

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CRISTINA BEATRIZ AROCA RIBEIRO

**PERFIL PROTEÔMICO DE *ESCHERICHIA COLI* PRODUTORA DE TOXINA
SHIGA ESTIRPE M03 CULTIVADA NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DE SAIS
BILIARES E IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE
EXPRESSAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS MALDI-TOF**

CURITIBA

2012

CRISTINA BEATRIZ AROCA RIBEIRO

**PERFIL PROTEÔMICO DE *ESCHERICHIA COLI* PRODUTORA DE TOXINA
SHIGA ESTIRPE M03 CULTIVADA NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DE SAIS
BILIARES E IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE
EXPRESSAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS MALDI-ToF**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a Dra Cyntia M. T. Fadel Picheth

Co-orientador: Prof. Dr. Emanuel M. de Souza

CURITIBA

2012

TERMO DE APROVAÇÃO


CRISTINA BEATRIZ AROCA RIBEIRO

Título: PERFIL PROTEÔMICO DE *ESCHERICHIA COLI* PRODUTORA DE TOXINA SHIGA ESTIRPE M03 CULTIVADA NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DE SAIS BILIARES E IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI-TOF


Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutor, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Análises Clínicas.


Prof.^a Dr.^a Cyntia M. T. Fadel Picheth
Orientadora


Prof.^a Dr.^a Fabiane Gomes de Moraes Rego
Universidade Federal do Paraná,


Prof.^a Dr.^a Marise Fonseca dos Santos
Universidade Federal do Paraná (Campus Palotina)


Prof.^a Dr.^a Katia Sabrina Paludo
Universidade Estadual de Ponta Grossa


Prof. Dr. Marcelo Muller dos Santos
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 13 de dezembro de 2012.

Dedico este trabalho à minha família universal, em especial àqueles que mais intimamente tem me acompanhado nesta experiência terrena.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Pai Celestial, pelas bênçãos e amor infinitos.

Agradeço aos meus familiares, em especial aos meus pais Lourdes Aroca e Valter M. Ribeiro, meu irmão Valter L. A. Ribeiro e meu esposo Rafael Marquardt pelo amor, dedicação, paciência, companheirismo e exemplos de vida.

Agradeço a todos os professores com os quais tive contato e que muito contribuíram para a minha formação acadêmica e profissional; em especial aos professores Cyntia M. T. Fadel-Picheth e Emanuel M. de Souza pelas orientações e correções feitas para a concretização deste trabalho.

Agradeço aos meus amigos e colegas dos laboratórios de Bacteriologia Clínica, Biquímica Clínica e Proteômica da UFPR, por todo apoio, cumplicidade e incentivo.

Agradeço aos colegas e amigos de trabalho do Campus Palotina da UFPR pela compreensão e incentivo.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade da realização deste trabalho e em especial ao professor Roberto Pontarolo, coordenador deste programa, pelo incentivo e compreensão.

Agradeço a Capes pela bolsa Capes/Reuni concedida durante a maior parte do tempo de realização deste trabalho.

Agradeço a Fundação Araucária pelo suporte financeiro.

“Não é o que você faz, mas quanto amor você dedica ao que faz o que realmente importa”.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

Escherichia coli produtora de toxina Shiga (STEC) compreende estirpes diarreogênicas de *E. coli* que são caracterizadas pela produção de toxinas Shiga, seu principal fator de virulência. O objetivo deste trabalho foi determinar o perfil proteômico de STEC M03 crescida na presença e na ausência do sal biliar desoxicolato de sódio (DCS), sob baixos níveis de oxigênio, compará-lo ao de *E. coli* ATCC 25922, uma estirpe não diarreogênica e identificar as proteínas diferencialmente expressas. As bactérias foram crescidas em meio LB na ausência e na presença de 2,5 mM de DCS, e as células utilizadas para o preparo do extrato de proteínas. O padrão de expressão proteica das estirpes foi determinado através de eletroforese bi-dimensional. Foram realizados 4 ensaios independentes, cada um em duplicata, para cada estirpe. Os géis foram analisados com o programa ImageMaster. As proteínas que apresentaram expressão diferencial em presença de DCS, em ambas as estirpes, foram identificadas por espectrometria de massas do tipo MALDI-ToF/ToF-ToF. Em STEC M03 a proteína fator de alongação Tu (EF-TU) teve sua expressão induzida em presença de DCS. Essa proteína atua na síntese de proteínas e também como chaperona. Duas enzimas tiveram a expressão reprimida pelo DCS: fosfato acetiltransferase (Pta) e glicerol desidrogenase (GldA). A primeira enzima está envolvida no metabolismo do acetato, e GldA não tem sua função claramente definida em *E. coli*. Ambas já foram associadas com virulência. Nas condições avaliadas no presente estudo a enzima frutose bifosfato aldolase classe 2 (FbaA2) foi detectada apenas na estirpe M03. Essa enzima atua na via glicolítica e gliconeogênese. Em *E. coli* ATCC 25922 a proteína *Cold Shock Protein A* (CspA) teve sua expressão induzida pelo DCS. Dentre os papéis desempenhados por CspA destaca-se o de RNA chaperona. As enzimas: L-treonina desidratase (TdcB) e glicerofosforil diéster fosfodiesterase (GlpQ) tiveram a expressão reprimida pelo DCS. A primeira participa da degradação de aminoácidos e do metabolismo anaeróbico do propanoato/propionato, enquanto GlpQ participa do metabolismo de glicerofosfolipídeos e do glicerol. Nas condições do presente trabalho, pode-se concluir que as estirpes STEC M03 e *E. coli* ATCC 25922 apresentam respostas diferentes frente ao agente estressante DCS e que proteínas associadas com o metabolismo e sobrevivência tiveram sua expressão mais afetada.

Palavras-chave: *Escherichia coli*. STEC. Eletroforese 2D. Desoxicolato de sódio.

ABSTRACT

Escherichia coli Shiga toxin-producing (STEC) are diarrheagenic strains of *E. coli* characterized by production of Shiga toxins, their main virulence factor. The objective of this work was to determine the proteomic profile of the STEC *E. coli* M03 and *E. coli* ATCC 25922, a non-diarrheagenic strain, grown in the absence and in the presence of the biliar salt sodium deoxycholate (DOC) under low oxygen levels, and to identify the differentially expressed proteins. The bacteria were grown in LB medium in the absence and in the presence of 2.5 mM DOC, and cells were used to prepare the protein extract. The protein profile was determined using 2D-electrophoresis. Four independent assays, in duplicates, were performed for both strains. The 2D gels were analyzed with the software ImageMaster. The proteins that were differentially expressed in response to bile in both bacteria were identified using mass spectrometry MALDI-ToF/ToF-ToF. In STEC M03 the protein elongation factor Tu (EF-TU) was induced in the presence of DOC. This protein has a role in translation and also acts as a chaperone. Two enzymes were repressed by DOC: phosphate acetyltransferase (Pta) and glycerol dehydrogenase (GldA). The first is involved in the acetate metabolism, and the last has not its role clearly defined in *E. coli*. Both were also associated with virulence. In the conditions analyzed at this study, the enzyme fructose biphosphate aldolase class II (FbaA2), was detected only in strain M03. This enzyme acts in the gluconeogenesis and in the glycolysis. In *E. coli* ATCC 25922 DOC induced the expression of cold shock protein A (CspA). This protein have many cellular functions, one of them is the RNA chaperone activity. Yet in the same condition, this strain repressed the expression of two enzymes: L-threonine dehydratase (TdcB) and glycerophosphoryl diester phosphodiesterase (GlpQ). TdcB is involved in the amino acid degradation and anaerobic propanoate/propionate metabolism. GlpQ is involved in the glycerol and glycerophospholipids metabolisms. At this work conditions, we can conclude that STEC M03 and *E. coli* ATCC 25922 answered differently to the stress agent DOC. The proteins which more affected expression were metabolic enzymes and those related to survival.

Key words: *Escherichia coli*. STEC. 2D electrophoresis. Sodium deoxycholate.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – ETAPAS DA ANÁLISE PROTEÔMICA.....	28
ESQUEMA 1 - ATIVAÇÃO DAS CEPAS BACTERIANAS E ELABORAÇÃO DO PRÉ-INÓCULO.....	38
ESQUEMA 2 - AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DAS ESTIRPES STEC M03 E E. COLI ATCC 25922	39
ESQUEMA 3 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS INTRACELULARES	41
FIGURA 2 - SARCÓFAGOS UTILIZADOS PARA REIDRATAÇÃO DAS AMOSTRAS E SEQUENCIAL IEF EM APARELHO ETTAN IPG PHOR.....	42
FIGURA 3 - APARELHO EMPREGADO PARA A REALIZAÇÃO DAS IEF - ETTAN IPG PHOR.....	43
ESQUEMA 4 - EQUILÍBRIO DAS TIRAS DE IEF	44
FIGURA 4 - PCR MULTIPLEX PARA DETECÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA STX1 STX2 EAEÁ HLYA.	47
FIGURA 5 – PERFIL PROTEICO 1D DOS EXTRATOS CELULARES BACTERIANOS OBTIDOS NA CONDIÇÃO CONTROLE.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
FIGURA 6 - GEL 2D PH 3-10 DA FRAÇÃO SOLÚVEL DO EXTRATO PROTEICO DE STEC M03 CULTIVADA NA AUSÊNCIA DE DESOXICOLATO DE SÓDIO	50
FIGURA 7 - GEL 2D PH 3-10 DA FRAÇÃO SOLÚVEL DO EXTRATO PROTEICO DE STEC M03 CULTIVADA NA PRESENÇA DE 2,5 MM DE DESOXICOLATO DE SÓDIO.....	51
FIGURA 8 - GEL 2D PH 3-10 DA FRAÇÃO SOLÚVEL DO EXTRATO PROTEICO DE E. COLI ATCC 25922 CULTIVADA NA AUSÊNCIA DE DESOXICOLATO DE SÓDIO.....	52
FIGURA 9 - GEL 2D PH 3-10 DA FRAÇÃO SOLÚVEL DO EXTRATO PROTEICO DE E. COLI ATCC 25922 CULTIVADA NA PRESENÇA DE 2,5 MM DE DESOXICOLATO DE SÓDIO.....	53
FIGURA 10 - GEL 2D PH 4-7 DA FRAÇÃO SOLÚVEL DO EXTRATO PROTEICO DE STEC M03 CULTIVADA NA AUSÊNCIA DE DESOXICOLATO DE SÓDIO.	54
FIGURA 11 - GEL 2D PH 4-7 DA FRAÇÃO SOLÚVEL DO EXTRATO PROTEICO DE STEC M03 CULTIVADA NA PRESENÇA DE 2,5 MM DE DESOXICOLATO DE SÓDIO.....	55
FIGURA 12 - GEL 2D PH 4-7 DA FRAÇÃO SOLÚVEL DO EXTRATO PROTEICO DE E. COLI ATCC 25922 CULTIVADA NA AUSÊNCIA DE DESOXICOLATO DE SÓDIO.....	56
FIGURA 13 - GEL 2D PH 4-7 DA FRAÇÃO SOLÚVEL DO EXTRATO PROTEICO DE E. COLI ATCC 25922 CULTIVADA NA PRESENÇA DE 2,5 MM DE DESOXICOLATO DE SÓDIO.....	57
FIGURA 14 – GÉIS 2D DE STEC M03 COM PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS MARCADAS	64
FIGURA 15 - GÉIS 2D DE E. COLI ATCC 25922 COM PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS MARCADAS	71

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

TABELA 1 - PRINCIPAIS COMPONENTES E PROPRIEDADES DA BILE HUMANA.....	15
GRÁFICO 1 – CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO A $35 \pm 1^\circ\text{C}$ EM FUNÇÃO DA DENSIDADE ÓTICA EM 600NM.	48
GRÁFICO 2 – CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO A $35 \pm 1^\circ\text{C}$ EM FUNÇÃO DA CONTAGEM DO NÚMERO DE COLÔNIAS FORMADAS.	49
TABELA 2 – PORCENTAGEM MÉDIA DE SPOTS NOS GÉIS PH 3-10 DOS EXTRATOS PROTEICOS DE STEC M03	53
TABELA 3 - PORCENTAGEM MÉDIA DE SPOTS NOS GÉIS COM PH 3-10 DOS EXTRATOS PROTEICOS DE E. COLI ATCC 25922.	54
TABELA 4 – PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS POR STEC M03	65
TABELA 5 – PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS POR E. COLI ATCC 25922 NA CONDIÇÃO TESTE.....	70

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1. TRATO GASTROINTESTINAL	13
2.1.1. Intestinos	13
2.1.2. Bile	14
2.1.3. Diarreias de Origem Bacteriana	16
2.2. ANÁLISES PROTEÔMICAS	22
2.2.1. ELETROFORESE BIDIMENSIONAL	23
2.2.2. ESPECTROMETRIA DE MASSAS	25
2.2.3. PROGRAMAS PARA ANÁLISE DAS IMAGENS.....	26
3. OBJETIVOS	31
3.1. OBJETIVO GERAL	31
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4. JUSTIFICATIVA	32
5. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....	34
6. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
6.1. ESTIRPES UTILIZADAS.....	36
6.2. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) MULTIPLEX	36
6.3. DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES PARA PREPARO DA AMOSTRA	37
6.4. PREPARO DOS EXTRATOS PROTÉICOS DE <i>E. COLI</i> ATCC 25922 E STEC M03.....	39
6.5. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS NOS LISADOS CELULARES E EXTRATOS PROTEICOS DE <i>E. COLI</i> ATCC 25922 E STEC M03	40
6.6. ELETROFORESE BI-DIMENSIONAL (2D)	41
6.6.1. Primeira dimensão – Isoeletrofocalização (IEF)	42
6.6.2. Segunda dimensão - Eletroforese vertical	43
6.6.3. Visualização das proteínas.....	44
6.7. IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS.....	45
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
7.1. DETECÇÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA EM STEC M03	47
7.2. DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES PARA PREPARO DA AMOSTRA	48
7.3. ELETROFORESE BIDIMENSIONAL	50
7.4. IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS	58
8. CONCLUSÃO	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

1 INTRODUÇÃO

Para que um patógeno entérico seja bem sucedido em um processo infeccioso é necessário que ele responda aos sinais presentes no ambiente interno do hospedeiro e module adequadamente a expressão dos seus genes de virulência. Sabe-se que a bile pode atuar como um sinal ambiental, do mesmo modo que sinais clássicos como pH, osmolaridade e temperatura. Os patógenos entéricos podem responder à bile, expressando seus próprios mecanismos de patogenicidade. O conhecimento adquirido por meio das pesquisas realizadas com bile tem permitido uma melhor compreensão dos processos patológicos causados pelos patógenos entéricos (BEGLEY; GAHAN; HILL, 2005).

Escherichia coli produtora de toxina Shiga (STEC) é um patógeno entérico veiculado por alimentos que representa um sério problema de saúde pública em vários países (WHO/CSR/APH/98.8). A infecção causada por STEC decorre da ingestão de água e alimentos contaminados e pode se manifestar sob diferentes formas, algumas de evolução benigna e outras potencialmente fatais (BEERS e CAMERON, 1995; GRIFFIN e BOYCE, 1998; KUNTZ e KUNTZ, 1999; GOLDMAN e BENNETT, 2000). Atualmente não existe tratamento efetivo disponível para as infecções causadas por STEC. Vários relatos têm indicado que o uso de antimicrobianos pode levar ao agravamento do quadro clínico, não tendo estes medicamentos o emprego recomendado no tratamento das infecções causadas por STEC (MATSUSHIRO *et al.*, 1999; WONG *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2000).

Sendo assim, através deste projeto busca-se contribuir para o conhecimento sobre os mecanismos utilizados por STEC para provocar doença, analisando o comportamento da estirpe de *E. coli* M03 que foi a primeira STEC isolada no Estado do Paraná, a partir de fezes de uma criança com diarreia (DE TONI, 2004; DE TONI *et al.*, 2009). Para tanto, foram determinadas as proteínas diferencialmente expressas por este microrganismo em presença de bile e baixos níveis de oxigênio.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TRATO GASTROINTESTINAL

O sistema digestório é formado pelo tubo digestivo, longo e sinuoso com 10 a 12 metros de comprimento contendo a cavidade oral, esôfago, estômago, intestinos delgado e grosso, reto e ânus, e os anexos (glândulas salivares, fígado e pâncreas). Sua função é retirar dos alimentos ingeridos as moléculas necessárias para o desenvolvimento e manutenção do organismo. Além disso, as camadas mais internas do tubo digestivo constituem uma barreira protetora, entre o conteúdo do tubo digestivo, que pertence ao meio externo, e o meio interno do corpo (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999).

2.1.1. Intestinos

O intestino é um órgão complexo, altamente diferenciado para exercer as funções primárias de digestão, absorção e transporte dos nutrientes para o interior do organismo (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999; WECKER, 2010).

O intestino delgado mede cerca de 6 m e apresenta três regiões distintas: duodeno, jejuno e íleo (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999; WECKER, 2010). É recoberto por uma membrana mucosa com grande capacidade absorptiva em função da presença de estruturas como as vilosidades e microvilosidades, e é responsável pela digestão e absorção da maior parte dos nutrientes (SCHENK e KLIPSTEIN, 1972).

O intestino grosso mede cerca de 1,5 m de comprimento e é dividido em quatro partes principais: ceco, cólon, reto e ânus. Apresenta uma membrana mucosa lisa, sem pregas, exceto na porção retal (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999; WECKER, 2010). Suas principais funções são a absorção de água e sais e consequente formação do bolo fecal e produção de muco para lubrificação da superfície mucosa (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999; WECKER, 2010).

Uma fina camada de muco recobre as células intestinais, sendo composta por

moléculas de glicoproteínas, proteínas, glicolipídeos, lipídeos, açúcares e por uma glicoproteína de alto peso molecular, capaz de formar géis, denominada mucina. A camada de muco está em permanente processo de renovação (ATUMA *et al.*, 2001).

O trato gastrointestinal apresenta uma microbiota residente normal. Diversos tipos de bactérias são encontrados no trato gastrointestinal, porém têm distribuição heterogênea. No estômago e no intestino delgado o ambiente é desfavorável para a colonização e proliferação bacteriana, que é reduzida, pela ação bactericida do suco gástrico, da bile e da secreção pancreática, bem como pelo intenso peristaltismo do intestino delgado. No intestino grosso a população de anaeróbios assume particular importância. A enorme população bacteriana é composta predominantemente por anaeróbios obrigatórios, como bacteroides, bifidobactérias, fusobactérias e peptostreptococos, bem como por aeróbios obrigatórios e facultativos tais como lactobacilos e enterobactérias (CERUTTI e RESCIGNO, 2008).

O gênero *Escherichia* compreende bacilos gram negativos móveis e pertence à família *Enterobacteriaceae* (NATARO e KAPER, 1998). *E. coli* representa a espécie predominante dentre os aeróbios facultativos da microbiota intestinal humana. Existem, porém, muitas estirpes de *E. coli* patogênicas capazes de causar diversos tipos de infecções intestinais ou extra-intestinais em humanos (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Três tipos principais de síndromes clínicas podem ser desencadeados pelos patotipos de *E. coli*: enterite/diarreia, infecção do trato urinário e sepse/meningite (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Os patotipos de *E. coli* implicados em infecções do trato urinário, sepse e meningite tem sido denominados *E. coli* patogênica extraintestinal (EXPEC), e os associados com enterite/diarreia como *E. coli* diarreogênica (DEC) (SMITH; FRATAMICO; GUNTHER, 2007; RUSSO e JOHNSON, 2000).

2.1.2 Bile

O trato gastrointestinal produz agentes com atividade bactericida destacando-se as secreções gástricas e a bile (MERRITT e DONALDSON, 2009). A bile é uma mistura complexa de compostos orgânicos e inorgânicos (TABELA 1) com predomínio de sais biliares, fosfolipídios, colesterol, proteínas e bilirrubina (BEGLEY; GAHAN; HILL, 2005; ESTELLER, 2008).

TABELA 1 - PRINCIPAIS COMPONENTES E PROPRIEDADES DA BILE HUMANA

Constituinte/propriedade	Quantidade
Sódio	145 (mM)
Potássio	4 (mM)
Cloreto	90 (mM)
Sais biliares	40 (mM)
Colesterol	3 (mM)
Fosfolipídeos	7 (mM)
Peso seco	20 (mg/mL)
Osmolaridade	280 (mOsm/L)
pH	7,5 – 8,0

Adaptado de Bouchier, 1982.

Primeiramente os ácidos biliares (ácido cólico e quenodesoxicólico) são sintetizados no fígado a partir do colesterol (HOFMANN, 1999). Antes da secreção, os ácidos biliares são conjugados como N-acetil amidatos (ligação peptídica), principalmente com glicina (glicoconjugados) ou taurina (tauroconjugados) (HUIJGHEBAERT e HOFMANN, 1986; RIDLON; KANG; HYLEMON, 2006). Como conjugados os ácidos biliares têm característica de ácidos fortes. Eles encontram-se completamente ionizados em pH fisiológico e permanecem do lado de fora da bicamada lipídica das membranas celulares, a menos que exista um sistema de transporte disponível. Ácidos biliares não conjugados atravessam passivamente a bicamada lipídica e entram nas células. A velocidade de entrada desses ácidos biliares não conjugados é dependente do número de grupos hidroxila assim, os dihidroxilados atravessam rapidamente e os trihidroxilados muito mais lentamente (CABRAL *et al.*, 1987).

Durante a passagem pelo intestino os sais biliares conjugados podem sofrer transformações promovidas pela microbiota residente. Os produtos dessas transformações bacterianas são os sais biliares secundários (ácidos desoxicólico e litocólico) (RIDLON; KANG; HYLEMON, 2006; MONTE *et al.*, 2009).

Os sais biliares são moléculas anfipáticas que atuam como detergentes auxiliando na solubilização e digestão dos lipídeos e apresentam potentes propriedades antimicrobianas, fazendo parte do sistema de defesa do hospedeiro (HOFMANN e HAGEY, 2008).

Devido as suas propriedades a bile pode afetar os fosfolipídios e as proteínas das membranas celulares e interferir na homeostase celular. Além da atividade sobre as membranas celulares os ácidos biliares podem perturbar a estabilidade de macromoléculas (RNA, DNA), por meio de estresse oxidativo

(BEGLEY; GAHAN; HILL, 2005; MERRITT e DONALDSON, 2009). A dissociação intracelular de sais biliares pode levar a um estresse ácido e a movimentação de íons pode ter efeitos osmóticos (DE SMET *et al.*, 1995). Baixos níveis de bile também afetam as propriedades físico-químicas das superfícies celulares, tais como a hidrofobicidade e o potencial zeta (GOMEZ-ZAVAGLIA *et al.*, 2002; WAAR *et al.*, 2002).

Sendo de natureza complexa o estresse desencadeado pela bile, a tolerância das bactérias a este composto provavelmente envolve uma ampla variedade de proteínas, dentre as quais aquelas relacionadas com a síntese e proteção da membrana celular (THANASSI; CHENG e NIKAIDO, 1997; WIBBERNMEYER *et al.*, 2002), o reparo do DNA (PRIETO; RAMOS-MORALES; CASADESUS, 2004; KRISTOFFERSEN *et al.*, 2007), envolvidas no efluxo da bile (THANASSI; CHENG e NIKAIDO, 1997; LIN *et al.*, 2003; PROUTY *et al.*, 2004a; CERDA-MAIRA; RINGELBERG e TAYLOR, 2008), ou enzimas que modifiquem ou transformem os sais biliares também parecem possuir importante papel na resistência a esse agente estressante (BEGLEY; GAHAN; HILL, 2005).

Vários trabalhos apontam a bile como um sinal ambiental que controla a expressão de fatores relacionados com a colonização e virulência de muitas enterobactérias (PROUTY e GUNN, 2000; DE JESUS *et al.*, 2005; KRISTOFFERSEN *et al.*, 2007; TORRES *et al.*, 2007; MALIK-KALE; PARKER; KONKEL, 2008; HOUSE *et al.*, 2009).

2.1.3 Diarreias de Origem Bacteriana

A diarreia é a patologia mais comum que acomete a parte inferior do trato gastrointestinal. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a ocorrência de três ou mais evacuações líquidas ou semi-líquidas em quantidade moderada ou grande em 24 horas, caracteriza diarreia.

