



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Angélica Dimas de Carvalho

Influência dos íons metálicos no perfil aos antimicrobianos e na formação de biofilmes em cepas de *Escherichia coli* Uropatogênica (UPEC), *Escherichia coli* Enteroagregativa (EAEC) e *Escherichia coli* K-12

Rio de Janeiro

2018

Angélica Dimas de Carvalho

Influência dos íons metálicos no perfil aos antimicrobianos e na formação de biofilmes em cepas de *Escherichia coli* Uropatogênica(UPEC), *Escherichia coli* enteroagregativa(EAEC) e *Escherichia coli* K-12

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Ana Cláudia de Paula Rosa Ignácio

Rio de Janeiro

2018

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

C331 Carvalho, Angélica Dimas de.

Influência dos íons metálicos no perfil aos antimicrobianos e na formação de biofilmes em cepas de *Escherichia coli* Uropatogênica (UPEC), *Escherichia coli* Enteroagregativa (EAEC) e *Escherichia coli* K-12 / Angélica Dimas de Carvalho – 2018.

84 f.

Orientadora: Ana Cláudia de Paula Rosa Ignácio.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense.

1. *Escherichia coli* - Teses. 2. Íons metálicos – Teses. 3. Resistência a antimicrobianos. 4. Biofilmes – Teses. 5. Espécies Reativas de Oxigênio. I. Ignácio, Ana Cláudia de Paula. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 579.842.11

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB/7 - 6382

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Angélica Dimas de Carvalho

Influência dos íons metálicos no perfil aos antimicrobianos e na formação de biofilmes em cepas de *Escherichia coli* Uropatogênica (UPEC), *Escherichia coli* enteroagregativa(EAEC) e *Escherichia coli* K-12

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 2 de outubro de 2018.

Banca Examinadora:

Prof^a. Dra. Ana Cláudia de Paula Rosa Ignácio

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof. Dr. Flávio José da Silva Dantas

Instituto de Biologia Alberto Alcântara Gomes– UERJ

Prof. Dr. Alexandre Ribeiro Bello

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Rio de Janeiro

2018

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que me apoiaram nessa caminhada e que sempre estiveram ao meu lado para me dar forças e seguir em frente na conclusão dessa jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado forças e ter permitido que eu chegasse até aqui não olhando para as dificuldades.

Ao meu querido amigo e companheiro Éber Ary Nascimento Dias por incentivar meus estudos, pelo apoio e por estar ao meu lado em todos os momentos.

A minha filha Antônia Dias pela paciência e compreensão.

Aos meus pais Laerte de Carvalho e Maria das Graças Dimas Carvalho por todo o carinho e compreensão.

Aos meus queridos irmãos que me apoiaram desde o começo.

A professora Ana Cláudia de Paula Rosa Ignácio por ter me orientado e apoiado.

À professora Lídia Maria Buarque de Oliveira Asad (in memorium) pela orientação.

A Ana Carolina do laboratório 1 de Microbiologia e Imunologia da UERJ por toda a paciência, carinho, apoio, por ter sido uma grande amiga nos momentos difíceis e por sempre estar ao meu lado.

Ao meu amigo Paulo que me estendeu a mão quando precisei e não mediu esforços para me ajudar.

Aos meus colegas do mestrado pelo apoio e amizade.

Agradeço a minha amiga Tamiris Vieira pelo carinho, incentivo e apoio.

A todos os que me incentivaram e estiveram comigo desde o começo dessa jornada.

Agradeço aos técnicos que disponibilizaram material quando precisei.

Sou grata a todos que viram o meu esforço e não desistiram de me ajudar.

O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo.
Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.

José de Alencar

RESUMO

CARVALHO, Angélica Dimas. *Influência dos íons metálicos no perfil aos antimicrobianos e na formação de biofilmes em cepas de Escherichia coli Uropatogênica (UPEC), Escherichia coli enteroagregativa (EAEC) e Escherichia coli K-12*. 2018. 84f. Dissertação (Mestrado em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense) –Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Os íons metálicos, ferro e cobre são essenciais para todas as células, pois eles cumprem funções celulares indispensáveis para manutenção da vida, atuando como cofatores enzimáticos, elementos da estrutura da membrana celular do DNA e de enzimas. Não obstante, em concentrações elevadas, os íons ferro e cobre podem levar a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), atuando principalmente na peroxidação de lipídeos de membrana e no bloqueio da ação de enzimas fundamentais para o metabolismo celular. A produção de ERO é um dos mecanismos pelos quais os metais podem interferir na sobrevivência e virulência de espécies bacterianas. Estudos têm mostrado que os íons metálicos podem interferir na formação de biofilmes além de causar mudanças no perfil de resistência bacteriana a diferentes classes de antimicrobianos. A utilização de metais como agentes antimicrobianos é uma prática utilizada desde a antiguidade. Entretanto poucos estudos abordam a influência desses íons metálicos na formação de biofilme e no perfil de resistência. No presente estudo utilizamos os íons ferro e cobre nas concentrações de 100µM e 200µM (para os dois íons) para avaliar a resposta da produção de biofilme em *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC), *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC) e *Escherichia coli* K-12 (selvagem e mutantes deficientes em enzimas de reparo do DNA) frente a esses íons metálicos. Para isso utilizamos os testes de formação de biofilme qualitativo e quantitativo, o teste de viabilidade em biofilme e o teste de toxicidade. No teste de formação de biofilme quantitativo, para EAEC 042 houve redução significativa do biofilme na presença de ferro e de cobre nas concentrações de 100 µM e 200 µM, respectivamente. Para EAEC I49/3 houve aumento da produção de biofilme na presença de ferro na concentração de 200µM e nas concentrações de 100µM e 200µM de cobre. Já no grupo das UPEC houve aumento expressivo de biofilme para a cepa 7104 na concentração de 100 µM e 200µM de cobre. A cepa 666 teve um aumento de biofilme nas concentrações de 200µM de íon ferro e 100 µM e 200µM de cobre. Dentre as cepas de *E. coli* K-12, foi observado aumento de biofilme para a cepa selvagem AB1157 nas concentrações de 100µM e 200µM de cobre. No teste qualitativo, a cepa selvagem de *E. coli* K-12 (AB1157) apresentou filamento quando tratada com 100 µM de cobre e o mutante BW9091 na concentração de 100 µM de ferro. No teste de viabilidade 100% da cepa BW 528 (duplo mutante nfo- e nth-) morreram quando tratada com cobre. No teste de resistência a antibiótica cepa de UPEC 7104 apresentou mudança no perfil de sensível para resistente quando tratada com o antibiótico ciprofloxacino junto aos íons ferro e cobre. A cepa 9260 apresentou mudança no perfil de resistência para sensível quando tratada com cefuroxime, cefoxitina, cefotaxime, ceftazidime e ciprofloxacino, porém quando tratada com trimetoprima e trimetoprima/sulfametoxazol apresentou mudança no perfil de sensível para resistente junto aos dois íons metálicos. Os resultados obtidos até o presente momento evidenciaram que os íons metálicos interferem com a produção de biofilme em bactérias patogênicas, modulando a virulência desses microrganismos. Os íons cobre e ferro apresentam-se como uma possível estratégia de controle microbiano, uma vez que modulam o perfil de resistência aos antimicrobianos nesses microrganismos estudados.

Palavras-chave: *Escherichia coli*. Íons metálicos. Biofilme. Espécies Reativas de Oxigênio (ERO). Resistência aos antimicrobianos.

ABSTRACT

CARVALHO, Angélica Dimas. *Influence of metallic ions on the profile to antimicrobials and on the formation of biofilms in strains of Uropathogenic Escherichia coli (UPEC), Escherichia coli Enteroagregativa (EAEC) and Escherichia coli K-12*. 2018. 84f. Dissertação (Mestrado em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense), Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Metallic ions, iron and copper are essential for all cells, as they fulfill cellular functions essential for life maintenance, acting as enzymatic cofactors, elements of the cellular membrane structure of DNA and enzymes. However, in high concentrations iron and copper ions may lead to the formation of reactive oxygen species (ROS), acting mainly on membrane lipid peroxidation and blocking the action of enzymes that are fundamental for cellular metabolism. ERO production is one of the mechanisms by which metals can interfere with the survival and virulence of bacterial species. Studies have shown that metal ions can interfere in the formation of biofilms and cause changes in the bacterial resistance profile to different classes of antimicrobials. The use of metals as antimicrobial agents is a practice used since antiquity. However, few studies address the influence of these metal ions on biofilm formation and resistance profile. In the present study we used iron and copper ions at concentrations of 100 μ M and 200 μ M (for both ions) to evaluate the biofilm production response in enteroaggregating *Escherichia coli* (EAEC), uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) and *Escherichia coli* K-12 (wild and mutant deficient in DNA repair enzymes) against these metal ions. For this, we used the qualitative and semiquantitative biofilm formation tests, the biofilm viability test and the toxicity test. In the quantitative biofilm formation test, for EAEC 042 there was a significant reduction of the biofilm in the presence of iron and copper in the concentrations of 100 μ M and 200 μ M, respectively. For EAEC I49/3 there was an increase in biofilm production in the presence of iron in the concentration of 200 μ M and in the concentrations of 100 μ M and 200 μ M of copper. In the UPEC group there was an expressive increase of biofilm for the 7104 strain in the concentration of 100 μ M and 200 μ M of copper. The 666 strain had a biofilm increase in the concentrations of 200 μ M iron ion and 100 μ M and 200 μ M copper. Among the strains of *E. coli* K-12, biofilm increase was observed for wild strain AB1157 at concentrations of 100 μ M and 200 μ M of copper. In the qualitative test, wild-type strain *E. coli* K-12 (AB1157) presented filament when treated with 100 μ M of copper and the mutant BW9091 at the concentration of 100 μ M of iron. In the viability test 100% of strain BW 528 (double mutant nfo- and nth-) died when treated with copper. In the antibiotic resistance test the strain of UPEC 7104 showed a change in the profile of sensitive to resistant when treated with ciprofloxacin iron and copper ions. The strain 9260 showed a change in the resistance profile for sensitive when treated with cefuroxime, ceftazidime, cefotaxime, ceftazidime and ciprofloxacin. However, when treated with trimethoprim and trimethoprim / sulfamethoxazole, it presented a change in the profile of sensitive to resistant metal ions. The results obtained up to the present moment showed that the metal ions interfere with the biofilm production in pathogenic bacteria, modulating the virulence of these microorganisms. Copper and iron ions present as a possible microbial control strategy, since they modulate the profile of antimicrobial resistance in these microorganisms studied. Copper and iron ions represents a possible microbial control strategy, since they modulate the profile of antimicrobial resistance in these *E. coli* studied.

Keywords: *Escherichia coli*. Metal ions. Biofilm. Reactive Oxygen Species (ROS).

Antimicrobial resistance

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Patogênese da UPEC através de múltiplos microambientes.....	16
Figura 2 -	Estágios da patogênese de EAEC.....	18
Figura 3 -	Representação da estrutura do biofilme.....	20
Figura 4 -	Mecanismo de resistência em bactérias Gram-negativas e os antibióticos afetados.....	21
Figura 5 -	Esquema do mecanismo de ação do sideróforo.....	24
Figura 6 -	Adaptar e resistir: como os microrganismos lidam com a toxicidade dos metais.....	25
Figura 7 -	Reação de Fenton e Haber-Weiss.....	26
Figura 8 -	Ativação de OxyR pela ativação do H ₂ O ₂	28
Figura 9 -	Resposta SOS.....	30
Figura 10 -	Mecanismo de ação de BER.....	32
Figura 11 -	Formação de biofilme para a <i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa.....	41
Figura 12 -	Formação de biofilme para a <i>Escherichia coli</i> Uropatogênica.....	42
Figura 13 -	Formação de biofilme para a <i>Escherichia coli</i> k-12.....	43
Figura 14 -	Formação de biofilme em vidro pela EAEC 042 após 18 horas de incubação à 37 ⁰ C.....	45
Figura 15 -	Formação de biofilme em vidro pela H9/3 após 18 horas de incubação à 37 ⁰ C.....	46
Figura 16 -	Formação de biofilme em vidro pela H92/3 após 18 horas de incubação à 37 ⁰ C.....	47
Figura 17 -	Formação de biofilme em vidro pela EAEC I49/3 após 18 horas de incubação à 37 ⁰ C.....	48
Figura 18 -	Formação de biofilme em vidro pela UPEC I64 após 18 horas de incubação à 37 ⁰ C.....	49
Figura 19 -	Formação de biofilme em vidro pela UPEC 9260 após 18 horas de incubação à 37 ⁰ C.....	50
Figura 20 -	Formação de biofilme em vidro pela UPEC 7104 após 18 horas de incubação à 37 ⁰ C.....	51
Figura 21 -	Formação de biofilme em vidro pela UPEC 666 após 18 horas de incubação à 37 ⁰ C.....	52

Figura 22 -	Formação de biofilme em vidro pela <i>E.coli</i> k-12 AB1157 após 18 horas de incubação à 37 ⁰ C.....	53
Figura 23 -	Formação de biofilme em vidro pela <i>E. coli</i> k-12 BW9091 após 18 horas de incubação à 37 ⁰ C.....	54
Figura 24 -	Formação de biofilme em vidro pela <i>E. coli</i> k-12 BW528 após 18 horas de incubação à 37 ⁰ C.....	55
Figura 25 -	Formação de biofilme em vidro pela <i>E.coli</i> k-12 BW535 após 18 horas de incubação à 37 ⁰ C.....	56
Figura 26 -	Micrografia confocal de varredura a laser ilustrando a viabilidade do biofilme formado em vidro por <i>E. coli</i> K-12 na presença de ferro após 18 horas de incubação a 37 ⁰ C em DMEM.....	58
Figura 27 -	Micrografia confocal de varredura a laser ilustrando a viabilidade do biofilme formado em vidro por <i>E. coli</i> K-12 na presença de cobre após 18 horas de incubação a 37 ⁰ C em DMEM.....	59

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Cepas utilizadas nesse estudo.....	36
Quadro 2 -	Viabilidade do biofilme.....	57
Quadro 3 -	Resultados dos testes qualitativo e quantitativo das cepas de EAEC.....	60
Quadro 4 -	Resultados dos testes qualitativo e quantitativo das cepas de UPEC.....	61
Quadro 5 -	Resultados dos testes qualitativo e quantitativo das cepas de <i>E. coli</i> k-12.....	62
Quadro 6 -	Resultado do teste de susceptibilidade a diferentes antibióticos.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag43	Antígeno 43
ATP	Adenosina trifosfato
Ahp	Alquilhidroperóxido redutase
AP	Apurínicos ou apirimidínicos
BER	Reparo por excisão de bases
CuCL ₂	Cloreto de cobre
°C	Grau Celsius
Cys	Cisteína
CV	Cristal violeta
DNA	Ácido desoxirribonucleico
D-MEM	“Eagle’s Minimal Medium”
DO	Densidade óptica
dRPASE	Desoxirribose fosfodiesterase
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EPEC	Escherichia coli enteroagregativa
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FeCL ₃	Cloreto de ferro
Fe ²⁺	Ferro ferroso
Fe ³⁺	Ferro férrico
Fe-S	Ferro-enxofre
Fur	Ferric uptake regulator
gorA	Glutathione redutase
grxA	Glutarredoxina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HPI	Hidroperoxidase
KDa	kilodalton
LB	Lúria Bertani
μL	Microlitro
μM	Micromolar
MC	Mac Faland

MH	Mueller Hinton
mL	Mililitro
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NO●	Óxido Nítrico
O ₂	Oxigênio
O ₂ ●	Ânion superóxido
OH ⁻	Hidróxido
OH●	Radical hidroxil
PSB	Solução salina tamponada
SH	Ligações dissulfeto
SOD	Superóxido dismutase
TSA	Agar triptona soja
TSB	Caldo triptona soja
Ybt	yersinabactina
ZnSO ₄	Sulfato de zinco

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	15
1	OBJETIVOS.....	34
1.1	Objetivo geral.....	34
1.2	Objetivo específicos.....	35
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
2.1	Meios, Reagentes e Soluções.....	35
2.2	Cepas bacterianas e condições de conservação.....	35
2.2.1	<u>Cepas empregadas nesse estudo.....</u>	35
2.2.2	<u>Conservação das cepas bacterianas.....</u>	35
2.3	Preparo dos cultivos bacterianos.....	36
2.3.1	<u>Cultivo Simples.....</u>	36
2.4	Teste de Biofilme Qualitativo.....	37
2.5	Teste de Biofilme Quantitativo.....	37
2.6	Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos (TSA).....	38
2.7	A viabilidade das bactérias nos biofilmes de cepas <i>Escherichia coli</i> k-12 formadas na presença de íons metálicos.....	38
2.8	Análise estatística.....	39
3	RESULTADOS.....	40
3.1	Teste de Biofilme Quantitativo.....	40
3.2	Teste de Biofilme Qualitativo.....	43
3.3	A viabilidade das bactérias nos biofilmes da <i>E. coli</i> k-12 formado na presença dos íons metálicos com Kit Film Tracer LIVE/DEAD.....	57
3.4	Teste de sensibilidade a antibióticos.....	63
4	DISCUSSÃO.....	65

CONCLUSÕES.....	72
REFERÊNCIAS.....	73

INTRODUÇÃO

Theodor Escherich a partir de uma amostra de fezes humanas isolou pela primeira vez em 1885 a *Bacterium coli comune*, que corresponde a um bacilo gram negativo pertencente à família Enterobacteriaceae. Sendo essa, a principal bactéria anaeróbica facultativa que coloniza o trato gastrointestinal (Kaper et al., 2004). Posteriormente denominada de *Escherichia coli*. Essa espécie coexiste no hospedeiro humano e desempenha um importante papel na manutenção da fisiologia intestinal (Kaper et al., 2004).

A *Escherichia coli* é uma das bactérias mais abundantes no intestino de humanos e de mamíferos. No cólon humano mantém uma densidade microbiana de aproximadamente 10^{12} organismos por grama de fezes, representando um ecossistema perfeitamente equilibrado (Hooper & Gordon, 2001). Em ambiente líquido elas são geralmente dotadas de motilidade por meio de flagelo e também possuem fímbrias (Sousa, 2006). Embora a maioria das *E. coli* que habitam o intestino sejam comensais, certas cepas são patogênicas (Nataro and Kaper, 1998).

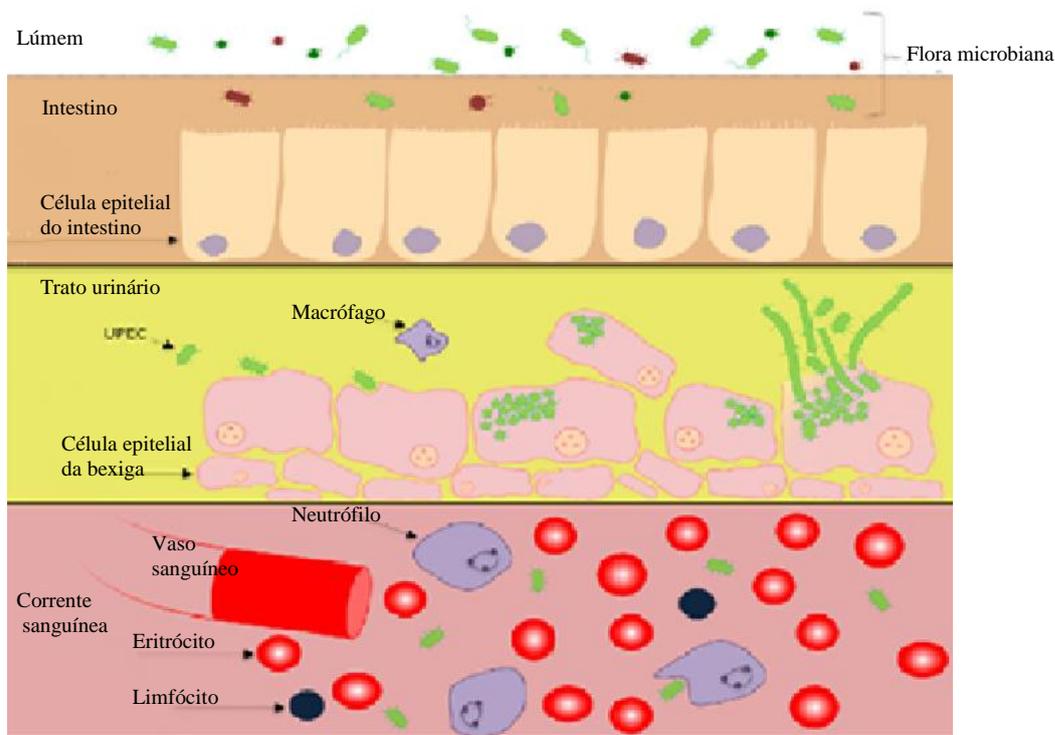
As cepas *E. coli* patogênicas e as comensais possuem estratégias que contribuem para que a bactéria aumente sua capacidade de colonizar o hospedeiro. Para as cepas patogênicas a infecção pela expressão de fatores de virulência incluem adesinas, toxinas, sistema de captação de ferro, sistema de secreção e capacidade de formar biofilmes (Moon et al., 2005; Maroncle et al., 2005; Parsot, 2005 e Hennequin and Forestier, 2007). As cepas de *E. coli* patogênicas podem ser classificadas em dois grupos: *E. coli* diarreio gênica (DEC) e *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC) (Rojas-Lopez et al, 2018).

A ExPEC, tem a capacidade de se disseminar e habitar outros locais levando a problemas de saúde, pois elas carregam fatores de virulência (Johnson et al., 2005). Dentre as ExPEC, a *E. coli* uropatogênica (UPEC) tem sido apontada como a causa mais frequente de infecções urinárias, principalmente em mulheres, 95% dessas infecções se desenvolvem em rota ascendente, ou seja, a maior parte dos uropatógenos são originários da flora retal que ascende até a bexiga, após colonizar a região periuretral e a uretra (Terlizzi et al., 2018).

Além da bexiga, UPEC tem a habilidade de colonizar outros ambientes no hospedeiro como os rins, com possibilidade de disseminação na corrente sanguínea causando urosepsis fatal (Figura 1) (Flores Mireles et al., 2012). UPEC expressa uma variedade de proteínas em sua superfície que participam da agressão ao hospedeiro (Terlizzi et al., 2018).

A ativação das proteínas da família Rho, tal como RhoA, Cdc42 e Rac1 resulta no rearranjo da membrana da célula do hospedeiro envolvendo a bactéria na vesícula endocítica (Martinez et al., 2000). Como consequência do processo de invasão, a bactéria é protegida da resposta imune inata. Ao se multiplicar dentro da célula do hospedeiro a bactéria desenvolve motilidade e filamentos levando a ruptura celular, promovendo assim a disseminação, adesão e colonização em outras células da superfície do hospedeiro (Justice et al., 2006b; Andersen et al., 2012). UPEC cresce como um denso grupo de bactérias revestida por matriz rica em polissacarídeo (Mann et al., 2017).

Figura 1- Patogênese da UPEC através de múltiplos microambientes



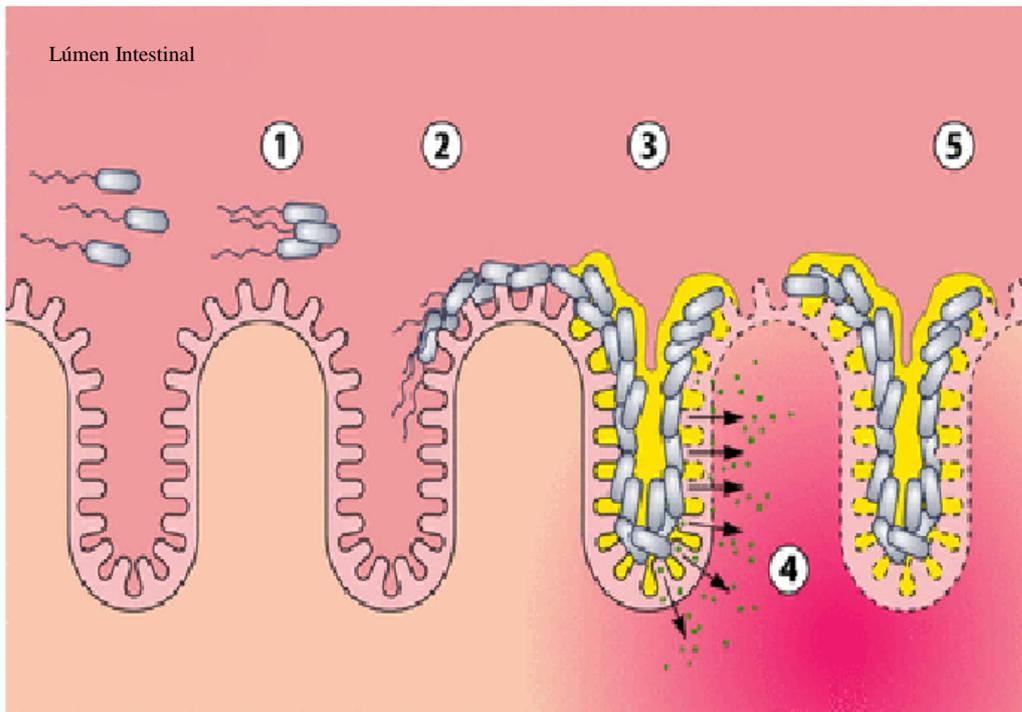
Legenda: *E. coli* uropatogênica (UPEC) cresce como comensal no intestino humano como parte do microbioma. Dentro deste ambiente, a UPEC interage com as células epiteliais intestinais em uma relação simbiótica, no entanto, há competição por nutrientes entre outros microorganismos. A UPEC também adaptou a capacidade de causar infecções do trato urinário e urosepsis através da transição para um ciclo de vida patogênico no trato urinário e na circulação sanguínea. No trato urinário, a UPEC expressa fatores de virulência (adesinas e flagelos) que facilitam a ligação às células epiteliais da bexiga. A invasão e replicação nas células do epitélio formam as IBCs (comunidade bacteriana intracelular) e uma subpopulação sofre alongamento celular (filamentação). Eventualmente, a célula epitelial contendo numerosas UPEC se rompe e libera bactérias alongadas e móveis que podem infectar as células adjacentes no epitélio do hospedeiro dando início a um novo ciclo infeccioso.

Fonte: (Mann et al., 2017)

Adaptado e modificado pela autora, 2018.

