *sulA*, *uvrBA*, *umuDC*), genes do operon *phage-shock*, genes relacionados a resposta ao choque térmico (*cspH*, *htrA*, *ibpAB*, *htpX* e *clpB*) e os sistemas TA *dinJ/yafQ*, *yefM*, *relB/E*, and *mazE/F* (KEREN et al., 2004). Os resultados do ensaio de persistência não foram homogêneos, e em EC273, mesmo após utilizar uma concentração de ciprofloxacino de 10 µg/mL, não observamos a diferença estatística na indução da persistência entre a cepa parental e mutante. Portanto, propomos algumas hipóteses para a não alteração do fenótipo de persistência, como: (1) presença de bomba de efluxo e (2) filamentação celular que reduziriam a concentração interna de antibiótico, e (3) indução da resposta SOS. Essa última sozinha parece não ser suficiente para induzir a persistência bacteriana, uma vez que foi descrito em literatura que as células suscetíveis e persistentes apresentaram indução similar da resposta SOS (GOORMAGHTIGH; VAN MELDEREN, 2019). Portanto, o entendimento e a caracterização da fisiologia das células persistentes, em nível individual são necessários, por ser a persistência: (1) um fenômeno complexo que envolve diversos mecanismos moleculares, que (2) parece depender fortemente do modelo experimental e do antibiótico testado, e (3) que deve ser estudada caso-a-caso. A associação entre sistema TA e persistência é bastante debatida e controversa. Alguns trabalhos, como os mencionados acima, descreveram a atuação do sistema TA na persistência bactéria, porém Fraikin e colaboradores (2020) consideram a associação simplista, e refutam alguns resultados contraditórios, como o trabalho realizado por Maisonneuve e colaboradores (2011). Nesse último, os pesquisadores observaram a redução da persistência ao deletar sucessivamente 10 sistemas TA. Posteriormente esse trabalho foi retratado, pois, a cepa *E. coli* K12 utilizada estava contaminada com o bacteriófago phi80, um importante contaminante laboratorial. Ao avaliar e reconstruir

os mutantes em uma cepa livre do contaminante, a deleção dos 10 sistemas não induziu a persistência aos antibióticos (MAISONNEUVE et al., 2018).

Tipicamente apenas 1 em  $10^5$  bactérias se tornam persistentes, porém observou-se um aumento de 1000 vezes na formação de células persistentes em *E. coli* portadoras do gene *hipA7* (SHUMACHER et al., 2020; MOYER et al., 1983). Foi descrito em literatura que a super expressão de HipA7 em baixa temperatura aumentou de 50-100 vezes o fenótipo de persistência na presença de mitomicina C na fase estacionária. E a deleção do sistema *hipA/B* não afetou a concentração mínima inibitória dos antibióticos, mas reduziu as células persistentes de 10 a 100 vezes na fase estacionária (fluoroquinolona e mitomicina C). Quando tratado com mitocina C e ciprofloxacino, foi visto que o mutante em  $\Delta hipAB$  demonstrou 150 e 4 vezes menor formação de biofilme quando comparado com a cepa parental em cepa laboratorial de *E. coli* (KEREN et al., 2004). HipA7 contém duas mutações, G22S e D291A, juntas essas substituições aumentaram o nível de células persistentes na população bacteriana. Outras substituições já foram descritas, como a P86L que apresentou taxa de persistência similar a *hipA7* (SCHUMACHER et al., 2015).

Ao analisar 477 isolados de UPEC e *E. coli* comensais em busca por mutantes em *hipA*, Schumacher e colaboradores (2015), encontraram 23 mutantes *hipA7* e uma substituição P86L. As mutações que resultaram em altas taxas de persistência foram *hipA7*, *hipA* (P86L) e *hipA* (D88N), previamente isolada em cepas laboratoriais (KORCH et al., 2003). As substituições G22S e P86L aumentam a persistência pela redução da formação do complexo HipA/B e consequente inabilidade de reprimir completamente o *operon hipA/B*. Já D88N não alterou a formação do complexo e apresentou menores taxas de formação de células persistentes (SCHUMACHER et al., 2015). Ao comparar a sequência de HipA das cepas EC182 e EC273 com a

sequência depositada de MG1655, observou-se que HipA de EC273 possui oito mutações, são elas: I104L, D107N, V110I, H112R, N227R, A242T, K290R e S424T. HipA/B parece ser mais conservado em cepas ETEC e EXPEC e as mutações comumente encontradas foram: I104L, D107N, V110I, C112R, K234E, Q277R, K290R, K382R, N408T, P435R, R436E, I437Y, R438G, Y439S/I, e a deleção de K em 440 (XU et al., 2020). A influência dessas mutações sob a indução de persistência ou no crescimento bacteriano ainda é incerto. Após expor EC273 ao ciprofloxacino, recuperamos  $10^6$  UFC/mL nas primeiras 5 h de tratamento e  $10^3$  UFC/mL após 24 e 48 h. Ensaios futuros precisam ser realizados para definir se as taxas de células persistentes em EC273 resultam das mutações encontradas, e se sim, quais seriam as mais importantes para o fenótipo observado.