2.1.3.1. Etiologia das diarreias infecciosas bacterianas

São várias as bactérias consideradas enteropatogênicas, isto é, capazes de proliferar na superfície ou intimidade da mucosa intestinal provocando diarreia. Os

principais agentes das infecções intestinais são encontrados na família *Enterobacteriaceae* e nos gêneros *Campylobacter* e *Vibrio*. As *Enterobacteriaceae* reconhecidas associadas com diarreia são: *Escherichia coli* enteropatogênica clássica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* que adere difusamente (DAEC), *Shigella*, *Salmonella* e *Y. enterocolitica*.

Escherichia coli diarreogênicas

Provavelmente nenhuma espécie bacteriana é tão versátil em sua patogenicidade como *E. coli*. As estirpes diarreogênicas compreendem um grande número de grupos e tipos sorológicos; possuem características de virulência distintas, o que sugere que a espécie *E. coli*, é constituída por uma variedade relativamente grande de bactérias patogênicas (TRABULSI *et al.*, 1981).

Com relação às infecções intestinais, pelo menos seis categorias deste micro-organismo são conhecidas:

➤ *Escherichia coli* enteropatogênica clássica (EPEC) – causam diarreia em crianças com menos de 1 ano de idade. A razão da grande prevalência dessas EPEC nas crianças ainda permanece desconhecida, entretanto, a infecção é mais frequente e mais grave naquelas que não se alimentam de leite materno. O reservatório parece ser o próprio homem, e o mecanismo de transmissão da infecção, na comunidade, ainda não foi estabelecido. Em hospitais e berçários, a bactéria é transmitida por contato pessoal. Essas bactérias têm a característica de adesão íntima localizada formando microcolônias na superfície das células epiteliais intestinais provocando lesão nas microvilosidades (NATARO e KAPER, 1998; MELLIES; BARRON; CARMONA, 2007).

➤ *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) – produzem as chamadas enterotoxinas LT (termolábil) e ST (termoestável). Algumas estirpes produzem as duas toxinas. A termoestabilidade é definida pela retenção da atividade tóxica após incubação a 100°C, durante 30 minutos, enquanto a termolabilidade significa que a atividade da toxina é perdida nestas condições. A LT-1 é produzida por amostras de ETEC associadas ao homem e a LT-II tem sido encontrada em amostras de ETEC isoladas de alimentos e certos animais. As ETEC aderem às células da mucosa do intestino

delgado sem provocar qualquer alteração nas microvilosidades não penetrando no epitélio intestinal. Por esta razão as fezes dos pacientes afetados não apresentam leucócitos, sangue ou muco (NATARO e KAPER, 1998).

➤ *E. coli* enteroinvasora (EIEC) - correspondem a sorotipos bem definidos, caracterizados pelos seus antígenos O, geralmente são imóveis, lactose e lisina descarboxilase negativas. Atualmente são conhecidos 14 sorotipos de EIEC, são estreitamente relacionadas com *Shigella*, apresentando em comum muitas características bioquímicas, antigênicas, genéticas e de patogenicidade. São mais frequentes em crianças maiores de dois anos de idade e no adulto. A transmissão se faz pela ingestão de água e alimentos contaminados e contato pessoal. As infecções por EIEC costumam curar espontaneamente (NATARO e KAPER, 1998).

➤ *E. coli* enteroagregativa (EAEC) - formam um padrão agregativo de adesão, quando se associam com células Hep-2 ou Hela. São bastante frequentes nas fezes de crianças saudáveis e com diarreia aguda, no entanto trabalhos têm mostrado uma associação das EAEC com diarreia de duração de 7 a 14 dias (NATARO e KAPER, 1998)

➤ *E. coli* que adere difusamente (DAEC) – seu papel na diarreia é controverso, ainda não está totalmente comprovado (NATARO e KAPER, 1998).

➤ *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC)

Foi reconhecida como patogênica em 1982, quando foi isolada de pessoas envolvidas em um surto de colite hemorrágica e síndrome urêmica-hemolítica que ficou conhecida como a “Síndrome do hambúrguer”. Esta denominação foi devida ao fato de hambúrgueres mal assados terem sido implicados como agentes transmissores da bactéria. A bactéria isolada dos doentes e dos alimentos implicados como veículos, foi identificada como *E. coli* O157:H7, sorotipo raro até então. Em seguida foi verificado que essas bactérias eram capazes de produzir uma toxina que apresentava efeito citotóxico em células Vero, e que a mesma apresentava grande similaridade com a toxina produzida por *Shigella dysenteriae* tipo 1. A bactéria passou a ser denominada *E. coli* produtora de toxina Shiga. A produção dessas toxinas é o que caracteriza as STEC e as distingue dos demais

tipos de *E. coli*. Essas toxinas também representam o principal fator de virulência de STEC, são codificadas em bacteriófagos inseridos no cromossomo dessas bactérias. Existem dois tipos principais dessas toxinas: toxina Shiga tipo 1 (Stx1) e tipo 2 (Stx2). As STEC podem produzir um ou ambos os tipos de toxinas. Além dessas toxinas, vários outros fatores de virulência podem ser produzidos pelas STEC, mas diferente das Stx, os demais têm uma distribuição heterogênea entre as estirpes (PATON e PATON, 1998a; GYLES, 2006; MELLIES; BARRON; CARMONA, 2007).

A intimina é produto do gene *eaeA*, localizado em uma ilha de patogenicidade denominada LEE (*locus for enterocyte effacement*), que contém outros genes associados com virulência (McDANIEL *et al.*, 1995; PERNA *et al.*, 2001). A produção da intimina torna as estirpes de STEC capazes de aderir fortemente aos enterócitos e gerar lesões do tipo A/E (*attaching and effacing*) nos enterócitos. Essas lesões são caracterizadas por mudanças na estrutura da célula, degeneração das microvilosidades e a íntima adesão da bactéria à superfície intestinal. Abaixo do sítio de adesão da bactéria ocorre acúmulo de componentes do citoesqueleto, resultando na formação de estruturas em pedestal (McDANIEL *et al.*, 1995; FRANKEL *et al.*, 1998). A presença simultânea de *eae* e *stx₂*, gene que codifica Stx2 foi associada com quadros clínicos mais graves como colite hemorrágica e síndrome urêmico-hemolítica (BOERLIN *et al.*, 1999; WERBER *et al.*, 2003). Outras proteínas de adesão tais como Saa (STEC *autoagglutinating adhesin*), Iha (*IrgA homologue adhesin*), OmpA foram identificadas, mas o seu papel na patogênese de STEC ainda não é bem compreendido (PATON *et al.*, 2001; JENKINS *et al.*, 2003).

A enterohemolisina é outro fator de virulência, e a sua presença foi associada com doença mais severa, mas a maneira como contribui para a patogênese da STEC ainda não é bem compreendida. Uma possibilidade é que a hemoglobina liberada por sua ação sobre os eritrócitos sirva como fonte de ferro, estimulando o crescimento dessa bactéria no intestino. Outros prováveis fatores de virulência incluem a enzima bifuncional catalase peroxidase KatP e a serina protease EspP. A produção da EspP foi relacionada com a exacerbação da hemorragia, já que ela é capaz de clivar o fator de coagulação V *in vitro* (KARCH *et al.*, 1999). Outro fator que pode contribuir para a patogênese da diarreia aquosa verificada nos estágios iniciais da infecção, é a produção de uma enterotoxina estável ao calor denominada EAST1 que provavelmente atua na secreção intestinal

de água e eletrólitos agindo sobre o modulador fisiológico de sinalização intracelular GMPc (FASANO, 1998; GYLES, 2006).

A doença causada por STEC pode se manifestar como uma síndrome diarreica não complicada, colite hemorrágica, púrpura trombocitopênica trombótica e síndrome hemolítico-urêmica (BEERS e CAMERON, 1995; GRIFFIN e BOYCE, 1998; KUNTZ e KUNTZ, 1999; GOLDMAN e BENNETT, 2000; COOMBES *et al.*, 2008). A produção de toxina Shiga por STEC é o fator de virulência primário no desenvolvimento da síndrome hemolítico-urêmica, porém várias estirpes de STEC não O157:H7 produzem toxina Shiga e não causam esta síndrome; fato que sugere a existência de outros fatores de virulência necessários para o estabelecimento da patologia (COOMBES *et al.*, 2008). A virulência, na maioria dos patógenos bacterianos, é regulada pela aquisição de elementos genéticos móveis (bacteriófagos, transposons, plasmídeos e ilhas genéticas) (LAWRENCE, 2005). Assim, as ilhas de patogenicidade (PAIs) abrigam genes que codificam fatores de virulência durante a infecção ao hospedeiro (COOMBES *et al.*, 2008). Em STEC LEE (*locus of enterocyte effacement*) é uma ilha de patogenicidade que codifica um sistema de secreção do tipo III necessário ao desenvolvimento da lesão associada à patologia causada por esse micro-organismo (COOMBES *et al.*, 2008). Pesquisas no campo da genética e da epidemiologia têm identificado genes presentes em STEC não O157 associados com a virulência e desenvolvimento de doença severa em humanos (WICKHAM *et al.*, 2006). O sistema de secreção do tipo III atua como um determinante genético chave tanto para a colonização e persistência em animais reservatórios, quanto para a virulência em humanos após transmissão zoonótica (DZIVA *et al.*, 2004; GYLES, 2006).

A estirpe M03 (DE TONI *et al.*, 2004) foi a primeira STEC isolada de humanos no Estado do Paraná, em 2003, e desde então vem sendo estudada no Laboratório de Bacteriologia Clínica do departamento de Patologia Médica da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Pertence ao sorotipo O69:H11, e apresenta o genótipo *stx*₁ *eae* *hly* indicando a produção da toxina tipo Stx1, intimina e hemolisina.

2.1.3.2. Epidemiologia de STEC

STEC sorotipo O157:H7 tem sido causa de inúmeros surtos em países industrializados como os Estados Unidos, Inglaterra e Japão. Elas são veiculadas

principalmente por alimentos contaminados e representam um sério problema de saúde pública em vários países. Seu reservatório é o intestino de uma variedade de animais, principalmente bovinos (WHO/CSR/APH/98.8). Os principais veículos de STEC incluem carne crua ou mal passada, leite, queijo, verduras cruas e também produtos industrializados como maionese e sucos de fruta (PATON e PATON, 1998a).

A doença causada por STEC pode se manifestar como uma síndrome diarreica não complicada, colite hemorrágica, púrpura trombocitopênica trombótica e síndrome hemolítico-urêmica (BEERS e CAMERON, 1995; GRIFFIN e BOYCE, 1998; KUNTZ e KUNTZ, 1999; GOLDMAN e BENNETT, 2000; COOMBES *et al.*, 2008).

As complicações decorrentes da doença causada pelas STEC tais como: insuficiência renal crônica, hipertensão, entre outras, implicam na necessidade de recursos elevados para o tratamento, onerando o sistema de saúde pública por longos períodos (PATON e PATON, 1998a). A OMS classifica a identificação rápida de STEC não O157 virulentas como uma prioridade a saúde pública (WHO/CSR/APH/98.8). Não existe tratamento específico para as infecções causadas por STEC, e os antibióticos são contraindicados por estimular a síntese da toxina Shiga levando a uma piora no quadro clínico dos doentes (MATSUSHIRO *et al.*, 1999; WONG *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2000). As medidas para prevenir o surgimento de novos casos da doença na população dependem da identificação das STEC em amostras clínicas dos doentes e da identificação da fonte de transmissão (PATON e PATON, 1998a).

STEC não são pesquisadas na grande maioria dos laboratórios clínicos do país, fator associado com a falta de informações sobre a bactéria e também com as dificuldades para o diagnóstico, uma vez que métodos como cultivo celular, ensaios imunológicos ou moleculares são necessários para a sua detecção. Desta forma, casos de infecção por STEC não tem sido reconhecidos.

No Laboratório de Bacteriologia Clínica do Curso de Farmácia da UFPR a pesquisa de STEC utilizando métodos moleculares foi iniciada em 2003. Estudos realizados nesse laboratório mostraram uma elevada prevalência de STEC em fezes de gado bovino aparentemente saudável, de várias regiões do estado (PIGATTO, 2003; FARAH *et al.*, 2007), indicando a presença de uma fonte potencial de contaminação de alimentos e do ambiente. As STEC isoladas são

predominantemente não-O157 e fermentadoras do sorbitol. A maioria das estirpes produz toxina Stx2 sugerindo que são causas potenciais de doença mais grave como a colite hemorrágica ou síndrome urêmica-hemolítica (FARAH *et al.*, 2007). Ainda no Paraná, detectou-se a presença de STEC em pessoas com diarreia e em portadores saudáveis (DE TONI *et al.*, 2004; FIALHO, 2008). A estirpe M03 O69:H11 (DE TONI *et al.*, 2004) foi o primeiro isolado de humanos no estado, e apresenta o genótipo (*stx₁ eae hly*) mais encontrado entre as STEC de isolados humanos no país (VAZ *et al.*, 2004).

2.2 ANÁLISES PROTEÔMICAS

O termo proteoma surgiu nos anos 90 e designa o conjunto de proteínas expressas por um determinado genoma em condições específicas. A análise proteômica permite saber se e quando um produto gênico está sendo expresso, a concentração relativa desse produto e, por fim, as modificações que podem ocorrer nessas proteínas após a sua tradução. Tais informações não podem ser previstas com precisão a partir das sequências dos ácidos nucleicos, devido as modificações pós-traducionais das proteínas, diferenças na estabilidade de mRNAs e proteínas e às diferentes velocidades de regeneração (produção/degradação) destas moléculas (GRAHAM; ELLIOT; van EYK, 2005; SCHERL; SANCHEZ; HOCHSTRASSER, 2005).

As tecnologias proteômicas têm sido amplamente utilizadas para a investigação da expressão gênica e da fisiologia microbianas. Mesmo com o rápido avanço no sequenciamento de genomas bacterianos completos (FOURNIER; DRANCOURT; RAOULT, 2007; VAN SCHAİK e WILLEMS, 2010) a análise do proteoma bacteriano permanece de grande importância por fornecer informações não disponíveis a partir de estudos genômicos isoladamente (CASH, 2011). As análises de RNA (transcriptoma), também bastante difundidas nos últimos anos, não são capazes de refletir diretamente o conteúdo proteico de uma célula (GRAVES e HAYSTEAD, 2002).

A análise proteômica envolve outros aspectos além da simples listagem de proteínas e pode fornecer indícios substanciais quanto à organização e à dinâmica dos processos metabólicos, regulatórios e de sinalização através dos quais os microorganismos desenvolvem-se nos diferentes ambientes e sob as mais variadas

condições. Sendo assim, o conhecimento dos proteomas, além do mapeamento de intrincados caminhos metabólicos celulares, pode possibilitar a identificação de novos alvos farmacológicos, novas moléculas bioativas e marcadores biológicos para fins de diagnóstico clínico (GRAHAM; ELLIOT; VAN EYK, 2005).

2.2.1 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL

A eletroforese bidimensional (2D) é uma ferramenta poderosa, em se tratando de separação de proteínas. Essas são separadas de acordo com seu ponto isoelétrico na primeira dimensão, e de acordo com sua massa molecular, na segunda dimensão (KLOSE, 1975; SCHEELE, 1975).

A principal aplicação do 2D continua sendo a avaliação do perfil de expressão proteico. Sob este enfoque, a expressão proteica de quaisquer duas amostras pode ser quantitativa e qualitativamente comparada. A presença ou ausência de “spots” pode fornecer informações sobre a expressão diferencial das proteínas, enquanto a intensidade dos “spots” pode fornecer dados quantitativos sobre os níveis de expressão destas (GRAVES e HAYSTEAD, 2002).

2.2.1.1 Isoeletrofocalização

As proteínas podem ser separadas eletroforéticamente com base em seus conteúdos relativos de resíduos ácidos e básicos. O ponto isoelétrico (pI) de uma proteína é o pH no qual a sua carga global é zero. Nesse pH, sua mobilidade eletroforética é nula, já que z na equação (1) é igual a zero. Quando uma mistura de proteínas é submetida à eletroforese em gel com gradiente de pH e sem adição de dodecilsulfato de sódio (SDS), cada proteína move-se até atingir o valor de pH equivalente ao seu ponto isoelétrico.

$$\text{Equação (1)} \quad v = Ez/f$$

onde: v é a velocidade de migração de uma molécula, E é a força do campo elétrico, z é a carga da molécula e f é o coeficiente friccional.

As tiras de pH imobilizado utilizadas na isoeletrofocalização são formadas por uma matriz de derivados de acrilamida que sofrem ligação covalente a radicais (carboxila e amina/amida) que estabelecem e mantêm um gradiente de pH. Como vantagens essas tiras oferecem maior reprodutibilidade, por manter o gradiente de pH fixo na matriz de poliacrilamida, e maior resolução, pela formação de gradientes de pH estreitos chegando até a uma variação de pI de $0,01 \text{ cm}^{-1}$ (SPEICHER, 2004). Desta forma, na presença de um gradiente de pH imobilizado e sob o efeito de uma corrente elétrica, uma proteína com a soma de suas cargas negativa, por exemplo, se deslocará em direção ao ânodo até o ponto em que suas cargas se anulem pela interação com os radicais positivos imobilizados, sendo que esse ponto corresponderia a um valor de pH igual ao pI da proteína em questão (GE Healthcare, 2005).

A isoeletrofocalização pode ser combinada com a eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE) para obter separações de alta resolução. Através do acoplamento destas técnicas é possível separar mais de mil proteínas diferentes produzidas por *E. coli* (PASQUALI *et al.*, 1996; LINK; ROBISON; CHURCH, 1997; STRYER; TYMOCZKO; BERG, 2007; MAILLET *et al.*, 2007).

2.2.1.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

Toda molécula carregada eletricamente move-se em um campo elétrico. A força elétrica (Ez) arrasta as moléculas carregadas do polo positivo para o negativo contra a força de viscosidade ($f\eta$) resultado da fricção entre as moléculas em movimento e o meio (PÉREZ, 2000; STRYER; TYMOCZKO; BERG, 2007).

O coeficiente friccional depende tanto da forma e massa da molécula migrante quanto da viscosidade (η) do meio (PÉREZ, 2000; STRYER; TYMOCZKO;

BERG, 2007).

Separações eletroforéticas são normalmente realizadas em suporte de gel ou em suportes sólidos como papel. Pelas características de sua malha o gel serve como uma peneira molecular que favorece a separação. Moléculas que são pequenas quando comparadas aos poros do gel, movem-se prontamente através deste. Ao contrário, moléculas maiores que os poros do gel ficam praticamente imóveis. Moléculas de tamanho intermediário movem-se através do gel com velocidades variadas (STRYER; TYMOCZKO; BERG, 2007).

A separação das proteínas em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes e em presença de SDS, ocorre com base na massa das moléculas em análise. Isso porque, o SDS ao interagir com as moléculas desagregadas confere a elas carga negativa e impede que estas interajam entre si durante a separação. Proteínas com massas diferindo em torno de 2% podem ser separadas. Essa é uma técnica sensível, que pode detectar quantidades bastante pequenas dependendo do corante utilizado na revelação das bandas (STRYER; TYMOCZKO; BERG, 2007). As metodologias de coloração pela prata são bastante sensíveis permitindo visualizar 1-10ng de proteínas por “spot”, mas apresentam baixa reprodutibilidade, maior tempo de realização e normalmente não são compatíveis com as análises por espectrometria de massas, enquanto as metodologias de coloração por *Coomassie brilliant blue* (CBB) são simples, compatíveis com análises por espectrometria de massas e capazes de detectar cerca de 8-100ng de proteínas por “spot” (PENQUE, 2009).

2.2.2 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A espectrometria de massas é uma técnica para análise de formas ionizadas de moléculas em uma fase gasosa. Essa técnica é mais prontamente aplicável aos gases ou aos líquidos voláteis, que facilmente liberam íons na fase gasosa. As medições de massa são obtidas determinando-se quão prontamente um íon é acelerado em um campo elétrico. Considerando dois íons com a mesma carga total e massas diferentes, em um campo de força conhecida, a mesma força irá atuar

sobre cada íon. Entretanto, a aceleração do íon mais pesado, ocasionada por essa força, será menor de acordo com a terceira Lei de Newton ($F = ma$). Então, a medida da aceleração de um íon em um campo de força conhecida permite a determinação da massa desse íon (STRYER; TYMOCZKO; BERG, 2007; PENQUE, 2009).

Como as proteínas e peptídeos não são voláteis, a geração de uma concentração suficientemente alta de moléculas de proteína ionizadas, porém intactas, na fase de gás é um grande desafio. Dois métodos amplamente utilizados e que têm sido desenvolvidos para solucionar esse problema são: dessorção-ionização com laser assistida por matriz (MALDI) e ionização por eletrospray (ESI) (AEBERSOLD e MANN, 2003).

2.2.2.1 Dessorção-ionização com laser assistida por matriz (MALDI)

Neste método a proteína ou peptídeo em estudo é co-precipitado com um composto orgânico (matriz) que absorve a luz do laser em um determinado comprimento de onda. O pulso de um laser sobre a preparação expelle moléculas da superfície. Essas moléculas capturam elétrons assim que saem da matriz e, portanto partem como íons carregados negativamente (AEBERSOLD e MANN, 2003; CAÑAS *et al.*, 2006).

2.2.3 PROGRAMAS PARA ANÁLISE DAS IMAGENS

Programas (softwares) de análise de imagens facilitam muito os processos de comparação e determinação do proteoma. Atualmente existem vários programas diferentes de análises de imagens, como ImageMaster, Melanie, PDQuest, Phoretix, ProGenesis, entre outros que estão comercialmente disponíveis para análise de géis 2D (PENQUE, 2009).

2.2.4 BIOINFORMÁTICA

A partir das análises de espectrometria de massas dois tipos específicos de dados podem ser obtidos, (1) “impressão digital” dos peptídeos, que envolve a determinação das massas de todos os peptídeos trípticos e (2) sequência dos aminoácidos nos peptídeos (MS/MS). Os espectros de MS e MS/MS são empregados em buscas contra perfis de massas ou sequências proteicas em um banco de dados a fim de identificar a proteína de interesse utilizando algoritmos como o SEQUEST ou MASCOT. Ao utilizar um banco de dados, as proteínas candidatas são classificadas de acordo com a combinação de massas mais próxima à procurada, usando vários algoritmos de pontuação (AEBERSOLD e MANN, 2003; CAÑAS *et al.*, 2006; PENQUE, 2009).

A FIGURA 1 ilustra o processo global de análise envolvido nos estudos proteômicos.

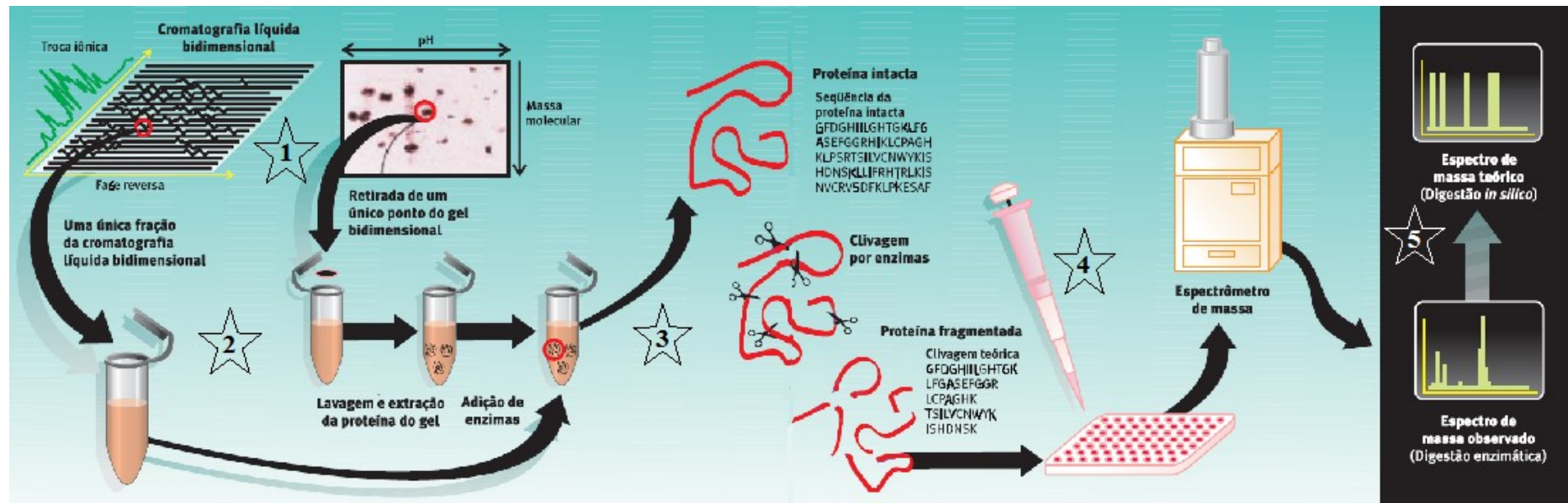


FIGURA 1 – ETAPAS DA ANÁLISE PROTEÔMICA.