Dentre as *E. coli* diarreio gênicas (DEC) *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) é um enteropatógeno emergente devido ao seu crescente envolvimento com doença diarreica aguda e persistente principalmente em crianças menores de 5 anos de idade (Huang et al., 2004; Black et al., 2010). EAEC foi descrita pela primeira vez em 1983 por Nataro et al., durante estudos de adesão em monocamadas de células Hep-2 em cultura. Entretanto, a primeira associação de EAEC com doença diarreica foi publicado em 1987 como parte de um estudo de diarreia infantil no Chile (Nataro et al., 1987). Contudo novos estudos tem mostrado que EAEC está associada a diarreia aguda em adultos com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Durrer et al., 2000). Quadros clínicos de diarreia dos viajantes também foram relacionados a EAEC, onde indivíduos susceptíveis ou imunodeprimidos adquirem a síndrome diarreica pela ingestão de alimentos e água contaminados, nos países em desenvolvimento (Huang and Dupont, 2004, 2006). As EAEC são caracterizadas pelo padrão de aderência agregativa (AA) semelhante a “tijolos empilhados” (Nataro et al., 1988). Estudos da patogênese sugerem três estágios da infecção: (i) aderência à mucosa intestinal em virtude das fímbrias de aderências agregativa (AAFs) (ii) produção de muco, formando biofilme na superfície da mucosa (iii) liberação de toxinas, esfoliação celular e indução de inflamação da mucosa (figura 2) (Hicks et al., 1996; Steiner et al., 1998, 2000; Bouckenooghe et al., 2000; Harrington et al., 2005).

Figura 1 - Estágios da patogênese de EAEC



Legenda: Estágios da patogênese da EAEC. Números em círculos mostram a progressão da patogênese da EAEC. (1) Aglutinação de bactérias EAEC planctônicas. (2) Adesão ao epitélio intestinal e colonização do intestino. (3) Formação de biofilme. (4) Liberação de toxinas bacterianas, induzindo danos ao epitélio e aumento da secreção. (5) Estabelecimento de biofilme adicional.

Fonte: Jensen, 2014.

Em EAEC vários fatores de virulência tem sido identificados incluindo citotoxinas e enterotoxinas, entretanto o regulon AggR é o principal fator de virulência desta bactéria, pois ela controla a expressão de fatores de aderência (Nataro, 2005 & Morin et al., 2013). Dentre os fatores de aderência está a fimbria (Nataro et al., 1992). Há quatro tipos de fimbria regulados por AggR, dentre os quais podemos citar o *aggA* (AAF/I), *aafA* (AAF/II), *agg3A* (AAF/III) e *agg4A* (AAF/IV) no plasmídeo pAA. Além do fenótipo agregativo, essas fímbrias também estão envolvidas no processo de hemaglutinação em eritrócitos humanos (Nataro et al., 1992; Boisen et al., 2008; Huttner et al., 2018).

Além dos genes de virulência citados, o AggR também regula os genes *aatA*, responsável por transportar a proteína dispersina para fora da membrana de EAEC, *aap* responsável pela dispersão de EAEC através da mucosa intestinal. AggR também regula a toxina Pet, uma proteína auto-transportadora que funciona como uma enterotoxina, a citotoxina termolábil e a toxina SigA, homólogo a protease IgA (Nishi et al., 2003; Sheik et al., 2002; Nataro et al., 1992; Czczulin et al., 1997; Navarro-Garcia et al., 1998; Rajakumar et al., 1997; Huttner et al., 2018).

Dentre outros genes e fatores de virulência estão a proteína Pic a qual é capaz de causar hemoaglutinação de eritrócitos, Sat que secreta toxina autotransportadora, EAST-1, que codifica a toxina enteroagregativa estável ao calor (EAST-1) a qual tem similariedade química e mecânica da *E. coli* enterotoxigênica STa, Irp2, que codifica o sistema de captação de ferro mediado pelo sideróforo yersiniabactina o qual tem papel no transporte e regulação de ferro (Henderson et al., 1999^a; Guyer et al., 2000; Savarino et al., 1993; Schubert et al., 1998).

Os fatores de virulência de EAEC, incluindo *aggA*, *aggR*, *aafA* e *aap*, estão associados com aumento de citocinas fecais e marcadores inflamatórios. O efeito inflamatório foi ligado a expressão de uma nova proteína flagelina de EAEC a qual induz IL-8 das células epiteliais do intestino (Donnelly and Steiner, 2002; Okhuysen and Dupont, 2010). Okhuysen and Dupont (2010) demonstraram em seus estudos que a flagelina foi o principal fator pró-inflamatório da EAEC nas células epiteliais intestinais em cultura.

O biofilme é um dos fatores de virulência muito utilizado pelas bactérias ele é formado por uma comunidade de microrganismos aderidos a uma superfície, envoltos por uma matriz polissacarídica (Huttner et al, 2018). Na sua composição são encontradas fímbrias, adesinas, proteínas de superfícies não-fimbriais, exopolissacarídeos e DNA extracelular que ajudam a *E.coli* a se fixar em superfícies (Romling et al.,2014). Uma comunicação química entre as células é efetuada através de moléculas sinalizadoras extracelulares chamadas de autoindutores que permite às bactérias coordenarem sua atividade e se agrupar em comunidades que se assemelham ao funcionamento de organismos multicelulares. Portanto, os biofilmes não são somente camadas limosas bacterianas, mas sistemas biológicos onde as bactérias são organizadas em uma comunidade funcional coordenada (Huttner et al, 2018).

Dentro do biofilme as bactérias são capazes de compartilhar nutrientes e são protegidas da ação de fatores danosos do ambiente, como a ação de antibióticos, a ação de agentes oxidantes e o sistema imune do hospedeiro. As bactérias possuem um mecanismo chamado de quorum-sensing. Esse sinal indutor permite que ocorra a interação célula-célula. Dentro do biofilme as bactérias utilizam desse sinal o qual permite que elas se comportem de forma coordenada em relação ao ambiente, a expressão de genes em resposta a densidade populacional, intervenção de processos fisiológicos como fluxo de nutrientes, diferenciação celular e fatores de virulência entre microrganismos (Bai and Rai, 2011).

Geralmente, um biofilme começa a se formar quando uma bactéria livre no líquido de cultivo (planctônica) se fixa em uma superfície. Essa comunidade cresce e se torna cada vez

maior e mais complexa, formando estruturas em forma de pilares com canais entre eles através dos quais a água pode circular transportando diversas moléculas, nutrientes e retirando resíduos (Magana et al, 2018). Grupos de microrganismos envoltos de matriz eventualmente deixam o biofilme e se movem para um novo local. (Figura 3).

Figura 2 - Representação da estrutura do biofilme



Legenda: As correntes de água se movem, como mostrado pela seta azul, entre os pilares de limo formados pelo crescimento das bactérias aderidas nas superfícies sólidas. Isso permite um acesso eficiente dos nutrientes e uma remoção dos produtos residuais. Bactérias individuais formadoras de limo ou agregados de limo se desprendem e migram para um novo local.

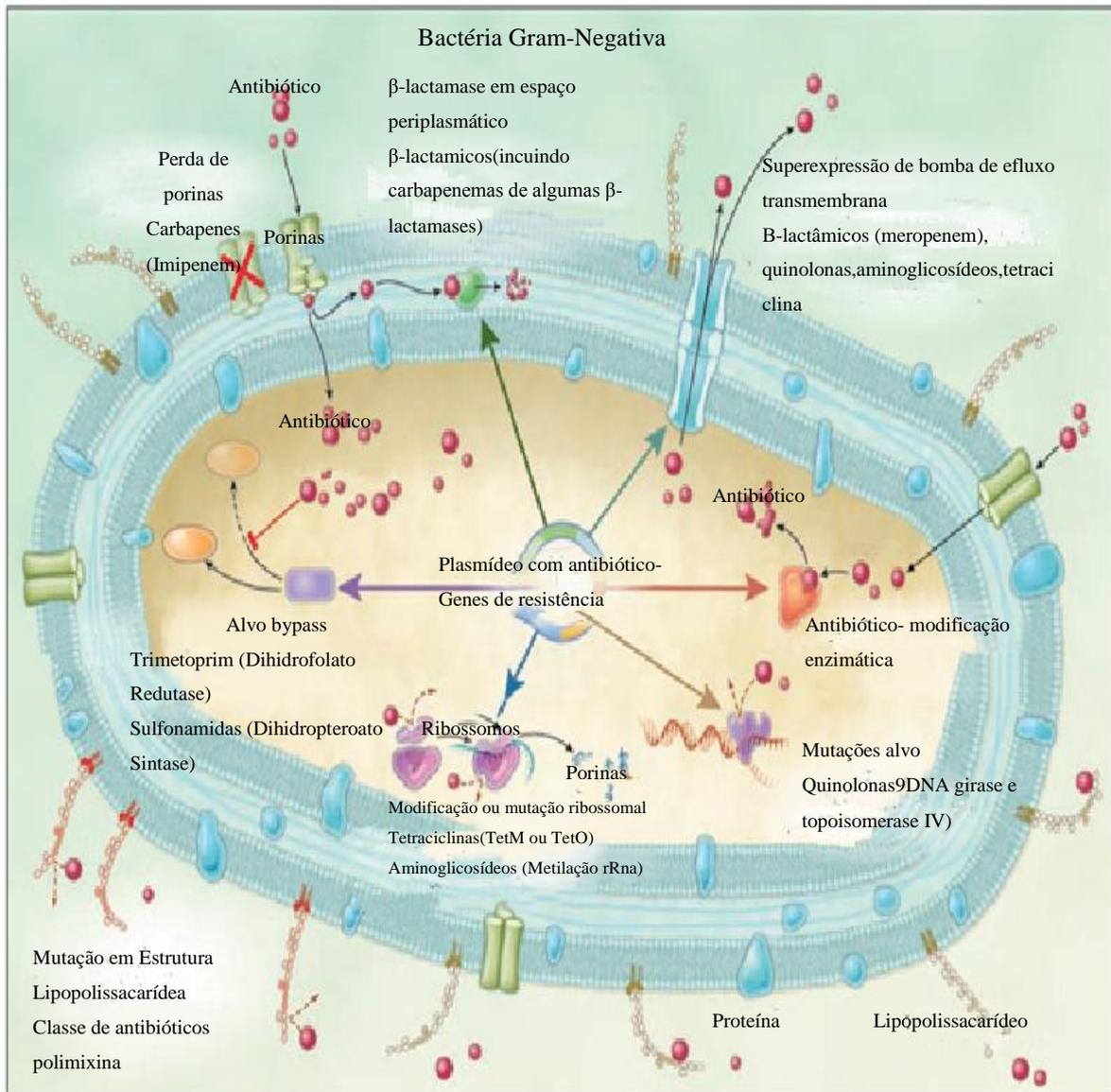
Fonte: Tortora, 2012.

Bactérias gram-negativas, como *E.coli* formam biofilmes em condições onde existe abundância de nutrientes, porém quando ocorre a diminuição desses nutrientes elas tendem a se dispersar (Wu and Outten, 2008; Magana et al, 2018). Um biofilme maduro pode tolerar elevadas concentrações de antibióticos, estima-se que de 10-1000 vezes o que é requerido para matar a bactéria de vida livre. Bactérias em biofilmes são mais resistentes à fagocitose dificultando a resposta imune do hospedeiro e se tornando, portanto fonte de muitas infecções (Davis, 2003; Potrykus and Wegrzyn, 2004).

Algumas bactérias gram-negativas possuem mecanismos de resistência mediados por plasmídeos, dos quais incluem perda de porinas fazendo com que o movimento do fármaco através da membrana celular seja reduzido, presença de β -lactamases no espaço periplasmático o qual degrada β -lactama, bombas de efluxo que expelle a droga antes que ela faça efeito, enzimas que modificam o antibiótico impedindo-o de interagir com o alvo, mutação do local alvo impedindo o antibiótico de se ligar, desvio metabólico que utiliza

enzima alternativa resistente para contornar o efeito inibitório do antibiótico, mutação do lipopolissacarídeo impedindo que a polimixina seja incapaz de se ligar ao alvo e modificações ribossômicas que impede o antibiótico de se ligar e inibir a síntese protéica. (Peleg et al., 2010). (figura 4)

Figura 4 -Mecanismos de Resistência em Bactérias Gram-Negativas e os Antibióticos Afetados



Fonte: Peleg et al., 2010.
Modificado e adaptado pela autora.

Para a *E.coli* o ácido colânico é o principal polissacarídeo extracelular relacionado ao desenvolvimento de biofilme e sua síntese é um processo que envolve cerca de 20 genes diferentes (Potrykus and Wegrzyn, 2004). Também estão envolvidos na formação de biofilme

a celulose que é um polissacarídeo extracelular, o antígeno 43 (Ag43), o qual é produto do gene flu (também chamado de agn), fimbrias do tipo I e fimbria curli em *E.coli* (Hasman et al.,1999; Danese et al., 2000).

Para sobreviver, as bactérias desenvolveram mecanismos de resistência a antibióticos e essa resistência é um problema de saúde pública mundial (Demain, 2009; Sanchez,2009;Yu et al, 2017). O aumento da resistência aos antimicrobianos coloca em risco a eficácia do tratamento de muitas infecções (Enne et al., 2006; Levy, 2001). Muitos microrganismos se tornam resistentes através de mutação cromossômica e outros através de transferência de DNA por conjugação, transdução ou transposição (Hall et al., 2002; Bradford, 2001; Skrnik et al., 2005). Entre os exemplos de mecanismos de resistência estão: a) a inativação enzimática da droga, b) alteração do sítio alvo da célula, c) bombas de efluxo que eliminam os antibióticos impedindo que alcancem uma concentração efetiva (Kumar S. and Varela M.F., 2013).

A resistência bacteriana pode ser específica para um antibiótico ou classes de antibióticos. Os genes contidos em plasmídeos ou transposons conferem elevados níveis de resistência a um antibiótico específico através da expressão de enzimas que inativam o antimicrobiano ou alteram o seu alvo na célula como as β -lactamases ou rRNA metilases (Koutsolioutsou et al, 2005).A resistência de um microrganismo a um determinado antibiótico pode ser classificada inicialmente como intrínseca, ou seja que faz parte das características naturais, fenotípicas do microrganismo transmitidas verticalmente, fazendo parte da herança genética bacteriana ou pode ser classificada como adquirida (Fiol and Groppo, 2000).

O papel dos íons metálicos em cepas patogênicas é amplamente estabelecido (Robbinson et al, 2018).Além disto, os íons metálicos podem cooperar no aumento da resistência bacteriana ao organismo hospedeiro aumentando a formação de biofilmes por estes. Isto ocorre porque alguns íons metálicos podem aumentar a produção de celulose que é um dos componentes da matriz polimérica em algumas espécies bacterianas. Este fenômeno é visto em *Pseudomonas aeruginosa*, quando tratada com altos níveis de ferro (50 mM) o que promove um aumento da celulose, fortalecendo a matriz polimérica. (Rowe et al., 2010).

Já no caso de *Escherichia coli* uropatogênica, quando o ferro é quelado ocorre o aumento da síntese de celulose, favorecendo a formação da matriz (Rowe et al., 2010). Além disto, o ferro, através da ativação de Fur, regula a expressão da fimbria do tipo 1 em *E.coli*, o

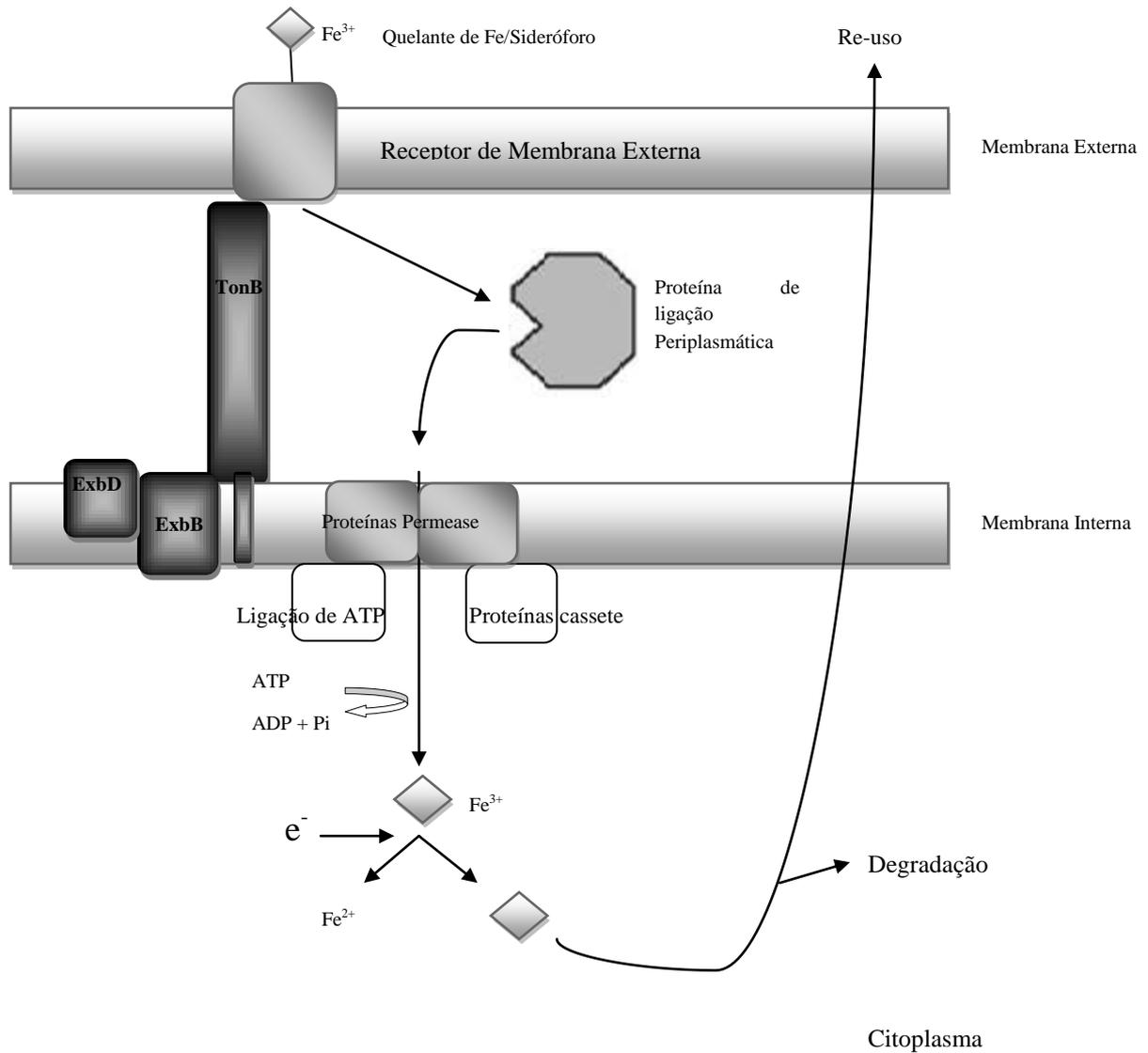
que interfere na aderência das bactérias na formação dos biofilmes (Wu and Outten, 2009; Terlizzi et al, 2018).

O ferro é essencial para todas as células (Yu e tal., 2017). No corpo humano o ferro é utilizado como componente dos citocromos, na cadeia de transporte de elétrons, como cofator enzimático e como parte da hemoglobina que transporta o oxigênio. No entanto, a concentração desses íons livre é baixa, sendo assim muitos patógenos desenvolveram moléculas e estratégias de captação de ferro, pois esse metal é essencial para sua sobrevivência. *E.coli* utiliza o ferro para a síntese de DNA, transporte de oxigênio, transporte de elétrons e metabolismo de peróxidos (Brito et al.,2004; Yu et al., 2017).

No hospedeiro o ferro encontra-se firmemente ligado a moléculas como lactoferrina, ferritina, transferrina e hemoglobina. Para captarem ferro livre, as bactérias secretam proteínas chamadas sideróforos (Tortora, 2012). Esses sideróforos são agentes quelantes de ferro com baixo peso molecular, que se ligam ao Fe^{3+} com mais afinidade do que a transferrina e a lactoferrina (Palmer and Sakaar, 2016). Nas bactérias Gram-negativas uma vez formado o complexo ferro-sideróforo este se liga aos receptores de sideróforos na superfície da membrana externa da bactéria em um processo dependente de energia. O sideróforo é internalizado através da hidrólise de ATP e o complexo ferro-sideróforo é separado. O sideróforo é então degradado ou reutilizado e o ferro é então absorvido e levado para dentro da célula bacteriana (Figura 5) (Koster, 2001; Andrews et al.,2003).

A importância do ferro na virulência bacteriana pode ser observada através dos estudos com a proteína metaloreguladora Fur que é codificada pelo gene *fur*. Esse gene se liga ao DNA e reprime a transcrição de múltiplos genes alvos envolvidos na homeostase do ferro. Em condições de limitação de ferro o fur se dissocia do DNA permitindo a transcrição de genes envolvidos no transporte de ferro (Wu and Outten,2008). Apesar de o ferro ser um nutriente essencial para uma variedade de bactérias ele pode afetar a formação de biofilmes. O ferro ferroso (Fe^{2+}) reage com o H_2O_2 na reação de Fenton para formar radical hidroxila que pode danificar proteínas, lipídios e o DNA (Barreiros et al. 2006; Liguori et al. 2018).

Figura 5 - Esquema do mecanismo de ação dos sideróforos



Legenda: Representação esquemática mediada por sideróforo na absorção de ferro em Gram-negativo.

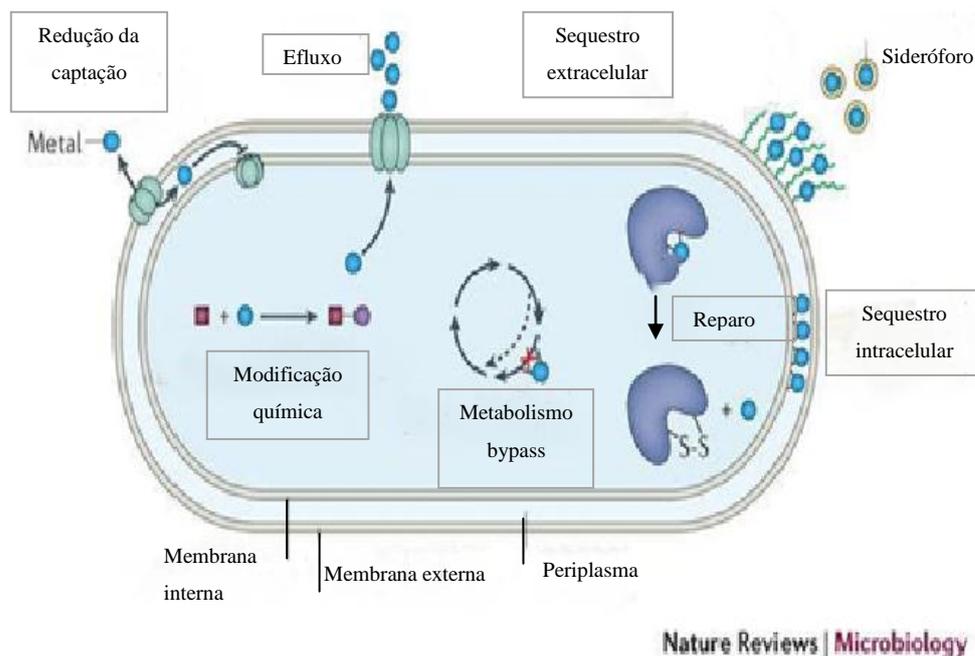
Fonte: Andrews, 2003.

Adaptado e modificado pela autora, 2018.

Certos metais cumprem funções celulares que não podem ser desempenhadas por moléculas orgânicas e esses metais são indispensáveis pela bioquímica da vida em todos os organismos. Como por exemplo, na estrutura da membrana celular e DNA, como componentes de metaloproteínas e servem de elementos estruturais para as enzimas. (Lemire et al, 2013).

Nas bactérias o cobre é utilizado como catalisador para reações de transferência eletrônica em algumas metaloenzimas envolvidas em reações de transferência de elétrons como citocromo-oxidase (Hodgkinson and Petris, 2012). Durante o processo infeccioso o organismo do hospedeiro produz proteínas que são capazes de quelar íons metálicos e desta forma limitar a disponibilidade desses metais a patógenos invasores. Além disso, a toxicidade dos metais como o cobre pode ser utilizado como mecanismo de defesa do hospedeiro para promover a morte bacteriana. Portanto, os íons metálicos são essenciais para a sobrevivência dos microrganismos, mas em elevadas concentrações podem ter efeitos deletérios. Por isso, as bactérias possuem tanto mecanismos de captação quanto sistemas de controle do aporte desses íons como as bombas de efluxo, proteínas utilizadas para eliminar o excesso de íons metálicos e proteínas transportadoras específicas que mantêm esses íons no espaço periplasmático (Figura 6) (Skaar, 2010; Porcheron, 2013; Poole, 2017).

Figura 6 - Adaptar e resistir: como os microrganismos lidam com a toxicidade dos metais



Nota: As bactérias possuem mecanismos de proteção contra os efeitos lesivos dos íons metálicos através da redução da captação, do sistema de efluxo, do sequestro extra e intracelular, do reparo, do metabolismo by-pass e da modificação química
 Fonte: Lemire et al., 2013.

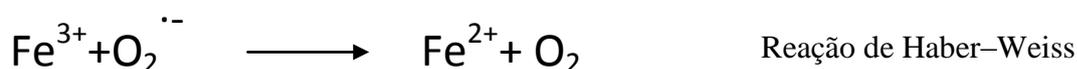
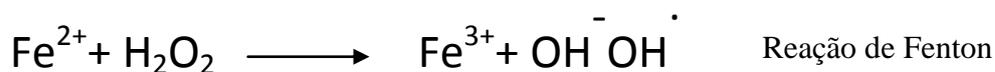
Os metais são essenciais em sistemas biológicos, contudo certos metais levam a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Troxelland Hassan, 2013). Em *E. coli* desregulação do metabolismo do ferro leva a danos ao DNA (Lemire, 2013). Além do íon ferro, o cobre pode participar da reação de Fenton gerando o radical hidroxil. *E. coli* possui no

espaço periplasmático uma enzima que garante a homeostase do íon cobre protegendo a célula do estresse oxidativo (Tree et al., 2005). Experimentos em cultura líquida mostraram que o cobre leva a geração de ERO ocorrendo em grande parte no periplasma de *E. coli* (Macomber et al., 2007).

Espécies reativas de oxigênio são agentes (ERO) oxidantes que atacam o DNA cromossômico e nucleotídeos livres causando danos oxidativos ao DNA e conseqüentemente levando a alterações genéticas (Sakai et al., 2006). O produto das ERO pode danificar lipídeos, DNA, proteínas, hidratos de carbono e alterar a estrutura e as funções do organismo (Czerska et al., 2015).

As ERO são moléculas geradas durante o processo de respiração celular na mitocôndria e aproximadamente 5% do oxigênio consumido passa por etapas de redução produzindo uma variedade de substâncias químicas altamente reativas, como ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxil (OH^{\cdot}) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Silva and Gonçalves, 2010). O radical hidroxil é considerada o mais reativo em sistemas biológicos, sendo capaz de causar mais danos do que as outras EROs. Ela é formada a partir de peróxido de hidrogênio em uma reação catalisada por ferro ferroso (Fe^{2+}) ou cobre, ou pela interação do peróxido de hidrogênio com o ânion superóxido denominado reação de Fenton e reação de Haber-Weiss (figura 7) (Andrade, 2010).

Figura 7 - Reação de Fenton e Haber-Weiss



Legenda: Esquema mostrando a formação de OH^{\cdot} (radical hidroxila).
Fonte: Lemire, 2013.