Como dito, bactérias tolerantes são responsáveis pela incapacidade da erradicação da infecção, e conseqüente falha no tratamento com antibacterianos. Como os antibióticos bactericidas possuem como alvo processos presentes em células metabolicamente ativas, a subpopulação persistente de fenótipo variado sobrevive ao tratamento. Bactérias persistentes são uma importante causa de infecções recorrentes, especialmente causadas por bactérias formadoras de biofilme. A toxina HipA foi associada a formação de biofilme na presença de antibióticos, e a deleção do sistema *hipA/B* de *E. coli* BW25113 levou a uma redução da biomassa do biofilme em poliestireno. HipA parece influenciar na formação do biofilme pela produção de DNA extracelular que faz parte da massa do biofilme produzido por *E. coli* (ZHAO et al., 2013). A deleção de *hipA/B* não influenciou a formação de biofilme em superfície de poliestireno ou em meio YESCA, porém sua ausência reduziu a formação de biofilme de EC273 $\Delta$ *hipAB* em superfície de vidro. A incapacidade das cepas EC182 em formar biofilme deve possivelmente depender da presença do sistema TA. Corroborando

com o que foi observado em EC273, Xu e colaboradores (2020), observaram a redução expressiva da formação de biofilme ao inibir a expressão de *hipA/B* em *E. coli* Nissle 1917 (*EcN*), a única *E. coli* utilizada como probiótico, sugerindo que *hipA/B* atue ativamente na formação de biofilme em *EcN*. A formação de biofilme em meio YESCA possibilita avaliar a arquitetura de diferentes isolados bacterianos (EBERLY et al., 2017). As cepas ExPEC apresentaram bordas irregulares quando comparada as cepas 042 e DH5 $\alpha$ , porém entre cepas selvagens e mutantes não foram observadas alterações visíveis, sugerindo que o sistema HipA/B não influencia na arquitetura das colônias bacterianas.

ExPEC é responsável por 80-90% das infecções urinárias adquiridas na comunidade, e por 30% dos casos de bacteremia. Uma característica comum as ExPEC é a capacidade em acessar a corrente sanguínea levando a septicemia. Para acessar e multiplicar-se na corrente sanguínea ExPEC precisa superar desafios ambientais (baixo ferro livre e tensão de oxigênio), e as defesas do hospedeiro, como: fagocitose, sistema complemento, e peptídeos antimicrobianos (MA et al., 2018). Portanto, ensaios de resistência ao soro a infecção de macrófagos J774.A1 foram realizados, para avaliar se o sistema *hipA/B* forneceria algum vantagem na capacidade de ExPEC sobreviver a condições de estresse clinicamente relevantes. Ao expor as cepas ao complemento presente no soro humano, não foi observado nenhuma diferença estatisticamente significante em relação as cepas parental ou mutante. Ambas apresentaram fenótipo de resistência ao soro, já esperado por tratarem-se de cepas ExPEC isoladas de infecção sanguínea. Ao realizar um modelo experimental de incubação das bactérias com soro humano e posterior incubação com ampicilina, Ayrapetyan e colaboradores (2015) observaram que os componentes do sistema inato presente no soro foram responsáveis pela indução da persistência e de células viáveis

não cultiváveis (VBNC). E que a exposição ao soro humano elevou a expressão da toxina HipA e RelE em *Vibrio vulnificus*. TA parece estar fortemente associado a indução de persistência, inclusive ao soro, e a indução de VBNC. Porém esse fenótipo não foi observado em ExPEC, possivelmente por essa categoria de *E. coli* possuir outras vias de indução a resistência ao soro. Os genes descritos na literatura, que tiveram sua expressão aumentada durante a infecção sanguínea compõem o polissacarídeo extra citoplasmático (ECP): cápsula K1, ácido colânico, Yjb exopolissacarídeo e peptidoglicano (MA et al., 2018).

Macrófagos possuem estratégias antimicrobianas diversas, como: produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), proteases, enzimas lipolíticas, peptídeos antimicrobianos, óxido de nitrogênio (NO), mecanismo de depleção de nutrientes, e autofagia (BOKIL et al., 2011). Todos os mecanismos descritos anteriormente são fontes de estresse para as bactérias, e, portanto, poderiam induzir a expressão dos sistemas TAs. As cepas analisadas (EC182 e EC273) foram capazes de invadir e sobreviver aos mecanismos de contenção bacteriano presente em J744.A1. Ambas sobreviveram após 1 h de incubação com macrófagos, e todas as cepas, incluindo cepa parental, mutante e complementado responderam de forma similar a fagocitose. Desse modo, podemos inferir que HipA/B não participa na resposta ao estresse causado por macrófagos.