1 – primeira etapa: separação das proteínas do extrato celular por cromatografia líquida bidimensional ou por eletroforese bidimensional; 2 – segunda etapa: coleta das frações ou “spots” de interesse; 3 – terceira etapa: digestão da(s) proteína(s) coletada(s) ou extraída(s) (do gel) e digestão com tripsina; 4 – quarta etapa: aplicação dos peptídeos provenientes da digestão da(s) proteína(s) da terceira etapa e análise por espectrometria de massas; 5 – quinta etapa: comparação dos espectros de massa observados contra bancos de dados com espectros de massa teóricos.

Fonte: adaptado de PIMENTA (2003).

2.2.5 APLICAÇÃO DAS ANÁLISES PROTEÔMICAS

As técnicas proteômicas podem ser aplicadas ao estudo da interação patógeno/hospedeiro ou para melhor conhecimento do patógeno isoladamente. As alterações na expressão proteica apresentadas pelos micro-organismos em função de seu contato com o hospedeiro ou com fatores associados ao hospedeiro têm cada vez mais chamando a atenção dos pesquisadores (TANAKA, 2010). Taddei e colaboradores (2011) avaliaram as diferenças na membrana externa de EPECs típicas e atípicas por meio de análises proteômicas e relataram a presença de 128 bandas proteicas específicas para EPEC atípica, sendo que 8 proteínas foram identificadas pertencendo a diferentes classes dentre proteínas envolvidas no metabolismo celular, regulação gênica, estrutura celular e outras. Walters e Mobley (2009) avaliaram a expressão de proteínas da superfície da membrana de *E. coli* uropatogênicas (UPEC) quando cultivadas em urina humana e em meio LB e identificaram 25 proteínas expressas apenas durante o cultivo em urina, sendo que 9 das 25 proteínas foram identificadas como pertencentes ao sistema de transporte de ferro ou como proteínas de virulência reguladas pelo ferro. Li e colaboradores (2004) analisaram o proteoma extracelular de EHEC EDL933 e de EPEC E2348/69 e identificaram um total de 33 proteínas diferencialmente expressas, sendo 3 exclusivas de EHEC (EspA, TagA e uma proteína hipotética) e 4 de EPEC (EspC, EspF, FliC e uma proteína relacionada ao profago CP-933V), na sua maioria componentes do sistema de secreção do tipo III (TTSS) responsável pela secreção de fatores de virulência que interajam diretamente com o hospedeiro. Nandakumar e colaboradores (2006) realizaram a análise proteômica das proteínas extracelulares de *E. coli* W3110 e identificaram 44 proteínas, predominantemente proteínas envolvidas no transporte e secreção de moléculas. Estudos envolvendo modelos animais objetivando elucidar as alterações induzidas pelo ambiente intestinal sobre estirpes de *E. coli* demonstraram que no ambiente intestinal esses micro-organismos utilizam simultaneamente vários dos carboidratos disponíveis no muco, além de aminoácidos (ALPERT *et al.*, 2009; FABICH *et al.*, 2008), sendo que as análises proteômicas dessas bactérias isoladas das fezes e do ceco de camundongos revelaram maior alteração na expressão de enzimas envolvidas com o metabolismo desses compostos (ALPERT *et al.*, 2009). Além desse fato foi constatado que

estirpes patogênicas, quando crescidas isoladamente em intestino de camundongo, utilizam os carboidratos em ordem de prioridade diferente daquela adotada por estirpes comensais, nas mesmas condições e quando, crescidas em conjunto, as estirpes de *E. coli* consomem carboidratos distintos (FABICH *et al.*, 2008).

O estudo do comportamento fisiológico de um patógeno em resposta a sinais presentes no hospedeiro é importante para a compreensão dos mecanismos que dirigem o processo patológico e fundamental para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico e tratamentos aprimorados. Patógenos microbianos interagem com seus hospedeiros em vários níveis ao longo do desenvolvimento da doença, não existindo um único gene ou proteína do patógeno que sozinho possa definir a habilidade bacteriana de causar doença (CASH, 2011).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar o padrão de proteínas diferencialmente expressas pela STEC M03 na presença e na ausência de sais biliares, sob baixos níveis de oxigênio.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o padrão de expressão de proteínas em *E. coli* M03 e em *E. coli* ATCC 25922 crescidas na presença e na ausência de sais biliares, sob baixos níveis de oxigênio.
- Comparar os padrões de expressão de proteínas nas duas bactérias.
- Identificar as proteínas diferencialmente expressas em STEC M03, em ambas as condições, utilizando espectrometria de massas.

4. JUSTIFICATIVA

Informações substanciais sobre a patogenicidade das STEC foram acumuladas nos últimos anos, no entanto o processo de patogênese dessas bactérias ainda não é totalmente compreendido. Para que um patógeno tenha sucesso na colonização do intestino humano, ele deve ser capaz de proliferar na presença de sais biliares e em baixas concentrações de oxigênio. Mapas proteômicos, das diversas frações proteicas, de *E. coli* não patogênica em condições aeróbias e anaeróbias e em condições de estresse osmótico já foram estabelecidos, e as proteínas expressas diferencialmente naquelas condições identificadas (WEBER; KÖL; JUNG, 2006).

Os sais biliares atuam de forma semelhante a detergentes, permeabilizando membranas bacterianas e causando dano celular (BEGLEY; GAHAN; HILL, 2005; DE BOEVER; VERSTRAETE, 1999). Nas bactérias gram negativas, pouca informação está disponível sobre a tolerância à bile, acredita-se que estas sejam inerentemente mais resistentes que as gram positivas, já que sais biliares são frequentemente utilizados nos meios seletivos para as primeiras. *E. coli* é considerada como resistente à bile e é frequentemente isolada da em ambientes com concentrações de bile moderada a alta, em animais e humanos.

A genética da resistência à bile ainda é pouco compreendida, embora várias alterações promovidas ao nível de membrana celular já tenham sido descritas para as estirpes patogênicas de *E. coli* (GRUENHEID *et al.*, 2004; SAINZ *et al.*, 2005; SCORZA *et al.*, 2008; WALTERS e MOBLEY, 2009; SHAMES *et al.*, 2010; SOMMER *et al.*, 2010; TADDEI *et al.*, 2011). Considerando a natureza complexa deste estresse, a habilidade de um organismo tolerar a bile requer presumivelmente a síntese de proteínas que controlam a estrutura da membrana celular, que fazem a manutenção da homeostase intracelular e nas bactérias patogênicas, a expressão daquelas associadas com virulência (BEGLEY; GAHAN; HILL, 2005).

Dessa forma, o desenvolvimento deste projeto poderá auxiliar no esclarecimento dos mecanismos moleculares que determinam a tolerância à bile, bem como o efeito dessa substância sobre a expressão de fatores de virulência de STEC, contribuindo para a compreensão do processo de patogênese dessa bactéria

e eventualmente levar ao desenvolvimento de novas alternativas diagnósticas, para prevenção ou terapia antibacteriana.

5. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

As estirpes de *E. coli* patogênicas extra-intestinais (ExPEC) são, em sua maioria, oriundas da microbiota intestinal de seus hospedeiros (SMITH; FRATAMICO; GUNTHER, 2007; SANTOS *et. al.*, 2009). Segundo informações fornecidas pela American Type Culture Colection *E. coli* ATCC 25922 é um isolado clínico de ExPEC, pertence ao sorogrupo O6, produz alfa hemolisina e não produz toxina Shiga.

Um primeiro passo comum nas análises proteômicas de um patógeno bacteriano é a identificação de biomarcadores de virulência por meio da comparação entre isolados bacterianos virulentos e não virulentos (CASH, 2011). Geralmente, extratos proteicos celulares totais obtidos a partir de isolados bacterianos clínicos, exibindo diferenças em termos de virulência, são comparados visando correlacionar as proteínas expressas com a virulência bacteriana (HANSEN; WILSON; BASEMAN, 1979; THONGBOONKERD *et al.*, 2009).

Para tanto realizamos os seguintes procedimentos:

1. Estabelecimento das condições de cultivo, na presença e na ausência de 2,5 mM de desoxicolato de sódio, para a obtenção do extrato proteico;
2. Obtenção de 4 replicatas biológicas dos extratos proteicos celulares em duplicata, da cepa enteropatogênica (STEC M03) e da cepa controle não enteropatogênica (*E. coli* ATCC 25922);
3. Obtenção de géis bi-dimensionais pH 3-10 dos extratos proteicos celulares de ambas as cepas e em ambas as condições de cultivo;
4. Avaliação do perfil proteico obtido a partir dos géis bi-dimensionais pH 3-10 para determinação da melhor faixa para a visualização das proteínas diferencialmente expressas pelas cepas estudadas;
5. Obtenção de géis bi-dimensionais pH 4-7 dos extratos proteicos celulares de ambas as cepas e em ambas as condições de cultivo;
6. Comparação dos perfis proteicos celulares de STEC M03 em ambas as condições de cultivo para determinação das proteínas diferencialmente

expressas e que pudessem caracterizar a resposta de STEC M03 ao desoxiclotato de sódio;

7. Comparação dos perfis proteicos celulares de *E. coli* ATCC 25922 em ambas as condições de cultivo, para determinação das proteínas diferencialmente expressas que pudessem caracterizar a resposta de uma *E. coli* não enteropatogênica ao desoxiclotato de sódio;
8. Comparação dos perfis proteicos celulares de STEC M03 e *E. coli* ATCC 25922 cultivadas na presença e na ausência do sal biliar para determinação das proteínas diferencialmente expressas pela estirpe enteropatogênica em função da presença do sal biliar;
9. Identificação por espectrometria de massas do tipo MALDI-ToF/ToF-ToF das proteínas diferencialmente expressas pelas estirpes avaliadas.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1. ESTIRPES UTILIZADAS

- STEC M03: sorotipo O69:H11

genótipo *stx*₁ *eaeA* *hlyA*.

Foi a primeira STEC isolada de fezes de criança com diarreia, no Estado do Paraná (DE TONI *et al.*, 2004; DE TONI *et al.*, 2009). Fonte: bacterioteca do Laboratório de Bacteriologia Clínica e Biologia Molecular (UFPR).

- *E. coli* ATCC 25922 sorogrupo O6

genótipo *stx*⁻ *eaeA*⁻ *hlyA*⁻ (não produtora de toxina Shiga, intimina e enterohemolisina).

Fonte: a bactéria foi adquirida comercialmente da ATCC. Outras denominações: DSM 1103, NCBI 12210.

As estirpes foram reativadas conforme indicado no Esquema 1.

6.2. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) MULTIPLEX

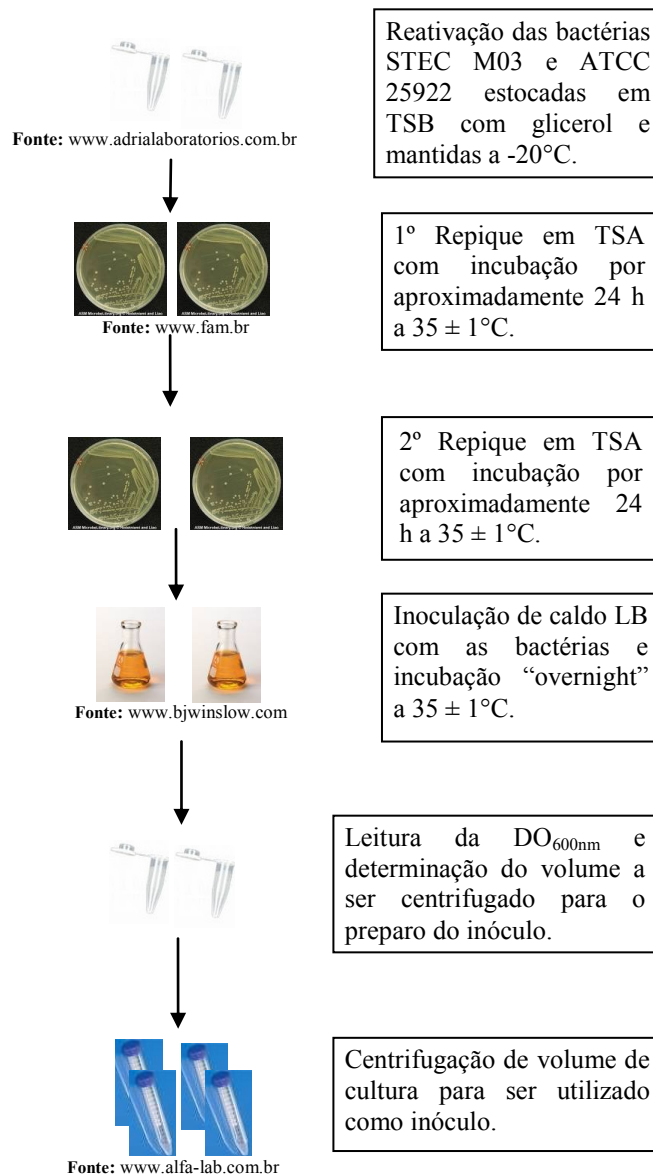
Foi realizada PCR multiplex de ambas as estirpes de *E. coli* empregadas neste trabalho para a confirmação do genótipo, quanto aos genes *stx*₁, *stx*₂, *eaeA* e *hlyA*. A metodologia empregada na realização desta análise encontra-se descrita por PATON e PATON (1998b). Quatro microlitros dos extratos de DNA bacterianos foram utilizados para reação de PCR realizada em um volume final de 50 µL. A mistura de reação continha 2,5 U de *Taq* DNA polimerase, tampão de *Taq* 1X, MgCl₂ 1,5 mM, 300 nM de cada iniciador (*primer*) e 200 µM de dNTP. Para a PCR foi utilizado o seguinte programa: 1 ciclo a 94°C por 5 min.; 10 ciclos de 94°C por 1 min., 65°C por 1 min. e 72°C por 1 min. Após esses ciclos a temperatura de anelamento foi reduzida em 1°C por ciclo até 60°C e então foram realizados mais 20 ciclos de 94°C por 1 min, 60°C por 1 min. e 72°C por 1 min. (DE TONI, 2004). O produto da PCR multiplex foi visualizado por meio de eletroforese em gel de agarose a 2,5%,

tampão TBE 1X, 35 V por 3 horas.

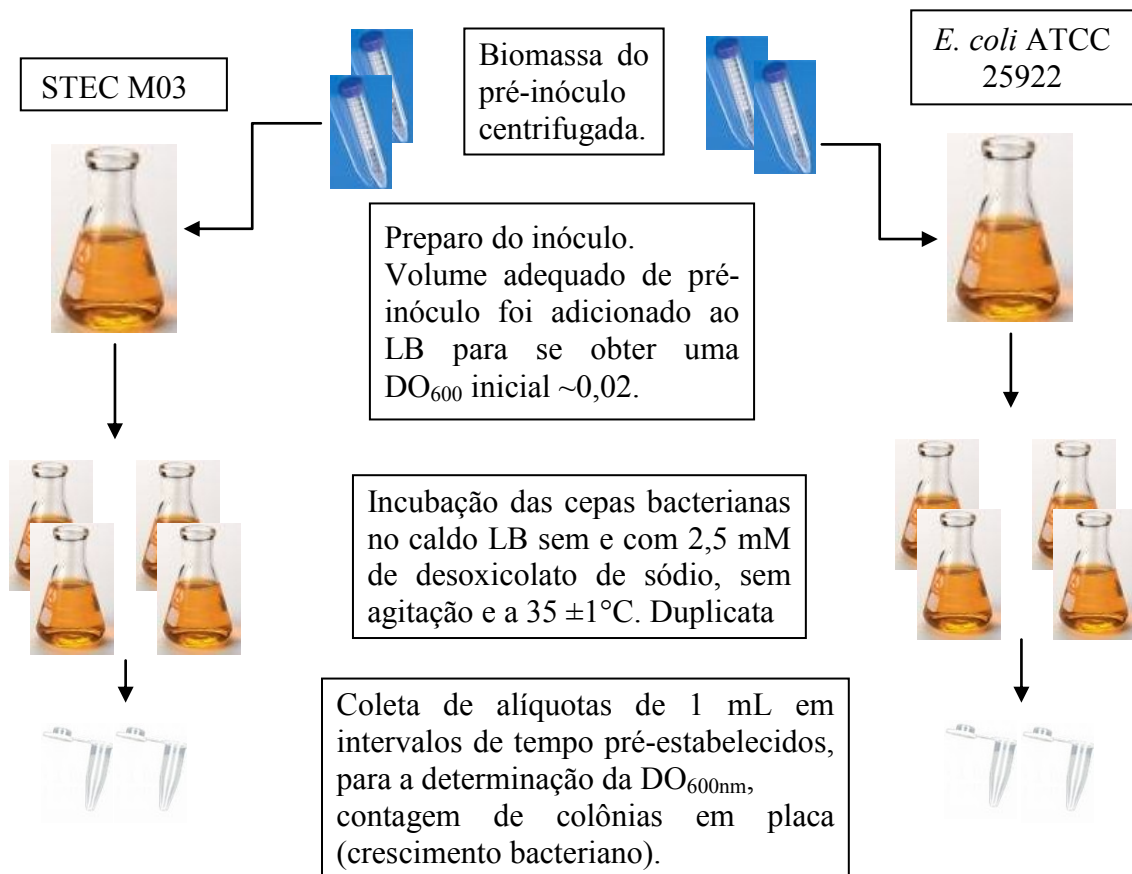
6.3. DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES PARA PREPARO DA AMOSTRA

Curvas de crescimento foram realizadas em diferentes condições para as estirpes de *E. coli* visando determinar: as condições de preparo do inóculo e concentração do mesmo, volume de cultivo, momento adequado para coleta das células (em fase logarítmica de crescimento) e preparo dos extratos proteicos. As células foram cultivadas em caldo LB (SAMBROOK *et al.*, 2001) acrescido ou não de 2,5 mM de desoxicolato de sódio (Merck) (STENSRUD *et al.*, 2008), incubado a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ sem agitação. Os ensaios foram realizados em duplicata. Alíquotas foram retiradas em intervalos de uma hora e a densidade ótica das culturas determinadas espectrofotometricamente em 600 nm. O processo está descrito nos ESQUEMAS 1 e 2.

ESQUEMA 1 - ATIVAÇÃO DAS CEPAS BACTERIANAS E ELABORAÇÃO DO PRÉ-INÓCULO.



ESQUEMA 2 - AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DAS ESTIRPES STEC M03 e *E. coli* ATCC 25922



6.4. PREPARO DOS EXTRATOS PROTÉICOS DE *E. COLI* ATCC 25922 e STEC M03

As células foram centrifugadas a 800g, 4°C por 7 minutos, lavadas três vezes com 30 mL de tampão de lavagem estéril (KCl 3,0 mM; KH_2PO_4 ; 1,5 mM; NaCl 68 mM; NaH_2PO_4 9,0 mM), uma vez com 30 mL de tampão de ressuspensão (10 mM Tris-HCl pH 8.0; 1,5 mM MgCl_2 ; 10 mM KCl; 0,5 mM DTT). O sedimento foi ressuspensão em quantidade adequada de tampão de tampão de lise (2,0 M tiourea; 7,0 M ureia; 40 mM DTT; 4% (p/v) CHAPS; 2% (v/v) Pharmalyte 3-10 e 1% (v/v) inibidor de proteases) (GÖRG *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2002). O processo de lise foi complementado por processo de congelamento (-20°C) e descongelamento (temperatura ambiente) realizado três vezes. A cada extrato foi adicionado mix de

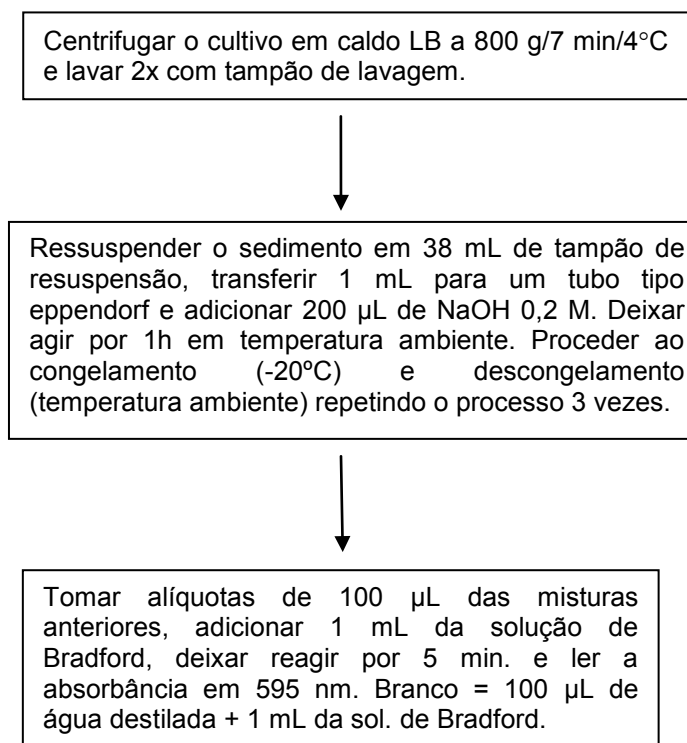
nucleases, na proporção de 1 μL /100 μL de extrato proteico e em seguida as amostras foram sonicadas 5 vezes por 10s com intervalo de 30s entre as sonicações (Sonicator Ultrasonic Processor XL2020). Na sequência, os extratos proteicos foram centrifugados a 10.000g, 4°C por 15 min. e os sobrenadantes (proteínas solúveis) transferidos para novos tubos tipo eppendorf. Os extratos solúveis foram armazenados em freezer a -20°C até o momento de realização das IEF.

6.5 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS NOS LISADOS CELULARES E EXTRATOS PROTEICOS DE *E. COLI* ATCC 25922 E STEC M03

Antecedendo a última centrifugação, as células foram ressuspensas em tampão de ressuspensão e tomou-se uma alíquota de 1,0 mL. Às alíquotas foram adicionados 200 μL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M e deixado reagir a temperatura ambiente por 1h. Em sequência elas foram congeladas (-20°C) e descongeladas (temperatura ambiente) três vezes.

Procedeu-se a quantificação de proteínas em 100 μL das alíquotas com 1,0 mL do reativo de Bradford (1976), pelo método homônimo. A conversão das leituras de absorbância das alíquotas foi feita por meio da equação da curva padrão de proteínas em BSA (nas concentrações de 2 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$, 4 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$, 8 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ e 10 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$). Foram aceitas curvas cuja equação da reta apresentou $R^2 \geq 0,97$. As quantificações foram realizadas em duplicata. A metodologia é descrita no Esquema 3.

ESQUEMA 3 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS INTRACELULARES



6.6. ELETROFORESE BI-DIMENSIONAL (2D)

Foram realizadas eletroforeses desnaturantes com SDS-Tris-Glicina em gel de poliacrilamida (12, 5%) para determinar o perfil preliminar de proteínas totais dos cultivos de *E. coli* ATCC 25922 e de STEC M03.

O protocolo de eletroforese 2D foi adaptado do Manual da GE Healthcare para proteoma e de Görg e colaboradores (2000). O processo inclui a isoeletrofocalização (IEF) que é realizada em tiras de gel IPG Immobiline (GE Healthcare). Após a IEF e equilíbrio das tiras com solução de tampão de equilíbrio e DTT ou iodoacetamida, estas são colocadas sobre o gel da SDS-PAGE vertical. Os equipamentos necessários para a realização da eletroforese 2D, IPGphor Isoelectric focusing system (GE Healthcare), foram disponibilizados pelo Núcleo de Fixação de Nitrogênio, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

6.6.1. Primeira dimensão – Isoeletrofocalização (IEF)

A reidratação foi feita com a aplicação de 350 μ g de proteína das amostras, permitindo que a IEF fosse feita em um único passo. A amostra foi misturada a solução de reidratação (tiouréia 2 M, ureia 7 M, 2% CHAPS, 0,05% DTT, 0,5% de Pharmalyte pH 3-10 e 0,002% de azul de bromofenol), e aplicada com micropipeta nas tiras de Immobiline para pH de 3-10. O processo de IEF foi realizado inicialmente na faixa de pH de 3 a 10 e nas seguintes condições: 1º Passo) Re-hidratação ativa 20 V/11 h, 2º Passo) Step Hold 500 V/500 Vh, 3º Passo) Gradiente 1000 V/800 Vh, 4º Passo) Gradiente 8000 V/11300 Vh, 5º Passo) Gradiente 8000 V/4400 Vh. E posteriormente foi realizada IEF na faixa de pH 4-7 nas seguintes condições: 1º Passo) Re-hidratação ativa 20 V/11 h, 2º Passo) Step Hold 500 V/500 Vh, 3º Passo) Gradiente 1000 V/800 Vh, 4º Passo) Gradiente 8000 V/11300 Vh, 5º Passo) Gradiente 8000 V/12000 Vh. As IEF foram realizadas em sarcófagos (FIGURA 2) no aparelho Ettan IPGphor (Amersham Bioscience) (FIGURA 3). Esse protocolo de IEF foi feito com temperatura de 20°C e termina com o acúmulo de aproximadamente 24800 Vh. Terminada a IEF as fitas foram retiradas do aparelho e preparadas para a realização da segunda dimensão.