As EROs estão envolvidas no sistema imunológico agindo contra antígenos durante a fagocitose (Finaud, Lac and Filaire, 2006). Células fagocitárias como macrófagos e neutrófilos são ativadas sob condições oxidativas a fim de causar danos ao organismo invasor. Essa ativação é mediada pelo sistema NADPH oxidase que resulta no consumo de oxigênio e consequente produção de ânion superóxido (Hitchon and Gabalawy, 2004). Os macrófagos produzem ativamente grandes quantidades de $O_2^{\cdot -}$ e óxido nítrico (NO^{\cdot}) a fim de matar microrganismos patogênicos invasores (Robinson, 2009).

Como as células estão constantemente expostas a danos oxidativos vários mecanismos de defesa estão envolvidos na proteção do sistema celular. Estes incluem enzimas intracelulares que convertem os agentes oxidantes em espécies menos tóxicas evitando que diversas estruturas celulares sejam danificadas. Dentre estas enzimas podemos citar a superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação do ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), a catalase, que catalisa a decomposição do H_2O_2 formando H_2O e O_2 , glutathione peroxidase degrada o H_2O_2 através da glutathione reduzida (GSH) para formar glutathione oxidada (GSSG) que por sua vez é reduzida pela glutathione reductase (Hitchon, 2004, Wendel and Silva, 2013). Quando os níveis de EROs estão aumentos excedendo o limite de segurança, as bactérias tem a capacidade de montar uma resposta indutível, resultando em aumento da expressão de enzimas que reparam o dano oxidativo (Pomposiello and Demple, 2002).

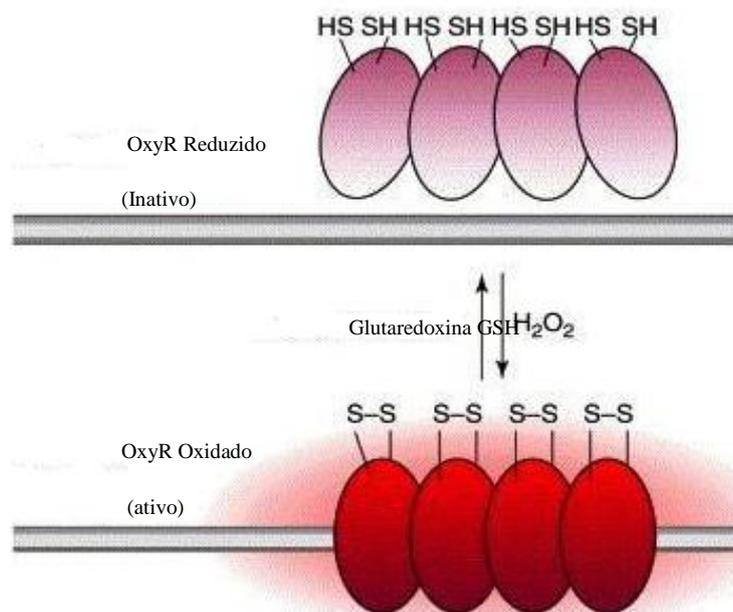
OxyR é um regulador da resposta ao estresse oxidativo (Knapp et al., 2008). A proteína OxyR regula positivamente o gene *flu* em resposta ao H_2O_2 (Andrews et al., 2003). O gene *oxyR* age como sensor de estresse oxidativo, atuando como um ativador da transcrição de um conjunto de genes envolvidos na defesa contra danos oxidativos. A ativação de OxyR envolve a formação de ligações dissulfeto entre resíduos de cisteínas Cys 199 e Cys 208 na presença de H_2O_2 levando a modificações nos monômeros de OxyR que são importantes para a ligação ao DNA (Zheng, 2000; Zaim and Kierzek, 2003).

Em resposta ao estresse oxidativo *E.coli* aumenta a expressão de mais de 20 genes, incluindo genes envolvidos na defesa antioxidante induzida por H_2O_2 . Dentre estes genes estão *katG* (codifica catalase HPI), *dps* (codifica a proteína Dps), *ahp* (alquilhidroperóxido redutase) protege a célula contra os peróxidos orgânicos, *sufA* (codifica proteína envolvida na biossíntese ferro-enxofre), *grxA* (codifica a glutaredoxina e forma um complexo com a enzima glutathione reductase auxiliando em sua função), *gorA* (codifica glutathione reductase) participa da redução de proteínas oxidadas codificada pela glutathione

redutase, *fur* (codifica a proteína Fur) regula a entrada do íon ferro na célula e *oxyS* (um pequeno RNA regulador) (Knapp et al., 2008; Dubbs and Scorn, 2012).

A proteína OxyR é produzida constitutivamente e é oxidada pelo H_2O_2 . A forma oxidada de OxyR liga-se a regiões promotoras de genes alvos. Cada subunidade de OxyR contém dois resíduos de cisteína que formam ligações dissulfeto. As ligações dissulfeto (SH) são reduzidas pela glutathionaredutase. A expressão da glutathionaredutase e do gene glutarredoxina está sob controle transcricional de OxyR e assim, a resposta é auto-regulada (Figura 8) (Pomposiello and Demple, 2001).

Figura 8 - Ativação de OxyR pelo H_2O_2

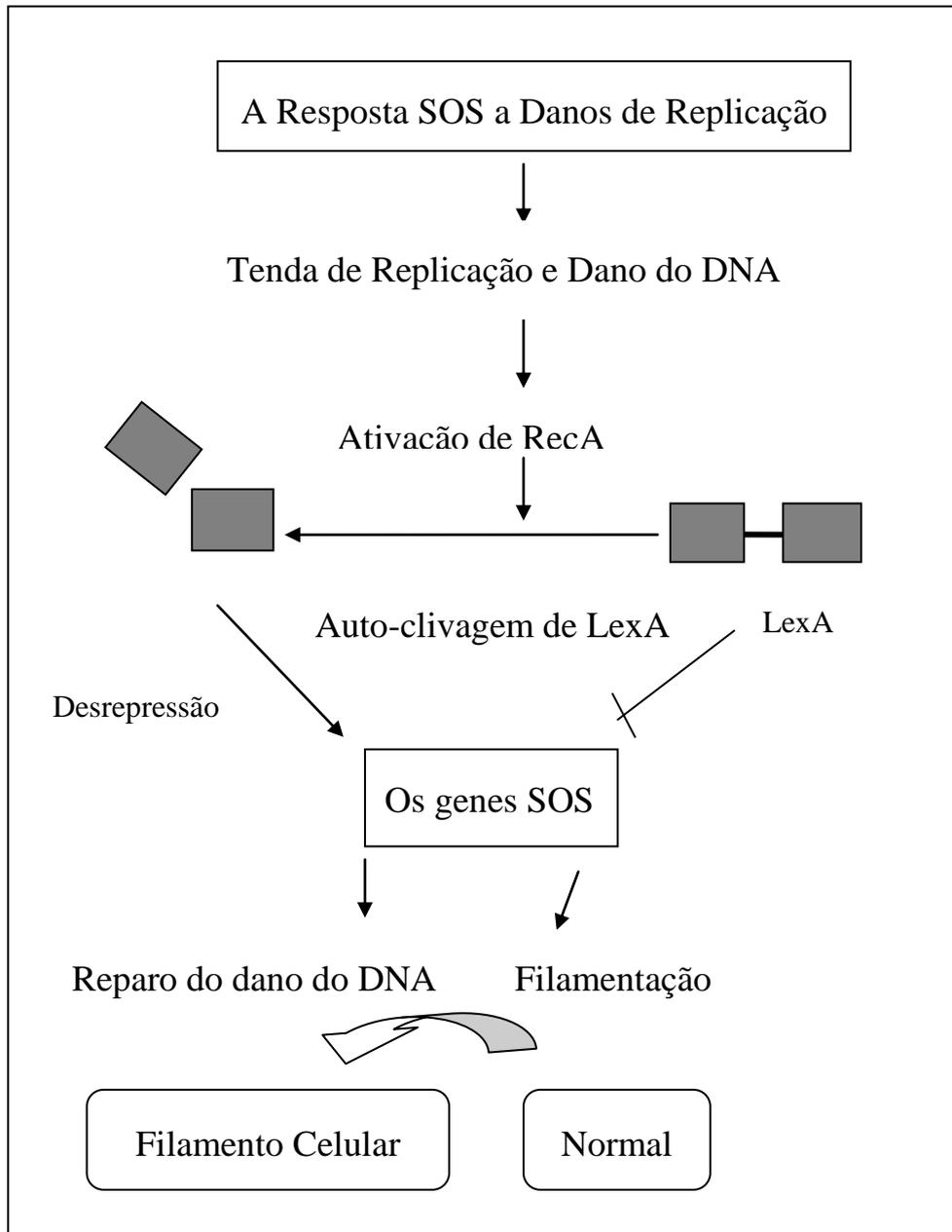


Legenda: A proteína OxyR é constitutivamente produzida e é oxidada por peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A forma oxidada de OxyR se liga a regiões promotoras de genes alvo e ativa transcrição por contato proteína-proteína com RNA polimerase. Genes Ativados por OxyR tem funções antioxidantes direta e indireta. Cada subunidade do tetrâmero OxyR contém dois resíduos de cisteína que formam em cima ligações dissulfeto intramoleculares em exposição ao H_2O_2 . As ligações dissulfeto são reduzidas pela glutathionaredutase, que por sua vez é reduzida pela glutathionaredutase. A expressão da glutathionaredutase e genes de glutaredoxina é sob controle transcricional de OxyR, e assim, a resposta é autorregulada. Abreviação: GSH, glutathionaredutase.

Fonte: Pomposiello and Demple, 2001.

O sistema SOS é um processo utilizado pela maioria das bactérias quando surgem lesões no genoma ou quando ocorre inibição na síntese de DNA (Neeley et al., 2007). A resposta SOS é mediada pela ação de duas proteínas RecA e LexA. Em condições fisiológicas a resposta SOS é bloqueada por LexA, que atua como repressor de uma série de genes incluindo o gene *lexA* e o gene *RecA*. Quando ocorre dano no DNA sua replicação é bloqueada ocorrendo um sinal indutor que é reconhecido pela proteína RecA. A forma ativada de RecA atua como uma co-protease para catalisar a autoclivagem de LexA. LexA é um repressor transcricional que liga-se a região do operador e reprime a expressão de 40 genes (genes SOS). Os genes SOS têm funções diferentes, incluindo reparo no DNA, recombinação do DNA, inibição prematura da divisão celular, filamentação bacteriana e mutagênese induzível. A maior parte destas funções contribui para reiniciar a replicação. Quando a replicação do DNA retorna ao normal o sinal indutor é diminuído voltando RecA ao seu estado co-proteolítico com isso há o acúmulo de *lexA* na célula e a repressão dos genes SOS é restaurada (Figura 9) (Ming et al., 2007; Friedberg et al., 2006). A filamentação celular é uma das respostas SOS importante, pois permite o reparo das lesões do genoma antes da divisão celular prevenindo desta forma que mutações deletérias sejam herdadas pelas células filhas (Janion, 2001).

Figura 9 - Resposta SOS

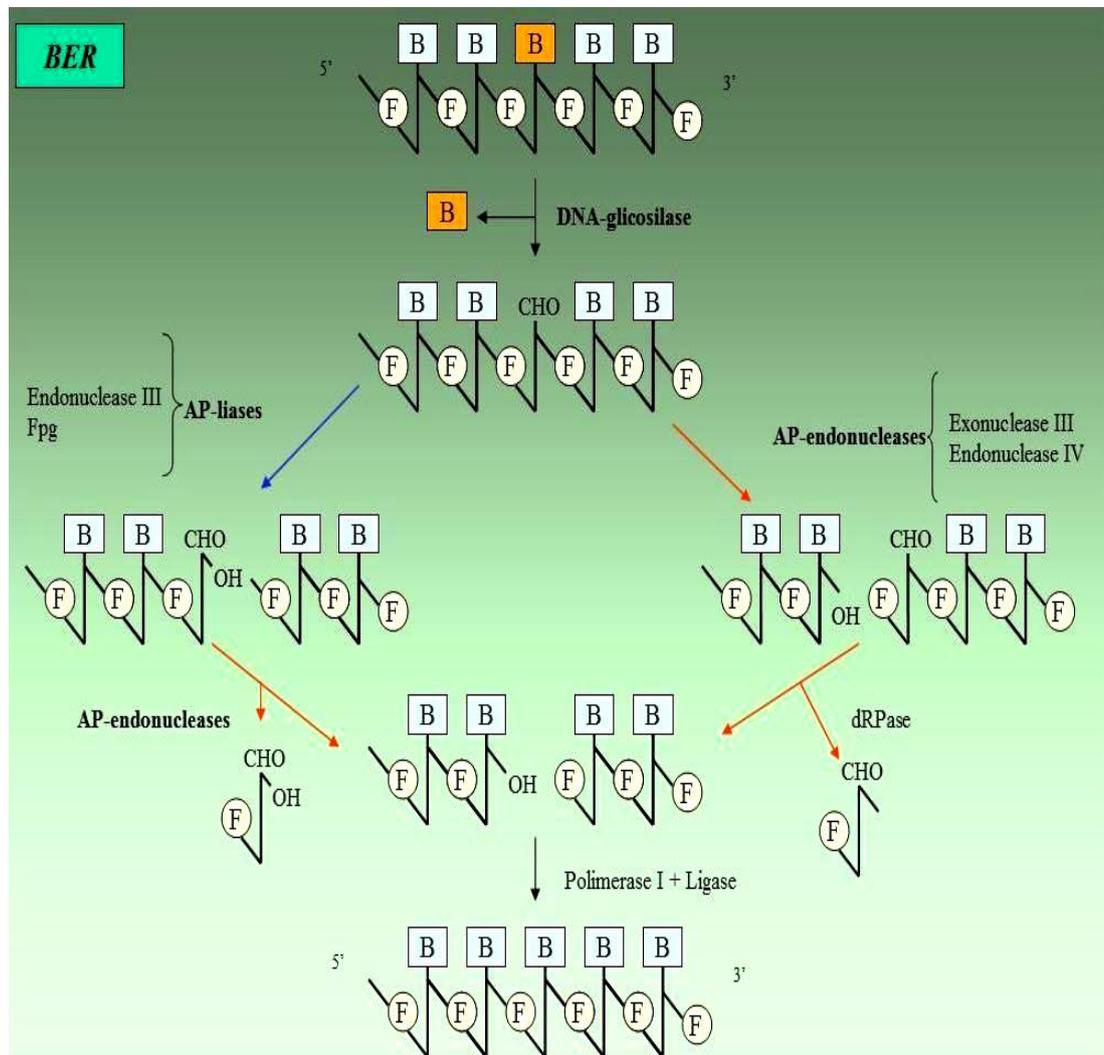


Legenda: LexA e RecA controlam os genes que codificam SOS funções necessárias para areparação de danos do DNA. LexA reprime esses genes. Danos ao DNA ativa RecA para estimular clivagem auto catalítica de LexA de modo que os genes SOS são desreprimidos e expressos para o reparo. A divisão celular é inibida e o atraso resulta em filimentação para permitir o reparo antes da divisão celular.

Fonte: Adaptado de Dallo and Weitao, 2010.
Adaptado e modificado pela autora, 2018.

O sistema de reparo por excisão de bases repara danos no DNA causados pela desaminação, oxidação e alquilação (Krokan and Bjoras, 2013). O BER é iniciado pela DNA glicosilase que reconhece cada classe específica de nucleotídeos do DNA danificado. A base alterada é retirada através da hidrólise da ligação N-glicosídica entre a base danificada e a desoxirribose por meio da DNA-glicosilase, gerando como produto final os sítios apurínicos ou apirimidínicos, também chamados sítios AP, que são tóxicos e mutagênicos, devendo ser processado e removido rapidamente (Hosfield et al., 1999 & Fridberg et al., 2003). Além de removerem a base alterada, algumas DNA glicosilases também apresentam atividade AP liase que clivam o sítio AP do lado 3' (Zharkov, 2008). As enzimas Fpg e endonuclease III são dois exemplos de AP-liases. Quando a via de remoção do sítio AP começa pela atuação de uma AP-liase, o terminal 5' é removido por uma das AP-endonucleases. No entanto, se o reparo começa com um corte no lado 5' feito por uma das AP endonucleases elas cortam a cadeia polipeptídica no lado 5' da lesão deixando a extremidade 3' OH e 5'P livres. As enzimas APglicosilases e endonuclease III atuam na reparação de bases por agentes oxidantes. A remoção do sítio AP pode ser feita pela exonuclease III ou pela endonuclease IV (Dempeland Harrison, 1994; Friedberget al., 2006). Quando o DNA é exposto a agentes oxidantes levando a alteração da base, DNA glicosilase retira essa base o que leva a formação do sítio AP. Caso a DNA glicosilase tiver atividade AP insaturado. Este terminal quando reconhecido é removido pelas AP endonucleases (endonuclease IV ou exonuclease III). Se o sítio AP gerado pela DNA glicosilase não tiver atividade AP liase, o sítio AP é removido pelas AP endonucleases através do lado 5'. As AP endonucleases produzem um terminal que é processado pela enzima dRPASE, essa enzima deixa a extremidade 3'OH e 5'P livres fazendo com que a DNA polimerase preencha a lacuna com o nucleotídeo correto (Friedberg et al., 2006; Wallace et al., 2012) (Figura 10).

Figura 10 - Mecanismo de ação de BER



Legenda: adaptado por Friedberg et al., 2006.

A exonuclease III é uma proteína de aproximadamente 28 kDa, em *E. coli* ela é codificada pelo gene *xthA* e é uma enzima constitutiva representando 80-90% da atividade AP total na célula. Esta proteína tem necessidade de Mg^{2+} para desempenhar sua atividade endonucleotídica e é inativada por agentes quelantes de metal. Exonuclease III foi caracterizada como 3'-5' exonuclease com atividade fosfodiesterase e catalisa a hidrólise no lado 5' da perda de base, deixando terminais 3'OH e 5'P (Friedberg et al,2006; Kerins et al., 2002).

A endonuclease IV é codificada pelo gene *nfo* e tem aproximadamente 30kDa. Ela é uma endonuclease resistente ao EDTA em condições normais de ensaio e é uma endonuclease

dependente de Zn^{2+} (Levinet et al., 1991). A endonuclease IV possui uma atividade intrínseca 3'-5' exonuclease e é responsável por 5-10% da atividade AP celular total (Kerins et al., 2002).

A endonuclease III é codificada pelo gene *nth*. Ela possui dois tipos de atividades: AP liase (eliminação de 3'fosfato do sítio AP) e DNA glicosilase (hidrólise de ligação N-glicosídicas) que retira resíduos oxidativos de pirimidina como a timina glicerol que pode bloquear a DNA polimerase durante a replicação (Saito et al., 1997;Kuznetsov et al.,2015). A Endonuclease III é uma proteína de reparo de excisão de base (BER) que contém agrupamentos 4Fe-4S, que encontra-se ativada quando ligada ao DNA (Thayer et al., 1995).O estudo com os íons metálicos ferro e cobre são relevantes, pois apesar do seu potencial como agente antimicrobiano, existem poucos estudos realizados com microrganismos de origem clínica. A influência dos íons metálicos nos mecanismos de reparo de lesões de DNA tem sido pouco estudada. Diferentes mecanismos que tornam os íons de ferro e cobre tóxicos para a célula, mas a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) via reação de Fenton, é particularmente importante. Apesar dos metais parecerem ser uma alternativa contra microrganismos, é importante ressaltar que a influência desses metais é concentração dependente, ou seja, proteínas controlam os níveis de íons dentro da célula por diferentes mecanismos. Estudos com esses metais, que visam avaliar a influência de íons metálicos em fatores de virulência e perfil de resistência são relevantes e necessários, uma vez que trabalhos anteriores mostraram que a ausência de determinadas enzimas deste sistema influenciam nas respostas a esses íons metálicos (Campos, 2015).

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo é avaliar a influência dos íons de ferro e cobre no perfil de resistência aos antibióticos e na formação de biofilmes pelas cepas de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC), *Escherichia coli* Uropatogênica (UPEC) e *Escherichia coli* K-12 deficientes em enzimas do BER.

1.2. Objetivos específicos

- a) Verificar a capacidade de formação de biofilme em superfície abiótica e sua modulação na presença e ausência de íons ferro e cobre nas cepas de EAEC, UPEC e *Escherichia coli* K-12 deficiente em BER;
- b) Avaliar a toxicidade da concentração/tempo de exposição de cada íon metálico para as cepas em estudo;
- c) Estudar os efeitos da presença ou ausência dos íons de ferro e cobre na modulação do perfil de resistência aos antimicrobianos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Meios, reagentes e soluções

Os meios de cultivo e reagentes foram obtidos em sua forma desidratada e preparados conforme a indicação do fabricante. Exceto quando especificado, os meios de cultura utilizados foram de procedência Difco (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) ou Merck (Merck S.A., Rio de Janeiro, RJ). O preparo dos meios e soluções foi realizado com água destilada ou ultra-pura. Os sais utilizados foram de procedência Merck (Merck S.A – Rio de Janeiro, RJ) e os demais reagentes foram de procedência Sigma (Sigma Chemical, Co., St. Louis, MO, USA) ou Gibco-BRL (Invitrogen, Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, USA). Foram utilizados íons metálicos de ferro (FeCl_3) e cobre (CuCl_2) (Sigma).

2.2 Cepas bacterianas e condições de conservação

2.2.1 Cepas empregadas nesse estudo

Os mutantes derivados de *E. coli* K-12, UPEC e EAEC utilizados neste estudo encontram-se listados na Tabela 1.

2.2.2 Conservação das cepas bacterianas

As cepas foram estocadas em tubos de plástico com rosca contendo 1 mL de meio LB com glicerol 20% (v/v) e mantidas em temperatura de -20°C e -70°C . Alíquotas dos tubos do estoque mantido a temperatura de -20°C foram utilizadas para a realização dos testes e os tubos mantidos a -70°C constituíram o estoque permanente.

Quadro1 - Cepas utilizadas nesse estudo

Cepas	Genótipo Relevante	Fenótipo Relevante	Referência
<i>E. coli</i> k-12			
AB1157	Selvagem	Possui todos os mecanismos de reparo	Hall & Howard-Flanders ¹
BW9091	Similar a AB1157, mas $\Delta xthA^-$	Deficiente em exonuclease III	B. Weiss ²
BW528	Similar a AB1157, mas nfo^- e $\Delta xthA^-$	Deficiente em endonuclease IV e exonuclease III	B. Weiss ²
BW535	Similar a AB1157, mas nth^-nfo^- e $\Delta xthA^-$	Deficiente em endonuclease III e IV e nulo na exonuclease III	B. Weiss ²
EAEC			
42	pAA/aggR,aafA	Padrão de aderência agregativa em Hep-2; biofilme forte	Nataro et al., 19873
I49/3	pAA/aggR,aggA	Padrão de aderência agregativa em Hep-2; biofilme fraco	Rosa et al., 19983
H92/3	pAA/aggR,aafA	Padrão de aderência agregativa em Hep-2; biofilme forte	Rosa et al., 19983
H9/3	pAA/aggR	Padrão de aderência agregativa em Hep-2; biofilme forte	Rosa et al., 19983
UPEC			
7104	ST131/bla _{kpc-2}	ECP	Campos et al., 2018
9260	ST131/bla _{ctx-M-15}	ESBL	Campos et al., 2018
666	ST69/strA, strB e aad5	MDR	Campos et al., 2018

Legenda: pAA, plasmídeo de aderência agregativa; aggR, ativador transcricional; aafA, fímbria de aderência agregativa II; agg, fímbria de aderência agregativa III; MDR: cepa resistente a 3 classes de antibiótico ou mais; ECP, *E. coli* produtora de carbapenemase; ESBL, Beta-lactamase de Espectro Estendido.

Fonte: Esse estudo.

2.3 Preparo dos cultivos bacterianos

2.3.1 Cultivos simples

As cepas foram inoculadas em 3 mL de caldo Luria-Bertani (LB, Merck, S. A) para os testes de formação de biofilme e incubadas em estufa a 37°C por um período de 18 horas até atingirem a fase estacionária de crescimento (cerca de 2×10^9 células/mL).

2.4. Teste de Biofilme Qualitativo

Após cultivar as cepas bacterianas em caldo LB por 18 horas a 37°C, na presença dos íons metálicos. Foram transferidas 10µL de cada cultura para 1 mL do meio DMEM (Dulbecco's Minimal Essential Medium, Gibco-BRL) contendo 0,45% de glicose e acrescentados os íons metálicos ferro(FeCl₃) e cobre (CuCl₂) nas concentrações de 100µM e 200 µM e em seguida foram distribuídos em cada placa de 24 orifícios (TPK) contendo lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro previamente esterilizados. A placa foi incubada por 18 horas a 37°C. Após o período de incubação, as lamínulas foram lavadas três vezes com PBS-D e em seguida fixada com metanol por 15 minutos. Para coloração das lamínulas foi utilizado o corante cristal violeta (Laplast Labor) 0,5% por 5 minutos. As lamínulas foram lavadas com água destilada, secas, dispostas sobre lâminas de vidro, depois de secas as lamínulas foram coladas com entellan (Merck S.A. Rio de Janeiro) e observadas ao microscópio óptico (Nikon) (Sheikhet al., 2001).

2.5 Teste de Biofilme Quantitativo

As cepas bacterianas foram cultivadas em caldo LB por 18 horas a 37°C acrescentados dos íons metálicos após esse período foram transferidos 5µL de cada cultura para 200µL do meio DMEM (Dulbecco's Minimal Essential, Gibco-BRL) contendo 0,45% de glicose e acrescentados os íons metálicos ferro (FeCl₃) e cobre (CuCl₂) na concentração de 100µM e 200 µM previamente distribuídos em cada orifício de uma placa de poliestireno com 96 orifícios (TPK). A microplaca foi incubada por 18 horas a 37°C. Após o período de incubação o meio foi removido e descartado e, em seguida lavado três vezes com água destilada e adicionado 50 µL de cristal violeta (Laplast Labor) 0,5% por 5 minutos.

Terminado este período repetiu-se o procedimento de lavagem três vezes com água destilada e acrescentado 200 µL de etanol por 30 minutos. Posteriormente, 150 µL dessa solução foram transferidos para outra microplaca de poliestireno com 96 orifícios e fez-se a leitura da densidade óptica em 570nm (OD570) no aparelho de espectrofotômetro (Sheikh et al., 2001).

