

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**CASSIANE ELISABETE LOPES**

**COMPARAÇÃO GENÔMICA E FENOTÍPICA ENTRE ISOLADOS DE  
*Escherichia coli* UROPATOGÊNICAS (UPEC) E ENDOMETRIAS  
PATOGENICAS (EnPEC) ORIGINÁRIOS DE CISTITE E PIOMETRA  
SIMULTÂNEAS EM CADELAS E GATAS**

**Porto Alegre**

**2023**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**COMPARAÇÃO GENÔMICA E FENOTÍPICA ENTRE ISOLADOS DE**  
***Escherichia coli* UROPATOGÊNICAS (UPEC) E ENDOMETRIAS**  
**PATOGÊNICAS (EnPEC) ORIGINÁRIOS DE CISTITE E PIOMETRA**  
**SIMULTÂNEAS EM CADELAS E GATAS**

Cassiane Elisabete Lopes

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Ciências Veterinárias, especialidade Bacteriologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Franciele Maboni Siqueira

Porto Alegre

2023

O Presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

### CIP - Catalogação na Publicação

Lopes, Cassiane Elisabete  
COMPARAÇÃO GENÔMICA E FENOTÍPICA ENTRE ISOLADOS DE  
Escherichia coli UROPATOGÊNICAS (UPEC) E ENDOMETRIAS  
PATOGENICAS (EnPEC) ORIGINÁRIOS DE CISTITE E PIOMETRA  
SIMULTÂNEAS EM CADELAS E GATAS / Cassiane Elisabete  
Lopes. -- 2023.  
89 f.  
Orientadora: Franciele Maboni Siqueira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa  
de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto  
Alegre, BR-RS, 2023.

1. piometra. 2. cistite. 3. genômica. 4.  
patogenicidade. 5. Escherichia coli. I. Maboni  
Siqueira, Franciele, orient. II. Título.

**Cassiane Elisabete Lopes**

COMPARAÇÃO GENÔMICA E FENOTÍPICA ENTRE ISOLADOS DE *Escherichia coli* UROPATOGÊNICAS (UPEC) E ENDOMETRIAS PATOGÊNICAS (EnPEC) ORIGINÁRIOS DE CISTITE E PIOMETRA SIMULTÂNEAS EM CADELAS E GATAS

Dissertação de Mestrado em Bacteriologia Veterinária submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Aprovado em 14 FEV 2023

Aprovado por:

.....

Dra. Franciele Maboni Siqueira  
Orientador e Presidente da Comissão

.....

Dra. Flavia Figueira Aburjaile  
Membro da Comissão

.....

Dra. Fabiana Horn  
Membro da Comissão

.....

Dra. Livia Kmetzsch  
Membro da Comissão

## AGRADECIMENTOS

Muitas foram as mãos e mentes que auxiliaram para que esse trabalho se tornasse realidade. Fico muito feliz e agradecida pelas oportunidades de aproximação que a pesquisa proporciona e cada vez mais certa de que a colaboração é chave necessária para o desenvolvimento psíquico e técnico de pesquisadores. Esse trabalho me fez, mais do que nunca, estar à frente das incertezas e do encantamento pela biologia. Desenvolver a dissertação em parte da pandemia de COVID-19 e também frente à desmoralização da pesquisa científica no nosso país não foi tarefa fácil. Por isso, a experiência e o auxílio de cada pessoa foram muito importantes para a persistência e por fim, a satisfação pessoal e coletiva que os resultados desse estudo proporcionaram e proporcionarão.

Agradeço primeiramente à minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dra. Franciele Maboni Siqueira por me dar apoio teórico, técnico e confiança do início ao fim desse trabalho. A presença do orientador é extremamente importante nesse momento de tantas dúvidas que é o desenvolvimento da dissertação. Também às colegas do Laboratório de Bacteriologia Veterinária da UFRGS (LaBacVet) que me auxiliaram muito na execução dos experimentos, sem elas nada disso seria possível. À minha família e amigos, que sempre apoiaram as minhas escolhas e me deram suporte emocional imprescindível durante os dois anos de mestrado.

Agradeço também aos colaboradores, Prof. Dr. Claudio Wageck Canal por fornecer o espaço físico e equipamentos do Laboratório de Virologia Veterinária da UFRGS (ViroVet) para a execução de parte dos experimentos. Também ao Prof. Dr. Marcelo Bertolini e à equipe do Laboratório de Embriologia e Biotécnicas da Reprodução da UFRGS por me auxiliarem com os cultivos celulares. À Prof<sup>a</sup> Dra. Tania Aparecida Tardelli Gomes pela colaboração e suporte teórico na elaboração metodológica desse trabalho. E por fim, aos Prof. Dr. Carlos Pérez Bergmann e Prof. Dra. Annelise Kopp Alves do Laboratório de Materiais Cerâmicos (LACER) da UFRGS pelo auxílio durante as etapas de microscopia eletrônica.

## RESUMO

Piometra e cistite são infecções muito frequentes em fêmeas de animais de companhia, podendo ocorrer de forma simultânea. *Escherichia coli* é o agente microbiano mais envolvido em ambas as infecções, no entanto pouco se sabe sobre a correlação entre *E. coli* Endometriais Patogênicas (EnPEC) e *E. coli* Uropatogênicas (UPEC) isoladas em quadros de infecções uterinas e urinárias simultaneamente. Portanto, o presente trabalho objetivou comparar fenotípica e genotipicamente cepas UPECs e EnPECs isoladas de sete cadelas e uma gata que apresentavam piometra e cistite simultaneamente. Para tanto, análises *in vitro*, através de ensaios de adesão e invasão celular, e *in silico*, utilizando-se comparações genômicas e filogenéticas, foram realizadas com 16 cepas de *E. coli*. As análises *in vitro* envolveram ensaios de adesão e invasão de *E. coli* em células eucarióticas, enquanto os ensaios *in silico* foram realizados com as sequências genômicas obtidas de cada uma das cepas. Os resultados dos ensaios *in vitro* demonstram que isolados EnPEC e UPEC possuem alta capacidade de adesão celular e baixa capacidade de invasão celular. Enquanto alguns isolados UPEC possuíram maior capacidade de adesão, outros isolados EnPEC possuíram maior capacidade de invasão celular em linhagens HeLa e T24. Esses resultados foram confirmados com as observações em microscopia eletrônica, onde o isolado UPEC mostrou-se com capacidade de formação de biofilme, enquanto seu par EnPEC não demonstrou a mesma habilidade. Já as comparações genômicas *in silico* revelaram que, com exceção de um caso, EnPEC e UPEC isoladas de um mesmo animal são clones extraintestinais de *E. coli*. Curiosamente, os oito isolados UPEC demonstraram maior número de genes de virulência comparado com os oito isolados EnPEC. Com os resultados obtidos podemos concluir que isolados EnPEC e UPEC de sete dos oito quadros infecciosos estudados são clones genéticos. Esses clones possuem potencial de virulência e demonstraram habilidade em colonizar *in vitro* células de útero e bexiga. Tais resultados auxiliam na compreensão da patogenicidade e correlações genéticas de *E. coli* envolvidas em ocorrências simultânea de piometra e cistite em fêmeas de animais de companhia

**Palavras-chaves:** piometra, cistite, genômica, patogenicidade

## **ABSTRACT**

*Pyometra and cystitis are frequent infections of pet females that can occur simultaneously. Escherichia coli is the most involved microbial agent on these both infections, however few is known about the correlations among Endometrial Pathogenic E. coli (EnPEC) and Uropathogenic E. coli (UPEC) isolated from simultaneously uterine and urinary infection cases. Therefore, the aim of this work was to phenotypically and genetically compare UPEC and EnPEC isolates from seven dogs and one cat suffering simultaneous pyometra and cystitis. For that, in vitro, using adhesion and invasion assays, and in silico, using genomic and phylogenetic comparisons, were performed with 16 E. coli strains. In vitro analyses involved E. coli adhesion and invasion assays on eucaryotic cells, while in silico assays were performed with genomic sequences of each strain. EnPEC and UPEC strains demonstrated high affinity to adhere and low capacity to invade cells on in vitro assays. While some UPEC strains showed high capacity to adhere, other EnPEC strains showed high capacity to invade HeLa and T24 cells. These results were confirmed by electron microscopy observations, where the UPEC strain showed biofilm production capacity, while its EnPEC pair did not demonstrate the same capacity. In silico genomic comparisons reveled that, except to one case, EnPEC and UPEC strains isolated from the same animal are extraintestinal E. coli clones. Curiously, the eight UPEC strains demonstrated greater number of virulent genes in comparison to the eight EnPEC strains. In conclusion, EnPEC and UPEC strains from seven of the eight infectious studied cases are genetic clones. These E. coli clones have virulent potential and demonstrated ability to colonize in vitro uterine and bladder cells. The results of this study help in understanding the pathogenicity and genetic correlations of E. coli on simultaneous pyometra and cystitis occurrence on pet females.*

**Keywords:** *pyometra, cystitis, genomic, pathogenicity*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Análise comparativa dos genomas de <i>E. coli</i> Endometriais Patogênicas e Uropatogênicas. ....	48
<b>Figura Suplementar 1.</b> Comparação circular entre os genomas de <i>E. coli</i> Endometriais Patogênicas (EnPEC) e Uropatogênicas (UPEC). ....	49
<b>Figura 2.</b> Comparação filogenética por MLST dos genomas de <i>E. coli</i> Endometriais Patogênicas (EnPEC) e Uropatogênicas (UPEC).....	50
<b>Figura 3.</b> Caracterização filogenética por MLST dos genomas de <i>E. coli</i> Endometriais Patogênicas (EnPEC) e Uropatogênicas (UPEC).....	52
<b>Figura 4.</b> Reconstrução filogenética baseada em <i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> (SNPs) dos genomas de <i>E. coli</i> Endometriais Patogênicas (EnPEC) e Uropatogênicas (UPEC).....	53
<b>Figura Suplementar 2.</b> Padrão de adesão de <i>E. coli</i> Endometriais Patogênicas (EnPEC) e Uropatogênicas (UPEC) em células HeLa por microscopia óptica.....	55
<b>Figura Suplementar 3.</b> Padrão de adesão de <i>E. coli</i> Endometriais Patogênicas (EnPEC) e Uropatogênicas (UPEC) em células T24 por microscopia óptica.....	56
<b>Figure 5.</b> Padrão de adesão de <i>E. coli</i> Endometriais Patogênicas (EnPEC) e Uropatogênicas (UPEC) em células HeLa por microscopia eletrônica.....	57
<b>Figure 6.</b> Adhesion pattern of Endometrial Pathogenic (EnPEC) and Uropathogenic (UPEC) <i>Escherichia coli</i> strains on T24 cells by electron microscopy.....	58
<b>Figura Suplementar 4.</b> Comparação entre o padrão de adesão de <i>E. coli</i> Endometriais Patogênicas (EnPEC) e Uropatogênicas (UPEC) com os isolados controles em células HeLa por microscopia eletrônica.....	59
<b>Figura Suplementar 5.</b> Comparação entre o padrão de adesão de <i>E. coli</i> Endometriais Patogênicas (EnPEC) e Uropatogênicas (UPEC) com os isolados controles em células T24 por microscopia eletrônica .....	60
<b>Figure 7.</b> Quantificação de adesão e invasão de <i>E. coli</i> Endometriais Patogênicas (EnPEC) e Uropatogênicas (UPEC) em células HeLa e T24 .....	64