FIGURA 2 - SARCÓFAGOS UTILIZADOS PARA REIDRATAÇÃO DAS AMOSTRAS E SEQUENCIAL IEF EM APARELHO ETTAN IPG PHOR.

Fonte: A autora (2012)



FIGURA 3 - APARELHO EMPREGADO PARA A REALIZAÇÃO DAS IEF - ETTAN IPG PHOR.

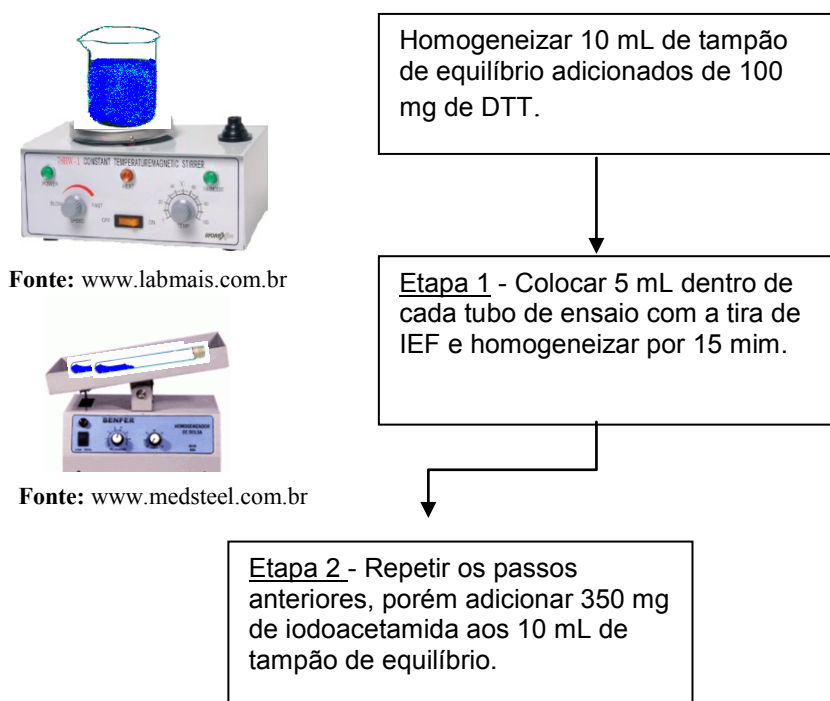
Fonte: A autora (2012)

6.6.2. Segunda dimensão - Eletroforese vertical

Antes de aplicar as tiras da IEF no gel para eletroforese SDS/segunda dimensão, estas foram equilibradas (em duas etapas) com quantidade padronizada de solução de equilíbrio. Para o equilíbrio de cada tira proveniente da IEF adicionou-se 5 mL da solução de equilíbrio base (6 M ureia, 75 mM Tris-HCl (pH 8,8), 29,3% glicerol (v/v), 2% SDS (p/v), 0,002% solução de azul de bromofenol 1% (p/v)) misturados com 50 mg de DTT para a primeira etapa e para a segunda etapa 175 mg de iodoacetamida a outros 5 mL de solução de equilíbrio base (ESQUEMA 5). Para a elaboração do gel da segunda dimensão (2D) foi utilizada a solução acrilamida/bisacrilamida ReadySol DNA/PAGE 40% T, 5% C (Amersham Bioscience), em proporção adequada para o preparo do gel de 1,5 mm com concentração de 12%. Após polimerização do gel 2D as tiras de IEF foram colocadas no topo do gel e seladas com uma camada de gel de agarose 1,0% em tampão LAEMMLI (250 mM TRIS, 1,92 M Glicina, 1% SDS) com 0,01% de azul de bromofenol. As corridas foram realizada em cuba Rubi (GE HealthCare) com fonte Electrophoresis Power Supply EPS-601 (Amersham Bioscience) por aproximadamente 4 h, com as seguintes condições: 45 mA por gel em corrida, 300

V, 50 W, temperatura de 11°C em tampão LAEMMLI (1x).

ESQUEMA 4 - EQUILÍBRIO DAS TIRAS DE IEF



6.6.3. Visualização das proteínas

Terminada a corrida da segunda dimensão os géis foram corados com PhastGel Blue R 0,1% por 12h a 18h. Em sequência foram descorados com etanol/ácido acético/água (3/1/6) e colocados em água destilada durante a noite para a intensificação da coloração das bandas. A imagem dos géis foi obtida por meio do aparelho Imagescanner (Amershan Biosciences) e com auxílio do programa Labscan (GE Healthcare). A análise do padrão de expressão foi realizada utilizando o programa ImageMaster 2D Platinum v.6.01 (Amershan Biosciences). Os géis foram mantidos em água destilada com 1% de ácido acético até a extração das bandas para análise.

6.7. IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

As proteínas diferencialmente expressas, tanto de STEC M03 quanto de *E. coli* ATCC 25922, foram retiradas do gel manualmente utilizando-se ponteiras novas estéreis tipo P1000 e colocadas em tubos tipo eppendorf. Cada banda retirada do gel foi descorada com 400 μ L de solução descorante (25 mM bicarbonato de amônio pH 8,0; acetonitrila 50% e água miliQ). Este procedimento foi repetido até descoloração completa dos pedaços de gel. Em seguida, os fragmentos de gel foram desidratados com 200 μ l de acetonitrila 100% por 5 minutos, sendo que este procedimento foi repetido por duas vezes. Após 10 minutos de desidratação, retirou-se com micropipeta o máximo volume de acetonitrila 100%, dos tubos tipo eppendorf, e os mesmos foram mantidos abertos para a completa secagem dos fragmentos de gel.

Para a digestão das proteínas adicionou-se 10 μ l de solução de tripsina (10 μ g/mL em tampão 40 mM bicarbonato de amônio pH 8,0 contendo 10% acetonitrila) sobre os fragmentos de gel e deixou-se reidratar por trinta minutos em gelo. Após esse tempo, as amostras foram retiradas do gelo e colocadas em estufa a 37°C por um período de 14 a 16 h.

As massas dos peptídeos trípticos foram determinadas utilizando um espectrômetro de massas MALDI-ToF/MS/MS modelo Autoflex II (Bruker Daltonics). O programa de computador utilizado foi FlexControl 2.0 (Promega Madison, USA). Os espectros foram obtidos no modo refletor positivo, com uma voltagem de aceleração de 20 kV, intervalo de 150 ns entre o pulso de laser e aplicação da voltagem e faixa de aquisição entre 800 – 3200 Da. A calibração externa foi feita utilizando o padrão de calibração para peptídeos II (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) e como calibrante interno foram utilizados picos de autólise da tripsina (842,50 Da e 2211,10 Da), quando presentes. A análise e tratamento dos espectros foi feita utilizando o programa FlexAnalysis 2.0 (Bruker Daltonics).

Dados de fragmentação de peptídeos (espectro MS/MS) foram obtidos utilizando o espectrômetro de massas MALDI-ToF/ToF/MS/MS tipo Autoflex II (Bruker Daltonics). O programa de computador utilizado foi o FlexControl 2.0 (Promega, Madison, USA), segundo procedimento descrito por Westermeier e Naven (2002). O espectro MS foi obtido utilizando os mesmos parâmetros descritos

anteriormente e o espectro MS/MS foi obtido utilizando os parâmetros especificados pelo método LIFT do programa FlexControl v.2.0.

Para identificação das proteínas diferencialmente expressas os “spots” de pelo menos duas replicatas de uma das cepas e de pelo menos um gel da outra cepa foram retirados para análise de identificação. A busca dos peptídeos tripticos foi realizada com o programa de acesso livre MASCOT (www.matrixscience.com) contra o banco de dados SwissProt, tendo definido o organismo *E. coli*. Picos de tripsina e queratina foram eventualmente empregados como padrões internos de calibração das massas dos peptídeos, previamente à busca no banco de dados SwissProt. Os parâmetros utilizados na busca da “impressão digital” dos peptídeos (PMF) foram os seguintes: enzima tripsina, um sítio de clivagem perdido, carbamidometilação de cisteínas como modificação fixa e oxidação de metionina como modificação variável, massa monoisotópica, valor de massa – MH^+ e tolerância máxima permitida na massa do peptídeo 100 ppm.

A identificação por MS, da proteína, foi considerada positiva obedecendo-se os critérios: cobertura mínima de 20%; pI teórico $\pm 0,5$ pI experimental (dados obtidos do gel) e massa molecular (MM) teórica $\pm 15\%$ da MM experimental (dados obtidos do gel). Proteínas que não atingiram algum desses critérios tiveram sua identidade confirmada por MS/MS.

Os parâmetros utilizados na busca do “íon parental” (MS) para subsequente fragmentação (MS/MS) foram os mesmos descritos anteriormente. Já os critérios para a busca dos íons resultantes da fragmentação do íon parental foram os seguintes: enzima tripsina, um sítio de clivagem perdido, carbamidometilação de cisteínas como modificação fixa e oxidação de metionina como modificação variável, tolerância na variação da massa MS/MS de 0,6 Da, massa monoisotópica, carga do peptídeo +1, formato do dado Bruker (.XML), instrumento MALDI-ToF-ToF, valor de massa – MH^+ e tolerância máxima permitida na massa do peptídeo 100 ppm.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1. DETECÇÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA EM STEC M03

Inicialmente a STEC M03 foi analisada para confirmar o genótipo, ou seja, a presença dos genes de virulência *stx*₁, *eaeA*, e *hlyA*. O ensaio também foi realizado com a estirpe ATCC 25922 que não contém esses genes. Foi empregada a metodologia de PCR multiplex como descrito por PATON e PATON (1998b) e De TONI (2004). A FIGURA 4 representa os resultados da PCR multiplex.

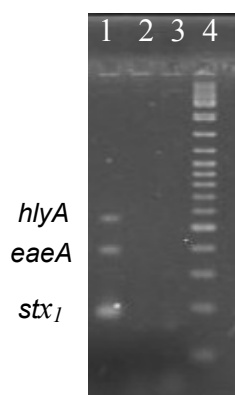


FIGURA 4 - PCR MULTIPLEX PARA DETECÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA *stx*₁ *stx*₂ *eaeA* *hlyA*.

Registro fotográfico de eletroforese realizada em gel de agarose a 2,5% preparada em tampão TBE 1X. A corrida eletroforética foi realizada em TBE 1X, 35 V por 3 horas. **Linha 1:** STEC M03; **linha 2:** branco; **linha 3:** *E. coli* ATCC 25922; **linha 4:** marcador de massa molecular 1 Kb (Fermentas).

Fonte: A autora (2012)

Como esperado, o perfil de PCR obtido foi idêntico ao relatado por De Toni (2004). Foram detectadas bandas representativas de fragmentos de DNA dos genes *stx*₁ (~ 180 pb), *eaeA* (~ 390 pb) e *hlyA* (~ 580 pb) foram observados nos produtos da PCR multiplex realizada com DNA extraído de STEC M03. As bandas não foram amplificadas no caso da estirpe *E. coli* ATCC 25922, confirmando que a mesma não possui esses genes.

7.2. DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES PARA PREPARO DA AMOSTRA

Anteriormente a obtenção dos extratos proteicos celulares propriamente ditos, várias curvas de crescimento foram realizadas visando à determinação das melhores condições para a obtenção dos mesmos. Os critérios avaliados durante a padronização das condições de cultivo para a obtenção dos extratos proteicos celulares foram: tempo de incubação a $35 \pm 1^\circ\text{C}$; quantidade de células bacterianas totais ($\text{DO}_{600\text{nm}}$), células bacterianas viáveis (contagem em placa) e quantidade de proteínas por Bradford ($\text{DO}_{595\text{nm}}$).

O tempo de incubação foi estabelecido em função da fase de crescimento (aproximadamente meio de fase exponencial) observada nos gráficos de absorbância (600 nm) e de contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL), em função do tempo de incubação a $35 \pm 1^\circ\text{C}$, Gráficos 1 e 2 respectivamente.

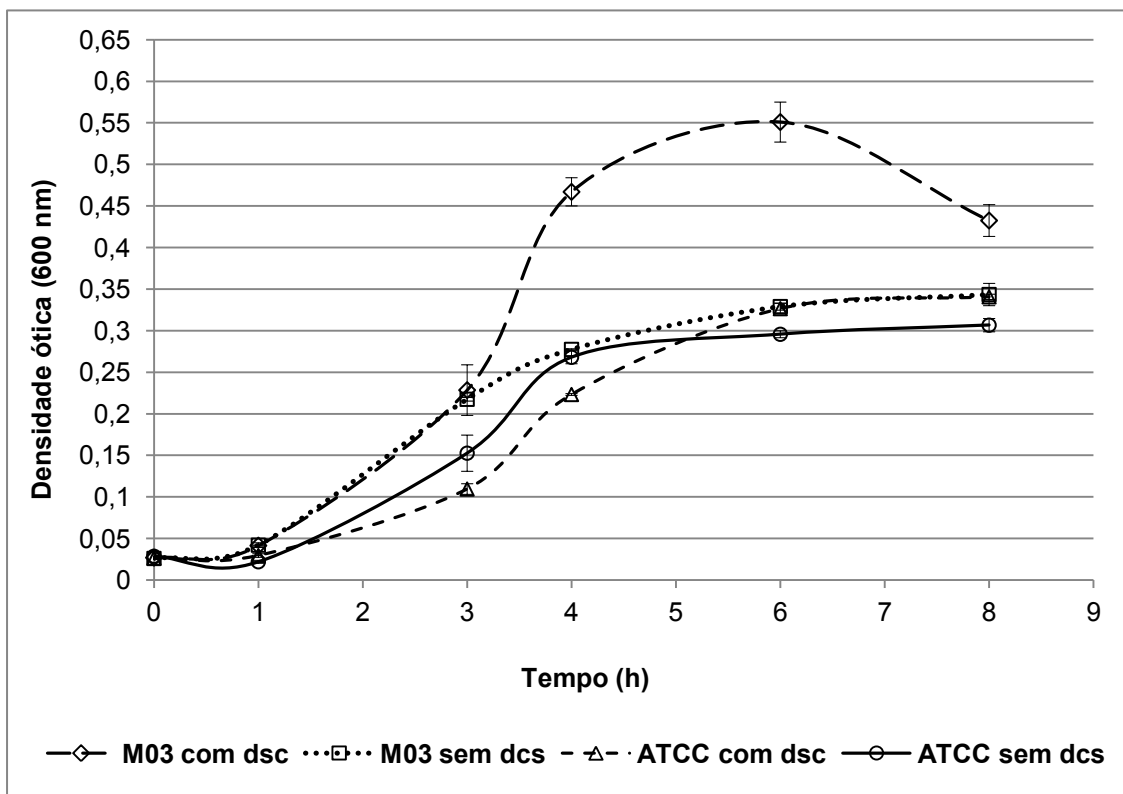


GRÁFICO 1 – CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO A $35 \pm 1^\circ\text{C}$ EM FUNÇÃO DA DENSIDADE ÓTICA EM 600nm.

Varição dos valores de densidade ótica a 600 nm de alíquotas (1 mL) dos cultivos bacterianos em função do tempo e dos tratamentos empregados: STEC M03 condição teste (-◇-), STEC M03 condição controle (-□-); *E. coli* ATCC 25922 condição teste (-△-); *E. coli* ATCC 25922 condição controle (-○-).

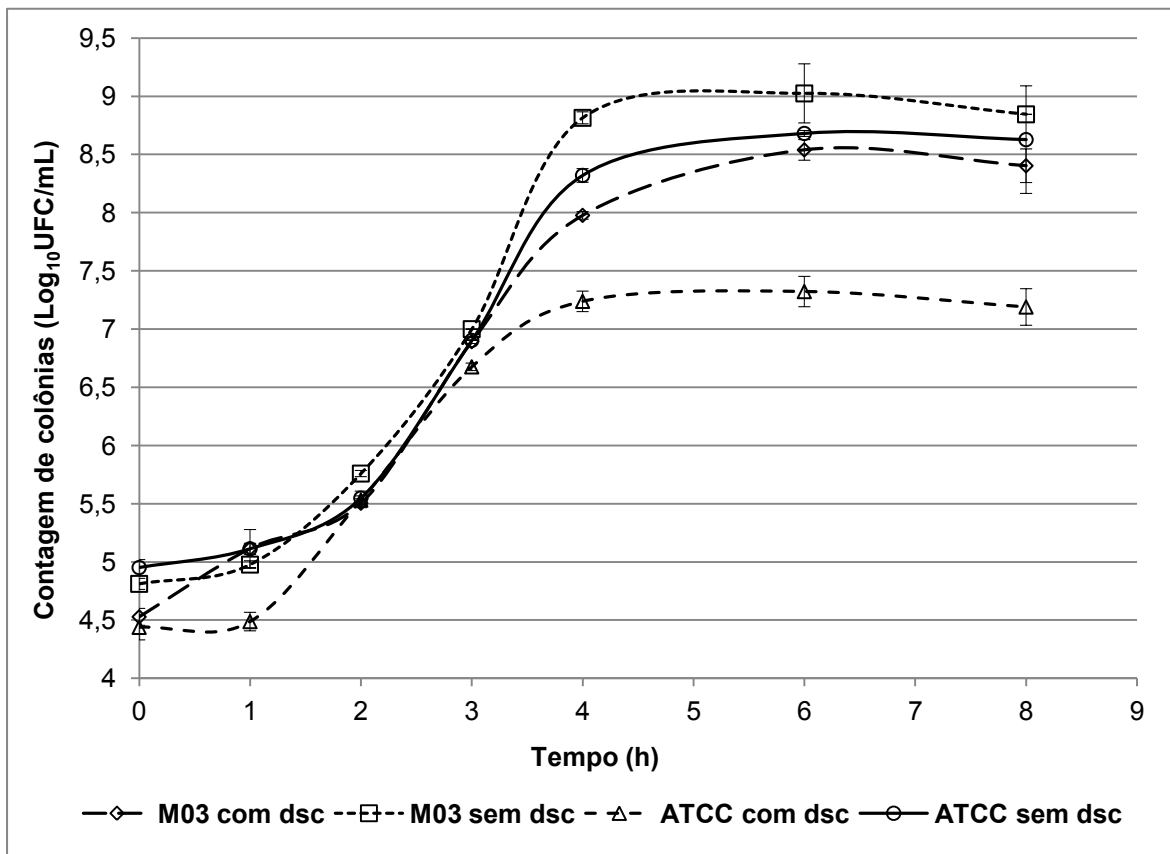


GRÁFICO 2 – CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO A $35 \pm 1^\circ\text{C}$ EM FUNÇÃO DA CONTAGEM DO NÚMERO DE COLÔNIAS FORMADAS.

Variação do número de unidades formadoras de colônia (UFC) expressas como \log_{10} em função do tempo e dos tratamentos empregados: STEC M03 condição teste (—◇—), STEC M03 condição controle (---□---); *E. coli* ATCC 25922 condição teste (---△---); *E. coli* ATCC 25922 condição controle (—○—).

Com base nas curvas de crescimento obtidas determinou-se que até as três primeiras horas de cultivo ambas as cepas se encontravam em fase exponencial de crescimento. Estabeleceu-se então que este seria o tempo de incubação e crescimento para a coleta de células visando à realização do extrato proteico celular. Não se adotaram valores finais de densidade ótica (DO) a 600 nm, como referência para o ponto de coleta dos extratos proteicos celulares, uma vez que o desoxicolato de sódio na concentração utilizada mostrou-se um interferente importante, provocando visível alteração da viscosidade do meio, com formação de grumos e consequentemente dificultando a leitura de densidade ótica para ambas as cepas utilizadas.

7.3. ELETROFORESE BIDIMENSIONAL

As IEF, primeira separação das análises bidimensionais, foram inicialmente realizadas em tiras de pH 3-10.

A partir das imagens digitalizadas dos géis e com o emprego do programa ImageMaster 2D Platinum[®] (GE Healthcare) foi possível analisar e comparar os géis entre si. Nas análises preliminares dos perfis proteômicos das cepas de *E. coli* foram empregados 8 géis 2D pH 3–10. Os géis obtidos foram então fotodocumentados e figuras representativas são mostradas abaixo.

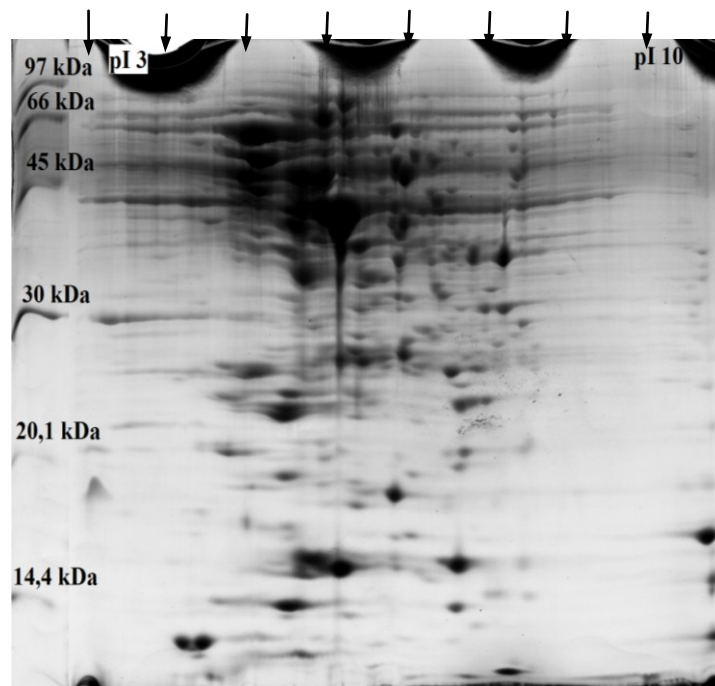


FIGURA 6 - GEL 2D pH 3-10 DA FRAÇÃO SOLÚVEL DO EXTRATO PROTEICO DE STEC M03 CULTIVADA NA AUSÊNCIA DE DESOXICOLATO DE SÓDIO

Imagem digitalizada de gel bidimensional pH 3-10 linear, preparado com 350 µg de proteínas do extrato de STEC M03 cultivada na condição controle. As setas localizadas na parte superior da figura, no sentido horizontal, indicam aproximadamente os valores de pH 3 a 10. No sentido vertical, à esquerda estão indicados as massas do marcador de baixo peso molecular (GE Healthcare). As manchas no gel representam as proteínas separadas em função do pI (horizontal) e MM (vertical). O gel foi corado com PhastGel Blue R 0,1% (GE Healthcare) e digitalizado com auxílio do aparelho Imagescanner (Amershan Biosciences) e do programa Labscan (GE Healthcare).