Apesar da abundância e diversidade, a função dos sistemas TA ainda está sob debate. Algumas questões ainda estão em aberto, como por exemplo: Qual o benefício para as bactérias possuírem esses sistemas? Qual a necessidade biológica em albergar mais de uma cópia do mesmo sistema? Por que tantas cópias em genomas relativamente pequenos? Essas são questões ainda em aberto que revelam o potencial dos sistemas TA para o entendimento da fisiologia bacteriana e

possível desenvolvimento de terapias alternativas. Diversos fenótipos têm sido associados aos sistema TA, sobretudo a resposta a condições estressantes diversas, indução de morte celular programada e virulência. Se a presença de TA em cepas virulentas se dá pela incapacidade dos isolados em perdê-los ou se TA funciona como um “fator de virulência”, ainda é uma questão em aberto. Porém, sabe-se que as toxinas podem induzir dormência e morte celular em diferentes hospedeiros, inclusive em células eucarióticas como leveduras. E que, portanto, possuem um grande potencial para desenvolvimento de terapias alternativas a bactérias resistentes, estratégias anticancerígenas, antivirais e podem ainda ser utilizados como ferramenta biotecnológica (KRISTOFFERSEN et al., 2000).

Quanto a sua funcionalidade, descrevê-los como único responsável por um fenótipo específico parece uma ideia tentadora, porém, considerada simplista e mesmo reducionista. Os sistemas TA parecem fazer parte do fenômeno de persistência, mas provavelmente atuem de forma redundante com outros genes. O que se sabe atualmente é que TA são sistemas pequenos, evolutivamente bem-sucedidos, abundantes e diversos, e são parte acessória do genoma de procariotos que se movem por transferência genética horizontal (HAYES; VAN MELDEREN, 2011; VAN MELDEREN; WOOD, 2017; DÍAZ-OREJAS et al., 2017; FRAIKIN; GOORMAGHTIGH; VAN MELDEREN, 2020).

## 7 CONCLUSÃO

No presente trabalho concluímos que, o sistema TA HipA/B está presente em 76 das 100 cepas analisadas por PCR. HipA/B participou da indução da persistência após 24 horas de incubação com o antibiótico ciprofloxacino apenas em um dos isolados analisados (EC182). A ausência de HipA/B em EC273 reduziu a formação de biofilme em superfície abiótica (vidro). O fenótipo de resistência ao soro humano e na sobrevivência intracelular em macrófagos não sofreu influência pela deleção do sistema HipA/B. Além disso, HipA da cepa EC273 possui oito mutações, e ensaios futuros precisam ser realizados para avaliar a importância desse achado.

## BIBLIOGRAFIA

AYRAPETYAN, M., WILLIAMS, T. C., BAXTER, R., OLIVER, J. D. Viable but Nonculturable and Persister Cells Coexist Stochastically and Are Induced by Human Serum. **Infect Immun**. 2015;83(11):4194-4203. doi:10.1128/IAI.00404-15

BALABAN, N. Q., HELAINE, S., LEWIS, K., ACKERMANN, M., ALDRIDGE, B., ANDERSSON, D. I., BRYNILDSEN, M. P., BUMANN, D., CAMILLI, A., COLLINS, J. J., DEHIO, C., FORTUNE, S., GHIGO, J. M., HARDT, W. D., HARMS, A., HEINEMANN, M., HUNG, D. T., JENAL, U., LEVIN, B. R., MICHIELS, J., STORZ, G., TAN, M. W., TENSON, T., VAN MELDEREN, L., ZINKERNAGEI, A. Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. **Nat Rev Microbiol**. 2019 Jul;17(7):441-448. doi: 10.1038/s41579-019-0196-3. Erratum in: *Nat Rev Microbiol*. 2019 Apr 29;: PMID: 30980069; PMCID: PMC7136161.

BARBER, A. E., FLEMING, B. A., MULVEY, M. A. Similarly Lethal Strains of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Trigger Markedly Diverse Host Responses in a Zebrafish Model of Sepsis. **mSphere**. 2016 Apr 20;1(2):e00062-16. doi: 10.1128/mSphere.00062-16. PMID: 27303721; PMCID: PMC4894679.

BLACK, D. S., IRWIN, B., MOYED, H. S. Autoregulation of hip, an operon that affects lethality due to inhibition of peptidoglycan or DNA synthesis. *J Bacteriol*. 1994 Jul;176(13):4081-91. doi: 10.1128/jb.176.13.4081-4091.1994. PMID: 8021189; PMCID: PMC205607.

BLANGO, M. G., FLEMING, B. A., KINCANNON, W.M., TRAN, A., LEWIS, A. J., RUSSELL, C. W., ZHOU, Q., BAIRD, L., M., BRANNON, J. R., BEEBOUT, C. J., BANDARIAN, V., HADJIFRANISKOU, M., HOWARD, M. T., MULVEY, M. A. Balanced Input from the tRNA Prenyltransferase MiaA Controls the Stress Resistance and Virulence Potential of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. bioRxiv 2021.02.02.429414;doi:http://doi.org/10.1101/2021.02.02.429414

BOKIL, N. J., TOTSIKA, M., CAREY, A. J., STACEY, K. J., HANCOCK, V., SAUNDERS, B. M., RAVASI, T., ULETT, G. C., SCHEMBRI, M. A., SWEET, M. J. Intramacrophage survival of uropathogenic *Escherichia coli*: differences between diverse clinical isolates and between mouse and human macrophages. **Immunobiology**. 2011 Nov;216(11):1164-71. doi: 10.1016/j.imbio.2011.05.011. Epub 2011 May 24. PMID: 21802164.