**Figure 8.** Perfil genético de *E. coli* Endometriais Patogênicas (EnPEC) e Uropatogênicas (UPEC) para capacidade de adesão e invasão celular.....68

**Figura Suplementar 6.** Perfil de genes de virulência dos isolados de *E. coli* Endometriais Patogênicas (EnPEC) e Uropatogênicas (UPEC) .....71

## LISTA DE TABELAS

**Tabela Suplementar 1.** Genomas incluídos nas análises filogenéticas por MLST desse estudo .....40

**Tabela 1.** Características genômicas dos isolados de *E. coli* Endometriais Patogênicas (EnPEC) e Uropatogênicas (UPEC) de animais de companhia.....46

**Tabela Suplementar 2.** Quantificação da adesão dos isolados de *E. coli* Endometriais Patogênicas (EnPEC) e Uropatogênicas (UPEC) em células HeLa e T24.....63

**Tabela Suplementar 3.** Quantificação da invasão dos isolados de *E. coli* Endometriais Patogênicas (EnPEC) e Uropatogênicas (UPEC) em células HeLa e T24.....67

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>14</b>
<b>2.1</b>	<b><i>Escherichia coli</i></b> .....	<b>14</b>
2.1.1	<i>Escherichia coli</i> extraintestinais patogênicas.....	16
2.1.2	<i>Escherichia coli</i> uropatogênicas.....	18
2.1.3	<i>Escherichia coli</i> endometriais patogênicas .....	21
<b>2.2</b>	<b>Piometra em animais de companhia</b> .....	<b>23</b>
<b>2.3</b>	<b>Cistite bacteriana em animais de companhia</b> .....	<b>27</b>
<b>2.7</b>	<b>Ocorrência simultânea de piometra e cistite em animais e as relações entre UPEC e EnPEC</b> .....	<b>30</b>
<b>3</b>	<b>HIPÓTESES CIENTÍFICAS</b> .....	<b>33</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>34</b>
4.1	Objetivo geral .....	34
4.2	Objetivos específicos.....	33
<b>5</b>	<b>METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>35</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>79</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>80</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>79</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A infecção purulenta do útero (piometra) e infecção de bexiga urinária (cistite) são afecções que comumente afetam fêmeas de animais de companhia. *Escherichia coli* é o agente mais comumente isolado de quadros de piometra (COGGAN *et al.*, 2008) e cistite (GYLES; FAIRBROTHER, 2010). São denominadas *E. coli* endometriais patogênicas (EnPEC) as isoladas a partir do útero e *E. coli* uropatogênicas (UPEC) as isoladas a partir do trato urinário, sendo que ambas fazem parte do grupo de *E. coli* extraintestinais patogênicas (ExPEC). A ocorrência simultânea das duas infecções, piometra e cistite, tem sido identificada com frequência em caninos e felinos (WADÁS *et al.*, 1996; HAGMAN; KÜHN, 2002; MELO *et al.*, 2022)). Um levantamento recente do nosso grupo de pesquisa analisou 22 casos de infecção simultânea de útero e bexiga em cadelas e gatas. Nesse trabalho observamos que em 14 casos (14/22; 63,6 %) foi isolada a mesma espécie bacteriana de ambos os sítios, sendo *E. coli* o agente mais frequentemente envolvido (10/14; 71,4 %) (dados não publicados).

*Escherichia coli* pertencentes ao grupo ExPEC se diferenciam de *E. coli* intestinais patogênicas (InPEC), pois apresentam habilidade de colonizar nichos específicos através da expressão de diversos fatores de virulência (GYLES; FAIRBROTHER, 2010), tais como adesinas, toxinas, sistemas de captação de ferro, fuga do sistema imune do hospedeiro, resistência a antimicrobianos, formação de biofilme e produção de colicinas. Por não apresentarem, muitas vezes, fatores de virulência específicos, isolados de um mesmo grupo patogênico podem apresentar diferenças com relação aos genes de virulência carregados no genoma (GYLES; FAIRBROTHER, 2010) e a diferenciação genotípica dos grupos de ExPEC se torna mais difícil. As técnicas de sequenciamento genômico total, juntamente a análises filogenéticas têm sido grandes ferramentas para caracterizar geneticamente os diferentes patotipos de *E. coli*, auxiliando na compreensão da evolução e especialização para colonização e infecção de sítios orgânicos distintos.

A patogenicidade de isolados UPECs inclui a adesão, toxicidade e invasão do epitélio da bexiga, o que confere proteção e possibilidade de recidivas após tratamento com antimicrobianos (DHAKAL *et al.*, 2008). Recentemente foi observado a capacidade de invasão de UPECs também em epitélio vaginal (BRANNON *et al.*, 2020). Geneticamente, os isolados desse patotipo possuem ilhas de patogenicidade que albergam

genes de virulência importantes para sua patogenicidade, como *fim*, *pap* e *sfa* (envolvidos na adesão), *cnf1* e *hly* (envolvidos na toxicidade), *kps* (produção de cápsula) e genes envolvidos em sistemas de captação de ferro (enterobactina, salmochelina, aerobactina e yersiniabactina) (GYLES; FAIRBROTHER, 2010).

Embora ainda não consolidada, algumas hipóteses com relação à caracterização patogênica de EnPECs têm sido propostas. Estudos anteriores sugeriram que *E. coli* isoladas simultaneamente de piometra e urina em cães são clones genéticos através de análises bioquímicas e moleculares (*Pulsed-field Gel Electrophoresis* e *Random Amplification of Polymorphic DNA PCR*) (WADÅS *et al.*, 1996; HAGMAN; KÜHN, 2002; MELO *et al.*, 2022). No entanto, as técnicas utilizadas têm sido substituídas por novos métodos moleculares, como o sequenciamento total de genoma, que compara isolados bacterianos de uma forma mais completa, produzindo resultados mais pertinentes.

Siqueira *et al.* (2009) demonstraram a elevada quantidade de fatores de virulência que UPECs e EnPECs compartilham, em contraste com *E. coli* comensais de trato intestinal. Já os resultados de Mateus *et al.* (2013) sugerem que nenhum perfil de virulência pode ser associado a *E. coli* isoladas de piometra, visto que o perfil de genes de virulência e ilhas de patogenicidade testados não diferenciaram de isolados de *E. coli* de cistite e de fezes de caninos saudáveis. Logo, sugeriram que tanto isolados de cistite quanto comensais podem ser potenciais patógenos do útero de cadelas (MATEUS *et al.*, 2013).

Recentemente um trabalho do nosso grupo de pesquisa do Laboratório de Bacteriologia Veterinária da UFRGS demonstrou que isolados EnPEC se distribuem filogeneticamente entre os isolados ExPEC (em sua maioria) e InPECs (minoria) (LOPES *et al.*, 2020). Além disso, uma análise detalhada do genoma de um isolado EnPEC apresentou vários fatores de virulência associados tanto à InPECs quanto à UPECs, demonstrando um perfil virulento diferenciado e único para as EnPECs.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Escherichia coli*

A espécie bacteriana *Escherichia coli* pertence à família *Enterobacteriaceae* e morfologicamente são pequenos bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, sendo em sua maioria móveis (QUINN *et al.*, 2005). Em ágar sangue ovino 5%, as colônias de *E. coli* são normalmente médias em tamanho, mucoides ou não e acinzentadas. A hemólise pode ser observada em isolados patogênicos. Em MacConkey, *E. coli* possuem coloração rosa, por utilizarem a lactose presente no meio, além de frequentemente apresentarem um halo ácido em torno das colônias (QUINN *et al.*, 2005). Bioquimicamente, reagem positivamente ao indol, mas regem negativamente aos testes de citrato, urease e produção de sulfeto de hidrogênio (GYLES; FAIRBROTHER, 2010). O ambiente natural de *E. coli* é o trato gastrointestinal de animais e humanos e a maioria dos isolados é considerado comensal. No entanto, uma parcela das cepas de *E. coli* são patógenos oportunistas ou primários envolvidos em enfermidades em animais e humanos (MOXLEY, 2013). As doenças causadas por *E. coli* são denominadas colibaciloses.

Cepas de *E. coli* patogênicas são classificadas em *E. coli* intestinais patogênicas (InPEC), incluindo todas que causam alguma infecção intestinal, ou em *E. coli* extraintestinais patogênicas (ExPEC), todas que causam infecção em algum sítio fora do trato gastrointestinal. Dentro do grupo InPEC estão os patotipos: EAEC (*E. coli* enteroagregativa), EIEC (*E. coli* enteroinvasiva), ETEC (*E. coli* enterotoxigênica), EPEC (*E. coli* enteropatogênica) e STEC (*E. coli* shigatoxigênica), subdividido em EHEC (*E. coli* enterohemorrágica) e VTEC (*E. coli* verotoxigênica). Já dentro do grupo ExPEC se encontram os patotipos: SEPEC (*E. coli* causadoras de septicemias), APEC (*E. coli* aviária patogênica), UPEC (*E. coli* uropatogênica), EnPEC (*E. coli* endometrial patogênica) e MPEC (*E. coli* mamária patogênica). Cada patotipo possui suas particularidades, seja a presença de algum fator de virulência específico ou um grupo de fatores necessários para o desenvolvimento da infecção no sítio de colonização (GYLES; FAIRBROTHER, 2010). Além desses patotipos clássicos, cepas ExPEC híbridas, que possuem genes de virulência de mais de um patotipo têm sido identificadas e descritas na literatura recentemente (BRAZ *et al.*, 2020; VALIATTI *et al.*, 2020).

Filogeneticamente, isolados de *E. coli* podem ainda ser classificados dentro de filogrupos. Os denominados filogrupos de Clermont, pesquisador que desenvolveu a

técnica, são classificados através da presença ou ausência de quatro regiões conservadas do genoma de *E. coli* (*arpA*, *chuA*, *yjaA*, *TspE4.C2*) (CLERMONT *et al.*, 2012). Oito filogrupos são descritos no momento: A, B1, B2, C, D, E, F e *Escherichia* clado I (CLERMONT *et al.*, 2012). Dentre eles, os grupos mais descritos são A, B1, B2 e D. Os grupos B2 e D abrangem grande parte dos isolados de ExPECs, enquanto os grupos B1 e A contém boa parte dos isolados comensais (SMITH *et al.*, 2007). Pouco se sabe até hoje sobre a epidemiologia dos grupos C, E e F. No entanto, o grupo F é geneticamente relacionado ao grupo B2, podendo também conter isolados extraintestinais patogênicos (CLERMONT *et al.*, 2012; VANGCHHIA *et al.*, 2016), enquanto o grupo C é filogeneticamente relacionado ao grupo B1 (MOISSENET *et al.*, 2010). Já o grupo *Escherichia* clado I abrange novas espécies de *Escherichia* que ainda não foram distinguidas filogeneticamente de *E. coli* (LUO *et al.*, 2011).

Além da classificação patogênica, as classificações epidemiológicas são importantes para a investigação da distribuição mundial de cepas de *E. coli* e na investigação da origem de surtos de colibacilose. Para isso, cepas de *E. coli* podem ser classificadas em sorotipos conforme os antígenos de superfície flagelar (H) e somático (O). Esses antígenos se encontram na camada de lipopolissacarídeos da membrana externa da parede celular de *E. coli* (MARKEY *et al.*, 2013). O teste de aglutinação em placa com antissoro comercial é utilizado para a identificação *in vitro* dos sorotipos. Muitos laboratórios ainda realizam essa técnica, principalmente na classificação de cepas de *E. coli* envolvidas em surtos alimentares (InPECs). No entanto, técnicas moleculares e *in silico* têm ganhado espaço na classificação epidemiológica de *E. coli*, visto a facilidade e acurácias que essas novas técnicas proporcionam.