FONTE: A autora (2012)

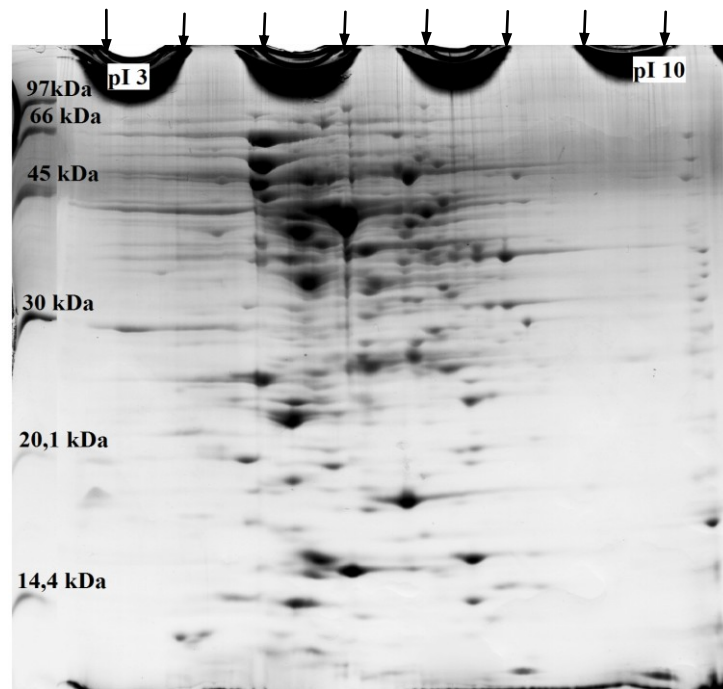


FIGURA 7 - GEL 2D pH 3-10 DA FRAÇÃO SOLÚVEL DO EXTRATO PROTEICO DE STEC M03 CULTIVADA NA PRESENÇA DE 2,5 mM DE DESOXICOLATO DE SÓDIO

Imagem digitalizada de gel bidimensional pH 3-10 linear, de 350 μ g de proteínas do extrato de STEC M03 cultivada na condição teste. **Horizontalmente no topo da esquerda para direita:** cada seta indica aproximadamente os valores de pH 3, pH 4, pH 5, pH 6, pH 7, pH 8, pH 9, pH 10; **verticalmente na lateral esquerda:** marcador de baixo peso molecular (GE Healthcare) e **região central:** proteínas separadas em função do pI (horizontal) e MM (vertical) e coradas por PhastGel Blue R 0,1% (GE Healthcare) e digitalizado com auxílio do aparelho Imagescanner (Amershan Biosciences) e do programa Labscan (GE Healthcare).

FONTE: A autora (2012)

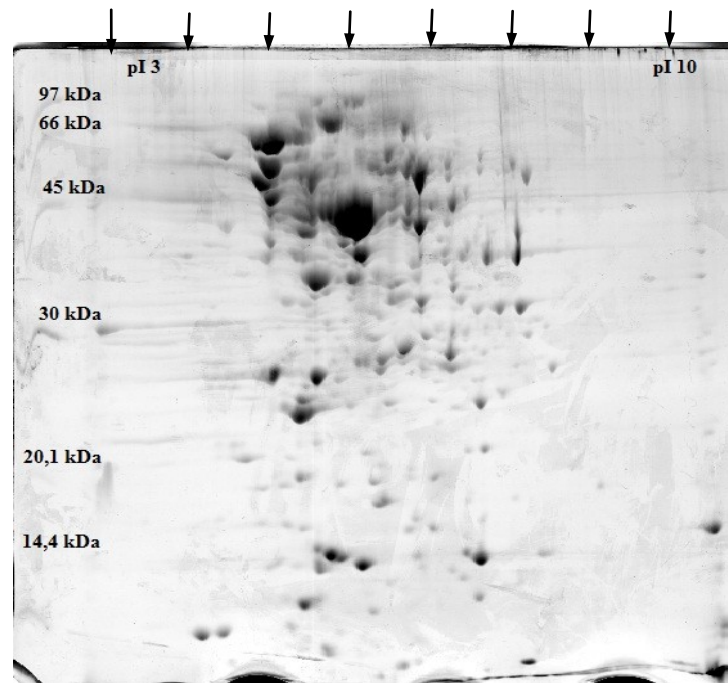


FIGURA 8 - GEL 2D pH 3-10 DA FRAÇÃO SOLÚVEL DO EXTRATO PROTEICO DE *E. coli* ATCC 25922 CULTIVADA NA AUSÊNCIA DE DESOXICOLATO DE SÓDIO

Imagem digitalizada de gel bidimensional pH 3-10 linear, de 350 μ g de proteínas do extrato de *E. coli* ATCC 25922 cultivada na condição controle. **Horizontalmente no topo da esquerda para direita:** cada seta indica aproximadamente os valores de pH 3, pH 4, pH 5, pH 6, pH 7, pH 8, pH 9, pH 10; **verticalmente na lateral esquerda:** marcador de baixo peso molecular (GE Healthcare) e **região central:** proteínas separadas em função do pI (horizontal) e MM (vertical) e coradas por PhastGel Blue R 0,1% (GE Healthcare) e digitalizado com auxílio do aparelho Imagescanner (Amershan Biosciences) e do programa Labscan (GE Healthcare).

FONTE: A autora (2012)

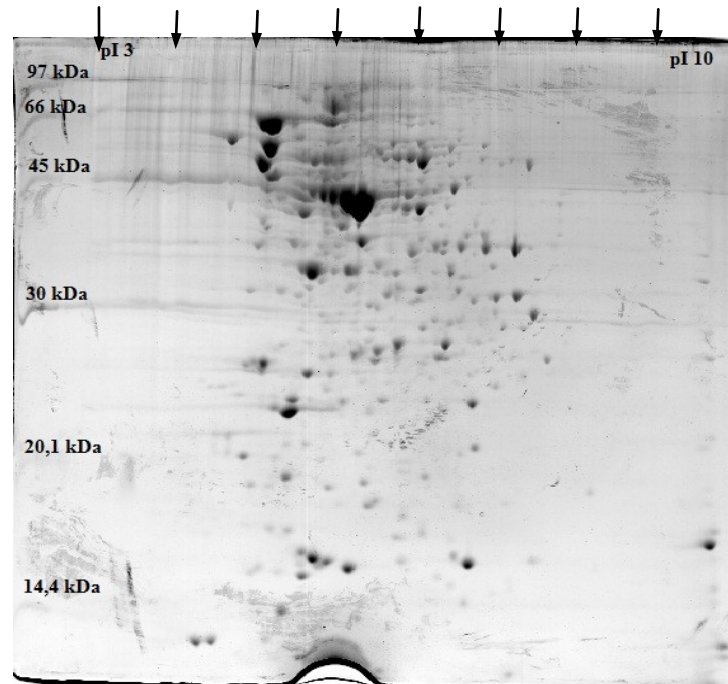


FIGURA 9 - GEL 2D pH 3-10 DA FRAÇÃO SOLÚVEL DO EXTRATO PROTEICO DE *E. coli* ATCC 25922 CULTIVADA NA PRESENÇA DE 2,5 mM DE DESOXICOLATO DE SÓDIO

Imagem digitalizada de gel bidimensional pH 3-10 linear, de 350 μ g de proteínas do extrato de *E. coli* ATCC 25922 cultivada na condição teste. **Horizontalmente no topo da esquerda para direita:** cada seta indica aproximadamente os valores de pH 3, pH 4, pH 5, pH 6, pH 7, pH 8, pH 9, pH 10; **verticalmente na lateral esquerda:** marcador de baixo peso molecular (GE Healthcare) e **região central:** proteínas separadas em função do pI (horizontal) e MM (vertical) e coradas por PhastGel Blue R 0,1% (GE Healthcare) e digitalizado com auxílio do aparelho Imagescaner (Amershan Biosciences) e do programa Labscan (GE Healthcare).

FONTE: A autora (2012)

Com base nos perfis encontrados nos géis feitos com as tiras pH 3-10, constatou-se que a maior concentração das proteínas celulares de ambas as cepas encontra-se na faixa de pH 4-7 (TABELAS 2 e 3) .

TABELA 2 – PORCENTAGEM MÉDIA DE SPOTS NOS GÉIS pH 3-10 DOS EXTRATOS PROTEICOS DE STEC M03

STEC M03	Crescimento sem desoxicolato	Crescimento em presença de desoxicolato
Quantidade de spots entre pH 3 – 4	1%	1%
Quantidade de spots entre pH 7 – 10	17%	11%
Quantidade de spots entre pH 4 – 7	82%	88%

TABELA 3 - PORCENTAGEM MÉDIA DE SPOTS NOS GÉIS COM pH 3-10 DOS EXTRATOS PROTEICOS DE *E. coli* ATCC 25922.

ATCC 25922	Crescimento sem desoxicolato	Crescimento em presença de desoxicolato
Quantidade de spots entre pH 3 – 4	1%	2%
Quantidade de spots entre pH 7 – 10	11%	7%
Quantidade de spots entre pH 4 – 7	88%	91%

Para as análises comparativas entre STEC M03 e *E. coli* ATCC 25922 baseadas nos géis 2D pH 4–7 foram empregados 32 géis com média de 340 bandas proteicas para STEC M03 e 410 para *E. coli* ATCC 25922. Alguns géis representativos são expostos nas FIGURAS 10, 11, 12 e 13.

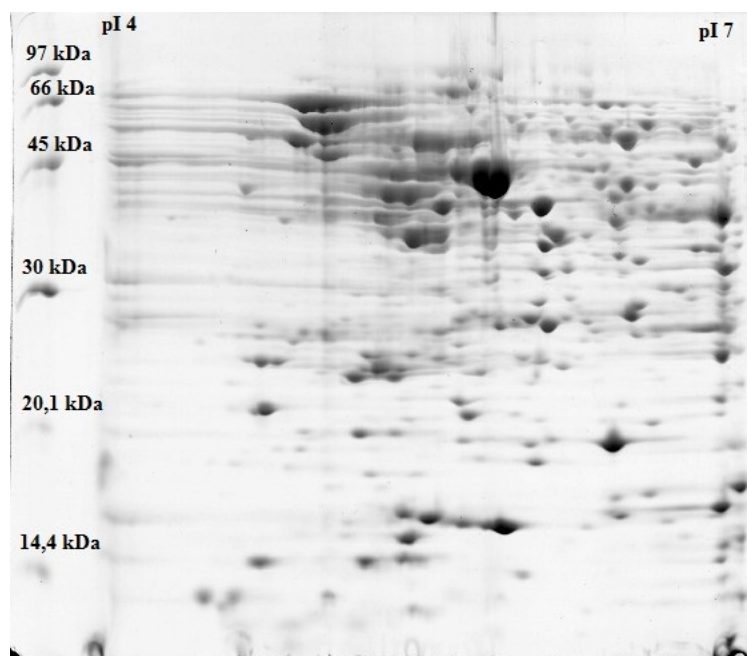


FIGURA 10 - GEL 2D pH 4-7 DA FRAÇÃO SOLÚVEL DO EXTRATO PROTEICO DE STEC M03 CULTIVADA NA AUSÊNCIA DE DESOXICOLATO DE SÓDIO.

Imagem digitalizada de gel bidimensional pH 4-7 linear, de 350 µg de proteínas do extrato de STEC M03 cultivada na condição controle. **Horizontalmente no topo da esquerda para direita:** variação do pH 4 - pH 7; **verticalmente na lateral esquerda:** marcador de baixo peso molecular (GE Healthcare) e **região central:** proteínas separadas em função do pI (horizontal) e MM (vertical) e coradas por PhastGel Blue R 0,1% (GE Healthcare) e digitalizado com auxílio do aparelho Imagescanner (Amershan Biosciences) e do programa Labscan (GE Healthcare).

FONTE: A autora (2012)

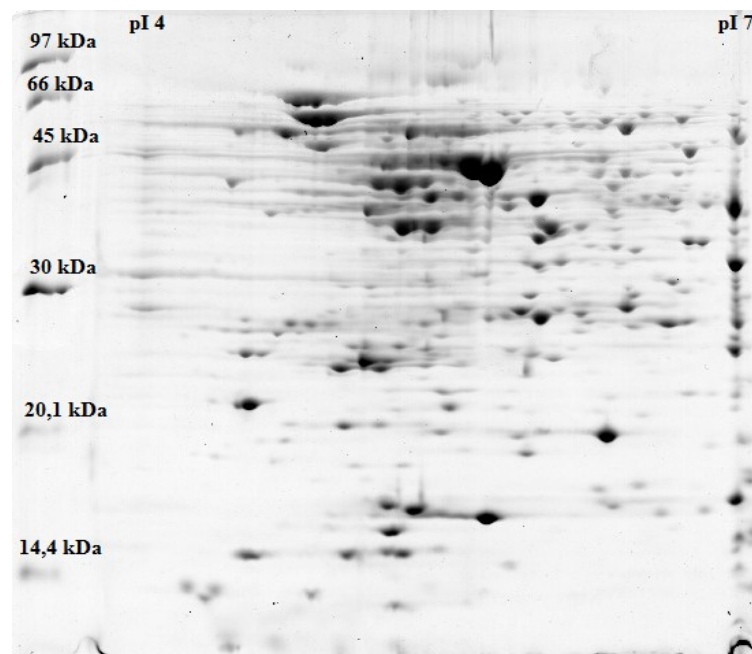


FIGURA 11 - GEL 2D pH 4-7 DA FRAÇÃO SOLÚVEL DO EXTRATO PROTEICO DE STEC M03 CULTIVADA NA PRESENÇA DE 2,5 mM DE DESOXICOLATO DE SÓDIO.

Imagem digitalizada de gel bidimensional pH 4-7 linear, de 350 μ g de proteínas do extrato de STEC M03 cultivada na condição teste. **Horizontalmente no topo da esquerda para direita:** variação do pH 4 - pH 7; **verticalmente na lateral esquerda:** marcador de baixo peso molecular (GE Healthcare) e **região central:** proteínas separadas em função do pI (horizontal) e MM (vertical) e coradas por PhastGel Blue R 0,1% (GE Healthcare) e digitalizado com auxílio do aparelho Imagescanner (Amershan Biosciences) e do programa Labscan (GE Healthcare).

FONTE: A autora (2012)

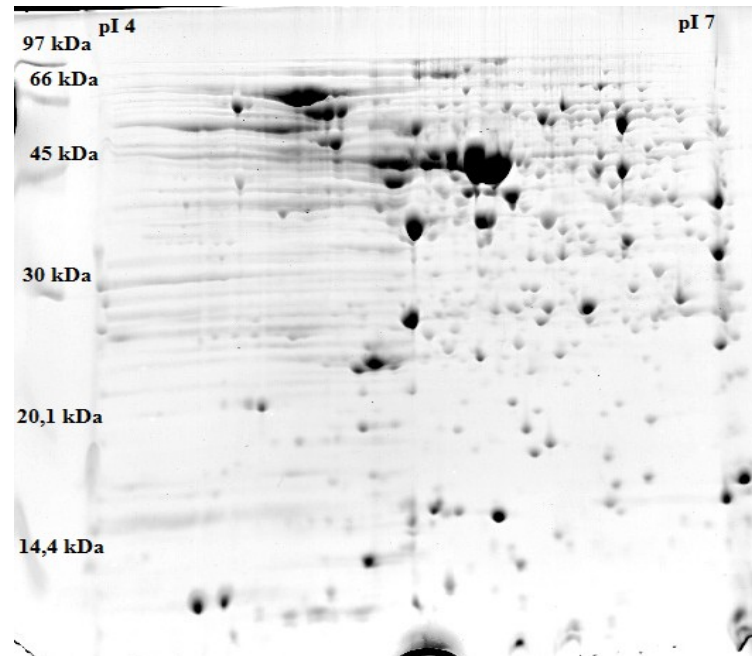


FIGURA 12 - GEL 2D pH 4-7 DA FRAÇÃO SOLÚVEL DO EXTRATO PROTEICO DE *E. coli* ATCC 25922 CULTIVADA NA AUSÊNCIA DE DESOXICOLATO DE SÓDIO.

Imagem digitalizada de gel bidimensional pH 4-7 linear, de 350 μ g de proteínas do extrato de *E. coli* ATCC 25922 cultivada na condição controle. Horizontalmente no topo da esquerda para direita: variação do pH 4 - pH 7; verticalmente na lateral esquerda: marcador de baixo peso molecular (GE Healthcare) e região central: proteínas separadas em função do pI (horizontal) e MM (vertical) e coradas por PhastGel Blue R 0,1% (GE Healthcare) e digitalizado com auxílio do aparelho Imagescanner (Amershan Biosciences) e do programa Labscan (GE Healthcare).

FONTE: A autora (2012)

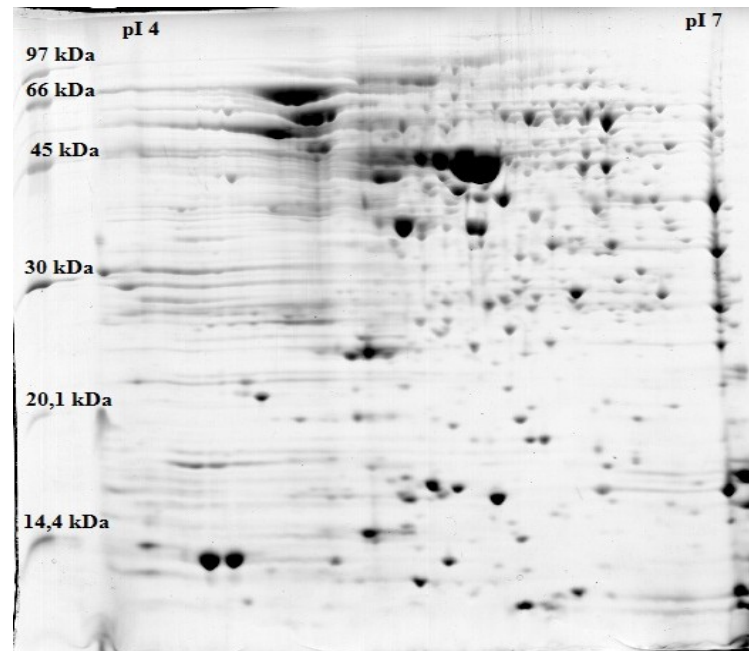


FIGURA 13 - GEL 2D pH 4-7 DA FRAÇÃO SOLÚVEL DO EXTRATO PROTEICO DE *E. coli* ATCC 25922 CULTIVADA NA PRESENÇA DE 2,5 mM DE DESOXICOLATO DE SÓDIO.

Imagem digitalizada de gel bidimensional pH 4-7 linear, de 350 µg de proteínas do extrato de *E. coli* ATCC 25922 cultivada na condição teste. **Horizontalmente no topo da esquerda para direita:** variação do pH 4 - pH 7; **verticalmente na lateral esquerda:** marcador de baixo peso molecular (GE Healthcare) e **região central:** proteínas separadas em função do pI (horizontal) e MM (vertical) e coradas por PhastGel Blue R 0,1% (GE Healthcare) e digitalizado com auxílio do aparelho Imagescanner (Amershan Biosciences) e do programa Labscan (GE Healthcare).

FONTE: A autora (2012)

As proteínas foram consideradas como diferencialmente expressas quando após análise pelo programa ImageMaster 2D Platinum[®] obtiveram relação da porcentagem de volume entre os spots comparados (ratio %vol.) igual ou superior a 1,5 e Teste *t* de Student com resultado superior ou igual a 2,44 correspondendo a $P < 0,05$. Para aquelas proteínas consideradas exclusivas foram adotados os critérios de presença em 75% ou mais dos géis da condição e/ou cepa em análise e ausência em 100% dos géis da outra condição e/ou cepa em análise.

7.4. IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS

Nas estirpes de *E. coli* diarreogênicas, enteropatogênica *E. coli* (EPEC) e enteropatogênica *E. coli* atípica (aEPEC) o estresse por sais biliares estimula o aumento da adesão as células epiteliais humanas (DE JESUS *et al.*, 2005; TORRES *et al.*, 2007). Análises por microarranjo de STEC O157:H7 indicaram que a presença de sais biliares resultaram em adaptações de proteção a membrana externa, reprimindo a expressão da porina OmpF e estimulando a expressão do sistema de efluxo AcrA-AcrB visando a limitação dos efeitos tóxicos na bactéria. OmpF está associada a passagem dos sais biliares através da membrana externa para dentro do espaço periplásmico. Outras respostas, que aparentemente não são necessárias para a resistência a bile propriamente, também são observadas. Entre elas a estimulação de genes cujos produtos são responsáveis por modificações do lipídeo A, conferindo resistência bacteriana a vários peptídeos catiônicos antimicrobianos, sugerindo que a bile poderia atuar como um sinal do ambiente que dispararia mudanças na membrana externa para aumentar a resistência às defensinas; integrantes do sistema imune inato no intestino delgado (KUS *et al.*, 2011).

Tem sido proposto que a bile poderia atuar como um sinal do ambiente que desencadearia a expressão de respostas adaptativas como a expressão de genes relacionados com o processo de colonização e virulência, em enterobactérias, permitindo sobrevivência bem sucedida no intestino do hospedeiro (PROUTY e GUNN, 2000; BEGLEY; GAHAN; HILL, 2005; MERRITT e DONALDSON, 2009; KUS *et al.*, 2011).

No presente trabalho a resposta de STEC M03 à presença do sal biliar desoxicolato de sódio (DCS) foi analisada por eletroforese bidimensional. Aproximadamente 340 bandas proteicas foram detectadas nos géis 2D preparados com os extratos celulares de STEC M03 nas condições controle (ausência de DCS) e teste (presença de 2,5 mM DCS). Não foi detectada proteína alguma que fosse específica da condição teste. Entretanto foram detectadas três proteínas que tiveram a expressão afetada pela presença do DCS, sendo duas delas reprimidas e uma proteína com expressão exclusiva (TABELA 4 e FIGURA 14).

Uma das proteínas reprimidas corresponde a glicerol desidrogenase (GldA) (EC 1.1.1.6) a qual participa da reação, em ambos os sentidos, de conversão de

glicerol a dihidroxiacetona, sendo NAD^+ dependente e apresentando ampla especificidade de substrato (TANG *et al.*, 1979; KELLEY e DEKKER, 1985; SUBEDI *et al.*, 2008). Em *E. coli* a expressão de GldA é maior na fase estacionária que na fase logarítmica de crescimento, sendo que a expressão máxima é encontrada na presença de hidroxiacetona durante a fase estacionária de crescimento (TRUNIGER e BOOS, 1994). No entanto o papel desta enzima, que assume a função de dissimilação aeróbica do glicerol em *E. coli* em mutantes para a glicerol-3-fosfato desidrogenase (G3PDH), não está bem estabelecido (TANG *et al.*, 1979; TRUNIGER e BOOS, 1994). Baseado na afinidade e especificidade da enzima pela dihidroxiacetona (DHA) em pH fisiológico e a sensibilidade apresentada por mutantes *gldA* a este composto, foi recentemente proposto que o papel principal desta enzima em *E. coli* seria a regulação dos níveis intracelulares de dihidroxiacetona, pela conversão desta a glicerol (SUBEDI *et al.*, 2008). Porém, um aspecto chave de GldA na dissimilação fermentativa do glicerol foi recentemente descrito em *E. coli*. Nesta via GldA é responsável pela conversão de glicerol a DHA que é transformada na sequência em DHA-fosfato, um intermediário glicolítico, pela ação da enzima dihidroxiacetona quinase. Além disso, GldA está também envolvida na síntese de 1,2-propanediol a partir de hidroxiacetona, provendo um meio para o consumo de equivalentes reduzidos gerados durante o crescimento, mantendo as condições do balanço redox (GONZALEZ *et al.*, 2008).

Além dos papéis desempenhados no metabolismo, uma função relacionada a virulência também tem sido sugerida à proteínas com atividade de glicerol desidrogenase. Em *E. coli* K1, um agente etiológico de meningite neonatal, a proteína CgID, que apresenta alta homologia com a GldA e tem atividade de glicerol desidrogenase, foi associada a virulência por induzir resposta inflamatória com dano grave ao hospedeiro (ZHANG *et al.*, 2009). Em *Salmonella* sorovariedade Typhimurium, existem dois genes que codificariam glicerol desidrogenases, *gldA* codificando GldA e *glhA* codificando GlhA (glicerol desidrogenase hipotética). Evidências apontam a necessidade da ação de uma glicerol desidrogenase para a completa expressão de *hilA*, um regulador da ilha de patogenicidade 1 (SPI-1) de *Salmonella*, necessário no processo de invasão das células epiteliais do intestino. Em mutantes *gldA* e *glhA* a expressão de *hilA* foi de 80% e 110% respectivamente em relação a estirpe selvagem. Para o duplo mutante a expressão de *hilA* foi de aproximadamente 60% em relação a estirpe parental, sugerindo que os genes *gldA*

e *glhA* são redundantes na ativação de *hilA* e que qualquer um deles pode desempenhar esse papel (NAKAYAMA e WATANABE, 2006). Além disso, foi descrito que na presença de bile há uma redução marcante na transcrição dos genes da SPI-1 (PROUTY e GUNN, 2000; PROUTY *et al.*, 2004b; HERNANDEZ *et al.*, 2012), sugerindo que *Salmonella* em ambiente com grande concentração de bile, como o lúmen intestinal, interprete isso como um sinal para a não expressão de sua capacidade invasiva. Porém, após a penetração na camada de muco, região com menor concentração de bile, e associação às células epiteliais intestinais o processo de invasão pode ser iniciado (PROUTY e GUNN, 2000; BEGLEY; GAHAN; HILL, 2005).