BRANTL, S., JAHN, N. sRNAs in bacterial type I and type III toxin-antitoxin systems. **FEMS Microbiol Rev**. 2015 May;39(3):413-27. doi: 10.1093/femsre/fuv003. Epub 2015 Mar 25. PMID: 25808661.

BRAVO, A., DE TORRONTAGUI, G., DÍAZ, R. Identification of components of a new stability system of plasmid R1, ParD, that is close to the origin of replication of this plasmid. **Mol Gen Genet** 210, 101–110 (1987). <https://doi.org/10.1007/BF00337764>

BROWN, B. L., GRIGORIU, S., KIM, Y., ARRUDA, J. M., DAVENPORT, A., WOOD, T. K., PETI, W., PAGE R. Three dimensional structure of the MqsR:MqsA complex: a novel TA pair comprised of a toxin homologous to RelE and an antitoxin with unique properties. **PLoS Pathog**. 2009 Dec;5(12):e1000706. doi:

10.1371/journal.ppat.1000706. Epub 2009 Dec 24. PMID: 20041169; PMCID: PMC2791442.

CHAN, W. T., ESPINOSA, M., YEO, C. C. Keeping the Wolves at Bay: Antitoxins of Prokaryotic Type II Toxin-Antitoxin Systems. **Front Mol Biosci.** 2016 Mar 22;3:9. doi: 10.3389/fmolb.2016.00009. PMID: 27047942; PMCID: PMC4803016.

CHOI, J. S., KIM, W., SUK, S., PARK, H., BAK, G., YOON, J., LEE, Y. The small RNA, SdsR, acts as a novel type of toxin in *Escherichia coli*. **RNA Biol.** 2018;15(10):1319-1335. doi: 10.1080/15476286.2018.1532252. Epub 2018 Oct 18. PMID: 30293519; PMCID: PMC6284582.

KAROUI, H., BEX, F., DRÈZE, P., COUTURIER, M. Ham22, a mini-F mutation which is lethal to host cell and promotes *recA*-dependent induction of lambdaoid prophage. **EMBO J.** 1983. 2:1863–1868. doi:10.1002/j.1460-2075.1983.tb01672.x.

CHRISTENSEN, B. E., KJOSBAKKEN, J., SMIDSRØD, O. Partial Chemical and Physical Characterization of Two Extracellular Polysaccharides Produced by Marine, Periphytic *Pseudomonas* sp. Strain NCMB 2021. **Appl Environ Microbiol.** 1985;50(4):837-845. doi:10.1128/AEM.50.4.837-845.1985

CROSSMAN, L. C.; CHAUDHURI, R. R.; BEATSON, S. A.; WELLS, T. J.; DESVAUX, M.; CUNNINGHAM, A. F.; PETTY, N. K.; MAHON, V.; BRINKLEY, C.; HOBMAN, J. L.; SAVARINO, S. J.; TURNER, S. M.; PALLAN, M. J.; PENN, C. W.; PARKHILL, J.; TURNER, A. K.; JOHNSON, T. J.; THOMSON, N. R.; SMITH, S. G.; HENDERSON, I. R. A commensal gone bad: complete genome sequence of the prototypical enterotoxigenic *Escherichia coli* strain H10407. **J. Bacteriol.**, v. 192, n. 21, p. 5822–5831, 2010.

DATSENKO, K. A., WANNER, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2000 Jun 6;97(12):6640-5. doi: 10.1073/pnas.120163297. PMID: 10829079; PMCID: PMC18686. DETER et al., 2017

DÍAZ-OREJAS, R., ESPINOSA, M., YEO, C. C. The Importance of the Expendable: Toxin-Antitoxin Genes in Plasmids and Chromosomes. **Front Microbiol.** 2017 Aug 4;8:1479. doi: 10.3389/fmicb.2017.01479. PMID: 28824602; PMCID: PMC5543033

EBERLY, A. R., FLOYD, K. A., BEEBOUT, C. J., COLLING, S. J., FITZGERALD, M. J., STRATTON, C. W., SCHMITZ, J. E., HADJIFRANGISKOU, M. Biofilm Formation by Uropathogenic *Escherichia coli* Is Favored under Oxygen Conditions That Mimic the Bladder Environment. **Int J Mol Sci.** 2017 Sep 30;18(10):2077. doi: 10.3390/ijms18102077. PMID: 28973965; PMCID: PMC5666759. SHUMACHER et al., 2020.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, L., BLASCO, L., LOPEZ, M., BOU, G., GARCÍA-CONTRERAS, R., WOOD, T., TOMAS, M. Toxin-Antitoxin Systems in Clinical Pathogens. **Toxins (Basel).** 2016 Jul 20;8(7):227. doi: 10.3390/toxins8070227. PMID: 27447671; PMCID: PMC4963858.