Nos últimos anos, a técnica denominada *Multilocus Sequence Typing* (MLST) tem sido uma ferramenta muito importante na distinção epidemiológica de isolados de *E. coli*, principalmente aliada ao sequenciamento genômico total. Através da análise MLST, os isolados recebem uma identificação clonal, ou *Sequence Type* (ST). A identificação tem como base o perfil alélico de sete genes conservados ou *housekeeping* (*adh*, *fumC*, *gyrB*, *mdh*, *icd*, *purA* e *recA*) (URWIN *et al.*, 2003). Essa classificação permite a comparação de isolados de *E. coli* no mundo inteiro, através de bancos de dados, além de permitir a análise evolutiva bacteriana (MAIDEN, 2006). Nesse âmbito, vários clones de *E. coli* têm sido identificados como patógenos hiper virulentos ou multirresistentes no mundo inteiro (WOODFORD *et al.*, 2011). Dentre os clones com maior aquisição de multirresistência

e virulência, estão os pertencentes ao patotipo UPEC, responsáveis por infecções urinárias e bacteremia em humanos e animais (ABADI *et al.*, 2019).

Uma subtipificação de clones bacterianos ainda pode ser feita com relação aos ST, avaliando-se a sequência de genes *fimH*. Esse gene faz parte do *operon fim* que codifica uma fimbria da superfície bacteriana denominada fimbria do tipo 1. Pequenas variações nesse gene geram diferentes alelos e permitem a distinção de subclones (ROER *et al.*, 2017). Essa distinção tem sido muito importante na diferenciação de clones pandêmicos, como no caso do clone extraintestinal *E. coli* ST131 (DENAMUR *et al.*, 2021). Por fim, atualmente a forma mais acurada na distinção entre clones bacterianos é através do sequenciamento genômico total seguido de busca de *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) ou Polimorfismo de Nucleotídeo Único. Os SNPs são mutações únicas de nucleotídeos que permitem a diferenciação de genomas bacterianos à nível muito pontual (HOMMAIS *et al.*, 2005). Sendo assim, as filogenias criadas com base em diferença de SNPs trazem informações mais profundas para a diferenciação entre cepas bacterianas, como a presença de subclones.

### 2.1.1 *Escherichia coli* extraintestinais patogênicas

*Escherichia coli* extraintestinais (ExPEC) são responsáveis por septicemias, infecções urinárias, infecções reprodutivas, infecções mamárias e meningites em animais e humanos (GYLES; FAIRBROTHER, 2010; RIBEIRO *et al.*, 2016). Embora sejam encontradas na microbiota intestinal, a composição genômica de ExPECs é distinta das *E. coli* intestinais e comensais (RIBEIRO *et al.*, 2016). Os isolados ExPEC carregam em seu genoma uma grande quantidade de genes de virulência necessários para colonizar diferentes sítios orgânicos. Diferentemente de *E. coli* intestinais, as ExPEC não possuem genes de virulência específicos que as classificam dentro de um grupo. Cada isolado de ExPEC é classificado dentro de um patotipo conforme sua origem de isolamento, como *E. coli* isoladas de casos de sepse (SEPEC), infecções urinárias (UPEC), infecções uterinas (EnPEC), infecções em aves (APEC) e infecções mamárias (MPEC).

O genoma de ExPECs, assim como de outras bactérias, é constituído por uma porção conservada e por porções não-conservadas. As regiões conservadas de *E. coli* são constituídas por genes codificantes de proteínas essenciais para a manutenção bacteriana, como aquelas envolvidas na replicação, transcrição, funções metabólicas e transporte (RASKO *et al.*, 2008). Evolutivamente, a inserção de elementos móveis nos genomas,



principalmente pela transferência horizontal, foi responsável pelo aumento da adaptação e virulência de ExPECs (DOBRINDT, 2005). Dentre os elementos móveis podem-se destacar os genes de bacteriófagos, *insertion sequences* (IS) ou sequências de inserção, transposons e integrons (TOUSSAINT; CHANDLER, 2012). Esses elementos podem ser integrados ao cromossomo ou replicarem independentemente nos plasmídeos (DOBRINDT, 2005).

As ilhas de patogenicidade ou *pathogenic islands* (PAIs) são regiões genômicas flanqueadas por elementos móveis e que carregam genes de virulência, denominados genes acessórios. Por estarem albergadas no mobiloma bacteriano, as PAIs são facilmente introduzidas, transmitidas ou deletadas do cromossomo (KAPER *et al.*, 2004). Apenas *E. coli* patogênicas apresentam PAIs, e isso faz com que o genoma de ExPEC, como o isolado CFT 073, possua em torno de 5.2 Mb de tamanho, enquanto um isolado comensal, como K-12, possua 4.6 Mb de tamanho. Cepas ExPEC que possuem elevado potencial patogênico normalmente pertencem aos filogrupos B2 de Clermont. No entanto, cepas ExPEC podem ainda pertencer aos filogrupos D e F (CLERMONT *et al.*, 2012; VANGCHHIA *et al.*, 2016). Embora os sorotipos de *E. coli* variem muito geograficamente e temporalmente, as cepas ExPEC possuem menor diversidade nos antígenos somáticos (O) comparado com cepas InPEC (VERBOOM *et al.*, 2021).

Além de todas as análises genéticas que auxiliam na identificação de *E. coli* extraintestinais patogênicas, a verificação da capacidade de colonização de certos sítios orgânicos é essencial para a classificação de ExPECs dentro de um grupo patogênico. Dessa forma, metodologias de ensaio *in vitro* de adesão e invasão bacteriana em células eucarióticas têm sido descritas (ELSINGHORST, 1994; EDWARDS; MASSEY, 2011; LETOURNEAU *et al.*, 2011; CHUE-GONÇALVES, 2018). A utilização de monocamadas de células de cultivo celular têm sido uma ferramenta muito importante no estudo de patogenicidade de *E. coli*, evitando o uso de animais de experimento. Além disso, a utilização de microscopia eletrônica de varredura têm sido uma importante ferramenta na identificação de padrões de adesão e invasão celular por *E. coli* (MARTINEZ *et al.*, 2000; VALIATTI *et al.*, 2020).

### 2.1.2 *Escherichia coli* uropatogênicas

O patotipo UPEC pertence ao grupo de ExPEC e são responsáveis por infecções do sistema urinário em animais e humanos, como cistites, pielonefrites, uretrites e

prostatite (GYLES; FAIRBROTHER, 2010). *Escherichia coli* é a espécie bacteriana mais relacionada a infecções urinárias (39 a 59% em felinos, 65 a 85% em humanos e em torno de 50% dos casos em cães) (FOXMAN, 2010; HALL *et al.*, 2013; DORSCH *et al.*, 2019). Os mecanismos de patogenicidade de UPECs em cães e gatos ainda não é bem estabelecido, no entanto a proximidade genética e epidemiológica desses isolados com isolados humanos sugere que os mecanismos utilizados sejam os mesmos. Devido a isso, os isolados UPECs têm sido considerados zoonóticos (GYLES; FAIRBROTHER, 2010; RIBEIRO *et al.*, 2016).

Isolados UPEC estão presentes na microbiota intestinal e vaginal de animais de companhia. Dessa forma, a colonização da uretra e ascensão para bexiga ocorre quando o sistema imune do hospedeiro está comprometido (por bactérias oportunistas) ou quando o isolado de *E. coli* possui mecanismos de virulência que o caracterizem como UPEC. A maioria dos isolados UPEC isolados de cães e gatos são pertencentes ao filo-grupo B2 de Clermont (TRAMUTA *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2015). Quanto à classificação de clones epidemiológicos de *E. coli*, a maioria dos isolados UPEC provenientes de cães pertencem ao ST372 (LECUYER *et al.*, 2018; GILBERTIE *et al.*, 2020). Já em felinos, um estudo anterior demonstrou a maior prevalência de ST73 e ST83, além de relatarem 10 novos tipos de ST ainda não descritos na literatura (LIU *et al.*, 2015).

*Escherichia coli* uropatogênicas possuem uma gama de genes de virulência especializados para colonização do trato urinário. Genomicamente, esses genes estão agrupados em Ilhas de Patogenicidade (PAI). Essas ilhas facilitam a transcrição de genes de forma rápida e efetiva no momento da colonização do sítio urinário, assim como a transferência horizontal desse material genético (RIBEIRO *et al.*, 2016). Dentre os principais mecanismos de patogenicidade de UPEC estão: a adesão e invasão celular, toxicidade celular, captação de ferro do hospedeiro, formação de biofilme e evasão do sistema imune.

Isolados UPEC requerem adesão ao uroepitélio como passo inicial no desenvolvimento da infecção, visto que o fluxo urinário rapidamente debela as bactérias invasoras da bexiga. Para isso, a interação de adesinas aos receptores de células eucarióticas é imprescindível. Uma ampla quantidade de adesinas e fímbrias são utilizadas por UPECs para a efetiva adesão. Dentre elas, as mais utilizadas são as fímbrias do tipo 1, fímbria P, fímbria S e adesinas Dr/Afa. (RIBEIRO *et al.*, 2016).

As fímbrias do tipo 1, compostas pelas subunidades fimA, fimF, fimG e fimH são as mais frequentes nos genomas de UPEC. Essas fímbrias têm como receptor celular as glicoproteínas uroplaquinas do epitélio da bexiga, facilitando a primeira ancoragem bacteriana a esse epitélio e também a formação de biofilme (RIBEIRO *et al.*, 2016). A ausência dos genes *fim* reduz drasticamente a capacidade de colonização de *E. coli* no sistema urinário (CONNELL *et al.*, 1996; BAHRANI-MOUGEOT *et al.*, 2002).

As fímbrias P (compostas pelas subunidades PapA, PapG, PapE, PapF e PapG) também são frequentemente encontradas nos genomas de UPEC e estão relacionadas a pielonefrites em humanos (GYLES; FAIRBROTHER, 2010). A subunidade PapG possui três variantes distintas: GI (encontrada em *E. coli* isoladas de fezes), GII (encontrada em *E. coli* isoladas de pielonefrite, principalmente em humanos) e GIII (frequentemente encontradas em *E. coli* isoladas de cistite de caninos) (RIBEIRO *et al.*, 2016). Além de contribuírem na adesão, as fímbrias P também auxiliam na produção de resposta inflamatória e evasão do sistema imune do hospedeiro (JOHNSON *et al.*, 2001).

Embora frequente em UPECs, pouco se sabe sobre a função das fímbrias S em infecções urinárias. A fímbria S é composta pelas subunidades sfaA, sfaG, sfaH e sfaS que realizam conexão com resíduo de ácido siálico exposto por receptores do uroepitélio (RIBEIRO *et al.*, 2016). A mesma fímbria tem sido descrita em *E. coli* causadoras de meningites (NMEC) (HACKER *et al.*, 1993).