Nossos resultados indicam que *GldA* tem sua expressão reprimida em STEC M03 na condição teste em relação a condição controle. Não podemos afirmar qual o significado fisiológico deste achado que deve ser melhor estudado. No entanto uma possibilidade é que o glicerol esteja sendo utilizado na síntese de lipídeos da membrana.

Fosfato acetiltransferase (*Pta*, EC 2.3.1.8), uma enzima envolvida na dissimilação do acetato, também foi encontrada reprimida em STEC M03 pela presença de DCS. O acetato é produzido a partir de acetil coenzima A (CoA) pela ação das enzimas *Pta* e acetato quinase (*AckA*). *Pta* converte de forma reversível acetil-CoA e fosfato inorgânico em acetil-fosfato, um composto altamente energético, regenerando CoA. Enquanto *AckA* reversivelmente converte acetil-fosfato e ADP em acetato e ATP, acoplando o metabolismo energético ao de carbono e fósforo. A primeira metade do processo de dissimilação do acetato permite as células crescerem rapidamente quando o carbono se apresenta em excesso em relação ao oxigênio ou nitrogênio, enquanto a segunda metade permite que as células recuperem o acetato excretado.

Em *E. coli*, os níveis de *AckA* e *Pta*, bem como suas atividades enzimáticas variam em resposta a diversos fatores ambientais e sob condições anaeróbias o nível de ambas aumentam (WOLFE, 2005). Extratos celulares de STEC M03 foram preparados a partir de células crescidas em estufa estacionária promovendo um ambiente anaeróbio, entretanto *Pta* foi encontrada reprimida pela presença do DCS. A repressão de *Pta* nessa condição pode ser relacionada ao papel chave do acetil-CoA como intermediário nas vias de degradação e biossíntese de lipídeos. Considerando que a bile pode causar dano a membrana (BEGLEY; GAHAN; HILL,

2005), o consumo de acetil-CoA para a síntese de lipídeos poderia estar aumentado. Então, a repressão de Pta, disponibilizaria uma maior quantidade de acetil-CoA para o metabolismo de lipídeos.

O volume de células de STEC M03 provenientes de cultivo na presença de DCS, recuperadas após centrifugação, foi menor que o obtido a partir das células cultivadas na condição controle. Esse efeito pode ser relacionado com a repressão de Pta uma vez que o acetil-fosfato, que é produzido na reação catalisada por essa enzima, regula vários processos celulares como divisão celular, assimilação de nitrogênio, osmorregulação, desenvolvimento de biofilme, biossíntese e montagem de flagelo e a expressão de porinas e efetores de estresse (SHIN e PARK, 1995; PRUSS, 1998; WOLFE *et al.*, 2003; WOLFE, 2005). Em adição, mutantes para Pta ou Pta e AckA cresceram mais lentamente que estirpes selvagens de *E. coli* (PRUSS, 1998; WOLFE *et al.*, 2003).

Estudos mostram que algumas proteínas apresentam expressão negativamente influenciada pelos níveis de acetil-fosfato, incluindo algumas envolvidas na biossíntese de flagelo, porinas de membrana externa (OmpF, OmpC) e chaperonas (DnaK, MopB, MopA). Outras envolvidas em proteção ao estresse (OsmB, OsmY) responderam positivamente (WOLFE *et al.*, 2003). O acetil-fosfato também tem sido associado com a regulação da biossíntese de alguns fatores de virulência como pili e a capsula (WOLFE *et al.*, 2003; WOLFE, 2005) que tem participação na patogênese de algumas bactérias. Em *Borrelia burgdorferi* o acetil-fosfato está relacionado com infectividade em ratos por ativar a via Rrp2-RpoN-RpoS, que modula a expressão diferencial de genes de virulência principais (XU *et al.*, 2010). Um mutante *pta* de *E. coli* CFT073 urinária mostrou inabilidade em colonizar os rins de camundongo (ANFORA *et al.*, 2008). Em *Salmonella* Typhimurium um mutante *pta* teve seu crescimento reduzido e foi atenuado em camundongos BALB/c (KIM *et al.*, 2006). Em *Vibrio cholerae* um mutante *pta* apresentou deficiência de crescimento, bloqueio da produção de toxina pilus co-regulada (estrutura fimbrial requerida para a colonização) e também a redução da produção de toxina da cólera (CHIANG e MEKALANOS, 1998). Assim, tem sido sugerido que o acetil-fosfato possa servir como um sinal global na patogênese bacteriana (XU *et al.*, 2010).

Foi mostrado que STEC EDL933 não conseguiu crescer no conteúdo intestinal de camundongo, mas colonizou o intestino crescendo na camada de muco

e em associação próxima com as células epiteliais intestinais (MIRANDA *et al.*, 2004) onde os níveis de bile são menores. Um comportamento similar é possível para STEC M03, que no muco intestinal com menor concentração de bile adaptaria seu metabolismo e expressaria suas características de virulência. Considerando que ambas, GldA e Pta têm sido associadas com virulência em algumas bactérias, nós especulamos que em adição a seus papéis no metabolismo, elas possam de alguma forma participar na virulência de STEC M03.

O fator de alongamento Tu (EF-Tu, TufA) foi induzido pelo DCS em STEC M03 (FIGURA 14, TABELA 4). Essa proteína é parte da maquinaria de tradução transportando o aminoacil-tRNA para o ribossomo. Entretanto, foi demonstrado que o EF-Tu de *E. coli* também tem atividade semelhante a chaperona, em adição a seu papel na tradução. Esse fator também interage com proteínas desnaturadas e com o enovelamento afetado (incorreto) e foi implicado no enovelamento e renaturação proteica após exposição a diferentes agentes estressantes incluindo choque térmico e guanidina, que são desnaturantes proteicos, e dietiltreitol (DTT), um agente redutor capaz de afetar o balanço redox no citoplasma (CALDAS; EL YAAGOUBI; RICHARME, 1998; HAN *et al.*, 2008).

EF-Tu foi encontrado super expresso em *Bifidobacterium longum* NCIMB 8809 após exposição aos sais biliares (SANCHEZ *et al.*, 2005) e em células de *E. coli* isoladas do trato gastrointestinal de camundongos gnotobioticos em relação aquelas isoladas a partir da cultura de fezes; sugerindo que no intestino exista um sinal que ative sua expressão (ALPERT *et al.*, 2009).

Uma vez que menor quantidade de células bacterianas foi recuperada a partir de cultivos na condição teste, a indução do EF-Tu pode ser uma resposta de proteção exibida pela estirpe M03 para superar os danos celulares decorrentes da exposição ao DCS. Nessa situação acreditamos que a atuação de EF-Tu como chaperona seja de fundamental importância para a manutenção do crescimento.

A enzima frutose bifosfato aldolase classe II (Alf/FbaA2, EC 4.1.2.13), que catalisa a quebra da frutose 1,6-bisfosfato em gliceraldeído 3-fosfato (G3P) e dihidroxiacetona fosfato (DHAP) foi detectada apenas em STEC M03, nas condições utilizadas. Essa é a enzima chave da via de Embden-Meyerhof-Parnas (ENCHEVA; SHAH; GHARBIA, 2009). Alf foi encontrada induzida em *E. coli* K-12 (ATCC 10798) cultivada sob agitação em meio mínimo M9 suplementado com acetado de sódio, em comparação com os cultivos na presença de glicose ou lactose (SILVA *et al.*,

2006). Em *Staphylococcus aureus* duas enzimas com função de frutose bisfosfato aldolase (FbaA e SA2399) foram induzidas durante fase exponencial de crescimento em relação a fase estacionária de crescimento (KÖHLER *et al.*, 2005). FbaA2 foi induzida em *Yersinia pestis* KIM5D27 cultivada na presença de cálcio e que a temperatura de 37°C sua expressão foi favorecida, quando comparada a temperatura de 26°C (CHROMY *et al.*, 2005). *E. coli* estirpe UNC em co-cultivo com células epiteliais de rato (IEC6) induziu a expressão de FbaA2 (ALPERT *et al.*, 2005). *E. coli* estirpes CMH1 e CMH2 inoculadas em camundongos gnotobioticos e obtidas de amostras do ceco e das fezes destes não apresentaram diferença de expressão da enzima FbaA2 (ALPERT *et al.*, 2009). Células de *Mycoplasma mycoides* em condição de biofilme apresentaram maior expressão de FbaA em relação às células em condição planctônica (MCAULIFFE *et al.*, 2008). *Yersinia pseudotuberculosis* cultivada em plasma humano induziu a expressão de FbaA em relação ao cultivo em LB (ROSSO *et al.*, 2008).

Conforme relatado por Alpert e colaboradores (2009), não encontramos diferença de expressão de FbaA2 em relação as condições teste (presença de DCS) e controle, mostrando que essa enzima é metabolicamente relevante para STEC M03 nas condições empregadas, mesmo na ausência de sal biliar.

Sendo essa uma enzima chave do metabolismo ela deve estar presente também na estirpe *E. coli* ATCC 25922, talvez como uma isoforma; com alguma modificação pós traducional ou mesmo em quantidade muito baixa não detectável nas condições deste estudo.

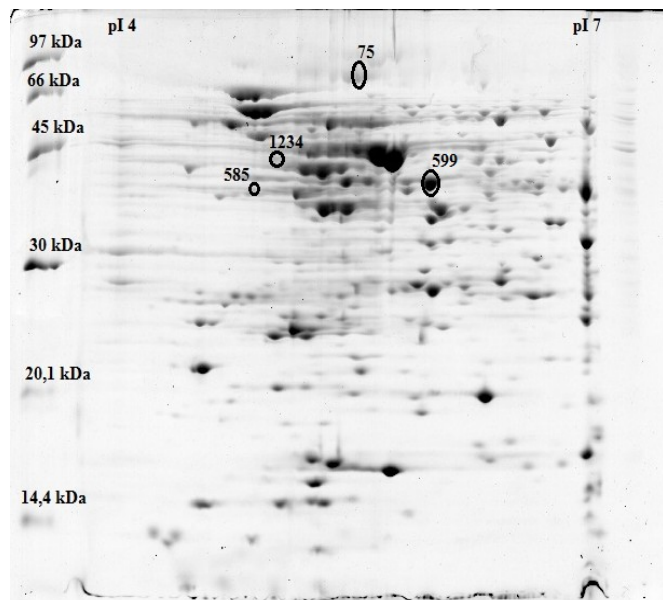
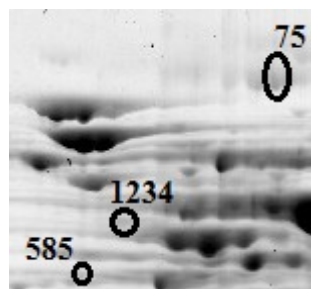
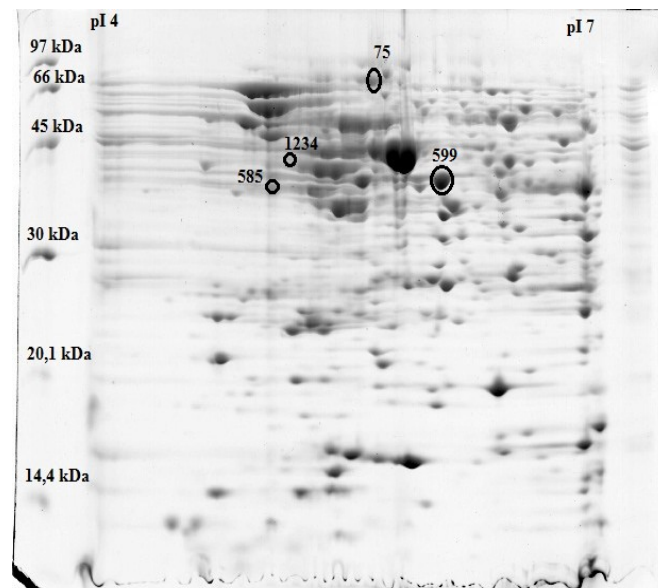
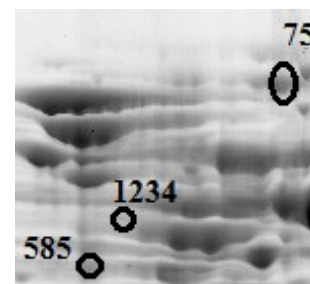
A**a****B****b**

FIGURA 14 – GÉIS 2D DE STEC M03 COM PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS MARCADAS

Imagem digitalizada de gel bidimensional pH 4-7 linear, de 350 µg de proteínas do extrato de STEC M03. **Horizontalmente no topo da esquerda para direita:** variação do pH 4 - pH 7; **verticalmente na lateral esquerda:** marcador de baixo peso molecular (GE Healthcare); **região central:** proteínas separadas em função do pI (horizontal) e MM (vertical) e coradas por PhastGel Blue R 0,1% (GE Healthcare); **círculos:** proteínas reprimidas (75 e 585) e estimulada (1234) na condição teste; **A:** gel 2D de STEC M03 cultivada na presença de dcs; **a:** detalhe do gel 2D de STEC M03 cultivada na presença de dcs; **B:** gel 2D de STEC M03 cultivada na ausência de dcs; **b:** detalhe do gel 2D de STEC M03 cultivada na ausência de dcs.

FONTE: A autora (2012)

TABELA 4 – PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS POR STEC M03

No. Spot	Vol. Spot (%)	Varição da expressão	Proteína ID	CA	Gene	Cepa com maior escore	MM/ pI experimental (kDa)	MM/pI teórica (kDa)	PP/ PE	SC (%)	Escore ID	EM	Fragmento identificado no EM2
Proteína detectada apenas em STEC M03													
559	2,23	presente	Frutose bifosfato aldolase classe 2	ALF_ECO57	fbaA	<i>E. coli</i> O157:H7	37 / 5,98	39,351 / 5,52	36/10	27	101	EM1	-
Proteína Induzida na condição teste													
1234	0,04	1,7	Fator de elongação Tu	EFTU_ECO57	tufA	<i>E. coli</i> O157:H7	43 / 5,16	43,457 / 5,30	28/11	36	119	EM1	-
Proteínas Reprimidas na condição teste													
75	0,12	1,85	Fosfato acetiltransferase	PTA_ECOLI	pta	<i>E. coli</i> K-12	73 / 5,65	77,472 / 5,28	25/10	17	93	EM1 e EM2	DAEVVLVEGLVPTR
585	0,34	3,9	Glicerol desidrogenase	GLDA_ECOL6	gldA	<i>E. coli</i> O6	38 / 5,06	39,094 / 4,81	-	2	27	EM2	LGEYLKPLAER

No. Spot: número atribuído ao “spot” no gel de referência utilizado nas análises no programa ImageMaster; **Vol. Spot (%):** volume médio dos referidos “spots” em porcentagem, obtido por meio do programa ImageMaster; **Varição da expressão:** razão entre o menor volume para um “spot” nos géis do tratamento teste, pelo maior volume para um “spot” no tratamento controle, valores positivos indicam indução, sendo considerados apenas os valores acima de 1,5 e que apresentaram teste t significativo em nível de 0,05; **Proteína ID:** proteína identificada por PMF no banco de dados SwissProt; **CA:** nome de acesso no SwissProt; **PP/PE:** quantidade de peptídeos tripticos procurados/ quantidade de peptídeos teóricos encontrados no banco de dados SwissProt; **SC:** sequência da proteína identificada coberta pelos peptídeos ou fragmentos de peptídeos procurados; **Escore ID:** escore obtido pela proteína identificada em relação ao valor de corte de 56 estabelecido pelo programa Mascot quando o SwissProt foi utilizado como banco de dados para as buscas, **EM:** espectro de massa utilizado para a identificação da proteína analisada, espectro de massas dos íons dos peptídeos tripticos (EM1 - ToF) e espectro de massas da fragmentação de íon parental (EM2 - ToF/ToF); **Fragmento identificado no EM2:** sequência de aminoácidos correspondente aos fragmentos de um íon parental, que permitiram a identificação da proteína analisada.

Para sobreviver e colonizar o hospedeiro as bactérias da microbiota precisam obter os nutrientes necessários para o crescimento a partir do ambiente interno do hospedeiro. Para tanto, as bactérias localizam e respondem a sinais específicos nos microambientes do hospedeiro, promovendo alterações nas vias metabólicas necessárias ao crescimento, sendo de fundamental relevância a compreensão da fisiologia bacteriana dentro do hospedeiro (BROWN *et al.*, 2008).

A comparação entre os géis 2D obtidos a partir dos extratos celulares de *E. coli* ATCC 25922 cultivada na condição controle e na condição teste revelou a indução (superior a 1,5 vezes) de uma proteína (nº spot 1418) e a repressão de duas outras (nº spot 602 e 670) na condição teste em relação a condição controle, identificados na FIGURA 15. Alguns dados acerca destas proteínas encontram-se na TABELA 5.

A proteína que apresentou maior expressão na condição teste em comparação a condição controle foi identificada como *Cold shock protein A* (CspA). CspA foi inicialmente identificada como sendo a proteína mais expressa em condição de choque ao frio. CspA foi encontrada ligada a ácidos nucleicos (JONES; van BOGELEN; NEIDHARDT, 1987; GOLDSTEIN; POLLITT; INOUE, 1990; YAMANAKA e INOUE, 2001) e descrita como chaperona de RNA (JIANG; HOU e INOUE, 1997; BAE; XIA; INOUE e SEVERINOV, 2000; GARAPATI e SURYANARAYANA, 2012) e participando na estimulação da expressão de genes relacionados com o choque frio (JONES, P. G. *et al.*, 1992) ao estabilizar complexos RNA-polimerase-DNA (GRAUMANN, P. L.; MARAHIEL, M. A., 1998). BAHK e colaboradores (2004), estudando dois isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis*, estirpes K e CDC1551, sugerem que a proteína Rv3648c, anteriormente purificada e caracterizada como CspA (WELDING *et al.*, 2000) esteja relacionada com virulência por ter sido capaz de induzir resposta por célula T (em camundongos) e do tipo hipersensibilidade tardia (em porquinhos da Índia infectados por *Mycobacterium tuberculosis*). CspA parece estar envolvida na resposta a diferentes agentes estressantes. Em *Pseudomonas putida* DOT-T1E cultivada na presença de tolueno, solvente orgânico capaz de desorganizar as membranas celulares, houve indução na expressão de *cspA2*, um gene que codifica para CspA. Mutantes *cspA2* submetidos a choque com tolueno apresentam taxa de sobrevivência semelhante a estirpe selvagem, porém durante cultivo prolongado na presença do mesmo solvente o resultado obtido foi oposto, sugerindo que CspA

possa estar envolvida na resistência a exposição prolongada a solventes, porém não na sobrevivência ao choque com tolueno (SEGURA *et al.*, 2005). *Staphylococcus aureus* estirpe COL (metecilina-resistente) e estirpe 8325 (sensível a metecilina) submetidos a tratamento com Triton X-100, detergente não iônico capaz de permeabilizar as membranas celulares, induziram a expressão de CspA em relação ao cultivo na ausência deste detergente. Essa resposta parece estar relacionada com a ativação do fator σ^B , induzido pela presença de Triton X-100 (CORDWELL *et al.*, 2002).

Sendo assim, o resultado encontrado no presente trabalho mostra-se de acordo com os estudos referenciados. Frente ao papel estressante exercido pelo DCS sobre as células de *E. coli* ATCC 25922, no sentido de provocar distúrbios na membrana celular, podemos supor que CspA estaria contribuindo para a estabilização de complexos RNA-polimerase-DNA, favorecendo o aumento da transcrição e tradução de enzimas envolvidas no reparo e manutenção da membrana celular, bem como dos sistemas de efluxo para os sais biliares.

O crescimento na condição teste levou a diminuição da expressão de duas proteínas identificadas como: catabólito da enzima L-treonina desidratase (TdcB) e glicerofosforil diéster fosfodiesterase (GlpQ).

O gene *tdcB* codifica a enzima L-treonina desidratase (EC 4.3.1.19) TdcB é responsável pela catálise da reação de desaminação da L-treonina a 2-cetobutirato e amônia (DATTA *et al.*, 1987). TdcB é codificado no operon *tdcABCDEFG* que é anaerobicamente regulado em *E. coli* e codifica outros genes envolvidos no transporte e metabolismo da L-treonina e L-serina (HESSLINGER; FAIRHURST e SAWERS, 1998; LIM *et al.*, 2010). TdcB foi encontrada com expressão aumentada em *E. coli* K12 crescida aerobicamente em pH levemente básico (MAURER *et al.*, 2005) e anaerobicamente em pH levemente ácido (HAYES *et al.*, 2006). Em *Klebsiella pneumoniae* crescendo em LB com 5% (p/v) de bile bovina foi observada a indução da expressão de *tdcB*, a qual se mostrou dependente unicamente da expressão de *tdcA* (HSIEH *et al.*, 2010). Com base nos dados apresentados, o fato de termos encontrado TdcB reprimida na condição teste (presença de sal biliar) pode sugerir que as condições do meio no momento da realização do extrato proteico de *E. coli* ATCC 25922 eram diferentes (pH e tensão de oxigênio) das presentes nos trabalhos com *E. coli* K-12. Condições semelhantes que levaram a indução de *tdcB* em *K. pneumoniae*, não foram capazes de produzir a mesma

resposta em *E. coli* ATCC 25922, provavelmente pelo fato deste operon, em *E. coli*, ser controlado por vários outros fatores (SAWERS, 2001).

A segunda proteína reprimida pelo cultivo de *E. coli* ATCC 25922 na condição teste foi glicerofosforil diester fosfodiesterase (GlpQ, EC 3.1.4.46), enzima responsável pela hidrólise de ésteres do glicerol-3-fosfato com formação de glicerol-3-fosfato e álcool (SONCK *et al.*, 2009). Em *Mycoplasma pneumoniae* essa enzima foi associada com o controle da expressão gênica em nível de transcrição atuando como enzima disparadora. Ainda neste micro-organismo a expressão do gene *glpQ* foi induzida na presença de glicerol-3-fosfato, importante intermediário no metabolismo de lipídeos, e reprimida quando fontes de carbono mais favoráveis (ex. glicose) estavam presentes no meio de cultivo (SCHMIDL *et al.*, 2011).

O regulon *glp* de *Bacillus subtilis* está envolvido na assimilação e catabolismo do glicerol e glicerol-3-fosfato. Dentro deste existem 4 operons, *glpP*, *glpFK*, *glpD* e *glpTQ* (NILSSON; BEIJER e RUTBERG, 1994) *glpP* codifica uma proteína antiterminação, *glpF* codifica um facilitador da entrada de glicerol, *glpK* uma glicerol quinase, *glpD* uma glicerol-3-fosfato dehidrogenase, *glpT* uma permease para glicerol-3-fosfato e *glpQ* uma glicerofosfodiester fosfodiesterase (TOMMASSEN *et al.*, 1991; NILSSON; BEIJER e RUTBERG, 1994). *E. coli* W3100 cultivada a 37°C, sob forte agitação em meio LB adicionado ou não de mitomicina C, um agente causador de dano ao DNA, apresentou expressão induzida de *glpQ* (KHIL e CAMERINI-OTERO, 2002). Células de *E. coli* K-12 MG1655 cultivadas de forma estacionária em LB adicionado de 0,2% de glicose, temperatura de 25°C com inoculo de 17 dias de cultivo, após subcultivadas por até 5 h (fase lag/adaptativa) apresentaram repressão dos genes envolvidos no metabolismo anaeróbico do glicerol e glicerolipídeos (*glpA*, *glpB*, *glpT* e *glpQ*) (PIN *et al.*, 2009). BELOIN e colaboradores (2004) relataram que GlpQ foi induzida em biofilmes maduros de *E. coli* K-12. Em *Salmonella enterica* Typhimurium cultivada em condições miméticas do sistema in vivo (baixa tensão de oxigênio e alta osmolaridade) induziram a expressão das proteínas TdcB e GlpQ (SONCK *et al.*, 2009). O resultado para GlpQ, por nós relatado foi obtido em condição diversa as descritas nos trabalhos acima. Sendo os extratos feitos a partir de inoculo com no máximo 28 h de incubação e subcultivadas por 3 h em meio LB sem adição de qualquer outra fonte de carbono, podemos afirmar que as células eram relativamente jovens e que se encontravam em fase exponencial e não adaptativa. Na condição teste (presença de DCS) o

glicerol-3-fosfato pode estar sendo desviado para a síntese de outros lipídeos que não os glicerolipídeos, no processo de manutenção da membrana celular, o que acarretaria uma diminuição da expressão de GlpQ.

Os resultados encontrados no presente trabalho mostram que não foi detectada a expressão diferencial em presença de sal biliar de nenhum fator de virulência clássico de *E. coli*. As justificativas para tanto poderiam estar na questão destes fatores estarem normalmente associados à membrana, sendo proteínas hidrofóbicas, serem secretados no meio extracelular ou terem pI fora do intervalo mais estudado neste trabalho (HAN e LEE, 2006).