2.6 Teste de sensibilidade a antimicrobianos (TSA)

Para a realização do teste de sensibilidade a antimicrobianos (TSA), a técnica utilizada foi a de microdiluição em caldo usando o E-test (Biomérieux). As amostras foram cultivadas por 48 horas em placa de 96 poços, incluindo o controle ATCC25922. Foi feita a suspensão bacteriana até alcançar a turbidez padrão de 0,5 da escala MC Farland. A suspensão bacteriana foi semeada em placas 90 x 120 mm e após foram adicionados as tiras E-teste[®] para detecção de resistência antimicrobiana (ARD) dos antibióticos Amoxicilina/ácido clavulânico (0,5, 2, 4, 8, 32µg/mL), Cefotaxime (0,5, 2 e 4 µg/mL), Ciprofloxacino (0,5, 2 e 4 µg/mL), Cefoxitina (8, 16 e 32µg/mL) e Cefuroxime (2, 8 e 32 µg), Ceftazidime (0,25, 1, 2, 8 e 32 µg/mL) Colistina (4, 16 e 32 µg/mL), Fosfomicina (8, 16 e 32 µg/mL), Gentamicina (4, 16 e 32 µg/m), Imipenem (1, 2, 6 e 12 µg/mL), Meropenem (0,5, 2, 6 e 12µg/mL), Nitrofurantoína (16, 32 e 64 µg/mL), Piperaciclina/Tazobactam (2/4, 8/4, 24/4 e 32/4 µg/mL), Tobramicina (8, 16 e 64 µg/mL), Trimetoprim (8, 16 e 64 µg/mL) e Trimetoprim/Sulfametoxazol (1/9, 4/76 e 16/304 µg/mL) dispensados até 15 minutos após semeadura na superfície do ágar. Foi utilizada a cepa ATCC25922 como controle positivo. As placas foram incubadas por 18 horas à temperatura de 37°C, sendo os halos de inibição aferidos após este período de acordo com as normas do (CLSI, 2017).

2.7 A viabilidade das bactérias nos biofilmes de cepas E.coli K-12 formado na presença de íons metálicos

Foi analisada a viabilidade dos biofilmes formados na presença e ausência de íons metálicos utilizando o Kit FilmTracer LIVE/DEAD Biofilm Viability (invitrogen). As cepas foram cultivadas em meio LB por 18h, sem agitação. Após esse período alíquotas de 10µL foram transferidos para 1mL de meio DMEM e foram acrescentados os íons metálicos ferro (FeCl₃) e cobre (CuCl₂) distribuídos em poços de uma placa de 24 orifícios com lamínulas de vidro previamente esterilizadas. A placa foi incubada por 18 h à 37° C. Após esse período as lamínulas foram lavadas com água destilada estéril, dispostas sobre lâmina de vidro e em

seguida foram observadas em microscópio de fluorescência à laser Confocal. Onde as células vivas no biofilme são marcadas em verde e as mortas em vermelho.

2.8. Análise estatística

Os experimentos foram analisados utilizando o programa GraphPad-Prism, versão 4.02, o teste utilizado foi T de Student sendo $P < 0,05$ considerado significativo.

3 RESULTADOS

3.1 Teste de Biofilme Quantitativo

A capacidade das cepas de formar biofilme na presença de soluções de íons metálicos ferro e cobre foram testadas para três grupos de *E. coli*. Para a EAEC houve redução de biofilme nas cepas 042 controle, H92/3 e H9/3, porém para a cepa 042 houve redução significativa nas concentrações de 100µM e 200 µM de ferro ($p < 0,0001$) e 100µM ($p = 0,0206$) e 200µM ($p = 0,0114$) de cobre. Já a cepa I49 houve aumento de biofilme em todas as concentrações testadas, no entanto o aumento foi significativo nas concentrações de 200µM ($p = 0,0262$) de ferro e nas concentrações de 100 µM ($p = 0,0003$) e 200 µM de cobre ($p = 0,0001$) (figura 9). No grupo das UPEC houve aumento de biofilme nas cepas 9260, 666 e 7104. A cepa 666 apresentou aumento significativo de biofilme nas concentrações de 200µM de ferro ($p = 0,0047$) e 100µM ($p = 0,0002$) e 200µM de cobre ($p < 0,0001$). Já a cepa 7104 houve aumento significativo de biofilme nas concentrações de 100 µM (0,0096) e 200 µM (0,0040) de cobre. A cepa controle I64 houve redução de biofilme em todas as concentrações de ferro e cobre (100µM e 200 µM)(Figura 9).

Diante desses resultados foi possível perceber que os íons metálicos afetam de formas diferentes a formação de biofilme em cada grupo. A resposta a esses metais parece depender no caso das cepas clínicas, não só dos genes de resistência aos íons metálicos, mas também a outros genes que modulam o perfil de resistência de EAEC e UPEC.

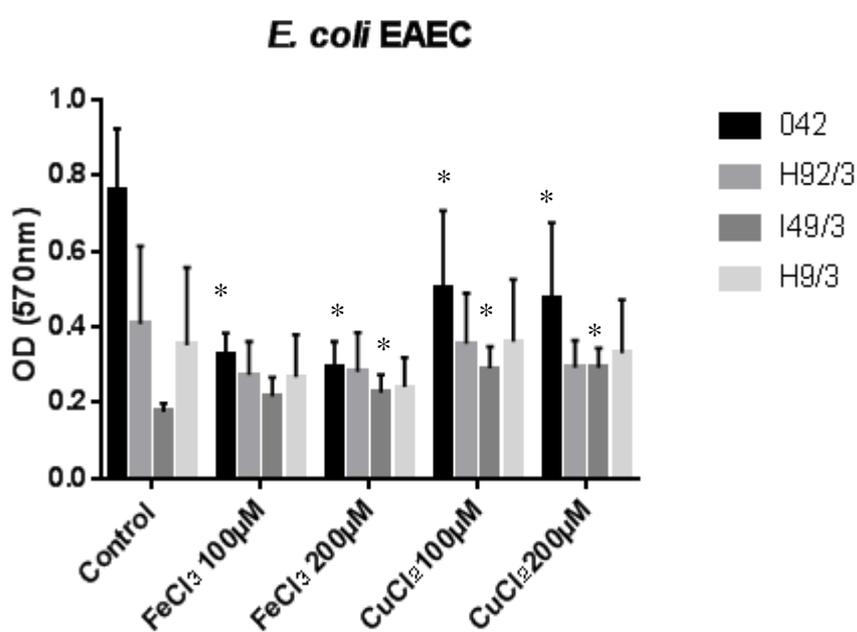
A ATCC 25922 apresentou redução significativa de biofilme nas concentrações de 100 µM ($p = 0,0390$) e 200 µM ($p = 0,0216$) de cobre. Para o grupo da *E. coli* K-12 houve aumento de biofilme em todas as concentrações testadas nas cepas AB1157 e BW535. A cepa controle AB1157 houve aumento significativo nas concentrações de 100 µM ($p = 0,0075$) e 200µM ($p = 0,0340$) de cobre. O triplo mutante BW 535 (*nfo*⁻, *nth*^{-Δ} e *xthA*) apresentou aumento significativo na concentração de 100 µM ($p = 0,0147$) de cobre. O duplo mutante BW528 apresentou redução de biofilme nas concentrações de 100µM e 200µM de ferro e 200 µM de cobre (Figura 10).

Para o grupo das *E. coli* K-12, os genes envolvidos no reparo de DNA e na proteção contra os danos produzidos por ERO, parecem não estar associados com os resultados de

formação de biofilme, levando-nos a acreditar que esse mecanismo pode não estar associado com a resistência a íons metálicos.

As cepas foram cultivadas em meio LB por 18h à 37⁰C, após esse período foram dispostas em placa de 96 poços em meio DMEM junto com os íons metálicos, incubadas pelo mesmo período de tempo e temperatura e tratadas com etanol e posteriormente feito a leitura em DO 570nm.

Figura 11 - Formação de biofilme para a *Escherichia coli* Enteroagregativa



Legenda: Controle – sem tratamento com íons metálicos.

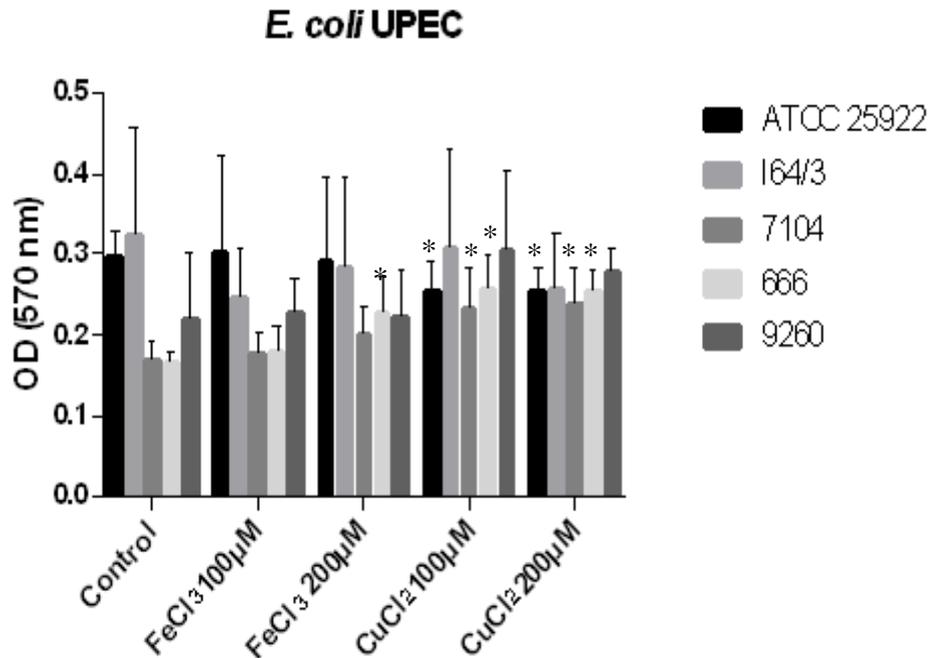
Tratado com solução de cloreto de ferro (FeCl₃) na concentração de: 100µM e 200µM.

Tratado com solução de cloreto de cobre (CuCl₂) nas concentrações de: 100µM e 200µM.

Os resultados estatisticamente significativos com p<0.05 estão indicados pelo asterisco (*).

Fonte: A autora.

Figura 12 - Formação de biofilme para a *Escherichia coli* Uropatôgena



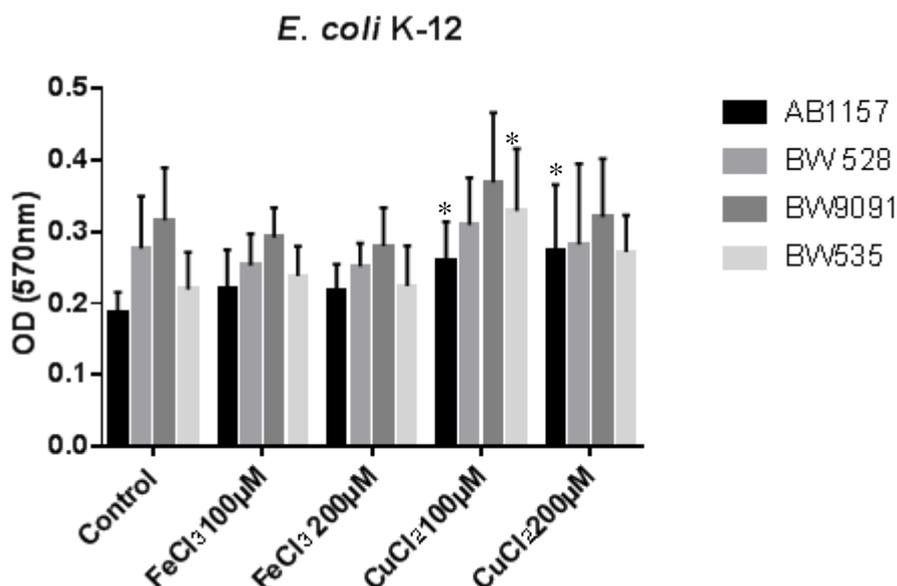
Legenda: Controle – sem tratamento com íons metálicos.

Tratados com solução de cloreto de ferro (FeCl₃) nas concentrações de: 100µM e 200µM.

Tratado com solução de cloreto de cobre (CuCl₂) nas concentrações de: 100µM e 200µM.

Os resultados estatisticamente significativos com $p < 0.05$ estão indicados pelo asterisco (*).

Fonte: A autora, 2018.

Figura 13- Formação de biofilme para a *Escherichia coli* K-12

Legenda: Control– controle sem tratamento com íons metálicos.

Tratados – Cloreto de ferro (FeCl₃) nas concentrações de: 100µM e 200µM.

Tratados com solução de Cloreto de cobre (CuCl₂) nas concentrações de 100µM e 200µM.

Os resultados estatisticamente significativos com $p < 0.05$ estão indicados pelo asterisco (*).

Fonte: A autora, 2018.

3.2 Biofilme Qualitativo

Para avaliar se as alterações na formação de biofilme dos diferentes grupos testados estariam ligadas ao tipo de superfície, realizamos o teste de formação de biofilme qualitativo no vidro. No grupo das EAEC as cepas 042 (controle positivo) apresentou biofilme forte nas concentrações de 100µM e 200µM de ferro e 200µM de cobre (figura 13). A H9/3 apresentou biofilme forte na concentração de 200µM de ferro e cobre (figura 14). A H92/3 apresentou biofilme forte nas concentrações de 100 µM e 200 µM de ferro (Figura 15). Já a cepa I49/3 apresentou pequeno aumento de biofilme em todas as concentrações de ferro 100µM e 200µM de ferro e 100µM cobre (Figura 16).

No grupo das UPEC a cepa I64 (controle positivo) apresentou aumento de biofilme na concentração de 200µM de íons ferro e cobre (Figura 17). A 9260 apresentou biofilme forte

na concentração de 200 μ M dos íons ferro e 100 μ M e 200 μ M cobre (Figura 18). A 7104 apresentou biofilme fraco nas concentrações de 100 μ M e 200 μ M de ferro e cobre (Figura 19) e a cepa 666 apresentou aumento de biofilme na concentração de 200 μ M de cobre (figura 20).

No grupo das *E. coli* K-12 a cepa selvagem AB1157 apresentou um biofilme fraco quando comparado com a cepa controle, porém houve presença de filamentos na concentração de 100 μ M de cobre (Figura 21). O mutante BW9091 (Δ xthA⁻) apresentou biofilme fraco nas concentrações de 100 μ M e 200 μ M de ferro e biofilme forte nas duas concentrações de cobre, porém houve presença de filamentação nas concentrações de 100 μ M de ferro (Figura 22). O duplo mutante BW528 (*nfo*⁻ e Δ xthA⁻) apresentou biofilme forte nas concentrações de 100 μ M e 200 μ M de cobre (Figura 23). O triplo mutante BW535 (*nfo*⁻, *nth*⁻, Δ xthA) apresentou aumento de biofilme na concentração de 200 μ M de cobre (Figura 24).

Figura 14- Formação de biofilme em vidro pela cepa EAEC 042 após 18 horas de incubação a 37°C

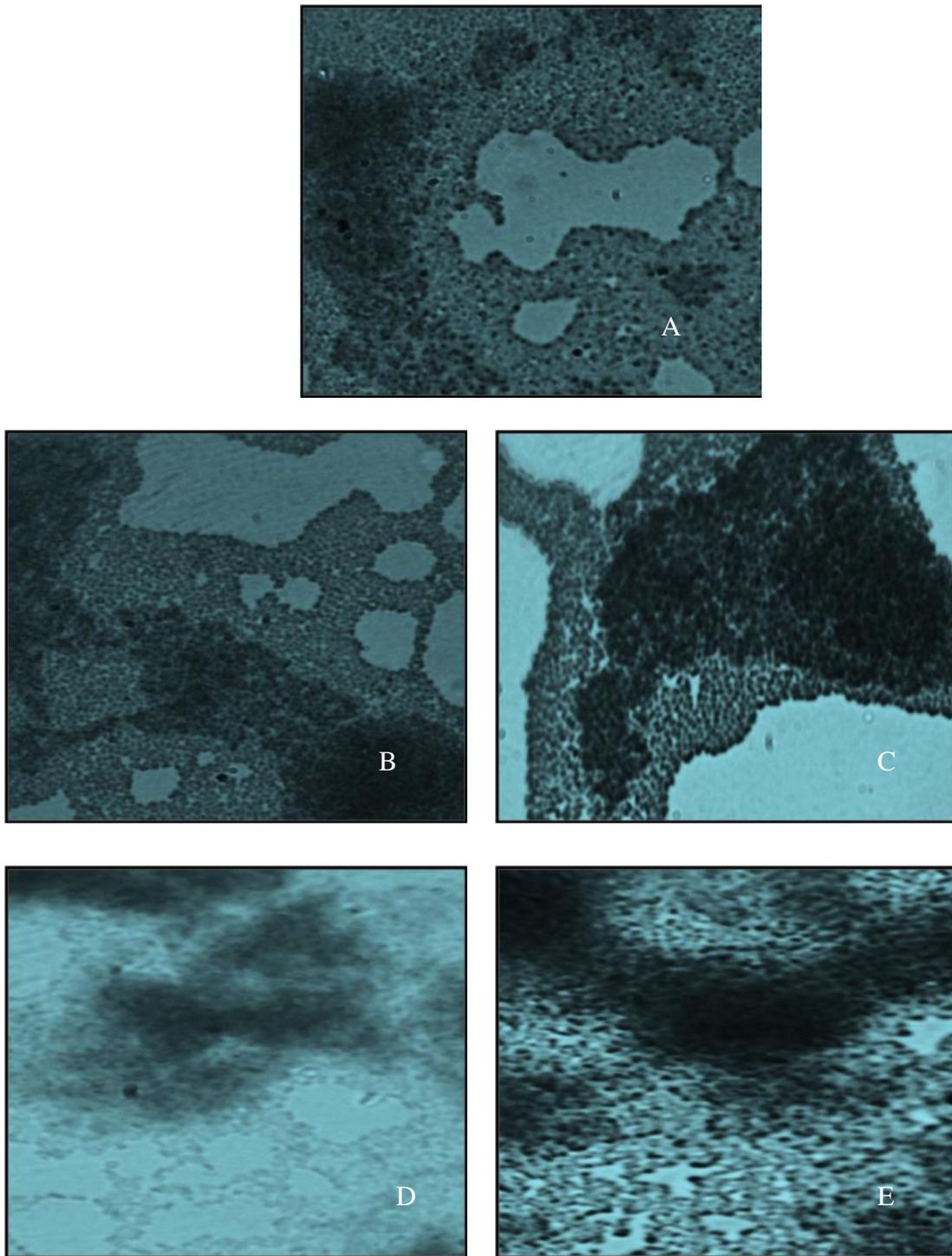


Figura: A) A cepa 042 controle apresentando um biofilme forte; B) Cepa 042 tratada com 100μM de FeCl₃ apresentando biofilme forte; C) Cepa 042 tratada com 200μM de FeCl₃ mostrando biofilme forte e D) Cepa 042 tratada com 100μM de CuCl₂ mostrando uma redução da formação de biofilme e E) cepa 042 tratada com 200μM de CuCl₂ apresentando biofilme forte.

Nota: Aumento 1000X.

Figura 15 - Formação de biofilme em vidro pela cepa EAEC H9/3 após 18 horas de incubação a 37°C

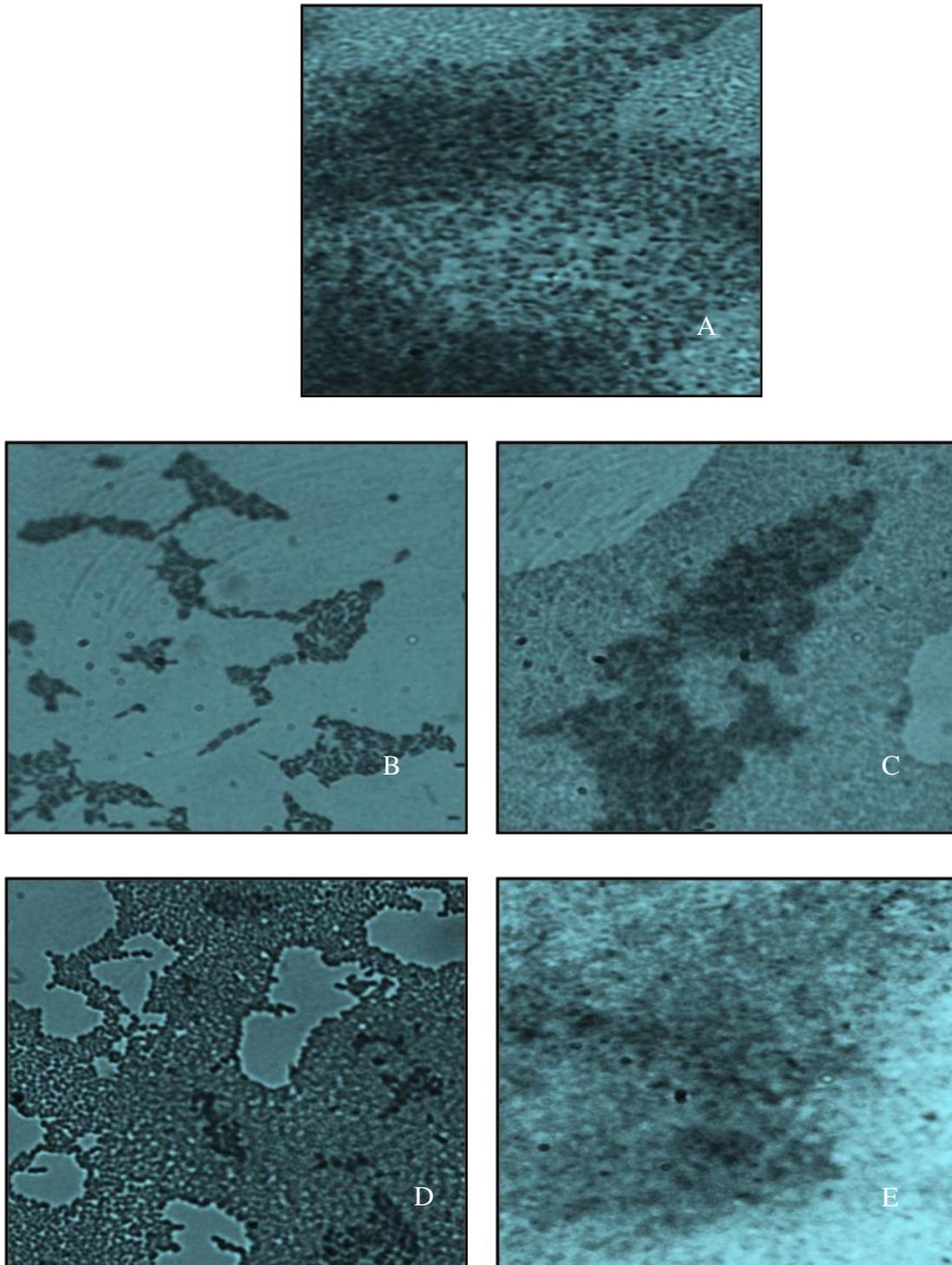


Figura: A) A cepa H9/3 controle apresentando um biofilme forte; B) Cepa H9/3 tratada com 100µM de FeCl₃ apresentando biofilme fraco; C) Cepa H9/3 tratada com 200µM de FeCl₃ mostrando um aumento da formação de biofilme; D) Cepa H9/3 tratada com 100µM de CuCl₂ mostrando um biofilme forte e E) cepa H9/3 tratada com 200µM de CuCl₂ apresentando biofilme fraco.
Nota: Aumento 1000X.

Figura 16- Formação de biofilme em vidro pela cepa de EAEC H92/3 após 18 horas de incubação a 37°C

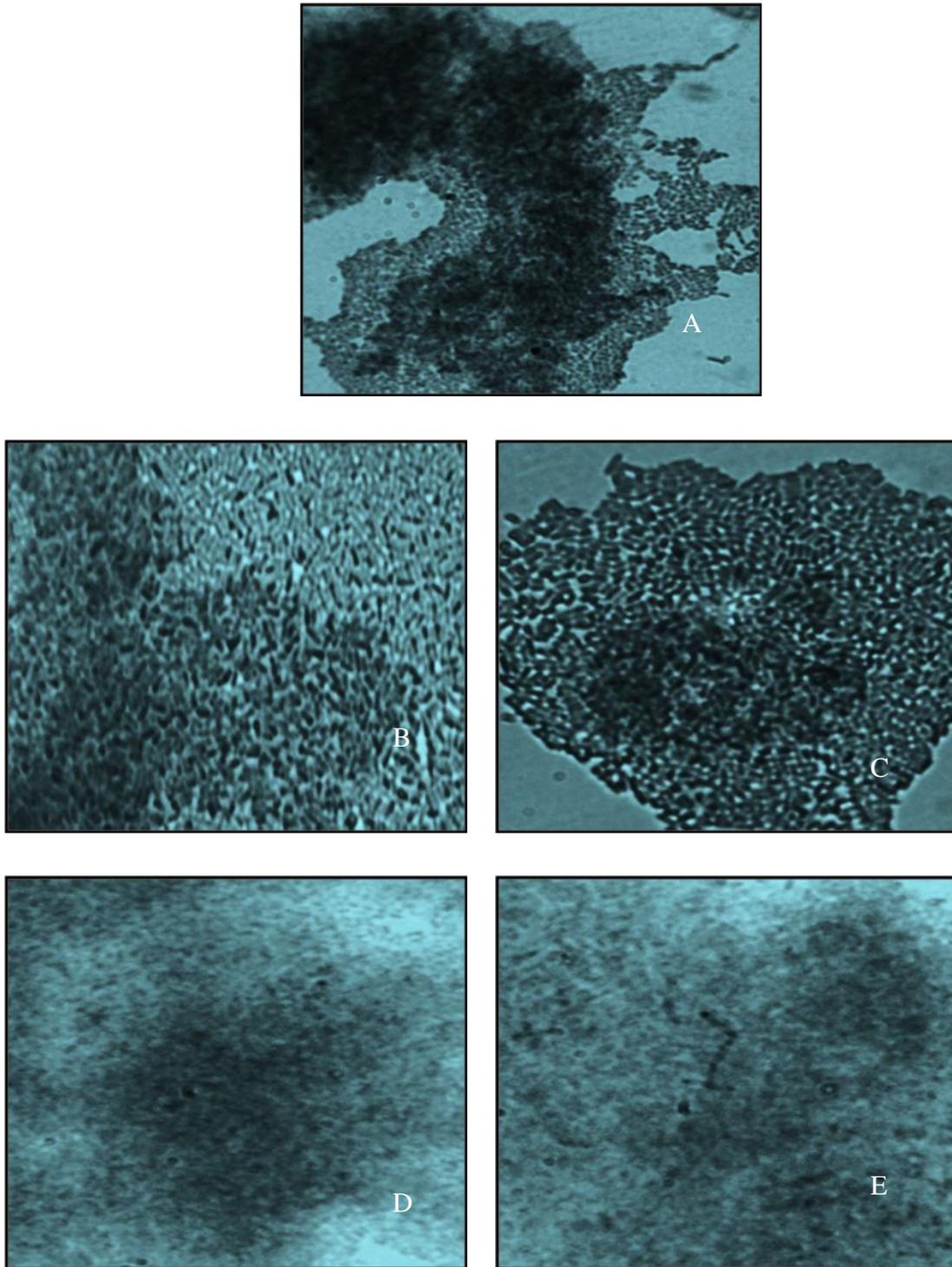


Figura: A) A cepa H92/3 controle apresentando um biofilme forte; B) Cepa H92/3 tratada com 100μM de FeCl₃ apresentando um biofilme forte; C) Cepa H92/3 tratada com 200μM de FeCl₃ mostrando um biofilme forte; D) Cepa H9/3 tratada com 100μM de CuCl₂ mostrando uma redução da formação de biofilme e E) cepa H92/3 tratada com 200μM de CuCl₂ apresentando uma redução de biofilme.