Para sobreviver ao ataque do sistema imune do hospedeiro, os isolados UPECs desenvolveram a capacidade de sobreviver em neutrófilos e invadir células epiteliais. Dois mecanismos são propostos para a invasão de bactérias a células não fagocíticas, o mecanismo em *zipper* e o mecanismo em *trigger* ou “gatilho” (COSSART; SANSONETTI, 2004; BRANNON *et al.*, 2020). Ambos os mecanismos realizam o rearranjo do citoesqueleto da célula epitelial, possibilitando o transporte da célula bacteriana para o interior da célula eucariótica. No mecanismo em *zipper* a adesão bacteriana proporciona a extensão da membrana eucariótica que lentamente envolve a célula bacteriana levando à fagocitose passiva (SANSONETTI, 2004). Já no mecanismo *trigger* ou “gatilho”, a internalização é ativamente mediada pelos sistemas de secreção do tipo III e do tipo IV presente em isolados de *E. coli* (SANSONETTI, 2004). O mecanismo do tipo *zipper* tem sido o mais associado a isolados UPEC na invasão de células da bexiga (MULVEY *et al.*, 1998) e de células vaginais (BRANNON *et al.*, 2020).

Para a invasão do uroepitélio, a expressão de fimbrias do tipo 1 e de adesinas Dr/Afa parece ser fundamental. A porção fimH da fimbria do tipo 1 se liga as integrinas  $\alpha 3$  e  $\beta 1$  da superfície celular, resultando em modificações do citoesqueleto eucariótico e posteriormente o englobamento bacteriano na forma de *zipper* (MARTINEZ *et al.*, 2000). Já as adesinas Dr/Afa parecem interagir com as integrinas DAF e  $\alpha 5\beta 1$ , que envolvem a célula bacteriana facilitando a entrada na célula do hospedeiro também pelo mecanismo em *zipper* (SELVARANGAN *et al.*, 2000; GUIGNOT *et al.*, 2001).

Após a invasão, as células bacterianas se mantêm em vacúolos intracelulares, possibilitando a cronicidade das cistites, denominadas cistites complicadas. Nesse estágio de infecção, as bactérias podem permanecer dormentes por longos períodos antes de retornar a se multiplicar e gerar novos ciclos de infecções (WILES *et al.*, 2008). A sobrevivência intracelular bacteriana depende da aquisição externa de ferro do hospedeiro, realizada por sistemas de captação de ferro. Quatro sistemas de captação de ferro por sideróforos (salmochelina, enterobactina, aerobactina e yersiniabactina) já foram identificados em isolados UPEC (WILES *et al.*, 2008).

As lesões ao epitélio visualizadas em caso de cistite são resultado de resposta inflamatória mediada por neutrófilos e por toxinas de UPECs (GYLES; FAIRBROTHER, 2010). A hemolisina alfa (HlyA) e a toxina CNF (*citotoxy necrotizing factor*) são as principais toxinas utilizadas por UPECs. A hemolisina alfa (HlyA), além de causar hemorragias, forma poros nas células-alvo, causando apoptose e descamação do uroepitélio durante as infecções urinárias (SMITH *et al.* 2008). Já as toxinas CNF estão vinculadas a dano epitelial, hemólise e inibição de fagocitose por células polimorfonucleares (GYLES; FAIRBROTHER, 2010). As toxinas Vat (*vacuolating autotransporter toxin*) e Sat (*secreted autotransporter toxin*) também são encontradas em UPECs e causam efeito citotóxico.

### 2.1.3 *Escherichia coli* endometriais patogênicas

Cepas de *E. coli* que possuem capacidade de colonizar e causar infecções uterinas em animais e humanos são denominadas *E. coli* endometriais patogênicas (EnPEC). *Escherichia coli* é a espécie bacteriana mais relacionada a infecções uterinas em animais domésticos (30% das endometrites em éguas, 30% das infecções uterinas em bovinos, 65% a 90% das piometras em cães, 70% das piometras em felinos, e de 10 a 20% de endometrites crônicas em humanos (DEL VECCHIO *et al.*, 1994; FRANSSON *et al.*,

1997; CICINELLI *et al.*, 2008; BICALHO *et al.*, 2010; GYLES; FAIRBROTHER, 2010; DAVIS *et al.*, 2013; KITAYA *et al.*, 2017; LOPES *et al.*, 2021; NOCERA *et al.*, 2021; HAGMAN, 2022).

Assim como outras ExPECs, as cepas EnPEC são habitantes da microbiota intestinal e vaginal de animais de companhia (PRADERIO *et al.*, 2019) e podem ascender para o interior do útero durante a fase de abertura da cérvix (estro). Nessa fase, o ambiente endometrial é favorável para a multiplicação bacteriana e o desenvolvimento de piometra se torna muito frequente em cadelas e gatas (WATTS *et al.*, 1996). Isolados EnPECs de piometra canina têm sido filogeneticamente classificados dentro do filogrupo B2 (MATEUS *et al.*, 2013; LOPES *et al.*, 2020). Xavier *et al.* (2022) demonstraram que a frequência de isolados pertencentes ao filogrupo B2 é maior nas fezes de animais com piometra causada por *E. coli* comparado com amostras de fezes de animais com piometra causada por outros patógenos (maior frequência de isolados do filogrupo B1).

Pouco se sabe sobre clones epidemiológicos relacionados a quadros de piometra, no entanto um estudo anterior demonstrou que um isolado de *E. coli* recuperado de piometra canina foi classificado como ST131, um clone pandêmico multirresistente frequentemente associado a infecções urinárias e bacteremias (LOPES *et al.*, 2020). Uma análise filogenética realizada com um dos genes *housekeeping* (*gyrB*) demonstrou que isolados *E. coli* de piometra canina se distribuem entre isolados extraintestinais patogênicos (sua maioria) e intestinais patogênicos (minoria), reforçando a possibilidade de ascensão intestinal e especialização dos isolados EnPEC em colonizar um sítio extraintestinal (LOPES *et al.*, 2020). Além disso, a distribuição de genes de virulência e classificação em filogrupos demonstrou que isolados EnPEC não possuem o mesmo perfil genético entre si (LOPES *et al.*, 2020).

Devido à proximidade genética e de sítio de colonização, a patogenicidade de isolados EnPEC tem sido comparada à de UPECs. De fato, fatores de virulência correlacionados a UPECs têm sido encontrados em isolados EnPEC provenientes de piometra de animais de companhia. Dentre os genes de virulência já identificados em EnPECs estão os codificantes para: i) fímbrias, como *fim*, *pap*, *sfa*, *iha* e *fli7*; ii) citotoxinas, como *cnf1*, *hlyA*, *hlyE*, *cdtA*, *artA* e *shlA*; e iii) sistemas de captação de ferro (aerobactina, enterobactina, salmochelina e yersiniabactina); iv) formação de biofilme (*bssS*, *bssR*, e *hmsP*); v) bacteriocinas (*usp*, *cdiA*); e vi) sobrevivência no soro (*iss*, *traT*)

(CHEN *et al.*, 2003; 16 COGGAN *et al.*, 2008; SIQUEIRA *et al.*, 2009; MATEUS *et al.*, 2013; MALUTA *et al.*, 2014; LOPES *et al.*, 2021, MELO *et al.*, 2022; XAVIER *et al.*, 2022).

A adesão ao tecido endometrial é o primeiro mecanismo utilizado por *E. coli* para causar piometra. A ligação à receptores endometriais é facilitada pelo efeito da progesterona nas fases de metaestro e diestro (SANDHOLM *et al.*, 1975). Estudos anteriores demonstram que as fímbrias do tipo 1 são as mais prevalentes em EnPECs (CHEN *et al.*, 2003; MATEUS *et al.*, 2013; MALUTA *et al.*, 2014; LOPES *et al.*, 2020). Além disso, a ausência de *fimH* é responsável por reduzir significativamente a adesão de *E. coli* no endométrio canino (KREKELER *et al.*, 2012). No entanto, um segundo estudo do mesmo autor, demonstrou ser necessária a ausência de três operons (*fim*, *pap* e *sfa*) para reduzir a adesão de EnPEC ao endométrio canino (KREKELER *et al.*, 2013). Os genes *pap* têm sido identificadas em 30 a 95% dos isolados EnPEC de piometra, enquanto a frequência de *sfa* varia de 35 a 71% dos isolados (CHEN *et al.*, 2003; COGGAN *et al.*, 2008; SIQUEIRA *et al.*, 2009; MATEUS *et al.*, 2013; MALUTA *et al.*, 2014; LOPES *et al.*, 2020).

A capacidade de adesão e invasão de EnPECs ao endométrio uterino de cadelas pôde ser evidenciado através de técnicas de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) (FIAMENGO *et al.*, 2020) e imunohistoquímica (LOPES *et al.*, 2021). Quantificações anteriores demonstraram que a adesão de dois isolados EnPECs em células endometriais de cadelas variou de 3 a 5%, enquanto a invasão foi considerada baixa (0,1 a 0,2%) (HENRIQUES *et al.*, 2016). Já a capacidade de formação de biofilme de *E. coli* no ambiente uterino parece ser importante no desenvolvimento da piometra, visto que EnPECs foram hábeis na formação de biofilme em ensaios *in vivo* e *in vitro* (FIAMENGO *et al.*, 2020; LOPES *et al.*, 2021).

Estudos histopatológicos anteriores demonstraram que infecções por *E. coli* estão relacionadas às lesões endometriais mais severas em casos de piometra (LOPES *et al.*, 2021). Infecções por *E. coli* estão relacionadas a hiperplasia ou atrofia endometrial cística, espessamento da parede uterina, aumento e diminuição das vilosidades glandulares e alterações celulares, como expansão de mitocôndria e lisossomos e dilatação de retículo endoplasmático (FIAMENGO *et al.*, 2020; QIAN *et al.*, 2020). A produção de toxinas citotóxicas por *E. coli* permite a lesão ao tecido alvo e maior extensão da infecção no

útero. Dentre elas, a produção de alfa hemolisina (HlyA) por essa espécie bacteriana causa maior dano às células do epitélio e estroma endometrial canino (HENRIQUES *et al.*, 2016). Além dessa, outras toxinas parecem auxiliar no dano tecidual durante os quadros de piometra, como CNF1 (identificado em 40 a 68% de isolados EnPECs), ArtA (40% dos isolados) e CDT (26,7% dos isolados) (CHEN *et al.*, 2003; COGGAN *et al.*, 2008; SIQUEIRA *et al.*, 2009; MATEUS *et al.*, 2013; LOPES *et al.*, 2020).

## 2.2 Piometra em animais de companhia

A piometra é a enfermidade reprodutiva mais comum em fêmeas de animais de companhia e ocorre principalmente em países em que a castração eletiva de cadelas e gatas não é uma prática tão frequente (HAGMAN, 2022). Embora não se conheça a frequência de piometra em cadelas e gatas no Brasil, na Suécia 20% das cadelas com mais de 10 anos (JITPEAN *et al.*, 2012) e 2,2% das gatas com mais de 13 anos (HAGMAN *et al.*, 2014) foram diagnosticadas com piometra em estudos de incidência. A idade média dos animais acometidos foi de sete anos em cadelas, com maior chance de ocorrência a partir dos 10 anos (JITPEAN *et al.*, 2012) e de seis anos em gatas, com maior chance a partir dos 13 anos (HAGMAN *et al.*, 2014). O desenvolvimento de piometra em gatas é menos comum do que em cadelas, no entanto a mortalidade em felinos (5,7%) (HAGMAN *et al.*, 2014), comparada com caninos (3-4%) (EGENVALL *et al.*, 2001), é maior por conta da menor expressão de sinais clínicos em felinos.