Os dados apresentados indicam que as estirpes de *E. coli* estudadas respondem de forma diferenciada as condições de tratamento impostas. As proteínas encontradas como diferenciais são sugestivas e vem ao encontro dos resultados das pesquisas mais recentes nesta área, que tem mostrado que as adaptações metabólicas bacterianas possam ser tão importantes quanto a capacidade de expressão de fatores de virulência clássicos, para o desenvolvimento do processo infeccioso. Porém, estudos confirmatórios com metodologias complementares como a reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR), RNA_{seq} ou mutagenese, visando corroborar os dados aqui apresentados seriam aconselháveis.

TABELA 5 – PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS POR *E. coli* ATCC 25922 NA CONDIÇÃO TESTE

No. Spot	Vol. Spot (%)	Varição da expressão	Proteína ID	CA	Gene	Cepa com maior escore	MM/ pI experimental (kDa)	MM/pI teórica (kDa)	PP/PE	SC (%)	Escore ID	EM	Fragmento identificado no EMS
Proteína Induzida													
1418	0,461	2,23	Proteína de choque frio CspA	CSPA_ECOLI	cspA	<i>E. coli</i> K12	12 / 6,08	7,7 / 6,54	-	14	39	EM1e EM2	VTFSIESGAK
Proteínas Reprimidas													
602	0,796	1,62	Glicerofosforildiester fosfodiesterase	GLPQ_ECOLI	glpQ	<i>E. coli</i> K12	42 / 5,76	40,8 / 5,38	18/7	17	82	EM1 e EM2	YYAIDFTLDEIK
670	0,172	1,68	L-treonina desidratase TdcB	TDCB_ECOL6	tdcB	<i>E. coli</i> O6	39 / 6,42	35,5 / 5,75	28/12	33	143	EM1	-

No. Spot: número atribuído ao “spot” no gel de referência utilizado nas análises no programa ImageMaster; **Vol. Spot (%):** volume médio dos referidos “spots” em porcentagem, obtido por meio do programa ImageMaster; **Varição da expressão:** razão entre o menor volume para um “spot” nos géis do tratamento teste, pelo maior volume para um “spot” no tratamento controle, valores positivos indicam indução, sendo considerados apenas os valores acima de 1,5 e que apresentaram teste t significativo em nível de 0,05; **Proteína ID:** proteína identificada por PMF no banco de dados SwissProt; **CA:** nome de acesso no SwissProt; **PP/PE:** quantidade de peptídeos tripticos procurados/ quantidade de peptídeos teóricos encontrados no banco de dados SwissProt; **SC:** sequência da proteína identificada coberta pelos peptídeos ou fragmentos de peptídeos procurados; **Escore ID:** escore obtido pela proteína identificada em relação ao valor de corte de 56 estabelecido pelo programa Mascot quando o SwissProt foi utilizado como banco de dados para as buscas, **EM:** espectro de massa utilizado para a identificação da proteína analisada, espectro de massas dos íons dos peptídeos tripticos (EM1 - ToF) e espectro de massas da fragmentação de íon parental (EM2 - ToF/ToF); **Fragmento identificado no EM2:** sequência de aminoácidos correspondente aos fragmentos de um íon parental, que permitiram a identificação da proteína analisada.

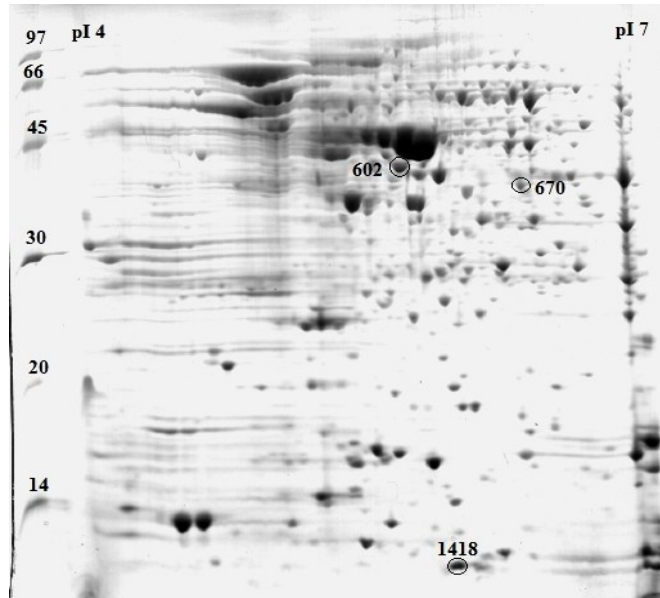
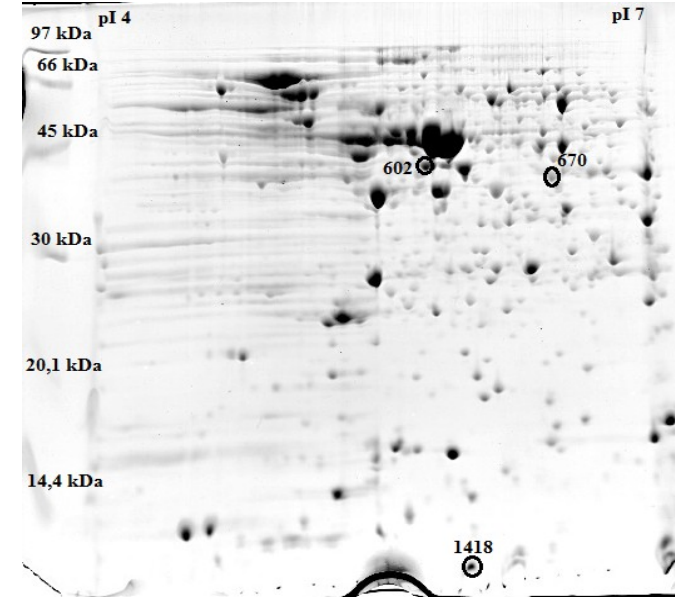
A**B**

FIGURA 15 - GÉIS 2D DE *E. coli* ATCC 25922 COM PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS MARCADAS

Imagem digitalizada de gel bidimensional pH 4-7 linear, de 350 μ g de proteínas do extrato de *E. coli* ATCC 25922. **Horizontalmente no topo da esquerda para direita:** variação do pH 4 - pH 7; **verticalmente na lateral esquerda:** marcador de baixo peso molecular (GE Healthcare); **região central:** proteínas separadas em função do pI (horizontal) e MM (vertical) e coradas por PhastGel Blue R 0,1% (GE Healthcare); **círculos:** proteínas reprimidas (75 e 585) e estimulada (1234) na condição teste; **A:** gel 2D de *E. coli* ATCC 25922 cultivada na presença de dcs; **B:** gel 2D de *E. coli* ATCC 25922 cultivada na ausência de dcs.

FONTE: A autora (2012)

8 CONCLUSÃO

Não foi detectada a expressão diferencial de fatores de virulência clássicos de *E. coli*.

As proteínas com expressão diferencial encontradas nas estirpes em estudo pertencem a enzimas do metabolismo geral ou da resposta à agentes estressantes.

A inibição de Pta e GldA, em presença de DCS, pode estar relacionada ao controle metabólico da virulência em STEC M03 sob as condições deste estudo, enquanto a estimulação da expressão de EF-Tu deve fazer parte da resposta geral ao estresse químico.

A indução da expressão de CspA pelo DSC deve fazer parte da resposta geral de *E. coli* ATCC 25922 ao estresse químico, enquanto a repressão da expressão de TdcB e GlpQ pode estar relacionada com a resposta de adaptação ao microambiente do hospedeiro.

Nas condições de ensaio empregadas a enzima frutose bifosfato aldolase classe 2 (FbaA2) foi detectada apenas na estirpe STEC M03.

Não foram encontradas proteínas exclusivas que caracterizassem a resposta das estirpes ao DCS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBERSOLD, R. e MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v.422, nº 13, mar. 2003.

ALPERT, C.; ENGST, W.; GUEHLER, A.; OELSCHLAEGER, T.; BLAUT, M. Bacterial response to eukaryotic cells analysis of differentially expressed proteins using nano liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1082, n. 1, p. 25–32, jul. 2005.

ALPERT, C.; SCHEEL, J.; ENGST, W.; LOH, G.; BLAUT, M. Adaptation of protein expression by *Escherichia coli* in the gastrointestinal tract of gnotobiotic mice. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 751-761, abr. 2009.

ANFORA, A. T.; HALLADIN, D. K.; HAUGEN, B. J.; WELCH, R. A. Uropathogenic *Escherichia coli* CFT073 is adapted to acetatogenic growth but does not require acetate during murine urinary tract infection. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 12, p. 5760-5767, dez. 2008.

ATUMA, C.; STRUGALA, V.; ALLEN, A.; HOLM, L. The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state *in vivo*. **American Journal of Physiology**, v. 280, n. 5, p. 922–929, mai. 2001.

BAE, W.; XIA, B.; INOUE, M.; SEVERINOV, K. *Escherichia coli* CspA-family RNA chaperones are transcription antiterminators. **PNAS**, v. 97, n. 14, p. 7784–7789, jul. 2000.

BAHK, Y. Y.; KIM, S. A.; KIM, J. S.; EUH, H. J.; BAI, G. H.; CHO, S. N.; KIM, Y. S. Antigens secreted from *Mycobacterium tuberculosis*: Identification by proteomics approach and test for diagnostic marker. **Proteomics**, v. 4, n. 11, p. 3299–3307, nov. 2004.

BEERS, M.; CAMERON, S. Hemolytic uremic syndrome. **Emerging Infectious Diseases**, v. 1, n. 4, p. 154-155, out. 1995.

BEGLEY, M.; GAHAN, C. G.; HILL, C. The interaction between bacteria and bile. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 4, p. 625-651, set. 2005.

BELOIN, C.; VALLE, J.; LATOUR-LAMBERT, P.; FAURE, P.; KZREMINSKI, M.; BALESTRINO, D.; HAAGENSEN, J. A. J.; MOLIN, S.; PRENSIER, G.; ARBEILLE, B.; GHIGO, J. M. Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. **Molecular Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 659-674, fev. 2004.

BOERLIN, P.; MCEWEN, S. A.; BOERLIN-PETZOLD, F.; WILSON, J. B.; JOHNSON, R. P.; GYLES, C. L. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n. 3, p. 497–503, mar. 1999.

BOUCHIER, I. A. D. Biliary tract disease. In: BOUCHIER, I. A. D., editor. **Gastroenterology**. 3^a ed., Baillière Tindall, London, p. 302–327, 1982.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytic Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, mai. 1976.

BROWN, S. A.; PALMER, K. L.; WHITELEY, M. Revisiting the host as a growth medium. **Nature Reviews in Microbiology**, v. 6, n. 9, p. 657-666, set. 2008.

CABRAL, D. J.; SMALL, D. M.; LILLY, H. S.; HAMILTON, J. A. Transbilayer movement of bile acids in model membranes. **Biochemistry**, v. 26, n. 7, p. 1801-1804, abr. 1987.

CALDAS, T. D.; EL YAAGOUBI, A.; RICхарME, G. Chaperone properties of bacterial elongation factor EF-Tu. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 19, p. 11478-11482, mai. 1998.

CAÑAS, B.; LOPEZ-FERRER, D.; RAMOS-FERNANDEZ, A.; CAMAFEITA, E.; CALVO, E. Mass spectrometry technologies for Proteomics. **Briefings in Functional Genomics and Proteomics**, v. 4, n. 4, p. 295-320, fev. 2006.

CASH, P. Investigating pathogen biology at the level of proteome. **Proteomics**, v. 11, n. 15, p. 3190-3202, ago. 2011.

CERDA-MAIRA, F. A.; RINGELBERG, C. S.; TAYLOR, R. K. The bile response repressor BrcR regulates expression of the *Vibrio cholerae* *breAB* efflux system operon. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 21, p. 7441-7452, nov. 2008.

CERUTTI, A.; RESCIGNO, M. The biology of intestinal immunoglobulin a responses. **Immunity Review**, v. 28, n. 6, p. 740-750, jun. 2008.

CHIANG, S. L.; MEKALANOS, J. J.; Use of signature-tagged transposon mutagenesis to identify *Vibrio cholerae* genes critical for colonization. **Molecular Microbiology**, v. 27, n. 4, p. 797–805, fev. 1998.

CHROMY, B. A.; CHOI, M. W.; MURPHY, G. A.; GONZALES, A. D.; CORZETT, C. H.; CHANG, B. C.; FITCH, J. P.; MCCUTCHEN-MALONEY, S. L. Proteomic characterization of *Yersinia pestis* virulence. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 23, p. 8172-8180, dez. 2005.

COOMBES, B. K.; WICKHAM, M. E.; MASCARENHAS, M.; GRUENHEID, S.; FINLAY, B. B.; KARMALI, M. A. Molecular analysis as an aid to assess the public

health risk of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. **Applied Environmental Microbiology**, v. 74, n. 7, p. 2153–2160, abr. 2008.

CORDWELL, S. J.; LARSEN, M. R.; COLE, R. T.; WALSH, B. J. Comparative proteomics of *Staphylococcus aureus* and the response of methicillin-resistant and methicillin-sensitive strains to Triton X-100. **Microbiology**, v. 148, n. 9, p. 2765–2781, set. 2002.

DATTA, P.; GOSS, T. J.; OMNAAS, J. R.; PATIL, R. V. Covalent structure of biodegradative threonine dehydratase of *Escherichia coli*: homology with other dehydratase. **PNAS**, v. 84, n. 2, p. 393–397, jan. 1987.

DE BOEVER, P.; VERSTRAETE, W. Bile salt deconjugation by *Lactobacillus plantarum* 80 and its implication for bacterial toxicity. **Journal of Applied Microbiology**, v. 87, n. 3, p. 345–352, set. 1999.

DE JESUS, M. C.; URBAN, A. A.; MARASIGAN, M. E.; BARNETT FOSTER, D. E. Acid and bile-salt stress of enteropathogenic *Escherichia coli* enhances adhesion to epithelial cells and alters glycolipid receptor binding specificity. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 192, n. 8, p. 1430–40, out. 2005.

DE SMET, I.; VAN HOORDE, L.; VANDE WOESTYNE, M.; CHRISTIAENS, H.; VERSTRAETE, W. Significance of bile salt hydrolytic activities of lactobacilli. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 79, n. 3, p. 292–301, set. 1995.

DE TONI, F.; DE SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; KLASSEN, G.; IRINO, K.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R.; FIALHO, O. B.; FARAH, S. M. S. S.; FADEL-PICHETH, C. M. T. A prospective study on Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in children with diarrhea in Parana State, Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, n. 5, p. 645–7, mai. 2009.

DE TONI, F.; SOUZA, E. M.; KLASSEN, G.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R.; CRUZ, C. R.; PICHETH, G.; FARAH, S. M. S. S.; FADEL-PICHETH, C. M. T. Detecção de *Escherichia coli* Shiga Toxigênica (STEC) através da amplificação dos genes *stx*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 36, n. 2, p. 73–77, 2004.

DZIVA, F.; van DIEMEN, P. M.; STEVENS, M. P.; SMITH, A. J.; WALLIS, T. S. Identification of *Escherichia coli* O157: H7 genes influencing colonization of the bovine gastrointestinal tract using signature-tagged mutagenesis. **Microbiology**, v. 150, n. 11, p. 3631–3645, nov. 2004.

ENCHEVA, V.; SHAH, H. N.; GHARBIA, S. E. Proteomic analysis of the adaptive response of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to growth under anaerobic conditions. **Microbiology**, v. 155, n. 7, p. 2429–2441, jul. 2009.

ESTELLER, A. Physiology of bile secretion. **World Journal of Gastroenterology**, v. 14, n. 37, p. 5641–5649, out. 2008.

FABICH, A. J.; JONES, S. A.; CHOWDHURY, F. Z.; CERNOSEK, A.; ANDERSON, A.; SMALLEY, D.; MCHARGUE, J. W.; HIGHTOWER, G. A.; SMITH, J. T.; AUTIERI, S. M.; LEATHAM, M. P.; LINS, J. J.; ALLEN, R. L.; LAUX, D. C.; COHEN, P. S.; CONWAY, T. Comparison of carbon nutrition for pathogenic and commensal *Escherichia coli* strains in the mouse intestine. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 3, p. 1143-1152, mar. 2008.

FARAH, S. M. S. S.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; IRINO, K.; SILVA, L. R.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R.; PIGATTO, C. P.; FADEL-PICHETH, C. M. T. Phenotypic and genotypic traits of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from beef cattle from Paraná State, southern Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 607-612, jun. 2007.

FASANO, A. Cellular microbiology: how enteric pathogens socialize with their intestinal host. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 26, n. 5, p. 520-532, mai. 1998.

FIALHO, O. B. **Identificação de estirpes de *Escherichia coli* diarreogênicas por PCR-multiplex**. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – UFPR. Dissertação de mestrado. 2008.

FOURNIER, P. E.; DRANCOURT, M.; RAOULT, D. Bacterial genome sequencing and its use in infectious diseases. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 11, p. 711-723, nov. 2007.

FRANKEL, G.; PHILLIPS, A. D.; ROSENSHINE, I.; DOUGAN, G.; KAPER, J. B.; KNOTTON, S. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. **Molecular Microbiology**, v. 30, n. 5, p. 911–921, dez. 1998.

GARAPATI, U. K.; SURYANARAYANA, T. Isolation of two strong poly (U) binding proteins from moderate halophile *Halomonas eurihalina* and their identification as cold shock proteins. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, e34409, abr. 2012.

GE HEALTHCARE; **2D-Electrophoresis: Principle and Methods**. United Kingdom: Amersham Biosciences UK Ltd, 2005.

GOLDMAN, L.; BENNETT, J. C. **Cecil Textbook of Medicine**. 21ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2000.

GOLDSTEIN, J.; POLLITT, N. S.; INOUE, M. Major cold shock protein of *Escherichia coli*. **PNAS**, v. 87, n. 1, p. 283-287, jan. 1990.

GOMEZ-ZAVAGLIA, A.; KOCIUBINSKI, G.; PEREZ, P.; DISALVO, E.; DE ANTONI, G. Effect of bile on the lipid composition and surface properties of bifidobacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, n. 5, p.794–799, nov. 2002.

GONZALEZ, R.; MURARKA, A.; DHARMADI, Y.; YAZDANI, S. S. A new model for the anaerobic fermentation of glycerol in enteric bacteria: trunk and auxiliary pathways in *Escherichia coli*. **Metabolic Engineering**, v. 10, n. 5, p. 234-245, set. 2008.

GÖRG, A.; OBERMAIER, C.; BOGUTH, G.; HARDER, A.; SCHEIBE, B.; WILDGRUBER, R.; WEISS, W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, v. 21, n. 6, p. 1037-1053, abr. 2000.

GRAHAM, D. R. M.; ELLIOT, S. T.; van EYK, J. E. Broad-based proteomic strategies a practical guide to proteomics and functional screening. **Journal of Physiology**, v. 563, n. 1, p. 1-9, fev. 2005.

GRAUMANN, P. L.; MARAHIEL, M. A. A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain. **Trends in Biochemical Sciences**, v.23, n. 8, p. 286–290, ago. 1998.

GRAVES, P. R. and HAYSTEAD, T. A. J. Molecular biologist's guide to proteomics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 1, p. 39-63, mar. 2002.

GRIFFIN, P. M.; BOYCE, T. G. In: SCHELD, M. W.; ARMSTRONG, D.; HUGHES, J. M. **Emerging infections**. Washington, D.C: ASM, p. 137-146, 1998.

GRUENHEID, S.; SEKIROV, I.; THOMAS, N. A.; DENG, W.; O'DONNELL, P.; GOODE, D.; LI, Y.; FREY, E. A.; BROWN, N. F.; METALNIKOV, P.; PAWSON, T.; ASHMAN, K.; FINLAY, B. B. Identification and characterization of NleA, a non-LEE-encoded type III translocated virulence factor of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Molecular Microbiology**, v.51, n. 5, p.1233-1249, mar. 2004.

GYLES, C. L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 13, p. 45-62, nov., 2006.

HAN, M. J.; LEE, S. Y. The *Escherichia coli* proteome: past, present, and future prospects. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 70, n. 2, p. 362–439, jun. 2006.

HAN, K. Y.; PARK, J. S.; SEO, H. S.; AHN, K. Y.; LEE, J. Multiple stressor-induced proteome responses of *Escherichia coli* BL21(DE3). **Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 5, p. 1891-1903, mai. 2008.

HANSEN, E. J.; WILSON, R. M.; BASEMAN, J. B. Two-dimensional gel electrophoretic comparison of proteins from virulent and avirulent strains of *Mycoplasma pneumoniae*. **Infection and Immunity**, v. 24, n. 2, p. 468-475, mar. 1979.

HAYES, E. T.; WILKS, J. C.; SANFILIPPO, P.; YOHANNES, E.; TATE, D. P.; JONES, B. D.; RADMACHER, M. D.; BONDURANT, S. S.; SLONCZEWSKI, J. L. Oxygen limitation modulates pH regulation of catabolism and hydrogenases, multidrug transporters, and envelope composition in *Escherichia coli* K-12. **BMC Microbiology**, v. 6, p. 89-107, out. 2006.

HERNANDEZ, S. B.; COTA, I.; DUCRET, A.; AUSSEL, L.; CASADESUS, J. Adaptation and preadaptation of *Salmonella enterica* to bile. **PLoS Genetics**. 8, e1002459. jan. 2012.

HESSLINGER, C.; FAIRHURST, S. A.; SAWERS, G. Novel keto acid formate-lyase and propionate kinase enzymes are components of an anaerobic pathway in *Escherichia coli* that degrades L-threonine to propionate. **Molecular Microbiology**, v. 27, n. 2, p. 477-492, jan. 1998.

HOFMANN, A. F. The continuing importance of bile acids in liver and intestinal disease. **Archives of Internal Medicine**, v. 159, n. 22, p.2647-2658, dez. 1999.

HOFMANN, A. F.; HAGEY, L. R. Bile acids: chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 16, p. 2461-2483, ago. 2008.

HOUSE, B.; KUS, J. V.; PRAYITNO, N.; MAIR, R.; QUE, L.; CHINGCUANCO, F.; GANNON, V.; CVITKOVITCH, D. G.; FOSTER, D. B. Acid-stress-induced changes in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 virulence. **Microbiology**, v. 155, n. 9, p. 2907-2918, set. 2009.

HSIEH, P. F.; LIN, H. H.; LIN, T. L.; WANG, J. T. CadC regulates *cad* and *tdc* operons in response to gastrointestinal stresses and enhances intestinal colonization of *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Infectious Disease**, v. 202, n. 1, p. 52-64, jul. 2010.

HUIJGHEBAERT, S. M. and HOFMANN, A. F. Influence of the amino acid moiety on deconjugation of bile acid amidates by cholyglycine hydrolase or human fecal cultures. **Journal of Lipid Research**, v. 27, n. 7, p. 742-752, jul. 1986.

JENKINS, C.; PERRY, N. T.; CHEASTY, T.; SHAW, D. J.; FRANKEL, G.; DOUGAN, G.; GUNN, G. J.; SMITH, H. R.; PATON, A.; PATON, J. C. Distribution of the *saa* gene in strains of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* of human and bovine origins. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1775-1778, abr. 2003.

JIANG, W.; HOU, Y.; INOUE, M. CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 1, p. 196-202, jan. 1997.

JONES, P. G.; van BOGELEN, R. A.; NEIDHARDT, F. C. Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 5, p. 2092-2095, mai. 1987.

JONES, P. G.; KRAH, R.; TAFURI, S. R.; WOLFFE, A. P. DNA gyrase, CS7.4, and the cold shock response in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 174, n. 18, p. 5798-5802, set. 1992.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 9^aed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 427p, 1999.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews in Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123-140, fev. 2004.

KARCH, H.; BIELASZEWSKA, M.; BITZAN, M.; SCHMIDT, H. Epidemiology and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Diagnostic in Microbiology Infectious Disease**, v. 34, n. 3, p. 229-243, jul. 1999.

KELLEY, J. J.; DEKKER, E. E. Identity of *Escherichia coli* d-1-amino-2-propanol:NAD⁺ oxidoreductase with *E. coli* glycerol dehydrogenase but not with *Neisseria gonorrhoeae* 1,2-propanediol:NAD⁺ oxidoreductase. **Journal of Bacteriology**, v. 162, n. 1, p. 170-175, abr. 1985.

KHIL, P. P.; CAMERINI-OTERO, R. D. Over 1000 genes are involved in the DNA damage response of *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 89–105, abr. 2002.