FOXMAN, B. The epidemiology of urinary tract infection. **Nature Reviews Urology**, v. 7, p. 653-660, 2010.

FOZO, E. M.; MAKAROVA, K. S.; SHABALINA, S. A.; YITUN, N.; KOONIN, E. V.; STORZ, G. Abundance of type I toxin–antitoxin systems in bacteria: searches for new candidates and discovery of novel families. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 11, p. 3743-3759, 2010.

FRAIKIN, N., GOORMAGHTIGH, F., VAN MELDEREN, L. Type II Toxin-Antitoxin Systems: Evolution and Revolutions. **J Bacteriol.** 2020;202(7):e00763-19. Published 2020 Mar 11. doi:10.1128/JB.00763-19

GERDES, K.; BECH, F. W.; JORGENSEN, S. T.; LOBNER-OLESEN, A.; RASMUSSEN, P. B.; ATLUNG, T.; BOE, L.; KARLSTROM, O.; MOLIN, S.; VON MEYENBURG, K. Mechanism of postsegregational killing by the hok gene product of the parB system of plasmid R1 and its homology with the relF gene product of the *E. coli* relB operon. *The EMBO Journal.*, v. 5, n. 8, p. 2023- 2029, 1986.

GEORGIADES, K., RAOUL, T. D. Comparative genomics evidence that only protein toxins are tagging bad bugs. **Front Cell Infect Microbiol.** 2011 Oct 25;1:7. doi: 10.3389/fcimb.2011.00007. PMID: 22919573; PMCID: PMC3417374.

GHAFOURIAN, S., SADEGHIFARD, N., SOHEILI, S., SEKAWI, Z. Extended Spectrum Beta-lactamases: Definition, Classification and Epidemiology. **Curr Issues Mol Biol.** 2015;17:11-21. Epub 2014 May 12. PMID: 24821872.

GOEDERS, N., VAN MELDEREN, L. Toxin-antitoxin systems as multilevel interaction systems. **Toxins (Basel).** 2014 Jan 10;6(1):304-24. doi: 10.3390/toxins6010304. PMID: 24434905; PMCID: PMC3920263.

GOORMAGHTIGH, F.; FRAIKIN, N.; PUTRINŠ, M.; HALLAERT, T.; HAURYLIUK, V.; GRACIA-PINO, A.; SJÓDIN, A.; KASVANDIK, S.; UDEKWU, K.; TENSION, T.; KALDALU, N.; VAN MELDEREN, L. Reassessing the role of type II toxin-antitoxin systems in formation of *Escherichia coli* type II persister cells. **American Society for Microbiology**, v. 9, p. 1-13, 2018.

GOORMAGHTIGH, F., VAN MELDEREN, L. Optimized method for measuring persistence in *Escherichia coli* with improved reproducibility. **Methods Mol. Biol.** 1333, 43–52 (2016).

GOORMAGHTIGH, F., VAN MELDEREN, L. Single-cell imaging and characterization of *Escherichia coli* persister cells to ofloxacin in exponential cultures. **Sci Adv.** 2019 Jun 19;5(6):eaav9462. doi: 10.1126/sciadv.aav9462. PMID: 31223653; PMCID: PMC6584399.

HAZAN, R., MAURA, D., QUE, Y. A., RAHME, L. G. Assessing *Pseudomonas aeruginosa* Persister/antibiotic tolerant cells. **Methods Mol Biol.** 2014;1149:699-707. doi:10.1007/978-1-4939-0473-0\_54

HAYES, F., VAN MELDEREN, L. Toxins-antitoxins: diversity, evolution and function. **Crit Rev Biochem Mol Biol.** 2011 Oct;46(5):386-408. doi: 10.3109/10409238.2011.600437. Epub 2011 Aug 5. PMID: 21819231. HUANG et al., 2020

JAFFÉ, A., OGURA, T., HIRAGA, S. Effects of the ccd function of the F plasmid on bacterial growth. **J Bacteriol.** 1985 Sep;163(3):841-9. doi: 10.1128/JB.163.3.841-849.1985. PMID: 3897195; PMCID: PMC219208. JIANG et al., 2002

JOHNSON, T. J.; LOGUE, C. M.; JOHNSON, J. M.; KUSKOWSKI, M. A.; SHERWOOD, J. S.; BARNES, H. J.; DEBROY, C.; WANNEMUEHLER, W. M.; OBATA-YASUOKA, M.; SPANJAARD, L.; NOLAN, L. K. Associations Between Multidrug Resistance, Plasmid Content, and Virulence Potential Among Extraintestinal Pathogenic and Commensal *Escherichia coli* from Humans and Poultry. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, n. 1, p. 37-46, 2012.

KASPY, I., ROTEM, E., WEISS, N., RONIN, I., BALABAN, N. Q., GLASER, G. HipA-mediated antibiotic persistence via phosphorylation of the glutamyl-tRNA-synthetase. **Nat Commun.** 2013;4:3001. doi: 10.1038/ncomms4001. PMID: 24343429.