A patogenia da piometra é complexa e envolve fatores hormonais e o potencial patogênico das bactérias envolvidas (HAGMAN, 2022). A enfermidade é resultado de uma infecção bacteriana que leva à inflamação e acúmulo de conteúdo purulento intrauterino (FELDMAN, 2014). Durante a fase de estro a abertura da cérvix possibilita a ascensão de bactérias ao corpo uterino (HAGMAN; KÜHN, 2002). Logo após, durante a fase de metaestro, ocorre a máxima produção de progesterona pelo corpo lúteo ovariano. A progesterona estimula o fechamento do cérvix uterina, aumento da atividade secretora das glândulas endometriais e diminuição da atividade de contração do miométrio e da atividade leucocitária local (NELSON; COUTO, 2001). Esses mecanismos, utilizados para a implantação dos possíveis embriões à parede uterina, também são favoráveis para a multiplicação bacteriana e por isso o desenvolvimento de piometra está fortemente relacionado à ação da progesterona no útero (HAGMAN; KÜHN, 2002).

Em fêmeas felinas, o mecanismo de desenvolvimento de piometra é similar. Após a ovulação (induzida ou espontânea), a produção de progesterona aumenta durante a fase de diestro, aumentando as chances de infecção bacteriana. Por esse motivo, os sinais clínicos podem ser evidenciados em quatro semanas após o início do último estro (HOLLINSHEAD; KREKELER, 2016). Embora o desenvolvimento de Hiperplasia Endometrial Cística (HEC) possa predispor à implantação de infecção uterina secundária em cadelas e gatas, a piometra pode ocorrer sem HEC (DE BOSSCHERE *et al.*, 2001; FRANSSON *et al.*, 2003; SANTANA *et al.*, 2020). Além disso, estudos já demonstraram que há diferença de expressão de receptores de estrogênio e progesterona em casos de HEC e piometra, sugerindo que não há associação obrigatória entre as duas enfermidades (DE BOSSCHERE *et al.*, 2002). Por esses motivos, o uso do termo, anteriormente proposto, *complexo hiperplasia endometrial cística-piometra*, está sendo questionado (SANTANA *et al.*, 2020).

Tendo em vista o ciclo estral de fêmeas de animais de companhia e os fatores predisponentes para o desenvolvimento da piometra, a incidência dessa enfermidade em cães e felinos é maior na fase de metaestro e diestro, fases posteriores ao estro (TSUMAGARI *et al.*, 2005). Também ocorre maior incidência em fêmeas nulíparas comparado com fêmeas múltíparas, visto que há maior risco de piometra em ciclos que não encerram com prenhez (HOLLINSHEAD; KREKELER, 2016). A utilização de terapias hormonais (progesterona exógena) com a finalidade de anticoncepção em animais de companhia é também um importante fator de risco para o desenvolvimento de piometra (FELDMAN, 2014). Ademais, técnicas de ovariosalpingohisterectomia (OSH) erroneamente executadas, podem gerar piometra de coto, na qual a patologia ocorre por remanescência de tecido uterino e/ou ovariano (FELDMAN, 2014).

Análises recentes demonstraram que a microbiota uterina de animais com piometra é predominada pelo filo *Firmicutes* e é menos diversa do que em animais saudáveis (ZHENG *et al.*, 2022). *Escherichia coli* é o agente bacteriano mais frequentemente isolado de piometra em animais de companhia e a presença desse microorganismo é associada a quadros de piometra sistêmicos e lesões endometriais severas (MATEUS *et al.*, 2013; LOPES *et al.*, 2021). Outros gêneros bacterianos também podem estar envolvidos na infecção, tais como *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Enterococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Proteus* sp., *Nocardia* sp., *Pasteurella* sp. e *Klebsiella* sp. (HAGMAN, 2022). Na maioria dos casos, uma única



espécie bacteriana é isolada de casos de piometra, no entanto infecções mistas podem ocorrer (LOPES *et al.*, 2021). Em casos de infecção única por *E. coli*, apenas um clone é responsável pela infecção (HAGMAN; KÜHN, 2002; MELO *et al.*, 2022).

A piometra pode ser classificada como aberta ou fechada, dependendo da abertura da cérvix. Em casos em que a cérvix se encontra aberta, a descarga de exsudato vaginal é observada (PRESTES *et al.*, 1991). Os sinais clínicos de piometra não são específicos, sendo letargia e anorexia os sinais mais comuns tanto em cadelas quanto em gatas (HAGMAN *et al.*, 2006; HOLLINSHEAD; KREKELER, 2016). Além desses, os animais podem apresentar vômito, perda de peso e descarga vaginal purulenta em casos em que a cérvix se encontra aberta (HOLLINSHEAD; KREKELER, 2016). Cães podem ainda apresentar poliúria e polidipsia quando há comprometimento renal, o que não é comum em felinos (HOLLINSHEAD; KREKELER, 2016). Ao exame clínico, os animais podem apresentar distensão abdominal, desidratação e febre (HOLLINSHEAD; KREKELER, 2016).

O diagnóstico preliminar de piometra é baseado em histórico, sinais clínicos, achados de exame físico, análise hematológica e bioquímica de sangue, ultrassonografia e/ou radiografia de abdômen (HAGMAN, 2022). A ultrassonografia abdominal é uma importante ferramenta no diagnóstico de piometra (HOLLINSHEAD; KREKELER, 2016). Nesse exame, podem ser observados espessamento da parede uterina com presença de alterações císticas, distensão dos cornos uterinos e presença de fluido hipocóico a hiperecoico no lúmen uterino (HOLLINSHEAD; KREKELER, 2016). A confirmação do diagnóstico é realizada pela análise patológica macro e microscópica do tecido uterino associada ao cultivo bacteriano do conteúdo purulento uterino (HAGMAN, 2022). Diagnósticos diferenciais de piometra devem levar em consideração o acúmulo de líquido intrauterino sem infecção bacteriana, como a mucometra, hidrometra e hemometra (HAGMAN, 2022).

A técnica de OSH é a alternativa mais preconizada no tratamento de piometra (FELDMAN, 2014; LYLE, 2015), visto que a retirada do útero exclui o foco infeccioso, evitando quadros de endotoxemia, sepse e recidivas (HAGMAN, 2022). Antes da técnica cirúrgica, no entanto, é preciso estabilizar o paciente com a utilização de fluidoterapia intravenosa. Além disso, o início da antibioticoterapia intravenosa pré-cirúrgica é indicada em quadros moderados a graves de piometra, preconizando-se a utilização inicial

de antimicrobianos efetivos para infecções por *E. coli*, o qual deve ser ajustado assim que a cultura e antibiograma estiverem disponíveis no pós-cirúrgico (HAGMAN, 2022; HOLLINSHEAD; KREKELER, 2016).

O tratamento unicamente medicamentoso deve ser realizado apenas em animais jovens e saudáveis, ou em casos cuja anestesia gere risco de vida ao paciente (HAGMAN, 2022). No entanto, efeitos adversos podem ocorrer durante o tratamento medicamentoso, como endotoxemia e sepse (HAGMAN, 2022). Após a estabilização do paciente, as estratégias de tratamento visam bloquear os efeitos da progesterona no útero e eliminação bacteriana, através da utilização de prostagladina F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ), agonistas da dopamina, bloqueadores de receptores de progesterona e antibioticoterapia (HOLLINSHEAD; KREKELER, 2016; HAGMAN, 2022).

A piometra pode gerar complicações sistêmicas, que levam ao risco de morte de caninos e felinos. O desenvolvimento de Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica (SRIS) ou septicemia, ocorre quando as bactérias conseguem alcançar a corrente sanguínea, levando à liberação de mediadores inflamatórios sistemicamente que culminam com choque séptico (FRANSON; RAGLE, 2003). A SIRS é detectada em mais de 50% dos casos de piometra causada por *E. coli* (KARLSSON *et al.*, 2012). Já a endotoxemia ocorre quando há liberação de lipopolissacarídeos (LPS) da parede celular de bactérias Gram-negativas na corrente sanguínea (CRUTCHLEY *et al.*, 1967). As endotoxinas LPS são liberadas quando há morte ou crescimento exacerbado de Gram-negativas no útero. Ao chegarem na circulação, são rapidamente ligadas a anticorpos, formando imunocomplexos que levam à falência renal, depressão cardiovascular e colapso (FRANSON; RAGLE, 2003). Além disso, a piometra também está relacionada ao aumento de resistência à insulina em cadelas, aumentando as chances de desenvolvimento de diabetes mellitus durante a infecção uterina (PÖPPL *et al.*, 2009; PÖPPL *et al.*, 2021).

O prognóstico do paciente, utilizando-se técnica cirúrgica para remoção uterina é bom e a taxa de mortalidade é relativamente baixa (3-20%) (HAGMAN, 2022); no entanto, se complicações como ruptura uterina e desenvolvimento de SRIS ocorrerem, a taxa de mortalidade se torna alta (HAGMAN, 2022). As complicações mais comumente desenvolvidas após OSH são: peritonite, infecções de trato urinário, infecções de pele, uveíte e arritmia cardíaca (JITPEAN *et al.*, 2014). Já o prognóstico de tratamento

medicamentoso é considerado de reservado a bom, com a possibilidade de recidivas de 0 a 85% dos casos em cães e 0 a 14% em felinos. Como forma de prevenção da piometra, a OSH eletiva é um importante manejo em fêmeas não reprodutoras, visto que evita, além da piometra, várias doenças uterinas e ovarianas (HAGMAN, 2022). Já o uso de estrógenos e progestágenos devem ser evitados por aumentarem as chances de desenvolvimento dessa e outras enfermidades.

### **2.3 Cistite bacteriana em animais de companhia**

As infecções bacterianas do trato urinário inferior são muito frequentes em animais e humanos. Estima-se que de 5 a 17% dos cães e 0,1 a 1% dos felinos passam por infecção urinária durante a sua vida (KOGIKA; WAKI, 2014; LING, 2004). Em cães, a maior frequência das infecções ocorre em fêmeas entre seis e 10 anos de idade (CHEW, 2011). As fêmeas costumam ser mais afetadas devido ao menor tamanho da uretra e maior proximidade com a região anal do que os machos, o que facilita a ascensão bacteriana pela uretra (KOGIKA; WAKI, 2014). Também é descrito que a possibilidade de infecção urinária aumenta em cadelas castradas (LLIDO *et al.*, 2020). Já em felinos, as infecções urinárias não são tão frequentes quanto em caninos devido à maior concentração urinária nessa espécie animal (KOGIKA; WAKI, 2014). Os felinos mais acometidos são fêmeas castradas com mais de 10 anos (LEKCHAROENSUK, 2001). No entanto, machos que passaram por desobstrução uretral por sondagem, prática frequente na clínica médica, possuem elevadas chances de adquirir infecção do trato urinário inferior (LING, 2004)

Tanto em caninos quanto em felinos, a incontinência urinária, o incompleto esvaziamento da bexiga, a presença de urólitos ou tumores, obstrução uretral, e a imunossupressão são alguns dos fatores predisponentes de infecções urinárias (ACIERNO; SENIOR, 2011; BYRON, 2019). Além disso, todas as afecções que resultam em isostenúria (como doença renal crônica, diabetes, hipertireoidismo e hiperadrenocorticismo) ou glicosúria (diabetes) predisõem os animais as infecções de trato urinário por diminuírem a concentração da urina (NELSON; COUTO, 2015). Infecções uterinas, como a piometra, também são importantes causas de desenvolvimento de cistite (CIANCIOLO; MOHR, 2016).