KIM, Y. R.; BRINSMADÉ, S. R.; YANG, Z.; ESCALANTE-SEMERENA, J.; FIERER, J. Mutation of phosphotransacetylase but not isocitrate lyase reduces the virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in mice. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 4, p. 2498-2502, abr. 2006.

KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. **Human Genetics**, v. 26, n. 3, p.231-243, set. 1975.

KOHLER, C.; WOLFF, S.; ALBRECHT, D.; FUCHS, S.; BECHER, D.; BÜTTNER, K.; ENGELMANN, S.; HECKER, M. Proteome analyses of *Staphylococcus aureus* in growing and non-growing cells: A physiological approach. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 295, n. 8, p. 547–565, dez. 2005.

KRISTOFFERSEN, S. M.; RAVNUM, S.; TOURASSE, N. J.; ØKSTAD, O. A.; KOLSTØ, A.; DAVIES, W. Low concentrations of bile salts induce stress responses and reduce motility in *Bacillus cereus* ATCC 14570. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 14, p. 5302–5313, jul. 2007.

KUNTZ, T. B.; KUNTZ, S. Enterohaemorrhagic *E. coli* infection. **Primary Care Update Ob/Gyns**, v. 6, n. 6, p. 192-196, dez. 1999.

KUS, J. V.; GEBREMEDHIN, A.; DANG, V.; TRAN, S. L.; SERBANESCU, A.; FOSTER, D. B. Bile salts induce resistance to polymyxin in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 17, p. 4509-4515, set. 2011.

LAWRENCE, J. G. Common themes in the genome strategies of pathogens. **Current Opinion in Genetics & Development**, v.15, n. 6, p. 584–588, dez. 2005.

LEE, K.; BAE, D.; LIM, D. Evaluation of parameters in peptide mass fingerprint for protein identification by MALDI-TOF mass spectrometry. **Molecules and Cells**, v.13, n. 2, p.175-184, abr. 2002.

LI, M.; ROSENSHINE, I.; TUNG, S. L.; WANG, X. H.; FRIEDBERG, D.; HEW, C. L.; LEUNG, K. Y. Comparative proteomic analysis of extracellular proteins of enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* strains and their *ihf* and *ler* mutants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n. 9, p.5274-5282,

set. 2004.

LIM, S.; KIM, M.; CHOI, J.; RYU S. A mutation in *tdcA* attenuates the virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Molecules and Cells**, v. 29, n. 5, p. 509-517, mai. 2010.

LIN, J. O.; SAHIN, O.; MICHEL, L. O. and ZHANG, Q. Critical role of multidrug efflux pump CmeABC in bile resistance and in vivo colonization of *Campylobacter jejuni*. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 8, p. 4250-4259, ago. 2003.

LINK, A. J.; ROBISON, K.; CHURCH, G. M. Comparing the predicted and observed properties of proteins encoded in the genome of *Escherichia coli* K-12. **Electrophoresis**, v. 18, n. 8, p. 1259-1313, ago. 1997.

MAILLET, I.; BERNDT, P.; MALO, C.; RODRIGUEZ, S.; BRUNISHOLZ, R. A.; PRAGANI, Z.; ARNOLD, S.; LANGEN, H.; WYSS, M. From the genome sequence to the proteome and back: Evaluation of *E. coli* genome annotation with a 2-D gel-based proteomics approach. **Proteomics**, v. 7, n. 7, p. 1097-1106, abr. 2007.

MATSUSHIRO, A.; SATO, K.; MIYAMOTO, H.; YAMAMURA, T.; HONDA, T. Induction of a prophages of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 with norfloxacin. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 7, p. 2257-2260, abr. 1999.

MAURER, L. M.; YOHANNES, E.; BONDURANT, S. S.; RADMACHER, M.; SLONCZEWSKI, J. L. pH regulates genes for flagellar motility, catabolism, and oxidative stress in *Escherichia coli* K-12. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 1, p. 304-319, jan. 2005.

MCAULIFFE, L.; AYLING, R. D.; ELLIS, R. J.; NICHOLAS, R. A. J. Biofilm-grown *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC exhibit both phenotypic and genotypic variation compared with planktonic cells. **Veterinary Microbiology**, v. 129, n. 3-4, p. 315-324, jun. 2008.

McDANIEL, T. K.; JARVIS, K. G.; DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **PNAS**, v. 92, n. 5, p.1664-1668, fev. 1995.

MALIK-KALE, P.; PARKER, C. T. and KONKEL, M. E. Culture of *Campylobacter jejuni* with sodium deoxycholate induces virulence gene expression. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 7, p. 2286-2297, abr. 2008.

MELLIES, J. L; BARRON, A. M. S.; CARMONA, A. M. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* virulence gene regulation. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 9, p. 4199-4210, set. 2007.

MERRITT, M. E.; DONALDSON, J. R. Effect of bile salts on the DNA and membrane integrity of enteric bacteria. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 12, p. 1533-1541, dez. 2009.

MIRANDA, R. L.; CONWAY, T.; LEATHAM, M. P.; CHANG, D. E.; NORRIS, W. E.; ALLEN, J. H.; STEVENSON, S. J.; LAUX, D. C.; COHEN, P. S. Glycolytic and gluconeogenic growth of *Escherichia coli* O157:H7 (EDL933) and *E. coli* K-12 (MG1655) in the mouse intestine. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 3, p. 1666-1676, mar. 2004.

MONTE, M. J.; MARIN, J. J.; ANTELO, A.; VAZQUEZ-TATO, J. Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology. **World Journal of Gastroenterology**, v. 15, n. 7, p. 804-816, fev. 2009.

NAKAYAMA, S.; WATANABE, H. Mechanism of *hilA* repression by 1,2-propanediol consists of two distinct pathways, one dependent on and the other independent of catabolic production of propionate, in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 8, p. 3121-3125, abr. 2006.

NANDAKUMAR, M. P.; CHEUNG, A. and MARTEN, M. R. Proteomic analysis of extracellular proteins from *Escherichia coli* W3110. **Journal of Proteome Research**, v. 5, n. 5, p. 1155-1161, mai. 2006.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 1, p. 142-201, jan. 1998.

NILSSON, R. P.; BEIJER, L.; RUTBERG, B. The *glpT* and *glpQ* genes of the glycerol regulon in *Bacillus subtilis*. **Microbiology**, v. 140, n. 4, p. 723-730, abr. 1994.

PASQUALI, C.; FRUTIGER, S.; WILKINS, M. R.; HUGHES, G.J.; APPEL, R. D.; BAIROCH, A.; SCHALLER, D.; SANCHEZ, J. C.; HOCHSTRASSER, D. F. Two-dimensional gel electrophoresis of *Escherichia coli* homogenates: the *Escherichia coli* SWUISS-2DPAGE database. **Electrophoresis**, v. 17, n. 3, p. 547-555, 1996.

PATON, A. W.; SRIMANOTE, P.; WOODROW, M. C.; PATON, J. C. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 11, p. 6999-7009, nov. 2001.

PATON, J. C.; PATON, A. W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, p.450-479, jul. 1998a.

PATON, A. W.; PATON, J. C. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx*₁, *stx*₂, *eaeA*, enterohaemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfaO111* and *rfaO157*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 598-602, fev. 1998b.

PENQUE, D. Two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry for biomarker discovery. **Proteomics Clinical Applications**, v. 3, n. 2, p. 155-172, fev. 2009.

PÉREZ, H. M. G. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. **Universo Diagnóstico**, v. 1, n° 2, p. 31-34, 2000.

PERNA, N. T.; PLUNKETT, G.; BURLAND, V.; MAU, B.; GLASNER, J. D.; ROSE, D. J.; MAYHEW, G. F.; EVANS, P. S.; GREGOR, J.; KIRKPATRICK, H. A.; PÓSFAL, G.; HACKETT, J.; KLINK, S.; BOUTIN, A.; SHAO, Y.; MILLER, L.; GROTEBECK, E. J.; DAVIS, N. W.; LIM, A.; DIMALANTA, E. T.; POTAMOUSIS, K. D.; APODACA, J.; ANANTHARAMAN, T. S.; LIN, J.; YEN, G.; SCHWARTZ, D. C.; WEICH, R. A.; BLATTNER, F. R. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Nature**, v. 409, n. 6819, p. 529-533, jan. 2001.

PIGATTO, C. P. **Isolamento e frequência de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) em cultura fecal de bovinos no Estado do Paraná.** Curitiba, 2003. 85f. Dissertação. Mestrado em Ciências Veterinárias, Área de concentração Patologia. Setor de Ciências Agrárias. Universidade Federal do Paraná.

PIMENTA, A. M. C. Os desafios do Proteoma. **Ciência Hoje**, v. 32, n. 192, p.16-22, abr. 2003.

PIN, C.; ROLFE, M. D.; MUÑOZ-CUEVAS, M.; HINTON, J. C. D.; PECK, M. W.; WALTON, N. J.; BARANYI, J. Network analysis of the transcriptional pattern of young and old cells of *Escherichia coli* during lag phase. **BMC System Biology**, v. 3, p. 108-125, nov. 2009.

PRIETO, A. I.; RAMOS-MORALES, F.; CASADESUS, J. Bile-induced DNA damage in *Salmonella enterica*. **Genetics**, v. 168, n. 4, p. 1787-1794, dez. 2004.

PROUTY, A. M.; BRODSKY, I. E.; FALKOW, S.; GUNN, J. S. Bile-salt-mediated induction of antimicrobial and bile resistance in *Salmonella* Typhimurium. **Microbiology**, v. 150, n. 4, p. 775-783, abr. 2004a.

PROUTY, A. M.; BRODSKY, I. E.; MANOS, J.; BELAS, R.; FALKOW, S.; GUNN, J. S. Transcriptional regulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium genes by bile. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 177-85, jun. 2004b.

PROUTY, A. M.; GUNN, J. S. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion is repressed in the presence of bile. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 12, p. 6763-9, dez. 2000.

PRUSS, B. M. Acetyl phosphate and the phosphorylation of OmpR are involved in the regulation of the cell division rate in *Escherichia coli*. **Archives Microbiology**, v. 170, n. 3, p. 141-146, set. 1998.

RIDLON, J. M.; KANG, D.-J.; HYLEMON, P.B. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. **Journal of Lipid Research**, v. 47, n. 2, p. 241-259, fev. 2006.

ROSSO, M. L.; CHAUVAUX, S.; DESSEIN, R.; LAURANS, C.; FRANGEUL, L.; LACROIX, C.; SCHIAVO, A.; DILLIES, M. A.; FOULON, J.; COPPÉE, J. Y.; MÉDIGUE, C.; CARNIEL, E.; SIMONET, M.; MARCEAU, M. Growth of *Yersinia pseudotuberculosis* in human plasma: impacts on virulence and metabolic gene

expression. **BMC Microbiology**, v. 8, p. 211-249, dez. 2008.

RUSSO, T. A., and J. R. JOHNSON. A proposal for an inclusive designation for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: ExPEC. The **Journal of Infectious Disease**, v. 181, n. 5, p. 1753-1754, mai. 2000.

SAINZ, T.; PÉREZ, J.; VILLASECA, J.; HERNÁNDEZ, U.; ESLAVA, C.; MENDOZA, G.; WACHER, C. Survival to different acid challenges and outer membrane protein profiles of pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from pozol, a Mexican typical maize fermented food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, n. 3, p. 357-367, dez. 2005.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning - A laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2001.

SANCHEZ, B.; CHAMPOMIER-VERGES, M. C.; ANGLADE, P.; BARAIGE, F.; de LOS REYES-GAVILAN, C. G.; MARGOLLES, A.; ZAGOREC, M. Proteomic Analysis of global changes in protein expression during bile salt exposure of *Bifidobacterium longum* NCIMB 8809. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 16, p. 5799-5808, ago. 2005.

SANTOS, A. C. M.; ZIDKO, A. C. M.; PIGNATARI, A. C. C.; GALES, A. C.; SILVA, R. M. A virulência de *Escherichia coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC) em relação à idade e ao sexo do hospedeiro. **O Mundo da Saúde**, v. 33, n. 4, p. 392-400, dez. 2009.

SAWERS, G. A novel mechanism controls anaerobic and catabolite regulation of the *Escherichia coli* *tdc* operon. **Molecular Microbiology**, v. 39, n. 5, p. 1285-1298, mar. 2001.

SCHEELE, G. A. Two-dimensional gel analysis of soluble proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 14, p. 5375-5385, jul. 1975.

SCHENK, E. A.; KLIPSTEIN, F. A. A protocol for the evaluation of small bowel biopsies. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 25, n. 10, p. 1108-1117, out. 1972.

SCHERL, A.; SANCHEZ, J. C.; HOCHSTRASSER, D. F. Challenges in the overall analysis of microbial proteomes. **Complexus**, v. 2, n. 2, p. 79-86, nov. 2005.

SCHMIDL, S. R.; OTTO, A.; LLUCH-SENAR, M.; PIÑOL, J.; BUSSE, J.; BECHER, D.; STÜLKE, J. A trigger enzyme in *Mycoplasma pneumoniae*: Impact of the glycerophosphodiesterase GlpQ on virulence and gene expression. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 9, e1002263, set. 2011.

SCORZA, F. B.; DORO, F.; RODRÍGUEZ-ORTEGA, M. J.; STELLA, M.; LIBERATORI, S.; TADDEI, A. R.; SERINO, L.; MORIEL, D. G.; NESTA, B.; FONTANA, M. R.; SPAGNUOLO, A.; PIZZA, M.; NORAI, N.; GRANDI, G. Proteomics characterization of outer membrane vesicles from the extraintestinal

pathogenic *Escherichia coli* Δ tolR IHE3034 mutant. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 7, n. 3, p. 473-458, mar. 2008.

SEGURA, A.; GODOY, P.; van DILLEWIJN, P.; HURTADO, A.; ARROYO, N.; SANTACRUZ, S.; RAMOS, J. L. Proteomic analysis reveals the participation of energy- and stress-related proteins in the response of *Pseudomonas putida* DOT-T1E to toluene. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 17, p. 5937–5945, set. 2005.

SHAMES, S. R.; DENG, W.; GUTTMAN, J. A.; DE HOOG, C. L.; LI, Y.; HARDWIDGE, P. R.; SHAM, H. P.; VALLANCE, B. A.; FOSTER, L. J.; FINLAY, B. B. The pathogenic *E. coli* type III effector EspZ interacts with host CD98 and facilitates host cell pro-survival signaling. **Cellular Microbiology**, v. 12, n. 9, p. 1322-1339, set. 2010.

SHIN, S.; PARK, C. Modulation of flagellar expression in *Escherichia coli* by acetyl phosphate and the osmoregulator OmpR. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 16, p. 4696-4702, ago. 1995.

SILVA, J. C.; DENNY, R.; DORSCHER, C.; GORENSTEIN, M. V.; LI, G. Z.; RICHARDSON, K.; WALL, D.; GEROMANOS, S. J. Simultaneous qualitative and quantitative analysis of the *Escherichia coli* proteome: a sweet tale. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 5, n. 4, p. 589–607, abr. 2006.

SMITH, J. L.; FRATAMICO, P. M.; GUNTHER, N. W. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 4, n. 2, p. 134-163, 2007.

SONCK, K. A. J.; KINT, G.; SCHOOF, G.; WAUVEN, C. V.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S. C. J. The proteome of *Salmonella* Typhimurium grown under in vivo-mimicking conditions. **Proteomics**, v. 9, n. 3, p. 565–579, fev. 2009.

SOMMER, U.; PETERSEN, J.; PFEIFFER, M.; SCHROTZ-KING, P.; MORSCZEK, C. Comparison of surface proteomes of enterotoxigenic (ETEC) and commensal *Escherichia coli* strains. **Journal of Microbiological Methods**, v. 83, n. 1, p. 13-19, out. 2010.

SPEICHER, D. W. **Proteome analysis: interpreting the genome**. The Netherlands: Elsevier B. V., 2004.

STENSRUD, K. F.; ADAM, P. R.; LA MAR, C. D.; OLIVE, A. J.; LUSHINGTON, G. H.; SUDHARSAN, R.; SHELTON, N. L.; GIVENS, R. S.; PICKING, W. L.; PICKING, W. D. Deoxycholate interacts with IpaD of *Shigella flexneri* in inducing the recruitment of IpaB to the type III secretion apparatus needle tip. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 27, p. 18646–18654, jul. 2008.

STRYER, L.; TYMOCZKO, J. L.; BERG, J. M. **Biochemistry**. 6th ed. W. H. Freeman and Company, 1026p., USA, 2007.

SUBEDI, K. P.; KIM, I.; KIM, J.; MIN, B.; PARK, C. Role of GldA in dihydroxyacetone and methylglyoxal metabolism of *Escherichia coli* K12. **FEMS Microbiology Letters** v. 279, n. 2, p. 180-7. fev. 2008.

TADDEI, C. R.; OLIVEIRA, F. F.; PIAZZA, R. M. F.; LEME, A. F. P.; KLITZKE, C. F.; SERRANO, S. M. T.; MARTINEZ, M. B.; ELIAS, W. P.; SANT'ANNA, O. A. A comparative study of the outer membrane proteome from an atypical and typical enteropathogenic *Escherichia coli*. **The Open Microbiology Journal**, v. 5, s. 1, p. 83-90, jul. 2011.

TANAKA, C. L. **Perfil proteômico de *Escherichia coli* ATCC 25922**. 35f. Trabalho de conclusão de curso (Curso de Ciências Farmacêuticas) - Setor Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

TANG, C. T.; RUCH, F. E. JR; LIN, C. C. Purification and properties of a nicotinamide adenine dinucleotide-linked dehydrogenase that serves an *Escherichia coli* mutant for glycerol catabolism. **Journal of Bacteriology**, v. 140, n. 1, p. 182–187, out. 1979.

THANASSI, D. G.; CHENG, L. W.; NIKAIDO, H. Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 8, p. 2512-8, abr. 1997.

THONGBOONKERD, V.; CHIANGJONG, W.; SAETUN, P.; SINCHAIKUL, S.; CHEN, S.-T.; KOSITANONT, U. Analysis of differential proteomes in pathogenic and non-pathogenic *Leptospira*: Potential pathogenic and virulence factors. **Proteomics**, v. 9, n. 13, p. 3522–3534, jul. 2009.

TOMMASSEN, J.; EIGLMEIER, K.; COLE, S. T.; OVERDUIN, P.; LARSON, T. J.; BOOS, W. Characterization of two genes, *glpQ* and *ugpQ*, encoding glycerophosphoryl diester phosphodiesterases of *Escherichia coli*. **Molecular and General Genetics**, v. 226, n. 1-2, p. 321-327, abr. 1991.

TORRES, A. G.; TUTT, C. B.; DUVAL, L.; POPOV, V.; NASR, A. B.; MICHALSKI, J.; SCALETSKY, I. C. Bile salts induce expression of the afimbrial LDA adhesin of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Cell Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 1039-49, abr. 2007.

TRABULSI, L. R.; CANDEIAS, J. A. N.; MURAHOVSKI, J.; NETO, U. F.; FALCÃO, D. P.; PASTERNAK, J.; ILVAN, D. R.; SILVA, R. M.; FERREIRA, M. C. S. **Atualização em Microbiologia Clínica: Microbiologia das Infecções Intestinais**, v.1, 135p., São Paulo, 1981.

TRUNIGER, V.; BOOS, W. Mapping and cloning of *gldA*, the structural gene of the *Escherichia coli* glycerol dehydrogenase. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 6, p. 1796-1800, mar. 1994.

VAN SCHAIK, W. and WILLEMS, R. J. L. Genome-based insights into the evolution of enterococci. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 6, p. 527-532, jun. 2010.

VAZ, T. M.; IRINO, K.; KATO, M. A.; DIAS, A. M.; GOMES, T. A.; MEDEIROS, M. I.; ROCHA, M. M.; GUTH, B. E. Virulence properties and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Sao Paulo, Brazil, from 1976 through 1999. **Journal of**

Clinical Microbiology, v. 42, n. 2, p. 903-905, fev. 2004.

WAAR, K.; MUSCHOLL-SILBERHORN, A. B.; WILLEMS, R. J. L.; SLOOFF, M. J. H.; HARMSSEN, H. J. M.; DEGENER, J. E. Genogrouping and incidence of virulence factors of *Enterococcus faecalis* in liver transplant patients differ from blood culture and fecal isolates. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 185, n. 8, p. 1121–1127, abr. 2002.

WALTERS, M. S. and MOBLEY, H. L. T. Identification of uropathogenic *Escherichia coli* surface proteins by shotgun proteomics. **Journal of Microbiological Methods**, v. 78, n. 2, p. 131-135, ago., 2009.

WEBER, A.; KÖL, S. A.; JUNG, K. Time-dependent proteome alterations under osmotic stress during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 20, p.7165-7175, out. 2006.

WECKER, J. E. **Sistema digestório**. Disponível em: <www.sogab.com.br/anatomia/sistemadigestoriojonas> Acesso em 01 de fevereiro de 2010.

WELDING, K.; HANSEN, A.; JACOBSEN, S.; ANDERSEN, P. High resolution electroelution of polyacrylamide gels for the purification of single proteins from *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 51, n. 1, p. 79–86, jan. 2000.

WERBER, D.; FRUTH, A.; BUCHHOLZ, U.; PRAGER, R.; KRAMER, M. H.; TSCHÄPE, H.; AMMON, A. Strong association between Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and virulence genes *stx2* and *eae* as possible explanation for predominance of serogroup O157 in patients with haemolytic uraemic syndrome. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease**, v. 22, n. 12, p. 726–730, dez. 2003.

WESTERMEIER, R.; NAVEN, T. **Proteomics in Practice**. A Laboratory Manual of Proteome Analysis. Weinheim: Wiley-VCH, 2002.

WHO/CSR/APH/98.8. **Zoonotic non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC)**. Report of a WHO scientific working group meeting. Berlin, Germany. p. 23-26, jun. 1998.

WIBBENMEYER, J. A.; PROVENZANO, D.; LAUDRY, C. F.; KLOSE, K. E.; DELCOUR, A. H. *Vibrio cholerae* OmpU and OmpT porins are differentially affected by bile. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 1, p. 121–126, jan. 2002.

WICKHAM, M. E.; LUPP, C.; MASCARENHAS, M.; VAZQUEZ, A.; COOMBES, B. K.; BROWN, N. F.; COBURN, B. A.; DENG, W.; PUENTE, J. L.; KARMALI, M. A.; FINLAY, B. B. Bacterial genetic determinants of non-O157 STEC outbreaks and hemolytic-uremic syndrome after infection. **Journal of Infectious Disease**, v. 194, n. 6, p. 819–827, set. 2006.

WOLFE, A. J. The acetate switch. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, n. 1, p. 12-50, mar. 2005.

WOLFE, A. J.; CHANG, D. E.; WALKER, J. D.; SEITZ-PARTRIDGE, J. E.; VIDAURRI, M. D.; LANGE, C. F.; PRÜSS, B. M.; HENK, M. C.; LARKIN, J. C.; CONWAY, T. Evidence that acetyl phosphate functions as a global signal during biofilm development. **Molecular Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 977–988, mai. 2003.

WONG, C. S.; JELACIC, S.; HABEEB, R. L.; WATKINS, S. L.; TARR, P. I. The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. **NEJM**, v. 342, n. 26, p. 1930-1936, jun. 2000.

XU, H.; CAIMANO, M. J.; LIN, T.; HE, M.; RADOLF, J. D.; NORRIS, S. J.; GHERARDINI, F.; WOLFE, A. J.; YANG, F. Role of acetyl-phosphate in activation of the Rrp2-RpoN-RpoS pathway in *Borrelia burgdorferi*. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 9, e1001104, set. 2010.

YAMANAKA K, INOUE M. Selective mRNA degradation by polynucleotide phosphorylase in cold shock adaptation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, v. 183, n. 9, p. 2808–2816, mai. 2001.

ZHANG, K.; ZHAO, W. D.; LI, Q.; FANG, W. G.; ZHU, L.; SHANG, D. S.; CHEN, Y. H. Tentative identification of glycerol dehydrogenase as *Escherichia coli* K1 virulence factor *cgID* and its involvement in the pathogenesis of experimental neonatal meningitis. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 198, n. 3, p. 195-204, ago. 2009.

ZHANG, X.; McDANIEL, A. D.; WOLF, L. E.; KEUSCH, G. T.; WALDOR, M. K.; ACHESON, D. W. K. Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages toxin production, and death in mice. **Journal of Infectious Disease**, v. 181, n. 2, p. 664-670, fev. 2000.