Nota: Aumento 1000X.

Figura 17- Formação de biofilme em vidro pela cepa de EAEC I49/3 após 18 horas de incubação a 37⁰C

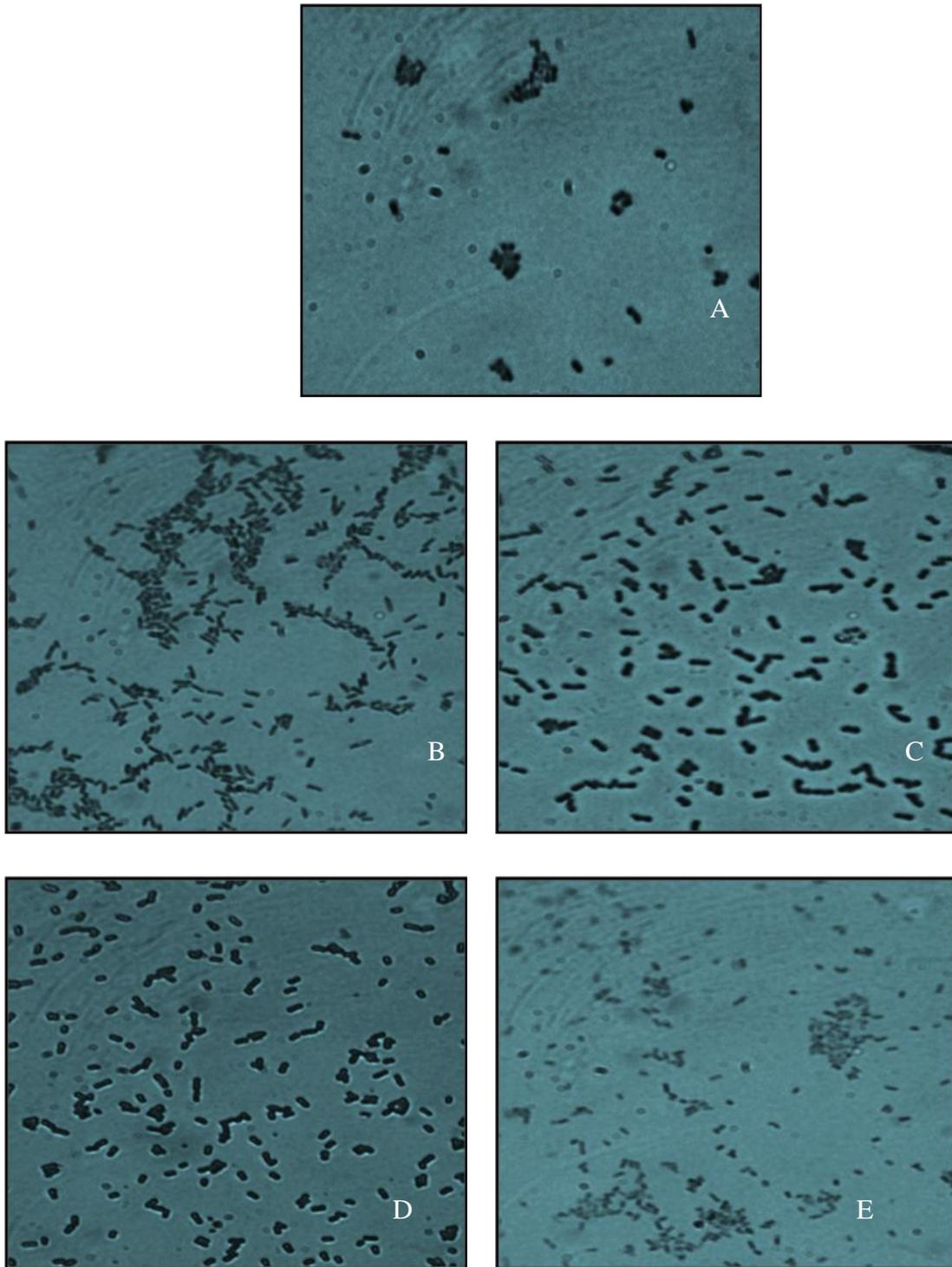


Figura: A) A cepa I49/3 controle apresentando um biofilme fraco; B) Cepa I49/3 tratada com 100μM de FeCl₃ apresentando um leve aumento de biofilme; C) Cepa I49/3 tratada com 200μM de FeCl₃ mostrando um aumento da formação de biofilme; D) Cepa I49/3 tratada com 100μM de CuCl₂ mostrando um leve aumento da formação de biofilme e E) cepa I49/3 tratada com 200μM de CuCl₂ apresentando biofilme fraco.

Nota: Aumento 1000X

Figura 18 - Formação de biofilme em vidro pela cepa de UPEC I64 após 18 horas de incubação a 37°C

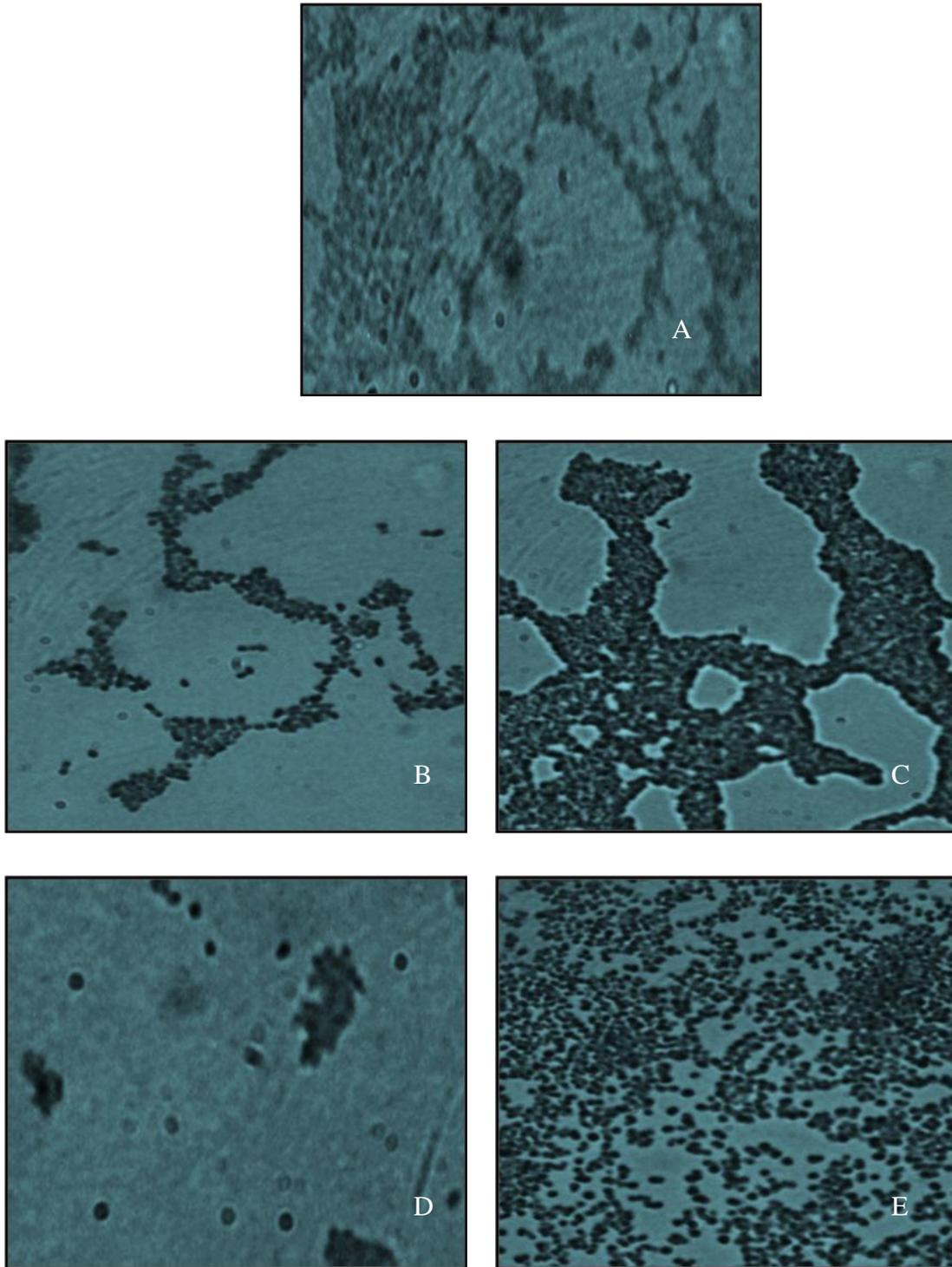


Figura: A) A cepa I64 controle apresentando um biofilme fraco; B) Cepa I64 tratada com 100µM de FeCl₃ apresentando biofilme fraco; C) Cepa I64 tratada com 200µM de FeCl₃ mostrando um aumento da formação de biofilme; D) Cepa I64 tratada com 100µM de CuCl₂ mostrando um biofilme fraco e E) cepa I64 tratada com 200µM de CuCl₂ apresentando aumento de biofilme.

Nota: Aumento 1000X.

Figura 19- Formação de biofilme em vidro pela cepa de UPEC 9260 após 18 horas de incubação a 37°C

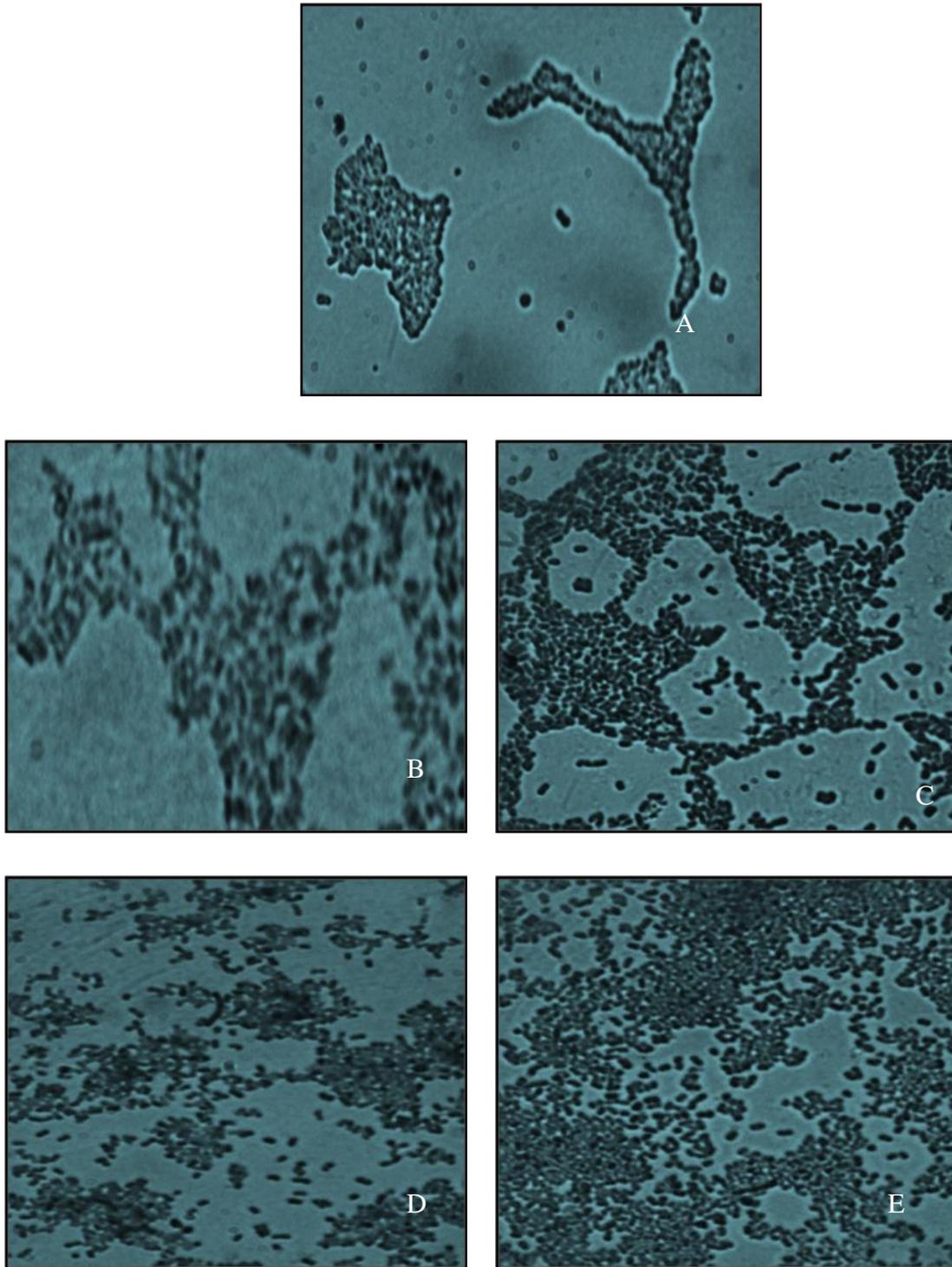


Figura: A) A cepa 9260 controle apresentando um biofilme fraco; B) Cepa 9260 tratada com 100μM de FeCl₃ apresentando biofilme fraco; C) Cepa 9260 tratada com 200μM de FeCl₃ mostrando um aumento da formação de biofilme e D) Cepa 9260 tratada com 100μM de CuCl₂ mostrando um aumento da formação de biofilme e E) cepa 9260 tratada com 200μM de CuCl₂ apresentando biofilme forte.

Nota: Aumento 1000X

Figura 20- Formação de biofilme em vidro pela cepa de UPEC 7104 após 18 horas de incubação a 37⁰C

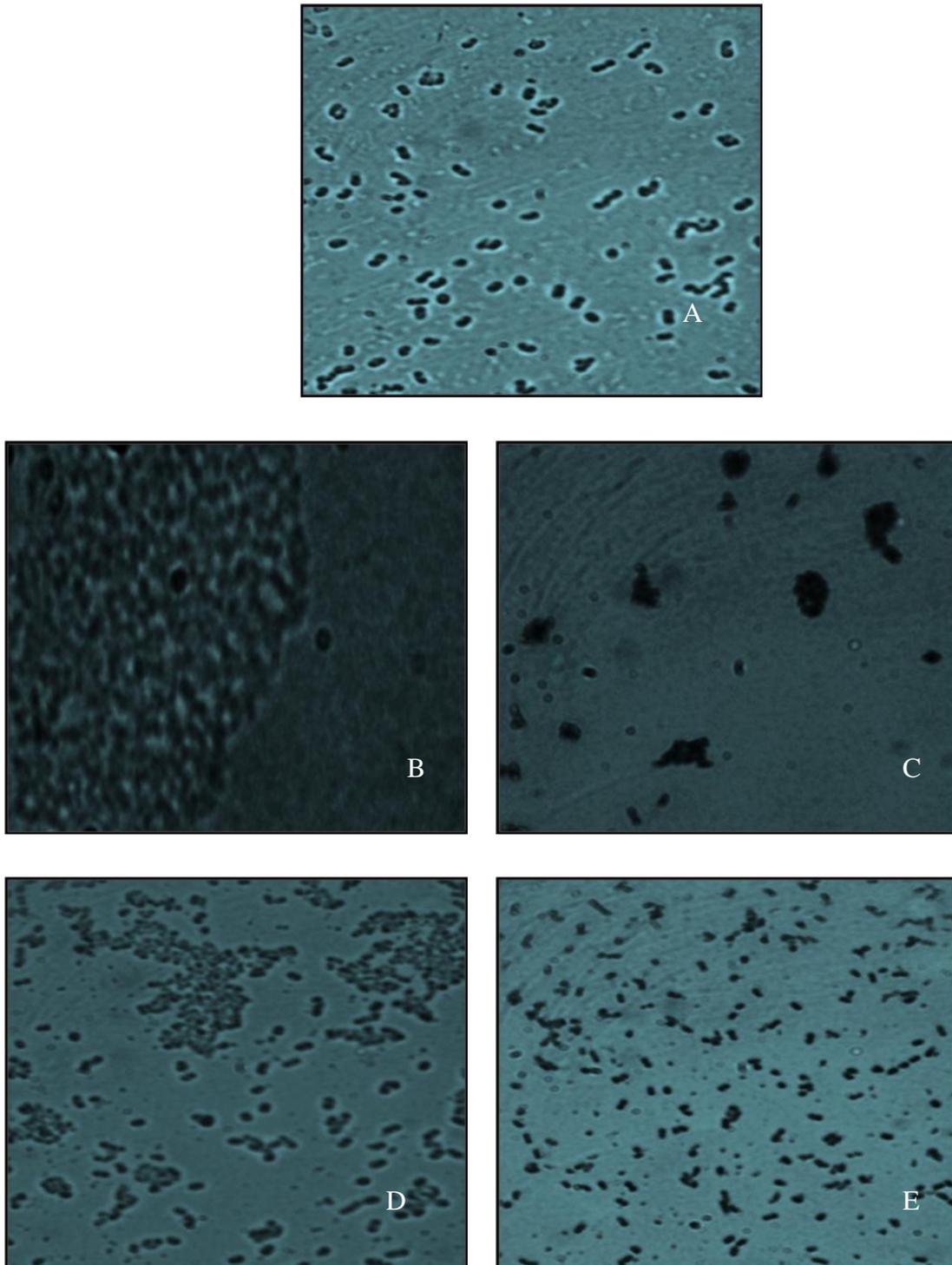
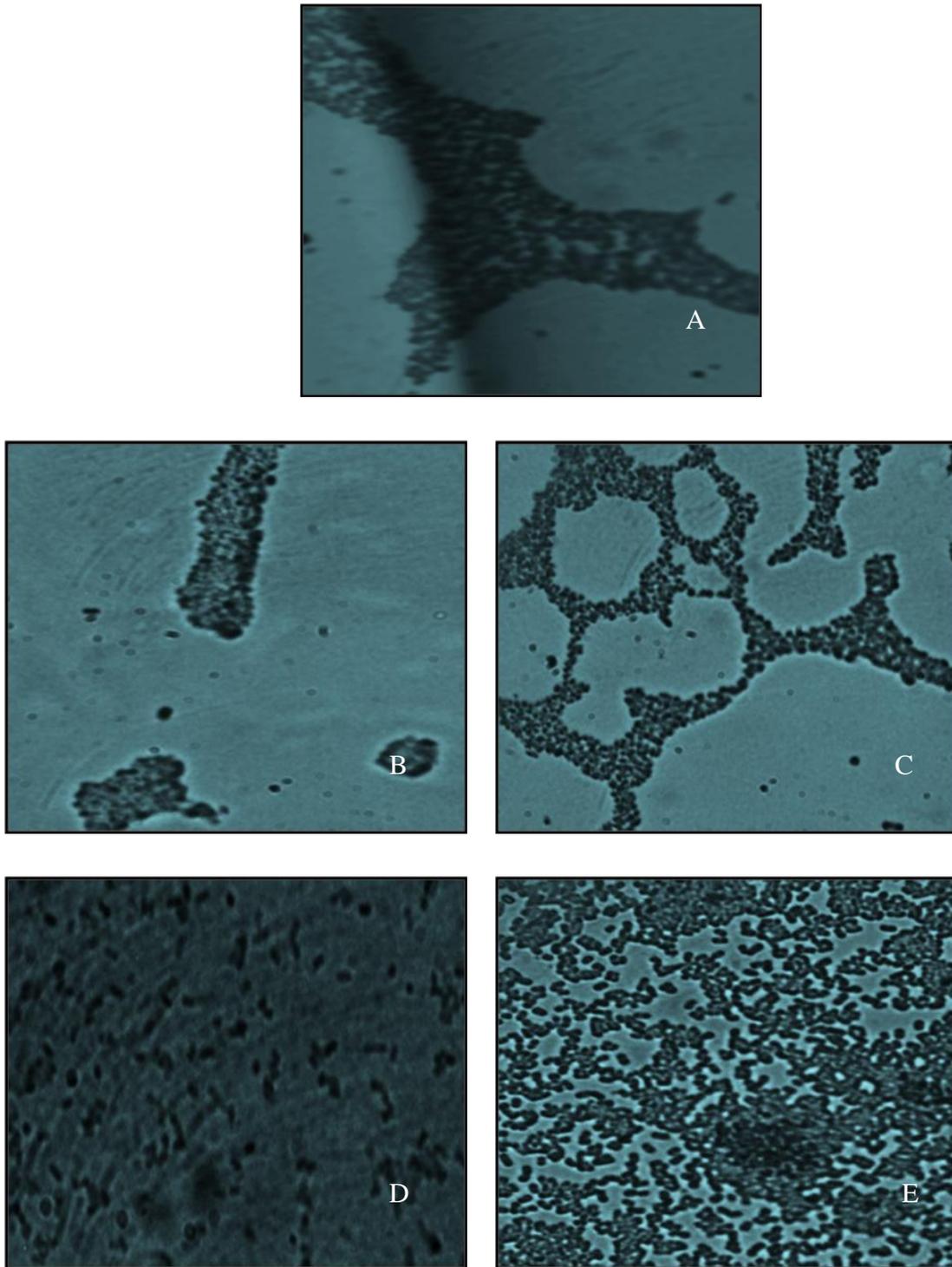


Figura: A) A cepa 7104 controle apresentando um biofilme fraco; B) Cepa 7104 tratada com 100 μ M de FeCl₃ apresentando biofilme fraco; C) Cepa 7104 tratada com 200 μ M de FeCl₃ mostrando um biofilme fraco; D) Cepa 7104 tratada com 100 μ M de CuCl₂ mostrando um biofilme fraco e E) cepa 7104 tratada com 200 μ M de CuCl₂ apresentando biofilme fraco.

Nota: Aumento 1000X.

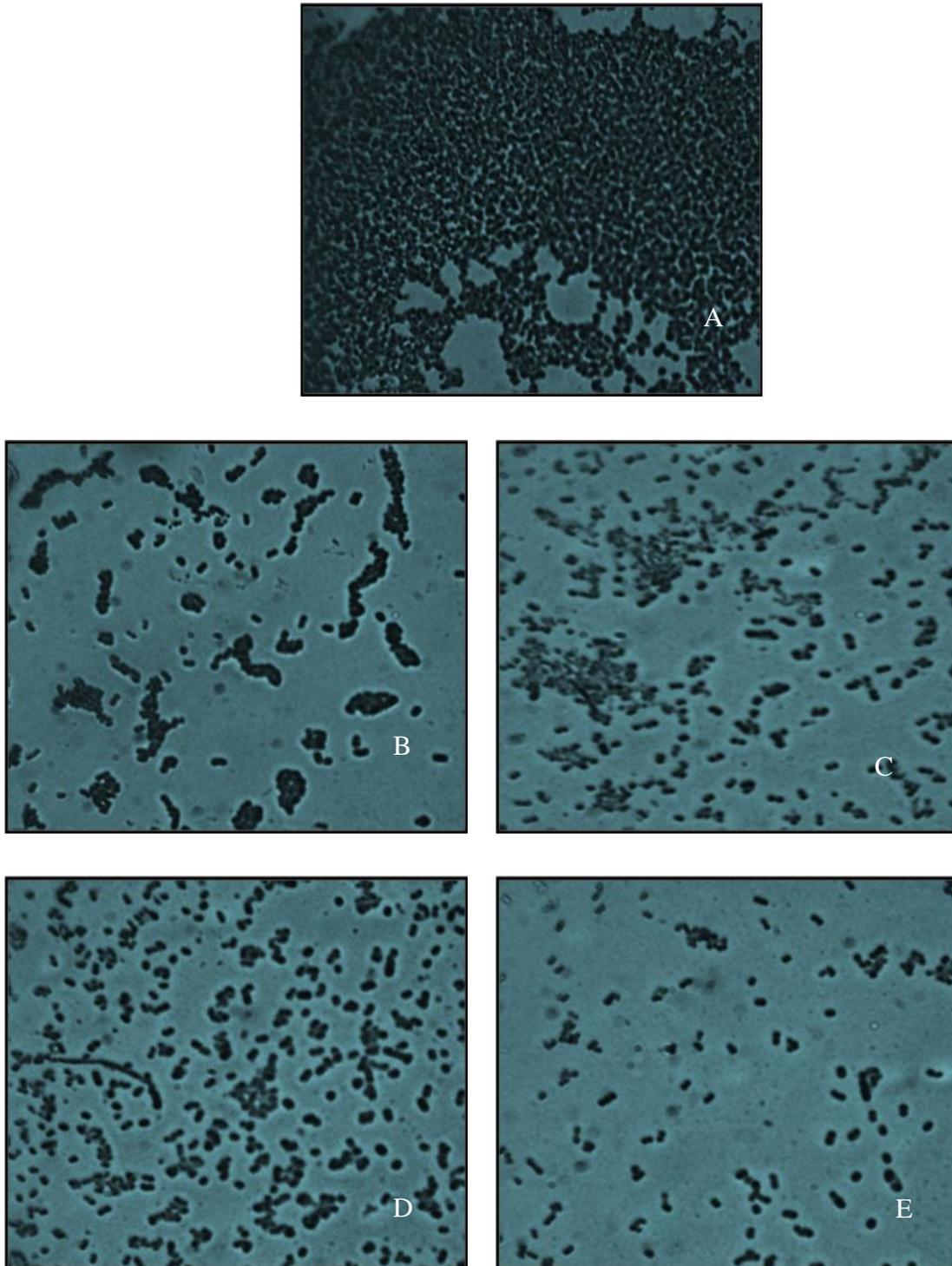
Figura 21 - Formação de biofilme em vidro pela cepa de UPEC 666 após 18 horas de incubação a 37°C



Legenda: A) A cepa 666 controle apresentando um biofilme fraco; B) Cepa 666 tratada com 100μM de FeCl₃ apresentando uma redução da formação de biofilme; C) Cepa 666 tratada com 200μM de FeCl₃ mostrando um aumento da formação de biofilme; D) Cepa 666 tratada com 100μM de CuCl₂ mostrando um biofilme fraco e E) cepa 666 tratada com 200μM de CuCl₂ apresentando biofilme forte.

Nota: Aumento 1000X.