Agentes bacterianos aeróbios são os mais comumente envolvidos em quadros de infecção do trato urinário inferior. Quando o hospedeiro é imunocompetente, a necessidade de mecanismos de virulência bacteriana é maior, sendo possível a

colonização apenas por espécies bacterianas especializadas. Já quando o animal é ou está imunossuprimido, bactérias oportunistas podem colonizar a bexiga. Na maioria das infecções, uma única espécie bacteriana é responsável pela cistite (LING, 2004). As células bacterianas podem estar em três formas na bexiga urinária: no estado planctônico (livres na urina); na forma de biofilme bacteriano; ou então em estado dormente (intracelulares) (BYRON, 2019).

*Escherichia coli* é a espécie bacteriana mais frequentemente isolada em casos de cistites animais. Essa espécie bacteriana costuma formar biofilmes bacterianos e realizar a invasão celular na bexiga urinária, permitindo maior adesão e resistência a antimicrobianos. Além dessa espécie, também são frequentemente isolados de caso de cistite: *Staphylococcus* spp. e *Proteus* spp., *Streptococcus* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Pseudomonas* spp. e *Mycoplasma* spp. (LING, 2004; ACIERNO; SENIOR, 2011; NEWMAN, 2013; SERAKIDES; SILVA, 2016). Raramente agentes fúngicos podem estar associados a infecções urinárias e quando presentes são secundários a infecções bacterianas (NEWMAN, 2013).

A cistite tem início quando a virulência bacteriana é capaz de ultrapassar os vários mecanismos de defesa urinários e conseguem aderir, colonizar e até invadir a mucosa da bexiga (NEWMAN, 2013). Ao chegar na lâmina própria, as bactérias causam lesão vascular e inflamação, podendo gerar cistite aguda (NEWMAN, 2013; SERAKIDES; SILVA, 2016). Histologicamente, a cistite aguda se caracteriza por descamação epitelial, edema de lâmina própria, acompanhado por células bacterianas na superfície do epitélio e infiltrado inflamatório neutrofílico (NEWMAN, 2013). Infecções crônicas podem se desenvolver em animais imunossuprimidos ou não tratados, ou ainda depois de tratamentos não eficientes.

Dentre os sinais clínicos de cistite, os mais comuns são polaciúria, disúria, estranguria, hematúria, micção em locais incomuns e urina turva ou fétida (NELSON; COUTO, 2015; TILLEY; JUNIOR, 2015). Ao exame físico, muitos pacientes podem não apresentar anormalidades físicas. No entanto, em alguns casos de infecção aguda, pode-se perceber sensibilidade à palpação na região da bexiga e uretra. Já em infecções crônicas, a bexiga pode estar espessada e se demonstrar firme à palpação (TILLEY; JUNIOR, 2015). Em 80% dos casos de infecção de trato urinário inferior em cães, não há evidências de sinais clínicos (LING, 2004).

O diagnóstico ouro de infecção urinária é a urocultura seguida por identificação bacteriana e teste de susceptibilidade a antimicrobianos (NELSON; COUTO, 2015). Para ser considerada clinicamente relevante, a contagem bacteriana na urina de cães deve exceder ou ser igual a  $10^3$  UFC/mL em urinas coletadas por cistocentese e  $10^5$  UFC/mL em urinas coletadas por micção espontânea ou cateterização (LING, 2004; NELSON; COUTO, 2015). As amostras de urina devem ser enviadas ao laboratório o mais rápido possível, visto que a contagem bacteriana pode aumentar ou diminuir com o tempo de espera entre coleta e processamento laboratorial (LING, 2004). O teste de susceptibilidade bacteriana a antimicrobianos preconizado é o de Concentração Inibitória Mínima (*MIC* no inglês) e os antimicrobianos testados devem ser aqueles que atinjam concentração efetiva na urina. A urinálise completa também é essencial para informações relevantes sobre doenças associadas e nível de inflamação do trato urinário (BYRON, 2019). As formas de coleta de urina preconizadas em caninos e felinos para ambas as análises (microbiológica e qualitativa) são a cistocentese e a cateterização por reduzirem as chances de contaminação da amostra durante sua coleta (LING, 2004; ACIERNO; SENIOR, 2011).

O tratamento realizado para infecções de trato urinário inferior compreende o uso de antimicrobianos e terapia de suporte quando necessário. O antibiótico de escolha deve possuir elevada concentração na urina e ter sido eficaz para a bactéria isolada no teste de susceptibilidade antimicrobiana (LING, 2004). Para verificar a eficácia do tratamento, uma nova coleta de urina pode ser feita entre o 7º e 10º dia de tratamento para nova urocultura (LING, 2004).

O prognóstico do paciente com cistite após o tratamento correto é favorável. No entanto, algumas complicações não são pouco comuns em infecções urinárias. Dentre elas, a persistência da infecção pode demonstrar erro na escolha ou na administração do antimicrobiano. Outra forma comum é a cistite recorrente, quando se verifica novo crescimento bacteriano da mesma espécie entre uma e duas semanas após o término da antibioticoterapia (KOGIKA; WAKI, 2014). Nesse caso o quadro pode se estabelecer devido ao retorno da multiplicação bacteriana após um período de dormência, de bactérias intracelulares, dentro do epitélio urinário. As infecções recorrentes são aquelas que ocorrem três ou mais vezes em um intervalo de um ano. Já as reinfecções são quadros em que uma espécie bacteriana diferente é isolada da urina do mesmo paciente em até 6 meses

da resolução da primeira infecção, comum em animais que possuem fatores predisponentes para a infecção (NELSON; COUTO, 2015).

#### **2.4 Ocorrência simultânea de piometra e cistite em animais e as relações genéticas entre *E. coli* Uropatogênicas e *E. coli* Endometriais Patogênicas**

Frequentemente, fêmeas de animais de companhia sofrem da ocorrência simultânea de piometra e cistite (GYLES; FAIRBROTHER, 2010). Um levantamento do Laboratório de Bacteriologia Veterinária da UFRGS demonstrou que, de 77 animais de companhia que apresentavam crescimento bacteriano proveniente de piometra, 28,5% (22/77) apresentavam também cistite bacteriana (dados não publicados). Dentre esses casos de infecção simultânea, 63,6% (14/22) apresentaram o crescimento da mesma espécie bacteriana na amostra clínica de piometra e de urina, sendo que *E. coli* foi identificada em 71,4% (10/14) das vezes (dados não publicados). Ou seja, infecções simultâneas por *E. coli* foram identificadas em 13% dos casos em que houve crescimento bacteriano em amostras de piometra. Da mesma forma, um grupo de pesquisa de Minas Gerais, identificou a frequência de 17% (6/35) de quadros de cistite e piometra simultâneas por *E. coli* em 32 cães cujas amostras de piometra apresentaram crescimento bacteriano (MELO *et al.*, 2022).

Poucos trabalhos foram realizados comparando fenotipicamente ou geneticamente os isolados de *E. coli* provenientes de quadros de infecção simultânea como citado acima. O primeiro estudo comparativo (WADAS *et al.*, 1997), realizou a comparação bioquímica entre os isolados bacterianos pela técnica de *Biochemical fingerprinting*, utilizando 24 testes bioquímicos distintos. Nesse estudo, *E. coli* foi responsável por 88% (90/102) dos crescimentos bacterianos de casos de piometra de caninos, dos quais 16 casos apresentaram infecção simultânea com crescimento de *E. coli* da urina dos pacientes. Dentre os 16 casos de infecção simultânea, os resultados bioquímicos demonstraram que em 10 casos clínicos os isolados de *E. coli* eram idênticos ou muito similares. Além disso, o trabalho demonstrou que isolados de piometra e de fezes do mesmo animal apresentavam similaridade no perfil bioquímico, indicando uma possível origem fecal dos isolados (WADAS *et al.*, 1997).

Com o advento das técnicas moleculares, as comparações entre EnPECs e UPECs voltaram a ocorrer através do emprego de enzimas de restrição seguido por PFGE (*Pulsed-field Gel Electrophoresis*) (HAGMAN; KÜHN, 2002). Nesse trabalho, isolados

de *E. coli* provenientes de infecções simultâneas de piometra e cistite de seis cadelas foram comparados. Em todos os seis casos, os isolados UPEC e EnPEC demonstraram perfil genético idêntico pela técnica de PFGE, considerando os mesmos como clones genéticos. Ademais, o estudo demonstrou perfil genético distinto de *E. coli* advindas de diferentes animais com piometra, sugerindo que diferentes clones epidemiológicos de *E. coli* possuem capacidade de causar infecção uterina. Por fim, o mesmo estudo demonstrou que, um mesmo clone de *E. coli* isolado de piometra ou urina pode demonstrar aspectos distintos de colônia (mucoide/não mucoide ou colorações diferentes), sem que haja alteração no perfil de fragmentação genômica (HAGMAN; KÜHN, 2002).

O trabalho mais recente comparando EnPECs e UPECs utilizou, por fim, a técnica denominada *Random Amplification of Polymorphic DNA PCR* (RAPD-PCR) (MELO *et al.*, 2022). Essa técnica molecular é muito próxima do PFGE, no entanto utiliza fragmentos amplificados por *primers* de diversas regiões genômicas para comparar isolados. Trinta e dois isolados de *E. coli* de origem uterina e urinária de 26 cães foram comparados no estudo de MELO *et al.* (2022). Através do perfil de amplificação genômico, quatro grupos distintos de isolados de *E. coli* foram identificados. Da mesma forma que os trabalhos anteriores, UPEC e EnPECs isoladas de um mesmo animal foram consideradas clones em cinco dos seis casos de infecção simultânea incluídos no estudo (MELO *et al.*, 2022).

Embora várias técnicas já tenham sido empregadas na comparação entre isolados EnPEC e UPEC de animais de companhia, o sequenciamento genômico total ainda não foi utilizado nessa comparação. Vale ressaltar que a técnica de RAPD-PCR, assim como PFGE, são métodos em desuso atualmente, com importantes limitações, o que gera possibilidade de interpretações errôneas. A técnica de sequenciamento completo, juntamente à filogenia por MLST, têm sido capazes de identificar de forma mais acurada a relação de clonabilidade entre isolados bacterianos. Além disso, a comparação da capacidade de adesão e invasão bacteriana ao epitélio uterino e urinário entre EnPECs e UPECs pode trazer informações relevantes para o entendimento da capacidade de *E. coli* em colonizar ambos os órgãos ao mesmo tempo.

### 3 HIPÓTESES CIENTÍFICAS

- Se EnPEC e UPEC isoladas simultaneamente de animais de companhia são clones genéticos, então a caracterização genética e patogênica de EnPEC se relaciona com UPEC.
  
- Se EnPEC e UPEC isoladas simultaneamente de animais de companhia não são genética e filogeneticamente similares, então a caracterização genética e virulenta de EnPEC é exclusiva, não havendo correlação com UPEC.
  
- Se isolados EnPEC e UPEC isolados do mesmo animal possuem mesma capacidade de adesão e invasão celular, então ambos os patótipos podem igualmente gerar infecção uterina e urinária em animais de companhia.
  
- Se isolados EnPEC de animais de companhia possuem maior capacidade de aderir e invadir células endometriais do que isolados UPEC, então os isolados EnPEC possuem especialização virulenta em colonizar o endométrio.



## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Comparar isolados EnPEC e UPEC isolados simultaneamente de cadelas e gatas através de análises *in silico* (análises genômicas) e *in vitro* (análises de patogenicidade).