KĘDZIERSKA, B., HAYES, F. Emerging Roles of Toxin-Antitoxin Modules in Bacterial Pathogenesis. **Molecules.** 2016;21(6):790. Published 2016 Jun 17. doi:10.3390/molecules21060790

KEREN, I., SHAH, D., SPOERING, A., KALDALU, N., LEWIS, K. Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. **J Bacteriol.** 2004;186(24):8172-8180. doi:10.1128/JB.186.24.8172-8180.2004

KORCH, S. B., HENDERSON, T. A., HILL, T. M. Characterization of the hipA7 allele of *Escherichia coli* and evidence that high persistence is governed by (p)ppGpp synthesis. **Mol Microbiol.** 2003 Nov;50(4):1199-213. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03779.x. PMID: 14622409.

KRISTOFFERSEN, P., JENSEN, G. B., GERDES, K., PISKUR, J. (2000) Bacterial toxin-antitoxin gene system as containment control in yeast cells. **Appl Environ Microbiol** 66: 5524–5526. Balanced Input from the tRNA Prenyltransferase MiaA Controls the Stress Resistance and Virulence Potential of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*

KUMAR, A., ALAM, A., BHARADWAJ, P., TAPADAR, S., RANI, M., HASNAIN, S.E. (2019) Toxin-Antitoxin (TA) Systems in Stress Survival and Pathogenesis. In: Hasnain S., Ehtesham N., Grover S. (eds) *Mycobacterium Tuberculosis: Molecular Infection Biology, Pathogenesis, Diagnostics and New Interventions*. **Springer**, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-32-9413-4\\_15](https://doi.org/10.1007/978-981-32-9413-4_15)

LEHNHERR, H., MAGUIN, E., JAFRI, S., YARMOLINSKY, M. B. Plasmid Addiction Genes of Bacteriophage P1: doc, which Causes Cell Death on Curing of Prophage, and phd, which Prevents Host Death when Prophage is Retained, **Journal of Molecular Biology**, Volume 233, Issue 3, 1993, Pages 414-428,

LI, Y., ZHANG, Y. PhoU is a persistence switch involved in persister formation and tolerance to multiple antibiotics and stresses in *Escherichia coli*. **Antimicrob Agents Chemother.** 2007 Jun;51(6):2092-9. doi: 10.1128/AAC.00052-07. Epub 2007 Apr 9. PMID: 17420206; PMCID: PMC1891003.

LIVERMORE, D. M., WOODFORD, N. The beta-lactamase threat in Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter. **Trends Microbiol.** 2006 Sep;14(9):413-20. doi: 10.1016/j.tim.2006.07.008. Epub 2006 Jul 31. PMID: 16876996.

LÓPEZ-VILLAREJO, J., DIAGO-NAVARRO, E., HERNÁNDEZ-ARRIAGA, A. M., DÍAZ-OREJAS, R. Kis antitoxin couples plasmid R1 replication and parD (kis,kid) maintenance modules. **Plasmid.** 2012 Mar;67(2):118-27. doi: 10.1016/j.plasmid.2011.12.015. Epub 2012 Jan 8. PMID: 22244926.

MA, L., GREEN, S. I., TRAUTNER, B. W., RAMIG, R. F., MARESSO, A. W. Metals Enhance the Killing of Bacteria by Bacteriophage in Human Blood. **Sci Rep.** 2018 Feb 2;8(1):2326. doi: 10.1038/s41598-018-20698-2. PMID: 29396496; PMCID: PMC5797145.

MAISONNEUVE, E., SHAKESPEARE, L. J., JØRGENSEN, M. G., GERDES, K. Bacterial persistence by RNA endonucleases [retracted in: **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2018 Mar 12;:]. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2011;108(32):13206-13211. doi:10.1073/pnas.1100186108

**Retraction for Maisonneuve et al., Bacterial persistence by RNA endonucleases [retraction of: Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Aug 9;108(32):13206-11]. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018;115(12):E2901. doi:10.1073/pnas.1803278115**

MARIMON, O., TEIXEIRA, J. M., CORDEIRO, T. N., SOO, V. W., WOOD, T. L., MAYZEL, M., AMATA, I., GARCÍA, J., MORERA, A., GAY, M., VILASECA, M., OREKHOV, V. Y., WOOD, T. K., PONS, M. An oxygen-sensitive toxin-antitoxin system. **Nat Commun.** 2016 Dec 8;7:13634. doi: 10.1038/ncomms13634. PMID: 27929062; PMCID: PMC5155140.

MARTÍNEZ, M. L., PLATA-MENCHACA, E. P., RUIZ-RODRÍGUEZ, J. C., FERRER, R. An approach to antibiotic treatment in patients with sepsis. **J Thorac Dis.** 2020;12(3):1007-1021. doi:10.21037/jtd.2020.01.47

MOYED, H. S., BERTRAND, K. P. 1983. hipA, a newly recognized gene of Escherichia coli K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. **J. Bacteriol.** 155:768-775.