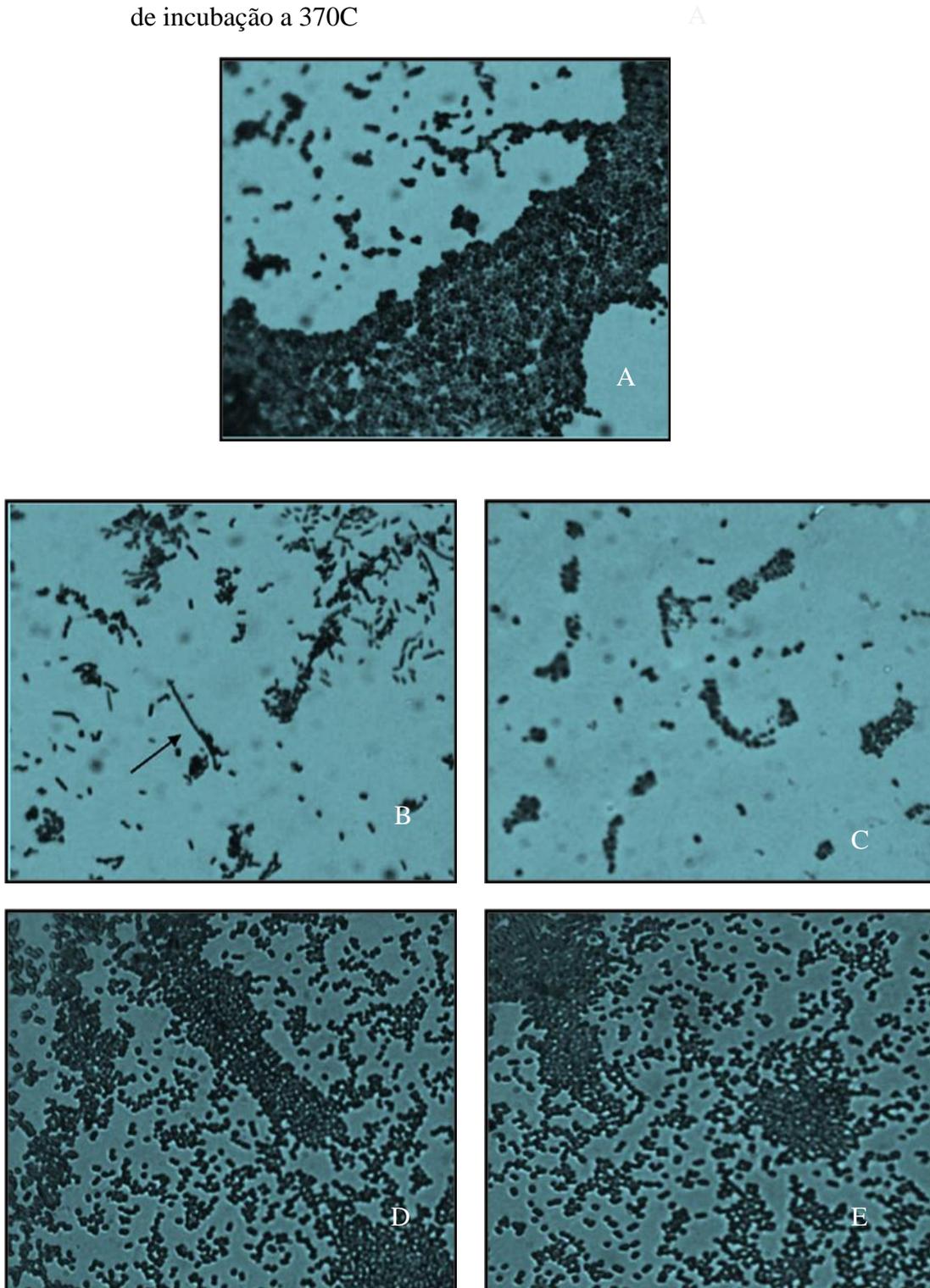
Figura 22 - Formação de biofilme em vidro pela cepa de *E. coli* K-12 AB 1157 após 18 horas de incubação a 37°C



Legenda: A) A cepa AB1157 controle apresentando um biofilme forte; B) Cepa AB1157 tratada com 100µM de FeCl₃ apresentando um biofilme fraco; C) Cepa AB1157 tratada com 200µM de FeCl₃ mostrando um biofilme fraco com presença de filamento, D) Cepa AB1157 tratada com CuCl₂ mostrando uma redução de biofilme e presença de filamento e E) Cepa AB1157 tratada com 200µM de CuCl₂ mostrando um biofilme fraco.

Nota: Aumento 1000X

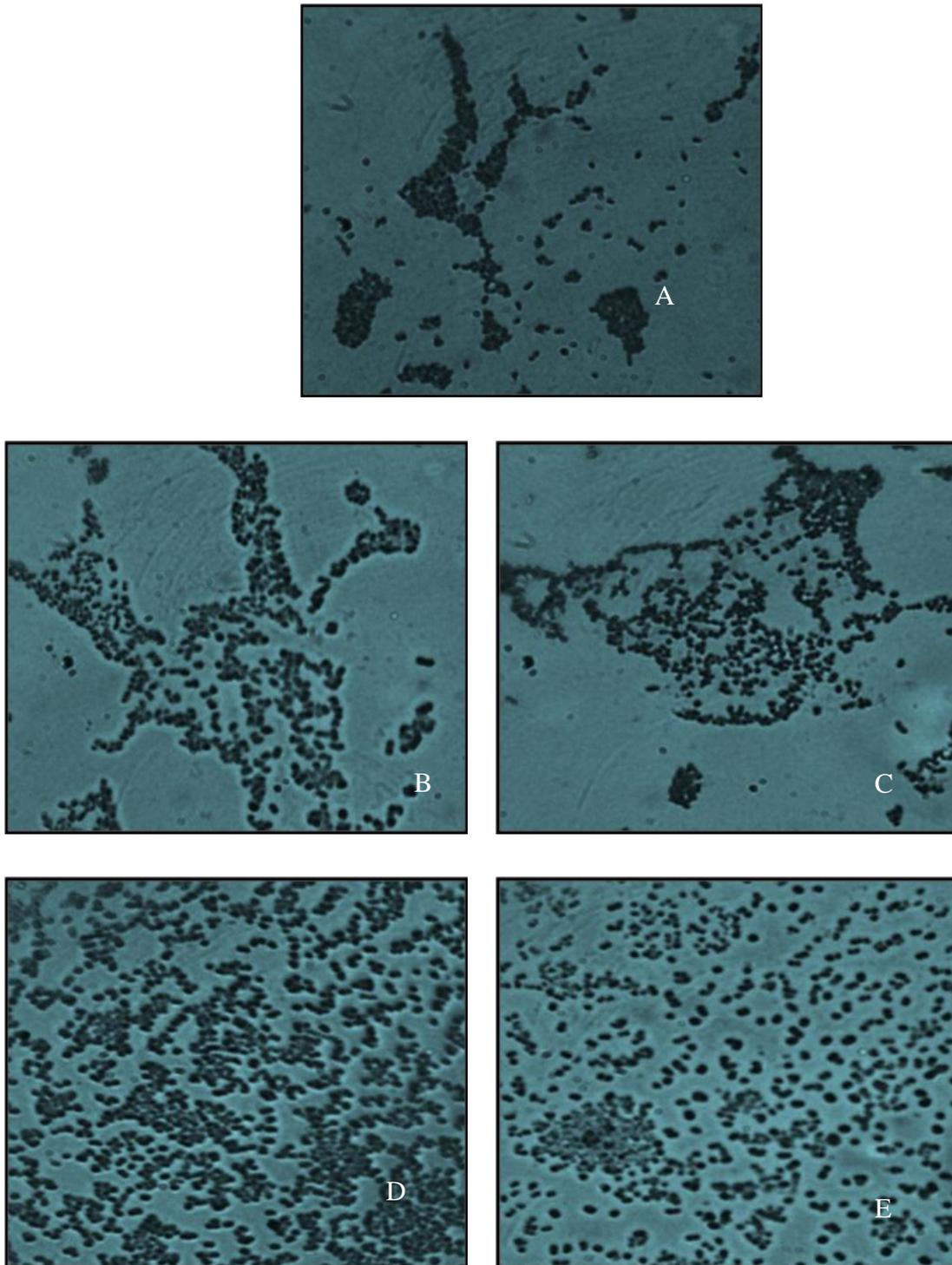
Figura 23 - Formação de biofilme em vidro pela cepa de *E. coli* K-12 BW9091 após 18 horas de incubação a 37°C



Legenda: A) A cepa BW9091 controle apresentando um biofilme forte; B) Cepa BW9091 tratada com 100 μM de FeCl₃ apresentando biofilme fraco e com presença de filamento. C) Cepa BW9091 tratada com 200 μM de FeCl₃ mostrando um biofilme fraco, D) Cepa BW9091 tratada com 100 μM de CuCl₂ mostrando um biofilme forte e E) Cepa BW9091 tratada com 200 μM de CuCl₂ mostrando um biofilme forte.

Nota: Aumento 1000X.

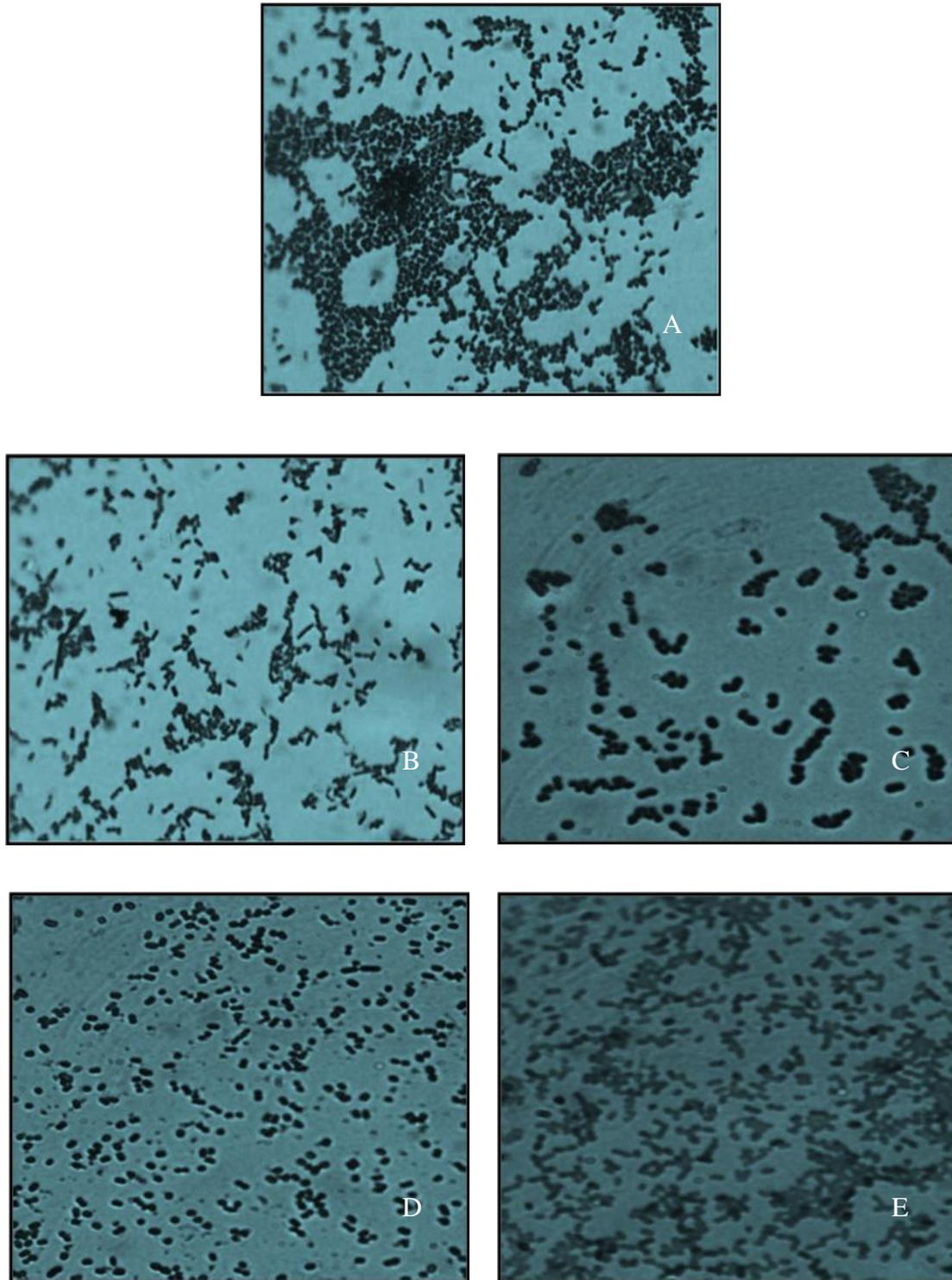
Figura 24- Formação de biofilme em vidro pela cepa de *E. coli*K-12 BW528 após 18 horas de incubação a 37°C.



Legenda: A) A cepa BW528 controle apresentando um biofilme fraco; B) Cepa BW528 tratada com 100µM de FeCl₃apresentando um biofilme fraco C) Cepa BW528 tratada com 200µM de FeCl₃mostrando um biofilme fraco, D) Cepa BW528 tratada com 100µM de CuCl₂ mostrando um biofilme forte e E)Cepa BW528 tratada com 200 µM de CuCl₂ mostrando um biofilme forte.

Nota: Aumento 1000X.

Figura 25 - Formação de biofilme em vidro pela cepa de *E. coli* K-12 BW535 após 18 horas de incubação a 37°C



Legenda: A) A cepa BW535 controle apresentando um biofilme forte; B) Cepa BW535 tratada com 100µM de FeCl₃ apresentando uma redução da formação de biofilme C) Cepa BW535 tratada com 100µM de FeCl₃ mostrando uma redução da formação de biofilme e D) Cepa BW535 tratada com 200µM 100µM de CuCl₂ mostrando uma redução da formação de biofilme e E) cepa BW535 tratada com de CuCl₂ apresentando redução de biofilme.

Nota: Aumento 1000X.

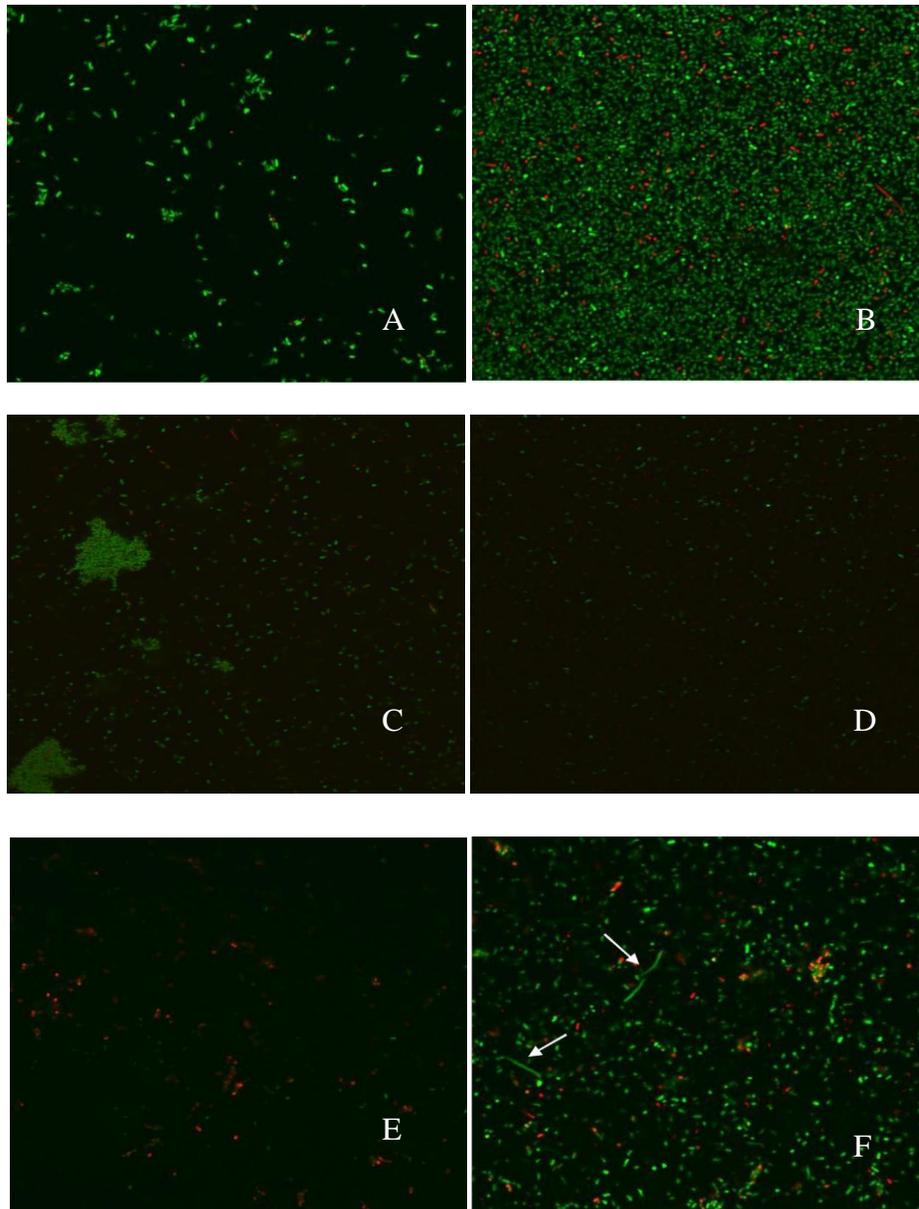
3.3 Viabilidade das bactérias nos biofilmes da *E. coli* k-12 formados na presença dos íons metálicos com o kit Film Tracer LIVE/DEAD

Quadro 2 - Viabilidade do biofilme

Cepas		Controle	Ferro	Cobre
AB1157	Vivas	82,1%	94%	66,3%
	Mortas	17,1%	5,9%	34,8%
BW528	Vivas	89,2%	70,8%	0%
	Mortas	10,7%	29,1%	100%
BW535	Vivas	62%	92,5%	72,1%
	Mortas	38%	7,4%	27,8%

A cepa selvagem AB1157 e o triplo mutante BW535 apresentaram aumento de biofilme na presença do FeCl_3 . O duplo mutante BW528 morreu quando tratada com CuCl_2 . O íon cobre mostrou-se extremamente tóxico para o duplo mutante ($\Delta xthA^-$ e nfo^-) e reduziu a viabilidade Para a cepa AB1157.

Figura 26- Micrografia confocal de varredura a laser ilustrando a viabilidade do biofilme formado em vidro por *E. coli* K-12 na presença de ferro após 18 horas de incubação a 37°C em DMEM

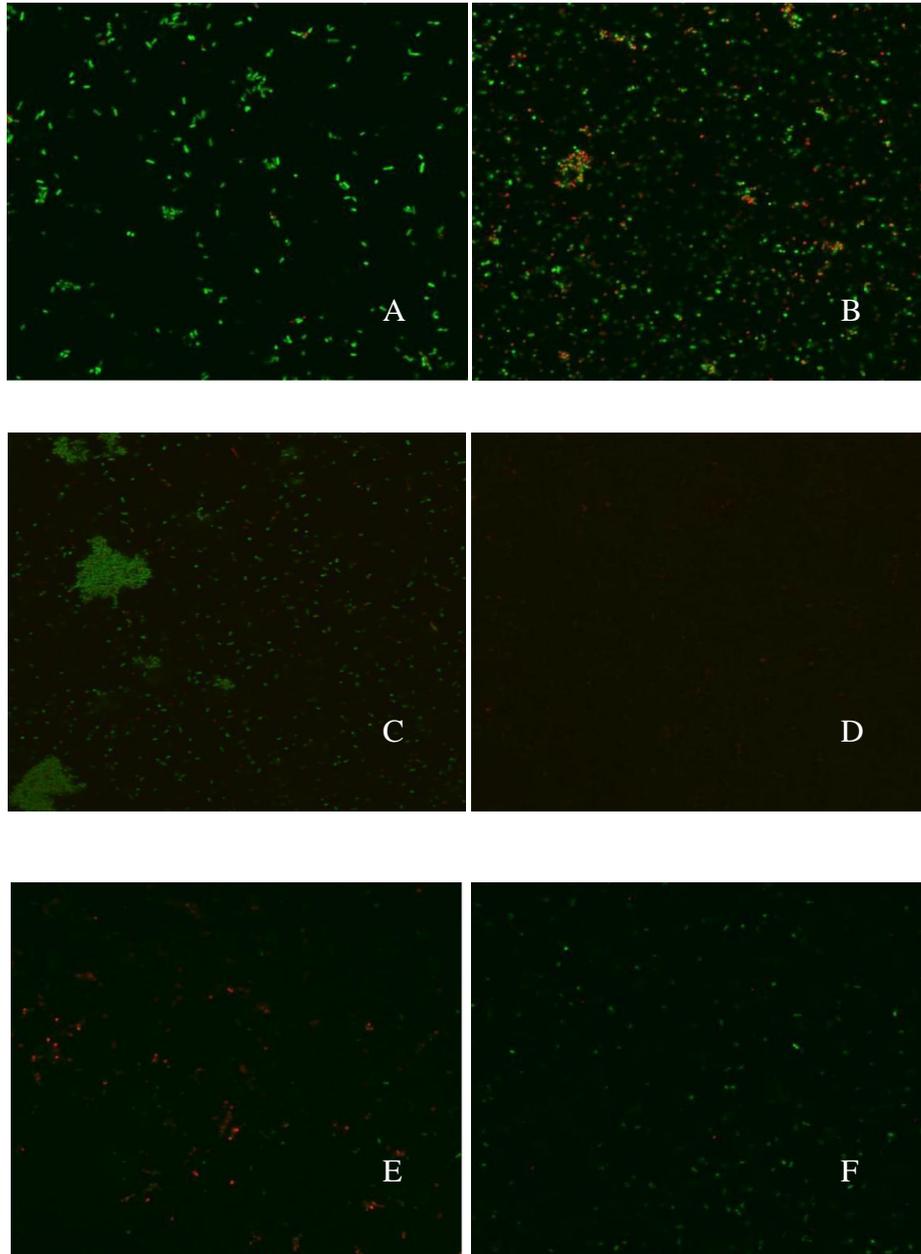


Legenda: Em (A) Cepa AB1157 na condição controle; (B) Cepa AB1157 na condição tratada com FeCl_3 ; (C) Cepa BW528 na condição controle; (D) BW528 na condição tratada com FeCl_3 ; (E) BW535 na condição controle; (F) Cepa BW535 na condição tratada com FeCl_3 apresentando filamentação.

Nota: Aumento 63X .

Fonte: Esse estudo

Figura 27- Micrografia confocal de varredura a laser ilustrando a viabilidade do biofilme formado em vidro por *E. coli* K-12 na presença de cobre após 18 horas de incubação a 37°C em DMEM



Legenda: Em (A) Cepa AB1157 na condição controle; (B) Cepa AB1157 na condição tratada com CuCl_2 ; (C) Cepa BW528 na condição controle; (D) BW528 na condição tratada com CuCl_2 ; (E) BW535 na condição controle; (F) Cepa BW535 na condição tratada com CuCl_2 .

Nota: Aumento 63X .

Fonte: Esse estudo.

Quadro 3 - Resultado dos testes qualitativo e quantitativo das cepas de EAEC

042				H9/3			
QUALIT.		QUANT.		QUALIT.		QUANT.	
FERRO 100µM	FORTE	FERRO 100µM	REDUÇÃO	FERRO 100µM	FRACO	FERRO 100µM	REDUÇÃO
FERRO 200µM	FORTE	FERRO 200µM	REDUÇÃO	FERRO 200µM	FORTE	FERRO 200µM	REDUÇÃO
COBRE 100µM	FRACO	COBRE 100µM	REDUÇÃO	COBRE 100µM	FORTE	COBRE 100µM	AUMENTO
COBRE 200µM	FORTE	COBRE 200µM	REDUÇÃO	COBRE 200µM	FRACO	COBRE 200µM	REDUÇÃO
H92/3				I49			
QUALIT.		QUANT.		QUALIT.		QUANT.	
FERRO 100µM	FORTE	FERRO 100µM	REDUÇÃO	FERRO 100µM	FRACO	FERRO 100µM	AUMENTO
FERRO 200µM	FORTE	FERRO 200µM	REDUÇÃO	FERRO 200µM	FRACO	FERRO 200µM	AUMENTO
COBRE 100µM	FRACO	COBRE 100µM	REDUÇÃO	COBRE 100µM	FRACO	COBRE 100µM	AUMENTO
COBRE 200µM	FRACO	COBRE 200µM	REDUÇÃO	COBRE 200µM	FRACO	COBRE 200µM	AUMENTO

A cepa I49 apresentou biofilme fraco no teste qualitativo e no teste de biofilme quantitativo apresentou aumento de biofilme nas concentrações de 100 µM e 200 µM de ferro e cobre.

Quadro 4 - Resultado dos testes qualitativo e quantitativo das cepas de UPEC

I64				9260			
QUALIT.		QUANT.		QUALIT.		QUANT.	
FERRO 100µM	FRACO	FERRO 100µM	REDUÇÃO	FERRO 100µM	AUMENTO	FERRO 100µM	AUMENTO
FERRO 200µM	FORTE	FERRO 200µM	REDUÇÃO	FERRO 200µM	FORTE	FERRO 200µM	AUMENTO
COBRE 100µM	FRACO	COBRE 100µM	REDUÇÃO	COBRE 100µM	AUMENTO	COBRE 100µM	AUMENTO
COBRE 200µM	FORTE	COBRE 200µM	REDUÇÃO	COBRE 200µM	FORTE	COBRE 200µM	AUMENTO
7104				666			
QUALIT.		QUANT.		QUALIT.		QUANT.	
FERRO 100µM	FRACO	FERRO 100µM	AUMENTO	FERRO 100µM	FRACO	FERRO 100µM	AUMENTO
FERRO 200µM	FRACO	FERRO 200µM	AUMENTO	FERRO 200µM	AUMENTO	FERRO 200µM	AUMENTO
COBRE 100µM	FRACO	COBRE 100µM	AUMENTO	COBRE 100µM	FRACO	COBRE 100µM	AUMENTO
COBRE 200µM	FRACO	COBRE 200µM	AUMENTO	COBRE 200µM	FORTE	COBRE 200µM	AUMENTO

A cepa 9260 apresentou aumento de biofilme nos testes qualitativo (vidro) e quantitativo (poliestireno) na presença dos íons ferro e cobre nas concentrações de 100µM e 200µM. Já a cepa 7104 apresentou biofilme fraco no teste qualitativo e aumento no teste de biofilme qualitativo nas concentrações de 100 µM e 200 µM dos íons ferro e cobre.

Quadro 5 - Resultado dos testes qualitativos e quantitativos das cepas de E. coli k-12

AB1157					BW528				
QUALIT.		QUANT.		VIAB.	QUALIT.		QUANT.		VIAB.
FERRO 100µM	FRACO	FERRO 100µM	AUMENTO	AUMENTO	FERRO 100µM	FRACO	FERRO 100µM	REDUÇÃO	REDUÇÃO
FERRO 200µM	FRACO	FERRO 200µM	AUMENTO		FERRO 200µM	FRACO	FERRO 200µM	REDUÇÃO	
COBRE 100µM	FRACO	COBRE 100µM	AUMENTO	REDUÇÃO	COBRE 100µM	FORTE	COBRE 100µM	AUMENTO	REDUÇÃO
COBRE 200µM	FRACO	COBRE 200µM	AUMENTO		COBRE 200µM	FORTE	COBRE 200µM	AUMENTO	
BW535					BW9091				
QUALIT.		QUANT.		VIAB.	QUALIT.		QUANT.		
FERRO 100µM	FRACO	FERRO 100µM	AUMENTO	AUMENTO	FERRO 100µM	FRACO	FERRO 100µM	REDUÇÃO	
FERRO 200µM	FRACO	FERRO 200µM	AUMENTO		FERRO 200µM	FRACO	FERRO 200µM	REDUÇÃO	
COBRE 100µM	FRACO	COBRE 100µM	AUMENTO	AUMENTO	COBRE 100µM	FORTE	COBRE 100µM	AUMENTO	
COBRE 200µM	FRACO	COBRE 200µM	AUMENTO		COBRE 200µM	FORTE	COBRE 200µM	AUMENTO	

As cepas AB1157 e BW535 apresentaram biofilme fraco em vidro e aumento de biofilme em poliestireno em todas as concentrações dos íons ferro e cobre.