### 4.2 Objetivos específicos

- Realizar o sequenciamento, montagem e anotação de genomas de *E. coli* isoladas de piometra (EnPEC) e de cistite (UPEC) em animais de companhia.
- Analisar os genomas dos isolados de *E. coli*, verificando e comparando características gerais da estrutura desses genomas e potencial de patogenicidade.
- Analisar e comparar filogeneticamente isolados EnPEC e UPEC de um mesmo animal.
- Analisar e comparar a relação filogenética dos genomas desse estudo com patotipos patogênicos de *E. coli* extraintestinais e intestinais.
- Analisar e comparar o padrão e capacidade *in vitro* de adesão e invasão desses isolados em células eucarióticas.

## **5 METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Neste item são apresentados a metodologia, os resultados obtidos e a discussão do presente estudo, no formato de artigo científico.

A autora desta Dissertação teve participação absoluta em todas as etapas, desde a concepção até a execução e interpretação dos experimentos, bem como escrita do manuscrito, sob orientação e supervisão da orientadora de mestrado. Para a execução dos experimentos houve também colaboração direta ou indireta de outros pesquisadores.

## 6 CONCLUSÕES

- As análises *in vitro* quantitativas e qualitativas realizadas nesse trabalho confirmam o potencial de adesão de cepas EnPEC e UPEC em células HeLa e T24, reforçando o potencial adaptativo desses patótipos na colonização do trato reprodutivo e urinário.
- Através de análises de genoma completo foi possível confirmar a hipótese de correlação de clonabilidade genética entre cepas de *E. coli* isoladas de piometra e cistite de animais de companhia.
- Os resultados obtidos nesse trabalho auxiliam na compreensão da patogenicidade e correlações genéticas dos patótipos UPEC e EnPEC isolados simultaneamente de animais de companhia.

## 7 PERSPECTIVAS

- Realizar ensaios com células de cultivo primário endometrial de animais de companhia, verificando assim a adesão e invasão de *E. coli* no endométrio canino e felino.
- Desenvolver modelo em 3D de endométrio canino para ensaios de adesão e invasão de bactérias causadoras de piometra, auxiliando no entendimento do desenvolvimento dessa enfermidade.

## REFERÊNCIAS

- ABADI, A. T. B. World Health Organization report: current crisis of antibiotic resistance. **BioNanoScience**, New York, v. 9, n. 4, p. 778-788, ago. 2019.
- ACIERNO, M. J.; SENIOR, D. F. Urinary disorders. *In*: SHAER, M. **Clinical medicine of the dog and cat**. 2. ed. Londres: Manson Publishing Ltd., 2011, cap. 13, p. 505-560.
- BAHRANI-MOUGEOT, F. K. *et al.* Type 1 fimbriae and extracellular polysaccharides are preeminent uropathogenic *Escherichia coli* virulence determinants in the murine urinary tract. **Molecular microbiology**, Oxford, v. 45, n. 4, p. 1079-1093, ago. 2002.
- BICALHO, R. C. *et al.* Molecular and epidemiological characterization of bovine intrauterine *Escherichia coli*. **Journal of dairy science**, Champaign, v. 93, n. 12, p. 5818-5830, dez. 2010.
- BRANNON, J. R. *et al.* Invasion of vaginal epithelial cells by uropathogenic *Escherichia coli*. **Nature communications**, London, v. 11, n. 1, p. 1-11, jun. 2020.
- BRAZ, V. S.; MELCHIOR, K.; MOREIRA, C. G. *Escherichia coli* as a multifaceted pathogenic and versatile bacterium. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Lausanne, v. 10, p. 548492, dez. 2020.
- BYRON, J. K. Urinary tract infection. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 49, n. 2, p. 211-221, mar. 2019.
- CHEN, Y. M. M. *et al.* Uropathogenic virulence factors in isolates of *Escherichia coli* from clinical cases of canine pyometra and feces of healthy bitches. **Veterinary microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 1, p. 57-69, 2003.
- CHEW D. J.; DIBARTOLA, S. P.; SCHENCK, P. A. Cystitis and urethritis: urinary tract infection. *In*: \_\_\_\_\_. **Canine and feline nephrology and urology**. 2. ed. Saint Louis: Elsevier Saunders, 2011. cap. 8, p. 240-271.
- CHUE-GONÇALVES, M. *et al.* New approach for detection of *Escherichia coli* invasion to HeLa cells. **Journal of microbiological methods**, Amsterdam, v. 152, p. 31-35, set. 2018.
- CRUTCHLEY, M. J. MARSH, D. G.; CAMERON, J. Free endotoxin. **Nature**, London, v. 214, n. 5092, p. 1052-1052, jun. 1967.
- CIANCIOLO, R. E.; MOHR, F. C. Urinary system. *In*: GRANT, M. M. **Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of domestic animals**. 6. ed. St. Louis: Elsevier, 2016, v. 2, cap. 4, p. 376-465.

CICINELLI, E. *et al.* Chronic endometritis: correlation among hysteroscopic, histologic, and bacteriologic findings in a prospective trial with 2190 consecutive office hysteroscopies. **Fertility and sterility**, New York, v. 89, n. 3, p. 677-684, mar. 2008.

CLERMONT, O. *et al.* The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environmental microbiology reports**, Hoboken, v. 5, n. 1, p. 58-65, nov. 2012.

COGGAN, J. *et al.* Microbiological and histopathological aspects of canine pyometra. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 3, p. 477-483, jul. 2008.

CONNELL, I. *et al.* Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 93, n. 18, p. 9827-9832, set. 1996.

COSSART, P.; SANSONETTI, P. J. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. **Science**, New York, v. 304, n. 5668, p. 242-248, abr. 2004.

DAVIS, H. A. *et al.* Uterine bacterial isolates from mares and their resistance to antimicrobials: 8,296 cases (2003–2008). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 242, n. 7, p. 977-983, abr. 2013.

DE BOSSCHERE, H. *et al.* Estrogen- $\alpha$  and progesterone receptor expression in cystic endometrial hyperplasia and pyometra in the bitch. **Animal reproduction science**, Amsterdam, v. 70, n. 3-4, p. 251-259, abr. 2002.

DEL VECCHIO, R. P. *et al.* Spontaneous uterine infections are associated with elevated prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  metabolite concentrations in postpartum dairy cows. **Theriogenology**, New York, v. 41, n. 2, p. 413-421, fev. 1994.

DENAMUR, E. *et al.* The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 19, n. 1, p. 37-54, jan. 2021.

DOBRINDT, U. (Patho-) genomics of *Escherichia coli*. **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, v. 295, n. 6-7, p. 357-371, out. 2005.

DORSCH, R.; TEICHMANN-KNORRN, S.; SJETNE LUND, H. Urinary tract infection and subclinical bacteriuria in cats: a clinical update. **Journal of feline medicine and surgery**, London, v. 21, n. 11, p. 1023-1038, nov. 2019.

EDWARDS, A.M., MASSEY, R.C. Invasion of human cells by a bacterial pathogen. **Journal of visualized experiments**, Boston, n. 49, e2693, mar. 2011.

EGENVALL, A. *et al.* Breed risk of pyometra in insured dogs in Sweden. **Journal of veterinary internal medicine**, Philadelphia, v. 15, n. 6, p. 530-538, nov. 2001.

ELSINGHORST, E. A. Measurement of invasion by gentamicin resistance. **Methods in Enzymology**, New York, n. 236, p. 405–420, 1994.

FELDMAN, E. C. O complexo Hiperplasia Endometrial Cística/Piometra e Infertilidade em Cadelas. In: STEPHEN, J. E.; FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária: doenças do cão e do gato**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014, v.2, p. 1632-1636.

FIAMENGO, T. E. *et al.* Evaluation of biofilm production by *Escherichia coli* isolated from clinical cases of canine pyometra. **Topics in companion animal medicine**, New York, v. 39, p. 100429, jun. 2020.

FOXMAN, B. The epidemiology of urinary tract infection. **Nature Reviews Urology**, London, v. 7, n. 12, p. 653-660, dez. 2010.

FRANSSON, B. *et al.* Bacteriological findings, blood chemistry profile and plasma endotoxin levels in bitches with pyometra or other uterine diseases. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, Berlin, v. 44, n. 1-10, p. 417-426, set. 1997.

FRANSSON, B. A. *et al.* C-reactive protein in the differentiation of pyometra from cystic endometrial hyperplasia/mucometra in dogs. **Journal of the American animal hospital association**, South Bend, v. 40, n. 5, p. 391-399, set. 2004.

GILBERTIE, J. M. *et al.* Comprehensive phenotypic and genotypic characterization and comparison of virulence, biofilm, and antimicrobial resistance in urinary *Escherichia coli* isolated from canines. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 249, p. 108822, out. 2020.

GUIGNOT, J. *et al.* Polarized Entry of Uropathogenic Afa/Dr Diffusely Adhering *Escherichia coli* Strain IH11128 into Human Epithelial Cells: Evidence for  $\alpha 5\beta 1$  Integrin Recognition and Subsequent Internalization through a Pathway Involving Caveolae and Dynamic Unstable Microtubules. **Infection and immunity**, Washington, v. 69, n. 3, p. 1856-1868, mar. 2001.

GYLES, C. L.; FAIRBROTHER, C. L. *Escherichia coli*. In: GYLES, C. L.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, J. G. THOEN, C. O. **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. 4. ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2010. cap. 15, p. 268-308.

HACKER, J. O. R. G. *et al.* Cloning and characterization of the S fimbrial adhesin II complex of an *Escherichia coli* O18: K1 meningitis isolate. **Infection and immunity**, Washington, v. 61, n. 2, p. 544-550, fev. 1993.

HAGMAN, R. *et al.* Incidence of pyometra in Swedish insured cats. **Theriogenology**, New York, v. 82, n. 1, p. 114-120, jul. 2014.

HAGMAN, R. Pyometra in Small Animals 2.0. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, Philadelphia, v. 52, n. 3, p. 631-657, mai. 2022.

HAGMAN, R; KÜHN, I. *Escherichia coli* strains isolated from the uterus and urinary bladder of bitches suffering from pyometra: Comparison by restriction enzyme digestion and pulsed-field gel electrophoresis. **Veterinary Microbiology**, v. 84, p. 143–153, jan. 2002.

HALL, J. L.; HOLMES, M. A.; BAINES, S. J. Prevalence and antimicrobial resistance of canine urinary tract pathogens. **Veterinary Record**, Oxford, v. 173, n. 22, p. 549-549, dez. 2013.

HENRIQUES, S. *et al.* Immunomodulation in the canine endometrium by uteropathogenic *Escherichia coli*. **Veterinary research**, Paris, v. 47, n. 1, p. 1-17, nov. 2016.

HOLLINSHEAD, F.; KREKELER, N. Pyometra in the queen: to spay or not to spay? **Journal of feline medicine and surgery**, London, v. 18, n. 1, p. 21-33, jan. 2016.

HOMMAIS, F. *et al.* Single-nucleotide polymorphism phylotyping of *Escherichia coli*. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 8, p. 4784-4792, ago. 2005.

JITPEAN, S. *et al.* Breed variations in the incidence of pyometra and mammary tumours in Swedish dogs. **Reproduction in domestic animals**, Berlin, v. 47, p. 347-350, dez. 2012.

JOHNSON J. R. Evolution of pathogenic *Escherichia coli*. In: DONNENBERG, M. (ed.). ***Escherichia coli: Virulence Mechanism of a Versatile Pathogen***. 1. ed. San Diego: Academic Press, 2002. p. 55-77.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature reviews microbiology**, London, v. 2, n. 2, p. 123-140, fev. 2004.

KARLSSON, I. *et al.* Cytokines as immunological markers for systemic inflammation in dogs with pyometra. **Reproduction in domestic animals**, Berlin, v. 47, p. 337-341, dez. 2012.