MASUDA, H., TAN, Q., AWANO, N., YAMAGUCHI, Y., INOUE, M. A novel membrane-bound toxin for cell division, CptA (YgfX), inhibits polymerization of cytoskeleton proteins, FtsZ and MreB, in Escherichia coli. **FEMS Microbiol Lett.** 2012;328(2):174-181. doi:10.1111/j.1574-6968.2012.02496.x

MOYED, H. S., BERTRAND, K. P. HipA, a newly recognized gene of Escherichia coli K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. **J Bacteriol.** 1983 Aug;155(2):768-75. doi: 10.1128/JB.155.2.768-775.1983. PMID: 6348026; PMCID: PMC217749.

NATARO, J. P., KAPER, J. B. Diarrheagenic Escherichia coli. *Clin Microbiol Rev.* 1998 Jan;11(1):142-201. Erratum in: **Clin Microbiol Rev** 1998 Apr;11(2):403. PMID: 9457432; PMCID: PMC121379.

NORTON, J. P., MULVEY, M. A. Toxin-antitoxin systems are important for niche-specific colonization and stress resistance of uropathogenic Escherichia coli. *PLoS*

Pathog. 2012;8(10):e1002954. doi: 10.1371/journal.ppat.1002954. Epub 2012 Oct 4. PMID: 23055930; PMCID: PMC3464220.

ORMANCI, S., YUCEL, N. Biofilm formation on polystyrene and glass surface by *Aeromonas* species isolated from different sources. **J Food Process Preserv.** 2017;00: e13223. doi:10.1111/jfpp.13223.

OGURA, T., HIRAGA, S. Partition mechanism of F plasmid: two plasmid gene-encoded products and a cis-acting region are involved in partition. **Cell.** 1983 Feb;32(2):351-60. doi: 10.1016/0092-8674(83)90454-3. PMID: 6297791.

PARK, S. J.; SON, W. S.; LEE, B.-J. Structural overview of toxin–antitoxin systems in infectious bacteria: A target for developing antimicrobial agents. **Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomics**, v. 1834, p. 1155- 1167, 2013.

PITOUT, J. D. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: an update on antimicrobial resistance, laboratory diagnosis and treatment. **Expert Rev Anti Infect Ther.** 2012 Oct;10(10):1165-76. doi: 10.1586/eri.12.110. PMID: 23199402.

PU, Y., ZHAO, Z., LI, Y., ZOU, J., MA, Q., ZHAO, Y., KE, Y., ZHU, Y., CHEN, H., BAKER, M. A. B., GE, H., SUN, Y., XIE, X. S., BAI, F. Enhanced Efflux Activity Facilitates Drug Tolerance in Dormant Bacterial Cells. **Mol Cell.** 2016 Apr 21;62(2):284-294. doi: 10.1016/j.molcel.2016.03.035. PMID: 27105118; PMCID: PMC4850422.

RÓWNICKI, M., LASEK, R., TRYLSKA, J., BARTOSIK, D.. Targeting Type II Toxin-Antitoxin Systems as Antibacterial Strategies. *Toxins (Basel)*. 2020 Sep 4;12(9):568. doi: 10.3390/toxins12090568. PMID: 32899634; PMCID: PMC7551001.

SAMUELSEN, Ø., HAUKLAND, H.H., ULVATNE, H., VORLAND, L.H. 2004. Anti-complement effects of lactoferrin-derived peptides. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 41:141-148.

SCHUMACHER, M. A., BALANI, P., MIN, J., CHINNAM, N. B., HANSEN, S., VULIĆ, M., LEWIS, K., BRENNAN, R. G. HipBA-promoter structures reveal the basis of heritable multidrug tolerance. **Nature.** 2015 Aug 6;524(7563):59-64. doi: 10.1038/nature14662. Epub 2015 Jul 29. PMID: 26222023; PMCID: PMC7502270.

SEEMANN, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics.* 2014 Jul 15;30(14):2068-9. doi: 10.1093/bioinformatics/btu153. Epub 2014 Mar 18. PMID: 24642063.

SHORT, F. L., MONSON, R. E., SALMOND, G. P. A Type III protein-RNA toxin-antitoxin system from *Bacillus thuringiensis* promotes plasmid retention during spore development. **RNA Biol.** 2015;12(9):933-7. doi: 10.1080/15476286.2015.1073438. PMID: 26274022; PMCID: PMC4615649.

SONG, S., WOOD, T. K. Toxin/Antitoxin System Paradigms: Toxins Bound to Antitoxins Are Not Likely Activated by Preferential Antitoxin Degradation. **Adv Biosyst.** 2020 Mar;4(3):e1900290. doi: 10.1002/adbi.201900290. Epub 2020 Feb 20. PMID: 32293143.

SOO, V. W., WOOD, T. K. Antitoxin MqsA represses curli formation through the master biofilm regulator CsgD. **Sci Rep.** 2013 Nov 11;3:3186. doi: 10.1038/srep03186. PMID: 24212724; PMCID: PMC4894380.