As cepas utilizadas nesse estudo possuem a capacidade de formar biofilme em superfícies abióticas (vidro e poliestireno), porém essa habilidade em formar biofilme mostrou-se diferente em relação as amostras clínicas, ou seja, elas apresentaram uma maior formação de biofilme em vidro do que em poliestireno, pois as cepas de E. coli k-12 apresentaram maior formação de biofilme em poliestireno.

Podemos observar com isso que as superfícies podem influenciar na formação de biofilme tanto para as cepas clínicas quanto para as cepas mutantes.

Os resultados em que as cepas apresentaram tanto aumento quanto redução de biofilme em ambas as superfícies podem sugerir que elas estão apresentando resposta adaptativa ao substrato.

3.4 Teste de sensibilidade a antibióticos

O perfil de susceptibilidade a diferentes classes de antibióticos após o tratamento com soluções de íons metálicos foi avaliado para as cepas AB1157 (*Escherichia coli* K-12, cepa selvagem), para a cepa ATCC25922, EAEC 042, EAEC H9/3 e para as cepas UPEC I64/3, 666, 9260 e 7104. As cepas EAEC, *E. coli* K-12 e ATCC25922 foram originalmente sensíveis a todos os antibióticos testados (Tabela 2), já as cepas UPECs foram todas originalmente resistentes a ampicilina, a 7104 foi resistente também a amoxicilina/clavulanato, piperacilina/tazobactam, cefuroxima, cefoxitina, cefotaxima, ceftazidima, imipenen e meropenen, enquanto a 9260 tem o perfil intermediário para amoxicilina/clavulanato e piperacilina/tazobactam e resistente para cefuroxime, cefoxitina, cefotaxime e ceftazidime. Já a cepa I64/3 tem o perfil resistente para amoxicilina/clavulanato, piperacilina/tazobactam, trimetoprim e trimetoprim/sulfametaxazol, enquanto que a 666 tem o perfil intermediário para amoxicilina/clavulanato e resistente para piperacilina/tazobactam, trimetoprim e trimetoprim/sulfametaxazol (Tabela 2). Após o tratamento com a solução de íons metálicos de ferro, a cepa ATCC25922 apresentou uma mudança no perfil de sensibilidade de sensível para intermediário, para os antibióticos ampicilina e amoxicilina/clavulanato, já as cepas 9260 e I64/3 apresentaram uma mudança no perfil de intermediário para resistente para amoxicilina/clavulanato. A cepa 666 apresentou uma mudança no perfil de resistente para sensível após ser tratada com íons de ferro para piperacilina/tazobactam (Tabela 2). A cepa 9260 foi a que mais apresentou alterações no perfil de sensibilidade mudando de resistente para sensível para os antibióticos cefuroxima, cefoxitina, cefotaxima e ceftazidima, mudando de intermediário para sensível para piperacilina/tazobactam e mudando de sensível para resistente para trimetoprim e trimetoprim/sulfametaxazol. Por outro lado, 7104 foi o isolado que apresentou apenas uma alteração de sensível para resistente para ciprofloxacina. Quando analisamos as mudanças causadas pelo tratamento com íons de cobre, elas foram exatamente as mesmas para as cepas já citadas e antibióticos (Tabela 2).

Quadro 6 - Resultado do teste de susceptibilidade a diferentes antibióticos

Amostras	Ampicilina	Amox/Ác.Clav	Pip/Tazo	Cefuroxime	Cefoxitina	Cefotaxime	Ceftazidime	Imipenem	Meropenem	Gentamicina	Tobramicina	Ciprofloxacino	Fosfomicina	Nitrofurantoina	Colistina	Trimetoprim	Trimet/Sulfa	Polimixicim B	Tigeciclina
AB1157 controle	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
AB1157Ferro	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
AB1157 Cobre	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ATCC25922 Controle	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ATCC25922 Ferro	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ATCC25922 Cobre	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
7104 Controle	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
7104 Ferro	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
7104 Cobre	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
9260 Controle	R	I	I	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
9260 Ferro	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S
9260 Cobre	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S
I64 controle	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S
I64 Ferro	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S
I64 Cobre	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S
666 controle	R	I	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S
666 ferro	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S
666 cobre	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S
H9/3 controle	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
H9/3 ferro	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
H9/3 cobre	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
042 controle	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
042 ferro	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
042 cobre	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Legenda: S-sensível ao antibiótico testado, I-intermediário e R- resistente aos antibióticos testados.

Nota: Notar que as mudanças de perfil de sensibilidade estão indicadas com letras em vermelho e células destacadas em amarelo.

Fonte: Esse estudo.

4 DISCUSSÃO

A concentração de íons metálicos como o ferro são importantes para a sobrevivência bacteriana nos organismos hospedeiros (Perry et al., 2015, German et al., 2016) . O exemplo disto é que o corpo humano possui um sistema que restringe o ferro causando uma hipoferremia quando algum microrganismo invade o hospedeiro (Nakashige et al., 2015). A bactéria tem a capacidade de responder a essa redução de ferro ao acionar sistemas chamados de sideróforos capazes de realizar captação de ferro. Os genes que codificam os sideróforos são considerados genes de virulência (Micenková et al., 2017). A capacidade de captação de nutrientes vitais, incluindo os íons metálicos, pode ser indispensável para o estabelecimento dos processos infecciosos (Schmitt et al, 1995). Além da captação de ferro, a capacidade de formar biofilme também é um aspecto importante da virulência de muitos microrganismos e sinais ambientais como a disponibilidade de nutrientes regulam a formação de biofilme. O ferro é um nutriente importante que pode afetar a formação de biofilme em várias espécies bacterianas (Yun Wu and F. Wayne Outten, 2008). Backer e colaboradores (2010) demonstraram que o cobre nas concentrações de 100 μ M e 200 μ M provocam resposta adaptativa nos microrganismos, envolvendo várias respostas ao estresse e genes de virulência. A importância do equilíbrio de ferro na formação de biofilme pode ser conferida em um estudo com *Pseudomonas aeruginosa*, onde foi verificado que baixas concentrações de ferro no meio de crescimento inibiam a formação de biofilme, porém em altas concentrações o mesmo efeito foi observado (Yang et al., 2007).

Em trabalhos desenvolvidos por Alves et al. (2010) foi mostrado que nas cepas de *Escherichia coli* enteroagregativas (EAEC) a diminuição dos íons de ferro alterava a formação de biofilmes de forma distinta entre as cepas, havendo aumento na capacidade de formar biofilme quando os níveis de ferro estavam baixos para algumas cepas EAEC e alto para outras, o que levou à constatação que a restrição de ferro afeta de forma variável as cepas EAEC utilizadas no estudo. Em nossos resultados, também observamos que o biofilme é afetado de forma variável para diferentes cepas de EAEC. Entretanto todas as cepas de EAEC com exceção apenas da I49/3 apresentaram redução da formação de biofilme na presença do íon de ferro. Já a cepa I49/3 apresentou aumento significativo de biofilme quando tratada com 200 μ M de ferro. Quando avaliamos o efeito dos íons ferro e cobre, a 042 mostrou redução significativa na formação de biofilme nas concentrações testadas. A I49/3 apresentou aumento significativo na presença das soluções de cobre.

No trabalho realizado por Alves et al. (2010) foi demonstrado que a cepa I49/3 apresentou aumento de biofilme quando tratada com quelante de ferro, significando que essa cepa possui um aspecto diferente em relação as outras EAEC, pois mostrou-se ser mais invasiva e aderente na presença do ferro. A cepa I49/3 também mostrou-se susceptível à modulação da formação de biofilme. Quanto a formação de biofilme em vidro, observamos que a cepa I49/3 apresentou biofilme fraco quando tratada com as concentrações de ferro e cobre. A 042 apresentou biofilme forte nas concentrações de de 100 μM e 200 μM de ferro.

Propriedades físico-químicas das superfícies influenciam a aderência das cepas aos substratos favorecendo a interação nas superfícies de vidro e poliestireno (Rodrigues et al., 2009; Araújo et al., 2010). Bozzi et al. (2014) verificaram que os mutantes deficientes em enzimas que fazem parte do BER e o do SOS se comportam de maneira distinta na formação de biofilme. Desta forma, avaliamos se a interferência dos sistemas BER na resposta de formação de biofilme estariam relacionadas com danos no DNA causadas por uma maior produção de espécies reativas de oxigênio na presença de íons metálicos ferro e cobre. Ao realizarmos o teste de biofilme qualitativo observamos que a cepa selvagem AB1157 apresentou um biofilme fraco nas concentrações de 100 μM e 200 μM de ferro e cobre, porém com filamentação na concentração de 100 μM de cobre. Contudo, no teste quantitativo a cepa AB1157 apresentou aumento significativo nas concentrações de 100 μM e 200 μM de cobre, mostrando que provavelmente as diferenças de substrato de aderência em vidro (teste qualitativo) e poliestireno (biofilme quantitativo) estariam interferindo na formação de biofilme, uma vez que essas superfícies são dotadas de cargas distintas (Rodrigues et al., 2009). O mesmo foi observado com cepas EAEC tratadas com ferro e cobre, em que as superfícies de vidro e poliestireno também são responsáveis prováveis pelas diferenças observadas entre os dois testes (biofilme qualitativo e biofilme quantitativo) (Campos et al., 2015). O cobre é essencial para a sobrevivência bacteriana, pois atua em diversos mecanismos intracelulares, como co-fatores enzimáticos e outras diferentes funções, porém em altas concentrações ele pode ser tóxico para a célula (Kevin et al., 2009; Lemire et al., 2013). Campos (2015) mostrou que a superfície de interação é um fator determinante na formação de biofilme pelas cepas e com isso, também é capaz de alterar a influência dos íons metálicos na formação de biofilme. Rodrigues et al., 2009 mostraram que há uma relação entre as propriedades das superfícies e a aderência das cepas a esses substratos e quanto maior a hidrofobicidade da superfície e das células bacterianas, maior será a capacidade de aderir a esse substrato. Esses dados podem ajudar a explicar os diferentes resultados obtidos no biofilme formado em diferentes superfícies.

Já o triplo mutante *nfo*⁻, *nth*⁻, *xthA*, deficiente nas três enzimas de reparo exonuclease III, endonuclease IV e endonuclease III (BW535) apresentou aumento de biofilme significativo na concentração de 100 µM de cobre. As proteínas codificadas pelos genes *nfo*⁻ e *xth* possuem substratos comuns incluindo sítios abásicos. A proteína codificada por *xth* mostra 99% de atividade 5'AP e supõe-se que seja a principal AP endonuclease em *E.coli* (Takeuchi et al., 1994). Os mutantes *nfo*⁻ *xthA*⁻ de *E.coli* são sensíveis a agentes alquilantes e extremamente sensível ao H₂O₂. As respostas desses mutantes a agentes que lesam o DNA podem ser consequência de alguma diferença na especificidade de substratos ou da diferença dos níveis intracelulares dessas enzimas (Walace, 1998; & Li Baikun, 2004 & Rodrigues et al., 2009). É cogitado que a ausência dessas enzimas de reparo comprometem o reparo das lesões e que os íons ferro e cobre não comprometem com a formação de espécies reativas de oxigênio já que houve um aumento de biofilme quando tratado com os íons metálicos ferro e cobre no triplo mutante BW 535 e no duplo mutante BW528 houve redução de biofilme (teste qualitativo) sugerindo que esses íons metálicos podem ter sido tóxicos para o duplo mutante.

Trabalho realizado por Harrinson et al., (2006) demonstraram que mesmo na ausência da clivagem de *xth* e *nfo* a quebra de cadeia dupla eram formadas a partir de sítios AP e que está descoberta demonstra que existe uma via de reparação e/ou enzimática desconhecida para os locais onde ocorreram danos e que podem haver também múltiplos sistemas de reparação adjacentes em células que podem processar danos no DNA fortemente opostos em lesões letais. Em nosso trabalho foi mostrado que a cepa triplo mutante não apresentou comprometimento quanto ao aumento de biofilme, mesmo na ausência das enzimas reparadoras. Além disso, foi observada a presença de filamentos nas cepas AB1157 e BW9091, quando crescidas na presença de íons de ferro (biofilme quantitativo). O ferro participa da reação de Fenton que leva a produção de espécies reativas de oxigênio. Essas ERO podem levar a danos oxidativos no DNA. Esses danos podem induzir respostas de defesa pelas células bacterianas como o SOS. Estudos realizados por Janion et al., 2003 mostraram que o triplo mutante BW535 apresentou indução crônica da resposta SOS o que sugere que o acúmulo de sítios abásicos no DNA são responsáveis pela indução desse sistema. A filamentação é um dos resultados da resposta SOS. Portanto, a filamentação observada pode ter sido causada pela indução desse sistema conforme evidenciado por estudo prévio (Baharoglu and Mazel, 2014).

A UPEC é capaz de aderir e invadir as células do trato urinário através da pili tipo 1 (Schwan and Ding, 2017). A formação de biofilme protege a UPEC contra o efluxo do trato urinário, contra a fagocitose, contra os mecanismos de defesa do sistema imunológico do hospedeiro e contra a ação de antibióticos (Hanna et al., 2003). Em nossos resultados a UPEC 7104 apresentou aumento significativo de biofilme nas concentrações de 100 μ M e 200 μ M de cobre e a cepa 666 apresentou aumento significativo de biofilme nas concentrações de 200 μ M de ferro e 100 μ M e 200 μ M de cobre no teste de biofilme quantitativo. Já no teste de biofilme qualitativo a cepa 9260 apresentou biofilme forte na concentração de 200 μ M de cobre. O cobre já foi descrito como um metal tóxico em diferentes espécies de microrganismos, não apenas por participar da reação de Fenton gerando o radical hidroxil o qual leva a danos genotóxicos, mas também tem sido apontado como a causa da modificação da estrutura e fisiologia de comunidades bacterianas devido a sua capacidade de causar danos a membrana (Asad & Leitão, 1991). Estudo realizado por Koh Eun-Ik e colaboradores (2017) foi mostrado que a UPEC pode utilizar a yersiniabactina para resistir a toxicidade do cobre. Esse ligante de metal sequestra cobre extracelular formando o complexo cobre-yersiniabactina e em pequenas quantidades ybt libera esse cobre no interior da célula retornando ao meio externo para sequestrar mais cobre controlando assim os níveis tóxicos desse metal. Koh demonstrou ainda que este mecanismo utilizado pela bactéria pode ser benéfica quando cobre é escasso ou quando ybt converteu níveis tóxicos de cobre em Cu(II)-ybt.

A resistência aos agentes antimicrobianos é um grande problema de saúde pública mundial reduzindo a cada dia as opções de tratamento a infecções. Antimicrobianos estão sendo usados em muitos países como terapia e profilaxia de doenças infecciosas, na produção de alimentos e pela população muitas vezes sem orientação médica. No entanto, o uso indiscriminado de antibióticos pode resultar em seleção bacteriana levando a um aumento de resistência a esses agentes (Koga et al, 2015). Hözel et al, 2012, mostraram que os íons metálicos podem alterar o perfil de resistência a diferentes classes de antimicrobianos. Nossos resultados mostram que no grupo das UPEC houve aumento da sensibilidade da cepa de UPEC 666 quando tratada com os íons ferro e cobre junto com o antibiótico beta-lactâmico piperacilina/Tazobactam. A cepa 9260 apresentou aumento da sensibilidade quando tratada com os íons ferro e cobre juntamente com as cefalosporinas (cefuroxima, cefoxitina, cefotaxima e ceftazidime) e o ciprofloxacino. Já quando tratada com os íons ferro e cobre, a cepa 7104 apresentou resistência ao antibiótico ciprofloxacino e a cepa 9260 quando tratada

com esses íons apresentou resistência ao antibiótico da classe das Sulfonamidas (trimetoprima e trimetoprima/sulfametoxazol).

Rodrigues et al, 2015, mostram que o ferro pode aumentar a resistência a antimicrobianos em cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ao interagir com antimicrobianos catiônicos. Além disso, Kotova et al, 2014, em um estudo com *Escherichia coli*, mostraram que espécies reativas de oxigênio podem inibir a ação de alguns antimicrobianos regulando negativamente a ação do mesmos. Como já mencionado, o ferro e o cobre participam da reação de Fenton podendo gerar ERO. Esse fato pode explicar os resultados observados no perfil de resistência aos antimicrobianos alterado na presença desses íons metálicos. Concentrações subinibitórias de antibióticos induzem a expressão de genes de virulência tal como toxinas e adesinas em *E.coli* e *Staphylococcus aureus*. Há cepas que adquirem genes de resistência as quais codificam proteínas que ativamente expulsam a tetraciclina da célula e gene que codifica uma proteína que se liga ao ribossomo não permitindo a ação do antibiótico (Gutierrez et al.,2012).

Hözel et al, 2012 mostraram que existem basicamente três mecanismos pelos quais os íons metálicos podem influenciar o perfil de resistência a antimicrobianos. O primeiro é alterando a estabilidade desses antimicrobianos; o segundo mecanismo está pautado em danos à estrutura dos microrganismos aumentando a sensibilidade destes aos antimicrobianos; o terceiro mecanismo é a indução da expressão de genes responsáveis pelo efluxo e outros mecanismos de escape da ação de antimicrobianos. Nesse mesmo trabalho, realizado em 2012, foi possível associar altas concentrações de cobre ao aumento da resistência de *E. coli* a amoxicilina/ ácido clavulânico através da degradação desses antibióticos. A interação da tetraciclina com o DNA em presença do íon cobre indica que a adição desse íon aumenta a porcentagem de ligação da tetraciclina ao DNA. O complexo de tetraciclina formado com cobre promove a quebra da fita de DNA (Maia et al., 2010).

A influência dos íons metálicos no perfil de susceptibilidade a antimicrobianos é um processo complexo. Envolve diversos mecanismos, como a formação de complexos com esses antimicrobianos, que podem assim inibir a sua captação como no caso da Tetraciclina, ou pelo aumento da expressão de genes de bombas de efluxo. Os mecanismos podem estar vinculados a própria toxicidade dos metais influenciando e alterando a membrana das células bacterianas levando à redução da susceptibilidade aos antimicrobianos. Todas essas respostas também são dependentes da concentração a qual esses microrganismos são submetidos. Tal fato pode explicar as diferentes respostas encontradas nesse trabalho. As cepas deficientes em BER com as quais trabalhamos manifestam respostas diferentes à resistência a antibióticos e aderência

em superfície abiótica. Kohanski et al., 2010 demonstraram que o tratamento com concentrações subletais de alguns antibióticos (incluindo β -lactâmicos) resultam em multirresistência a antibacterianos, atribuída a formação de ERO que resultam em eventos de mutagênese nas células. Os β -lactâmicos também parecem induzir a resposta SOS em várias espécies de bactérias (Erill et al., 2007).

As UPEC possuem mecanismos que contribuem para a sua resistência como inativação de enzimas hidrolíticas pelas beta-lactamases e por enzimas aminoglicosidoacetiltransferase (Peleg and Hooper, 2010). Isso pode contribuir para o resultado no perfil de resistência dessas cepas.

Além de observarmos a formação de biofilme nos testes qualitativo e quantitativo na presença dos íons metálicos, analisamos também a formação de biofilme através do *Kit Film Tracer live/dead biofilmviability* onde observamos o número de células vivas e mortas através do programa Image-Pro. A cepa selvagem AB1157 e o mutante BW535 apresentaram aumento da viabilidade do biofilme na presença do ferro. O mutante BW535 apresentou aumento da viabilidade do biofilme na presença do cobre. O mutante BW535 apresentou filamentação na presença do ferro. O aumento e a diminuição da viabilidade do biofilme na maioria das cepas foram pequenos. Os mutantes BW528 na presença do cobre apresentou redução significativa da viabilidade, pois 100% das células bacteriana foram mortas. Nesse teste podemos observar que os íons metálicos alteram sensivelmente a viabilidade das cepas presentes no biofilme. Campos (2015) mostraram que o cobre foi o íon metálico que mais reduziu a viabilidade das amostras, o que ocorreu também nesse trabalho com as cepas de *E. coli* K-12. Isso mostra que além de afetar a formação de biofilme os íons metálicos também são capazes de alterar a viabilidade das cepas no biofilme. Nas cepas de EAEC 042 e H9/3 houve aumento da viabilidade na presença do ferro e redução da viabilidade na presença do cobre, pois 99% da cepa 042 morreu.

As estratégias de resistência bacteriana podem ser limitadas ao sequestro intracelular e extracelular do metal, redução da permeabilidade, alteração dos locais alvo, desintoxicação enzimática e efluxo dos íons metálicos (Hobman & Brown, 1997). Esses mecanismos de resistência são similares aos mecanismos de resistência a antibióticos (Courvalin, 2008). Os mecanismos de resposta ao estresse e o efluxo de antibióticos podem contribuir com a tolerância e resistência aos íons metálicos. Os mecanismos específicos de resistência aos íons metálicos são caracterizados por uma resposta específica do regulador de íons (Silver & Phung, 1996). A resistência cruzada é implementada por bomba de efluxo que expulsam os metais e os antibióticos da célula bacteriana. Neste caso a co-regulação de genes de expressão

de resistência a metais e genes de resistência a antibióticos são influenciadas pelo mesmo fator (Baker et al.,2006).

Os resultados obtidos nesse estudo evidenciaram que os íons metálicos interferem com a produção de biofilme em bactérias patogênicas, modulando a virulência desses microrganismos. Os íons cobre e ferro apresentam-se como uma possível estratégia de controle microbiano, uma vez que modulam o perfil de resistência aos antimicrobianos.

CONCLUSÕES

As cepas bacterianas foram capazes de formar biofilme em superfície abiótica na presença dos íons metálicos ferro e cobre.

Os íons ferro e cobre mostraram-se tóxicos para as cepas clínicas e mutantes tanto em vidro quanto em poliestireno nas concentrações de 100 μ M e 200 μ M, porém nas cepas clínicas houve mais redução de biofilme do que nas cepas mutantes em um período de 18 horas de incubação à 37⁰C.

Os íons ferro e cobre interferiram com a produção de biofilme em EAEC invasoras e UPEC, modulando a virulência desses patótipos.

A presença desses íons metálicos podem alterar a modulação do perfil de resistência para as cepas UPEC, pois a 9260 mostrou mudança no perfil quando tratada com o ferro e o cobre juntamente com as classes de cefalosporinas e o antibiótico ciprofloxacino.

A interferência dos íons metálicos ferro e cobre com a dinâmica da formação de biofilme e alteração do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos apontam para uma estratégia potencial desses compostos no controle e regulação dos mecanismos de virulência e resistência bacterianos.

REFERÊNCIAS

ALVES J.R et al. Iron-limited condition modulates biofilm formation and interaction with human epithelial cells of enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC). *J. Appl. Microbiol.* v. 108, n. 1, p. 246-55, Jan. 2010.

ANDERSEN T.E. et al. *Escherichia coli* Uropathogenesis *In Vitro*: Invasion, Cellular Escape, and Secondary Infection Analyzed in a Human Bladder. *Cell Infection Model. Infect Immun.* V.80, n.5, p. 1858–1867, May 2012.

ANDRADE E.R. et al. Consequência da produção das Espécies Reativas de Oxigênio na produção e principais mecanismos antioxidantes. *Ver.Bras.Reprod.Anim.*, Belo Horizonte, V. 34, n. 2, p. 79-85, Abr - June, 2010.

ANDREWS S.C.; ROBINSON A.K.; RODRIQUEZ Q.F. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* v. 27, n. 2-3, p. 215-37, June 2003.

ANDREWS S.C., Robinson A.K., Rodriguez Q.F. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* 2003. V. 27 n.2-3, p. 215-37. June 2003.

ARAÚJO E.A. et al. Aspectos coloidais da adesão de micro-organismos. *Quim. Nova*, v. 33 n. 9, p. 1940-1948, São Paulo 2010.

ASAD N.R., LEITÃO A.C. Effects of metal íon chelators on DNA strand breaks and inactivation produced by hydrogen peroxide in *E. coli*: Detection of iron independent lesions. *J..Bacteriol.* V. 173, n . 8, p. 2562-2568, Apr 1991.

BACHMANN B.J. Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12. *Bacteriol. Rev.* v. 36, n. 4, p.525-57, Dec 1972.

BAHAROGLU Z.; MAZEL D. SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. *FEM Microbiol. Rev.* v. 38, n. 6, p. 1126-1145, Nov 2014.

BAI A.J.; RAI V.R. Bacterial quorum sensing and food industry. *Comprehensive Reviews in food Science and Food Safety*, Amsterdam. V. 10, n. 3, p. 183-193. Apr 2011.

BAKER-AUSTIN C. et al. Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol.* V.14, n. 4, p. 176-82, Apr 2006.

BAKER J. et al. Copper stress induces a global stress response in *Staphylococcus aureus* and represses *sae* and *agr* expression and biofilm formation. *Appl Environ Microbiol.* V. 76, n. 1 p. 150-60, Jan 2010.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre gerações de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BELOIN C.; Roux A.; Ghigo J.M. *Escherichia coli* Biofilms. *Curr Top Microbiol immunol.* V. 322, p. 249-289, May 2008.

- BERGSTROM K.S. et al. Innate host responses to enteric bacterial pathogens: a balancing act between resistance and tolerance. *Cell Microbiol.* V. 14, p. n. 4, 475-484, Jan 2012.
- BLACK, R.E et al. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *Lancet* v. 375, n.9730,p. 1969–1987,June 2010.
- BLATTNER F.R. et al. The complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12.*Science* 05;v. 277, Issue 5331,p. 1453-62,Sep 1997.
- BOISEN, N. Et al. New adhesin of enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF family. *Infect. Immun.* V. 76, n. 7, p. 3281–3292, July2008.
- BOUCKENOOGHE, A.R. et al. Markers of enteric inflammation in enteroaggregative *Escherichia coli* diarrhea in travelers. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* V. 62, n. 6, p. 711–713, June 2000.
- BOZZI S.C. et al. Adherence to abiotic surface induces SOS response in *Escherichia coli* k-12 strains under aerobic and anaerobic conditions. *Microbiology.* V. 160, pt 9, p. 1964-73, Sept 2014.
- BRADFORD P.A. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat.*Clin Microbiol Rev* v. 49, n. 4p. 3062–3065 ,Oct 2001.
- BRITO B.G.; VIDOTTO M.C.; TAGLIARI K.C. Fatores de virulência presentes em amostras de *Escherichia coli* uropatogênicas – UPEC para suínos. *Cienc. rural* v. 34, n. 2, p. 645-652, mar-abr 2004.
- CAMPOS, C.C. Influência de íons metálicos na formação de biofilme e aderência a células eucariontes em *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC). 2015. 80 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.
- CAREY A.J et al. Urinary tract infection of mice to model human disease: Practicalities, implications and limitations. *CritRev Microbiol.* V. 42, n. 5,p. 780-99, Sept2016.
- COURVALIN, P. Predictable and unpredictable evolution of antibiotic resistance. *J Intern Med* v. 264, n. 4, p. 4–16, Jul 2008.
- CUNNINGHAM R.P. et al. Endonuclease IV (nfo) mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* V. 168, n. 3, p. 1120-7, Dec 1986.
- CZECZULIN, J.R et al. Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* V. 65, n. 10,p. 4135–4145, Oct 1997.
- CZERSKA M. et al. Today's oxidative stress markers. *Med Pr.* V. 66, p. 393-405, Sep 2015.

- DALLO S.F.; Weitão T. Bacteria under SOS evolve anticancer phenotypes. *Infect Agent Cancer*. V. 5, p. 3, Feb 2010.
- DANESE P.N. et al. . The outer membrane protein, antigen 43, mediates cell-interactions within *Escherichia coli* biofilms. *Mol Microbiol*. V. 37,n. 2; p. 424-32, July2000.
- DAVES D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov*. V. 2, n.2, p. 114-22, Fev 2003.
- DEL FIOLE F.S.; GROppo F.C.; MATTOS FILHO T.R. Bacterial resistance. *Rev. Bras. Med*. V. 57, n. 10, p.1129-1140, Jan 2000.
- DEMAIN A.L.; SANCHEZ S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *J. Antibiot*. V. 62, n. 1, p. 5-16, Jan 2009.
- DEMPLE B., HARRISON L., Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annu. Rev. Biochem*. V. 63, n. 1, p. 915-48, July 1994.
- DEPAS W.H et al. Iron induces bimodal population development *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U.S.A*. v. 110, n. 7, p.2629-34, Fev 2013.
- DONNELLY, M.A.; STEINER, T.S. Two nonadjacent regions in enteroaggregative *Escherichia coli* flagellin are required for activation of toll-like receptor 5. *J. Biol. Chem*. V. 277, n. 43, p.40456–40461, Oct 2002.
- DUBBS J.M.; MONGKOLSUK S. Peroxide-sensing transcriptional regulators in bacteria. *J Bacteriol*. V. 194, n. 20, p. 5495-503, Oct 2012.
- DURRER P. et al. Intestinal infection due to enteroaggregative *Escherichia coli* among human immunodeficiency virus-infected persons. *J. Infect. Dis*. V. 182, n. 5, p. 1540-1544, Nov 2000.
- ELUOZO S.N. Modeling the Rate of *E.coli* Transport Through Fluid Pressure in Homogeneous Fine Sand Formation in Coastal Area Port Harcourt, Niger Delta of Nigeria. *International Journal of Environmental Engineering Science and Technology Research*. V. 1, p. 60-69, 2013.
- ENNE V.I., DELSOL A.A., ROE J.M.; BENNET P.M. Evidence of antibiotic resistance gene silencing in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. V. 50, n. 9, p.3003-10, Sept2006.
- ERILL I., CAMPOY.S.; BARBÉ J. Aeons of distress: an evolutionary perspective on the bacterial SOS response. *FEMS Microbiol Rev*. v. 31, n. 36, p. 637-56, Nov 2007.
- FINALD J.; LAC G.; FILAIRE E. Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports med*. V. 36, p. 327-358. Apr 2006.

- FLORES-MIRELES A.L. et al. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment and treatment options. *Nat. Rev. Microbiol.* V. 13, n. 5, p. 269-84, May 2015.
- FRIEDBERG E.C. DNA damage and repair. *Nature.* V. 421, p. 436-40, Jan 2003.
- FRIDBERG E.C. DNA repair and mutagenesis. American society for microbiology, Washington DC, 2006.
- GERMANN et al. Microbiol Virulence and Interactions with metals. *Prog. Mol. Biol. Transl.* V. 142, p.27-49, May 2016.
- GUTIERREZ A. et al. β -lactam antibiotics promote bacterial mutagenesis via RpoS-mediated reduction in replication fidelity. *Nat. Comm.* V. 4, p. 1610, 2013.
- GUYER, D.M. et al. Identification of sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* V. 38, n. 1, p. 53–66, Oct 2000.
- LEVERSTEIN –VAN HALL M.A. et al. Evaluation of the Etest ESBL and the BD Phoenix, VITEK 1, and VITEK 2 Automated instruments for detection of extended-spectrum beta-lactamases in multiresistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *J Clin Microbiol.* V. 40, n. 10, p.3703-3711, Oct 2002.
- HANNA A. et al. Role of capsular colanic acid in adhesion of uropathogenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* V.69, n. 8, p. 4474-81, Aug 2003.
- HARRINGTON, S.M. et al. Aggregative adherence fimbriae contribute to the inflammatory response of epithelial cells infected with enteroaggregative *Escherichia coli*. *Cell Microbiol.* V. 7, n. 11, p. 1565–1578, Nov 2005.
- HARRINSON L. et al. Closely opposed apurinic/apyrimidinic sites are converted to double strand breaks in *Escherichia coli* even in the absence of exonuclease III, endonuclease IV, nucleotide excision repair and AP lyase cleavage. *Science* V. 5, n. 3, p. 324-335, Mar 2006.
- HASMAN H., CHAKRABORTY T.; KLEMM P. Antigen-43-mediated autoaggregation of *Escherichia coli* is blocked by frimbriation. *J. Bacteriol.* V. 181, n. 16, p. 4834-41, Aug 1999.
- HENDERSON, I.R. et al. Characterization of pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* V. 67, n. 11, p. 5587–5596, Nov 1999.
- HENNEQUIN C.; FORESTIER C. Influence of capsule and extended-spectrum beta-lactamases encoding plasmids upon *Klebsiella pneumoniae* adhesion. *Res. Microbiol.* V. 158, n. 4, p. 339-47, May 2007.
- HICKS, S., CANDY, D.C.; PHILLIPS, A.D. Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa in vitro. *Infect. Immun.* V. 64, n. 11, p. 4751–4760, Nov 1996.

- HITCHON C.;EL-GABALAWY H.S.Oxidation in rheumatoid arthritis. *Res Ther.* V. 6, n.6, p. 265-278, Oct 2004.
- HOBMAN, J.L.; BROWN, N.L. Bacterial mercury-resistance genes. *Met. Ions Biol. Syst.*V. 34, p. 527–568, 1997.
- HODGKINSON V.; PETRIS M. J. Copper homeostasis at the host-pathogen interface. *J. Biol. Chem.* V. 287, n. 17, p. 13549-55, Apr 2012.
- HOLZEL C. et al. Heavy metals in liquid pig manure in light of bacterial antimicrobial resistance. *Environ. Res.*V. 113, n. p. 21-27, Feb 2012.
- HOOD M.I.; SKAAR E.P. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. *Nat Rev Microbiol.* V. 10, n. 8,p. 525-37, Jul 2012.
- HOOPER L.V.; CORDON J.I.; Commensal Host-Bacterial Relationships in the Gut. *Science.* V. 292, n. 5519, p.1115-8, May 2001.
- HOSFIELD D.J. et al. Structure of the DNA repair enzyme endonuclease IV and its DNA complex: double-nucleotide flipping at abasic sites and three-metal-ion catalysis. *Cell.* V. 98,n. 3 p. 397-408, Aug 1999.
- HUANG D.B.et al. Enteroreggregative *Escherichia coli*: an emerging enteric pathogen.*Am. J. Gastroenterol.* V. 99, n. 2,p. 383-389, Feb 2004.
- HUANG, D. B.; DUPONT, H. L. Enteroreggregative *Escherichia coli*: an emerging pathogen in children. *Semin.Pediatr.Infect. Dis.* V. 15, n. 4, p. 266–271, Oct 2004.
- HUANG, D. B. Et al. Enteroreggregative *Escherichia coli* is a cause of acute diarrheal illness: a meta-analysis. *Clin. Infect. Dis.* V. 43, n.5, p. 556–563, Sep 2006.
- HUFNAGEL D.A.; DEPAS W.H.; CHAPMAN M.R. The biology of the *Escherichia coli* extracellular matrix. *Microbiol Spectr.* V. 3, n. 3, 2015.
- HUTTENER M. et al. Stringent response and AggR-dependent virulence regulation in the Enteroreggregative *Escherichia coli* Strain 042. *Front.Microbiol.* 10;v. 9, p.717. Apr 2018.
- IMLAY J.A., CHIN S.M.; LINN S. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro.*Science.* V. 240, n. 4852,p. 640-2, Apr 1998.
- JANION C. et al. *E. coli* BW535, a triple mutant for the DNA Repair Genes *xth*, *nth* and *nfo* Cronically Induces the SOS Response. *Environ Mol Mutagen.* V. 41, n. 4, p. 237-42. Apr 2003.
- JENSEN B.H. et al. Epidemiology and Clinical Manifestations of Enteroreggregative *Escherichia coli*.*Clin Microbiol. Rev.* V.27, n. 3, p. 614-30, Jul 2014.
- JONSSON R. et al.Noel aggregative adherence fimbria variant of enteroreggregative *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* V.83. n. 4, p. 1396–1405, Apr 2015.

JUSTICE S.S. et al. Filamentation by *Escherichia coli* subverts innate defenses during urinary tract infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* V. 103, n. 52, p. 19884-19889, Dec 2006.

JUSTICE S.S. et al. Differentiation and developmental pathways of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* V. 101, n. 5, p. 1333-1338, Feb 2004.

KAPER J.B.; NATARO J.P.; MOBLEY H.L. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev. Microbiol.* V. 2, n. 2, p. 123-40, Feb 2004.

KERINS S.M.; COLLINS R.; MCCARTHLY T.V. Characterization of an endonuclease IV 3'-5' exonuclease activity. *J Biol Chem.* V. 278, n. 5, p. 3048-54, Jan 2003.

KNAPP G.S.; TSAI J.W.; HU J.C. The oligomerization of OxyR in *Escherichia coli*. *Protein Sci.* V. 18, n.1, p. 101-7, Jan 2009.

KOGA V.L. et al. Comparison of antibiotic resistance and virulence factors among *Escherichia coli* isolated from conventional and free-range poultry. *Biomed Res. Int.* 2015, 2015: 618752 Article ID 618752, 8 pages.

KOH E.I. et al. Copper import in *Escherichia coli* by the yersiniabactin metallophore system. *Nat Chem Biol.* V. 13, p. 1016-1021, Jul 2017.

KOHANSKI M.A.; DEPRISTO M.A.; COLLINS J.J.A. Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. *Mol. Cell.* V.37, n. 3, p. 311-320, Feb 2010.

KOSTER W.A.B.C. transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B12. *Res Microbiol.* V. 152, n. 3-4, p. 291-301, Apr-may 2001.

KOTOVA V.IU et al. Inducible specific lux-biosensors for the detection of antibiotics: Construction and main parameters. *Apl. Biochem. Microbiol.* V. 50, n. 1, p. 98-103, Jan 2014.

KOUTSOLIOUTSOU A., PEÑA-LIOPS S., DEMPLE B. Constitutive SOxR mutations contribute to multiple-antibiotic resistance in clinical *Escherichia coli* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* V. 49, n. 7, p. 2746-2752. July 2005.

KROKAN H.E.; BJORAS M. Base excision repair. *Cold Spring Harb Perspective Biol.* V. 5, n. 4, a012583, Apr 2013.

KUMAR S.; VARELA M.F. Molecular mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. In book *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*, chapter: molecular mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. Ed: A.Mendez-vilas, p. 522-534, 2013.

KUZNETSOV N.A. et al. Conformational dynamics of DNA repair by *Escherichia coli* Endonuclease III. *J. Biol. Chem.* V. 290, n. 23, p. 14338-49, Jun 2015.

- LEMIRE J.A.; HARRISON J.J.; TURNER R.J. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nat Rev Microbiol.* V. 11, n. 6,p. 371-84,Jun 2013.
- LEVIN D.; SHAPIRO B.; DEMPLE. Metalloenzymes in DNA repair. *Escherichia coli endonuclease IV and Saccharomyces cerevisiae Apn1.* *J. Biol Chem.* V. 266, n. 34,p. 22893-8, Dec 1991.
- LEVY S.B. Antibiotic Resistance: Consequences of Inaction. *Clin. Infect Des.* 15;33 Suppl 3:S124-9, Sept 2001.
- LI B.;LOGAN B.E.Bacterial adhesion to glass and metal-oxide surfaces.*Colloids Surf B Biointerfaces.*V. 36, n. 2, p. 81-90, Jul 2004.
- LIGUORI I. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin. Interv. Aging.*v. 13, p. 757-772, 2018.
- MACOMBER, L.; RENSING, C.; IMLAY, J.A. Intracellular copper does not catalyze the formation of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.*V. 189, n. 5,p. 1616–1626, Mar 2007.
- MAGANA M. et al. Options and limitations in clinical investigation of bacterial biofilms. *Clin.Microbiol.Rev.* V. 31,n. 3.Apr 2018. doi: 10.1128/CMR.00084-16
- MAIA E.C.P., et al. Tetraciclina e gliciliclinas: uma visão geral. *Quim.Nova.* V. 33, n. 3, p. 700-706. São Paulo, 2010.
- MANN R. Metabolic Adaptations of Uropathogenic *E. coli* in the Urinary Tract. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* V. 7, Article 241. June 2017.
- MARONCLE N.; RICH C.; FORESTIER C. The role of *Klebsiella pneumoniae* urease in intestinal colonization and resistance to gastrointestinal stress.*Res Microbiol.* V. 157, n. 2,p. 184-93, Mar 2006.
- MARTINEZ J. J.et al. Type 1 pilus mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *EMBO J.* V. 19, n. 12, p. 2803-2812, Jun 2000.
- MILLER M.B.; BASSIER B.L. Quorum sensing in bacteria.*Annu Rev Microbiol.* V. 155, p. 165-99, Out 2001.
- MICENKOVÁ L. et al.Human *Escherichia coli* isolates from hemocultures: Septicemia linked to urogenital tract infections is caused by isolates harboring more virulence genes than bacteraemia linked to other conditions.*Int J Med Microbiol.*V. 307, n. 3, p. 182-189, Apr 2017.
- MOLLER A.K. et al. An *Escherichia coli* MG1655 lipopolysaccharide deeprough core mutant grows and survives in mouse cecal mucus but fails to colonize the mouse large intestine. *Infect. Immun.* V. 71, n. 4, p. 2142-2152, Apr 2003.
- MORIN N. et al. Characterization of the AggR Regulon in Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* V. 81, n. 1, p. 122 -132, Jan 2013.

MOON JY.; PARK JH.; KIM YB., Molecular epidemiological Characteristics of virulence factors on enteroaggregative E.coli. *Fems Microbiol Lett.* V. 253, n. 2, p. 215-20, Dec 2005.

NAKASHIGE T.G., ZHANG B., KREBS C.; NOLAN E.M. Human calprotectin is an iron-sequestering host-defense protein. *Nat Chem Biol.* V. 11, n. 10, p. 765-71, Oct 2015.

NATARO J.P.; KAPER J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* V. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.

NATARO J.P.; STEINER T.; GUERRANT R. L. Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis.* V. 4, n. 2, p. 251-261, Apr-Jun 1998.

NATARO, J. P. et al. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Pediatric. Infect. Dis. J.* V. 6, n. 9, p. 829–831, Sep 1987.

NATARO, J.P. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. *Curr. Opin. Gastroenterol.* V. 21, n. 1, p. 4–8, Jan 2005.

NATARO, J.P. et al. Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. *Infect. Immun.* V. 60, n. 6, p. 2297–2304, Jun 1992.

NAVARRO-GARCIA, F. et al. In vitro effects of a high-molecular-weight heat-labile enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* V. 66, n. 7, p. 3149–3154, Jul 1998.

NEELY W.L. et al. Essigmann. DNA polymerase V allows of toxic guanine oxidation products in vivo. *J. Biol. Chem.* V. 282, n. 17, p. 12741-505, Apr 2007.

NISHI, J. et al. The export of coat protein from enteroaggregative *Escherichia coli* by a specific ATP-binding cassette transporter system. *J. Biol. Chem.* V. 278, n. 46, p. 45680–45689, Nov 2003.

O'TOOLE G.; KAPLAN H. B.; KOLTER R., Biofilm formation as microbial development. *Reviw of Microbiology.* V. 54, n. 1, p. 49 - 79, Oct 2000.

OKHUYSEN, P.C. ; DUPONT, H.L. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC): A cause of acute and persistent diarrhea of worldwide importance. *J. Infect. Dis.* V. 202, n. 4, p. 503–505, Aug 2010.

PARSOT C. *Shigella* spp And Enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors. *FEM Microbiol Lett,* V. 252, n. 1, p. 11-18, Nov 2005.

PALMER L.D; SKAAR E.P. Transition metals and virulence in bacteria. *Annu Rev. Genet.* V. 23, n. 50, p. 67-91, Nov 2016.

PELEG A.Y.; HOOPER D.C. Infections acquired in hospitals due to Gram-negative bacteria. *N. Engl. J. Med.* V. 362, n. 19, p. 1804-13, May 2010.

PERRON K. et al. CzcR-CzcS, a two-component system involved in heavy metal and carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* V. 279, n. 10, p. 8761-8768, Mar 2004.

PERRY R.D.; BOBROV A.G.; FETHERSTON J.D. The role of transition metal transporters for iron, zinc, manganese, and copper in the pathogenesis of *Yersinia pestis*. *Metallomics.* V. 7, n. 6, p. 965-78. Jun 2015.

POMPOSIELLO P. J.; DEMPLE B. Global adjustment of microbial physiology during free radical stress. *Adv. Microb. Physiol.* V. 46, n. 2, p.319-341, Jan 2002.

PORCHERON G. et al. Iron, copper, zinc and manganese transport and regulation in pathogenic Enterobacteria: correlations between strains, site of infection and the relative importance of the different metal transport systems for virulence. *Front Cell Infect Microbiol.* V. 3, 90, Dec 2013.

POTRYKUS J.; WEGRZYN G. The Ypdl gene codes for a putative lipoprotein involved in the synthesis of colonic acid in *Escherichia coli*. *FEM Microbiol Lett.* V. 235, n. 2, p. 265-71, Jun 2004.

POOLE K. At the Nexus of Antibiotics and Metals: The Impact of Cu and Zn on Antibiotic Activity and Resistance. *Trends Microbiol.* V. 25, n. 10, p. 820 – 832, Oct 2017.

RAJAKUMAR, K.; SASAKAWA, C.; ADLER, B. Use of a novel approach, termed island probing, identifies the *Shigella flexneri* she pathogenicity island which encodes a homolog of the immunoglobulin A protease-like family of proteins. *Infect. Immun.* V. 65, n. 11, p. 4606–4614, Nov 1997.

REISNER A. et al. In vitro biofilm formation of commensal pathogenic *Escherichia coli* strains: impact of environmental and genetic factors. *J Bacteriol.* V. 188, n. 10, p. 3572-81, May 2006.

ROBINSON J.M. Phagocytic leukocytes and reactive oxygen species. *Histochem and Cell Biology.* V. 131, n. 4, p. 465-9, Apr 2009.

ROBINSON A.E.; HEFFERNAN J.R.; HENDERSEN J.P. The iron hand of uropathogenic *Escherichia coli*: the role of transition metal control in virulence. *Future Microbiol.* V. 13, p. 745-756, Jun 2018.

ROCHA D.P. et al. Coordenação de metais a antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. *Química nova.* V.34, n. 1, São Paulo 2011.

RODRIGUES, L.B. et al. Hydrophobicity and biofilm formation on polystyrene by salmonella heidelberg isolated from a poultry slaughterhouse. *Acta Sci Vet* V. 37, n. 3, p. 225-230, Jan 2009.

ROJAS-LOPEAS M. et al. Intestinal Pathogenic *Escherichia coli*: Insights for Vaccine Development. *Front Microbiol.* V. 9, p. 440. Mar 2018

ROMLING U. et al. Microbial biofilm formation: a need to act. *J. Intern. Med.* V. 276, n. 2, p. 98-110, Aug 2014.

ROWE M.C.; WITHERS H.L.; SWIFT S. Uropathogenic *Escherichia coli* forms biofilms aggregates upon thr supply iron. *FEMS Microbiol. lett.* V. 307, n. 1, p. 102-109, Jun 2010.

RUSSO T. A.; JOHNSON J. R. Proposal for a new inclusive designation for Extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Dis.* V. 181, n. 5, p. 1753-1754, May 2000.

SAITO Y. et al. Characterization od Endonuclease III (nth) and Endonuclease VIII (nei) mutants of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* V. 179, n. 11, p.3783-3785, Jun 1997.

SKAAR E.P. The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts. *Plos pathog.* V 6, n. 8: e1000949, 2010.

SAKAI A. et al. Impact of reactive oxygen species on spontaneous mutagenesis in *Escherichia coli*. *Genes cells.* V. 11, n. 7, p. 767-78, Jul 2006.

SARANTUYA, J. et al. Typical enteroaggregative *Escherichia coli* is the most prevalent pathotype among *E. coli* strains causing diarrhea in Mongolian children. *J. Clin. Microbiol.* V. 42, n. 1, p. 133–139, Jan 2004.

SAVARINO, S.J. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* V. 90, n. 7, p. 3093–3097, Apr 1993.

SCHMIDT H. et al. Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* V. 33, n. 3, p.701-705. Mar 1995.

SCHUBERT, S. et al. Prevalence of the highpathogenicity island of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. *Infect. Immun.* V. 66, n. 2, p. 480–485, Fev 1998.

SCHWAN W.R.; DING H. Temporal Regulation of fim Genes in Uropathogenic *Escherichia coli* during Infection of the Murine Urinary Tract. *J Pathog.* 2017. ID 8694356.

SHEIKH, J. et al. A novel dispersin protein in enteroaggregative *Escherichia coli*. *J. Clin. Invest.* V. 110, n. 9, p. 1329–1337, Nov 2002.

SILVA A.A.; GONÇALVES R.C. Espécies reativas de oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. *Ciência rural.* V. 40, n. 4, p.994-1002, Apr 2010.

SILVER, S.; PHUNG, L.T. Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annu Rev Microbiol.* V. 50, n. 1, p. 753–789, Oct 1996.

SKAAR E.P. The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts. *Plos pathog.* V. 6, n. 8, e1000949. Aug 2010.

SKURNIK D. et al. Integron-Associated Antibiotic Resistance and Phylogenetic Grouping of *Escherichia coli* Isolates from Healthy Subjects Free of Recent Antibiotic Exposure. *Antimicrob Agents Chemother.* V. 49, n. 7, p.3062-3065, Jul 2005.

SOUSA C.P. *Escherichia coli* as a specialized bacterial Pathogen. *Rev.Biologia e Ciências da Terra.* V. 6,n. 2, p. 341-352, 2006.

STEINER, T. S. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* expresses a novel flagellin that causes IL-8 release from intestinal epithelial cells. *J. Clin. Invest.* V. 105,n. 12, p.1769–1777, Jun 2000.

STEINER, T.S. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* produce intestinal inflammation and growth impairment and cause interleukin-8 release from intestinal epithelial cells. *J. Infect. Dis.* V. 177, n. 1, p.88–96, Jan 1998.

TAKEUCHI M. et al., Interactions of *Escherichia coli* Endonuclease IV and Exonuclease III with abasic sites in DNA. *J. Biol. Chem.* V. 269, n. 34, p. 21907-21914, Aug 1994.

TERLIZZI M.A.; GRIBAUDO G.; MAFFEI M.E. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Infection: Virulence Factors, Bladder Responses, Antibiotic, and Non-antibiotic Antimicrobial Strategies. *Front. Microbiol.* V. 8, p. 1566, 2017.

THAYER M. M. et al. Novel DNA binding motifs in the DNA repair enzyme endonuclease III crystal structure. *EMBO J.* V. 14, n. 16, p. 4108-20, Aug 1995.

TORTORA G.J.; FUNKE B.R.; CASE C.L. *Microbiologia 10a edição.* Ed. Artmed. PP 163-470, 2012.

TOXEL B.; HASSAN HM. Transcriptional regulation by ferric uptake regulator (Fur) in pathogenic bacteria. *Front cell Infect Microbiol.* V. 3, p. 59, Oct 2013.

TREEJ.J. et al. Copper sensitivity of *cueO* mutants of *Escherichia coli* K-12 and the biochemical suppression of this phenotype. *Biochem Biophys Res Commun.* V. 328, n. 4, p. 1205-1210, Mar 2005.

VIDAL O. et al. Isolation of an *Escherichia coli* K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: involvement of a new *ompR* allele that increases curli expression. *J Bacteriol.* V. 180, n. 9, p.2442-9, May 1998.

WALDRON K.J; ROBINSON N.J. How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? *Nat Rev Microbiol.* V. 7, n. 1, p. 25-35, Jan 2009.

WALSH C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature.* V. 406, n. 6797, p. 775-81, Aug 2000.

WALLACE S.S. Enzymatic processing of radiation-induced free radical damage in DNA. *Off. J. Radiat Research Society.* V. 150, n. 5, p. 60-79. Nov 1998.

WALLACE S.S; MURPHY D.L.; SWEASY J.B Base Excision Repair and cancer. *Cancer lett.* V. 327, n. 1-2, p. 73-83, Dec 2012.

WILES T.J.; KULESUS R. R.; MULVEY M.A. 2008.Origins and virulence mechanisms of uropathogenic Escherichia coli. *Exp. Mol. Pathol.* 85: 11-19, 2008.

WU Y.; OUTTEN F.W. IscR Controls-iron independent biofilm formation in Escherichia coli by regulating type I fimbria expression. *J Bacteriol.*V. 191, n. 4, p. 1248-57, Feb 2009.

YANG T.C.; LI CF.; CHOU C.C. Cell age, suspending medium and metal ion influence the susceptibility of Escherichia coli O157:H7 to water-soluble maltose chitosan derivative. *Int. J. Food Microbiol.* V. 113, n. 3, p.258-262, Feb 2007.

YU Z. et al. Antimicrobial resistance and its association with tolerance to heavy metals in agriculture production. *Food Microbiology.* V. 64,p. 23-32. 2017

ZAIM J.; KIERZEK A.M. The structure of full-length Lys-type transcriptional regulations. Modeling of the full-length OxyR transcriptional factor dimer. *Nucleic Acids Res.* V. 31, n. 5, p. 1444-54, Mar 2003.

ZHARKOV D.O. Base Excision DNA Repair. *Cell.Mol.Life Sci.* V. 65, n. 10, p. 1544-1565, May 2008.

ZHENG M.; STORZ G. Redox sensing by prokaryotic transcription factors. *Biochem Pharmacol.* V. 59, n. 1, p. 1-6, Jan 2000.