SRIVASTAVA, A., PATI, S., KAUSHIK, H. Toxin-antitoxin systems and their medical applications: current status and future perspective. **Appl Microbiol Biotechnol** **105**, 1803–1821 (2021). <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11134-z>

STEPANOVIC, S., VUKOVIC, D., DAKIC, I., SAVIC, B., SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **J Microbiol Methods**. 2000 Apr;40(2):175-9. doi: 10.1016/s0167-7012(00)00122-6. PMID: 10699673.

TSUCHIMOTO, S., OHTSUBO, H., OHTSUBO, E. Two genes, pemK and pemI, responsible for stable maintenance of resistance plasmid R100. **Journal of Bacteriology** Apr 1988, 170 (4) 1461-1466; DOI: 10.1128/jb.170.4.1461-1466.1988

TU, C. H., HOLT, M., RUAN, S., BOURNE, C. Evaluating the Potential for Cross-Interactions of Antitoxins in Type II TA Systems. **Toxins (Basel)**. 2020 Jun 26;12(6):422. doi: 10.3390/toxins12060422. PMID: 32604745; PMCID: PMC7354431.

VAN MELDEREN, L., WOOD, T. K. Commentary: What Is the Link between Stringent Response, Endoribonuclease Encoding Type II Toxin-Antitoxin Systems and Persistence? **Frontiers in Microbiology** VOLUME=8 YEAR=2017 PAGES=191 URL=<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.00191> DOI=10.3389/fmicb.2017.00191 ISSN=1664-302X

XU, J., XIA, K., LI, P., QIAN, C., LI, Y., LIANG, X. Functional investigation of the chromosomal ccdAB and hipAB operon in *Escherichia coli* Nissle 1917. **Appl Microbiol Biotechnol**. 2020;104(15):6731-6747. doi:10.1007/s00253-020-10733-6

ZHANG, S. P., WANG, Q., QUAN, S. W., WANG, Y., PENG, L., FENG, H.Y., HE, Y.X. Type II toxin–antitoxin system in bacteria: activation, function, and mode of action. **Biophys Rep** **6**, 68–79 (2020). <https://doi.org/10.1007/s41048-020-00109-8>

ZHAO, J., WANG, Q., LI, M., HEIJSTRA, B. D., WANG, S., LIANG, Q., QI, Q. *Escherichia coli* toxin gene hipA affects biofilm formation and DNA release. **Microbiology** (Reading). 2013 Mar;159(Pt 3):633-640. doi: 10.1099/mic.0.063784-0. Epub 2013 Jan 17. PMID: 23329678.

WANG, X., LORD, D. M., CHENG, H. Y., OSBOURNE, D. O., HONG, S. H., SANCHEZ-TORRES, V., QUIROGA, C., ZHENG, K., HERRMANN, T., PETI, W., BENEDIK, M. J., PAGE, R., WOOD, T. K. A new type V toxin-antitoxin system where mRNA for toxin GhoT is cleaved by antitoxin GhoS. **Nat Chem Biol**. 2012 Oct;8(10):855-61. doi: 10.1038/nchembio.1062. PMID: 22941047; PMCID: PMC3514572.

WEN, Y., BEHIELS, E., DEVREESE, B. Toxin-Antitoxin systems: their role in persistence, biofilm formation, and pathogenicity. **Pathog Dis**. 2014 Apr;70(3):240-9. doi: 10.1111/2049-632X.12145. Epub 2014 Feb 24. PMID: 24478112. WILES; KULESUS; MULVEY, 2008

WILLIAMSON, D. A.; MILLS, G.; JOHNSON, J. R.; PORTER, S.; WILES, S. In vivo correlates of molecularly inferred virulence among extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) in the wax moth *Galleria mellonella* model system. **Virulence**, v. 5, p. 388-393, 2014.

WINDELS, E.M., MICHIELS, J.E., FAUVART, M., WENSELEERS, T., BERGH, B. V., MICHIELS, J. Bacterial persistence promotes the evolution of antibiotic resistance by increasing survival and mutation rates. **ISME J** 13, 1239–1251 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0344-9>

WU, N.; CUI, P.; WANG, W.; YUAN, Y.; LIU, S.; XU, T.; ZHANG, S.; WU, J.; ZHANG, W.; ZHANG, Y. Ranking of persister genes in the same *Escherichia coli* genetic background demonstrates varying importance of individual persister genes in tolerance to different antibiotics. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1-10.

YAMAGUCHI, Y., INOUE, M. Regulation of growth and death in *Escherichia coli* by toxin-antitoxin systems. *Nat Rev Microbiol.* 2011 Sep 19;9(11):779-90. doi: 10.1038/nrmicro2651. PMID: 21927020.

YANG, Q. E., WALSH TR. Toxin-antitoxin systems and their role in disseminating and maintaining antimicrobial resistance. **FEMS Microbiol Rev.** 2017 May 1;41(3):343-353. doi: 10.1093/femsre/fux006. PMID: 28449040; PMCID: PMC5812544.