KITAYA, K. *et al.* Live birth rate following oral antibiotic treatment for chronic endometritis in infertile women with repeated implantation failure. **American Journal of Reproductive Immunology**, Copenhagen, v. 78, n. 5, p. e12719, nov. 2017.

KOGIKA, M. M.; WAKI, M. F. Infecções do trato urinário de cães. In: JERICÓ, M. M.; KOGIKA, M. M.; NETO, J. P. A. **Tratado de Medicina Interna de Cães e Gatos**. São Paulo: Grupo GEN, 2014, v. 2, cap. 166. E-book. ISBN 978-85-277-2667-2. Disponível



em: <https://app.minhabiblioteca.com.br/#/books/978-85-277-2667-2/>. Acesso em: 10 nov. 2022.

KREKELER, N. *et al.* Uropathogenic virulence factor FimH facilitates binding of uteropathogenic *Escherichia coli* to canine endometrium. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, Exeter, v. 35, n. 5, p. 461-467, set. 2012.

KREKELER, N. *et al.* The role of Type 1, P and S fimbriae in binding of *Escherichia coli* to the canine endometrium. **Veterinary microbiology**, Amsterdam, v. 164, n. 3-4, p. 399-404, jun. 2013.

LECUYER, T. E. *et al.* Population structure and antimicrobial resistance of canine uropathogenic *Escherichia coli*. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 56, n. 9, p. e00788-18, ago. 2018.

LEKCHAROENSUK, C.; OSBORNE, C. A.; LULICH, J. P. Epidemiologic study of risk factors for lower urinary tract diseases in cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v. 218, n. 9, p. 1429-1435, mai. 2001.

LETOURNEAU, J. *et al.* In vitro assay of bacterial adhesion onto mammalian epithelial cells. **Journal of visualized experiments**, Boston, n. 51, e2783, mai. 2011.

LYLE, S. K. Piometra e hiperplasia endometrial cística. *In*: TILLEY, L. P.; JUNIOR, F. W. K. S. **Consulta Veterinária em 5 minutos**. 5. ed. Barueri: Manole LTDA, 2015, p. 1042 – 1043.

LING, G. V. Infecções bacterianas do trato urinário. *In*: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária: Doenças do cão e do gato**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, v. 2, cap. 171, p. 1768-17776.

LIU, X.; THUNGRAT, K.; BOOTHE, D. M. Multilocus sequence typing and virulence profiles in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from cats in the United States. **PloS one**, San Francisco, v. 10, n. 11, p. e0143335, nov. 2015.

LLIDO, M. *et al.* Transurethral cystoscopy in dogs with recurrent urinary tract infections: Retrospective study (2011-2018). **Journal of veterinary internal medicine**, Malden, v. 34, n. 2, p. 790-796, fev. 2020.

LOPES, C. E. *et al.* Insights on the genetic features of endometrial pathogenic *Escherichia coli* strains from pyometra in companion animals: Improving the knowledge about pathogenesis. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 85, p. 104453, nov. 2020.

LOPES, C. E. *et al.* Pet pyometra: correlating bacteria pathogenicity to endometrial histological changes. **Pathogens**, Basel, v. 10, n. 7, p. 833, jul. 2021.

LUO, C. *et al.* Genome sequencing of environmental *Escherichia coli* expands understanding of the ecology and speciation of the model bacterial species. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 108, n. 17, p. 7200-7205, abr. 2011.

MAIDEN, M. C. J. Multilocus sequence typing of bacteria. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 60, p. 561-588, 2006.

MALUTA, R. P. *et al.* Frequencies of virulence genes and pulse field gel electrophoresis fingerprints in *Escherichia coli* isolates from canine pyometra. **The Veterinary Journal**, London, v. 202, n. 2, p. 393-395, nov. 2014.

MARKEY, B. *et al.* *Enterobacteriaceae*. In: \_\_\_\_\_. **Clinical Veterinary Microbiology**. 2. ed. Missouri: Elsevier, 2013, cap. 17, p. 239-274.

MARTINEZ, J. J. *et al.* Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. **The EMBO journal**, London, v. 19, n. 12, p. 2803-2812, jun. 2000.

MATEUS, L. *et al.* Virulence genotypes of *Escherichia coli* canine isolates from pyometra, cystitis and fecal origin. **Veterinary microbiology**, v. 166, n. 3-4, p. 590-594, out. 2013.

MELO, R. T. *et al.* Phylogeny and Virulence Factors of *Escherichia coli* Isolated from Dogs with Pyometra. **Veterinary Sciences**, Basel, v. 9, n. 4, p. 158, fev. 2022.

MOISSENET, D. *et al.* Meningitis caused by *Escherichia coli* producing TEM-52 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase within an extensive outbreak in a neonatal ward: epidemiological investigation and characterization of the strain. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 48, n. 7, p. 2459-2463, jul. 2010.

MOXLEY, R. *Enterobactereacea: Escherichia*. In: MCVEY, D. S.; KENNEDY, M.; CHENGAPPA, M. M. **Veterinary Microbiology**. 3. ed. Ames, Iowa: John Wiley & Sons, 2013. cap.7, p.62-74.

MULVEY, M. A. *et al.* Induction and evasion of host defenses by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. **Science**, v. 282, n. 5393, p. 1494-1497, nov. 1998.

NELSON, R.; Couto, C. G. Infecções do Trato Urinário de Cães e Gatos. In: \_\_\_\_\_. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 5. ed. São Paulo: Grupo GEN, 2015, cap. 45, p. 679-685.

NEWMAN, S. J. O sistema urinário. In: ZACHARY, J. F.; McGAVIN, M. D. **Bases da patologia em veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013, cap. 11, p. 592-662.

NOCERA, F. P. *et al.* Importance of broth-enrichment culture in equine endometritis diagnosis. **New Microbiologica**, Pavia, v. 44, p. 19-23, jan. 2021.

PÖPPL, A. G. *et al.* Insulin sensitivity indexes in female dogs: effect of estrus cycle and pyometra. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 37, n. 4, p. 341-350, 2009.

PÖPPL, Á. G. *et al.* Pyometra-associated insulin resistance assessment by insulin binding assay and tyrosine kinase activity evaluation in canine muscle tissue. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 76, p. 106626, jul. 2021.

PRADERIO, R. G. *et al.* Uterine endometrial cytology, biopsy, bacteriology, and serum C-reactive protein in clinically healthy diestrus bitches. **Theriogenology**, New York, v. 131, p. 153-161, jun. 2019.

PRESTES, N. C. *et al.* **Piometra canina: aspectos clínicos, laboratoriais e radiológicos**. Londrina: Semina, v. 12, n. 1, p. 53-56, 1991.

QIAN, C.; JIANG, C.; HOU, J. The endometrium histopathology and cell ultrastructure in bitches with pyometra induced using progesterone and *Escherichia coli*. **Tissue and Cell**, Edinburgh, v. 67, p. 101414, dez. 2020.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. Família *Enterobacteraceae*. In: \_\_\_\_\_. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. cap.18, p.115-130.

RASKO, D. A. *et al.* The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. **Journal of bacteriology**, Washington, v. 190, n. 20, p. 6881-6893, out. 2008.

RIBEIRO, M. G.; LEITE, D. S.; SIQUEIRA, A. K. Enfermidades por *Escherichia coli*. In: MEGID, J; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. **Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia**. 1. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016. cap. 25, p. 243-273.

ROER, L. *et al.* Development of a web tool for *Escherichia coli* subtyping based on *fimH* alleles. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 55, n. 8, p. 2538-2543, ago. 2017.

RYTLEWSKA, M. *et al.* Molecular analysis of uropathogenic strains of *Escherichia coli* and the clinical course of urinary tract infection in children. **Medycyna Wieku Rozwojowego**, Warszawa, v. 9, n. 4, p. 727-739, out. 2005.

SANDHOLM, M.; VASENIUS, H.; KIVISTÖ, A. K. Pathogenesis of canine pyometra. **Journal of the American veterinary medical association**, Ithaca, v. 167, n. 11, p. 1006-1010, dez. 1975.

SANTANA, C. H. *et al.* Association of pseudoplacental endometrial hyperplasia and pyometra in dogs. **Journal of Comparative Pathology**, London, v. 180, p. 79-85, out. 2020.

SELVARANGAN, R. *et al.* Role of decay-accelerating factor domains and anchorage in internalization of Dr-fimbriated *Escherichia coli*. **Infection and immunity**, Washington, v. 68, n. 3, p. 1391-1399, mar. 2000.

SERAKIDES, R.; SILVA, J. F. Sistema urinário. SANTOS, R. L.; ALESSI, A. C. **Patologia Veterinária**. 2. ed. São Paulo: Grupo GEN, 2016, cap. 5. E-book. ISBN 9788527729253. Disponível em: <https://app.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788527729253/>. Acesso em: 10 nov. 2022.

SERVIN, A. L. Pathogenesis of human diffusely adhering *Escherichia coli* expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): current insights and future challenges. **Clinical microbiology reviews**, Washington, v. 27, n. 4, p. 823-869, out. 2014.

SIQUEIRA, A. K. *et al.* Virulence factors in *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infection and pyometra cases and from feces of healthy dogs. **Research in Veterinary Science**, v. 86, n. 2, p. 206-210, abr. 2009.

ŚLEDZIŃSKA, A. *et al.* Fatal sepsis in a pregnant woman with pyelonephritis caused by *Escherichia coli* bearing Dr and P adhesins: diagnosis based on postmortem strain genotyping. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, Oxford, v. 118, n. 2, p. 266-269, nov. 2010.

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

SMITH, Y. C. *et al.* Hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli* evokes extensive shedding of the uroepithelium and hemorrhage in bladder tissue within the first 24 hours after intraurethral inoculation of mice. **Infection and immunity**, Washington, v. 76, n. 7, p. 2978-2990, jul. 2008.

TILLEY, L. P.; JUNIOR, F. W. K S. **Consulta Veterinária em 5 Minutos: Espécies Canina e Felina**. 5. ed. Barueri: Editora Manole, 2015, p. 735-737.

TOUSSAINT, A.; CHANDLER, M. Prokaryote genome fluidity: toward a system approach of the mobilome. **Bacterial Molecular Networks**, p. 57-80, 2012.

TSUMAGARI, S. *et al.* Induction of canine pyometra by inoculation of *Escherichia coli* into the uterus and its relationship to reproductive features. **Animal reproduction science**, Amsterdam, v. 87, n. 3-4, p. 301-308, jul. 2005.

TRAMUTA, C. *et al.* Virulence factors and genetic variability of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Italy. **Journal of veterinary science**, Seoul, v. 12, n. 1, p. 49-55, mar. 2011.

URWIN, R.; MAIDEN, M. C. J. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. **Trends in microbiology**, Cambridge, v. 11, n. 10, p. 479-487, out. 2003.

VALIATTI, T. B. *et al.* Genetic and virulence characteristics of a hybrid atypical enteropathogenic and uropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC/UPEC) Strain. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, Lausanne, v. 10, p. 492, set. 2020.

VANGCHHIA, B. *et al.* Phylogenetic diversity, antimicrobial susceptibility and virulence characteristics of phylogroup F *Escherichia coli* in Australia. **Microbiology**, London, v. 162, n. 11, p. 1904-1912, nov. 2016.

VERBOOM, D. M. *et al.* O-serotype distribution of *Escherichia coli* bloodstream infection isolates in critically ill patients in The Netherlands. **Vaccine**, Amsterdam, v. 39, n. 12, p. 1670-1674, mar. 2021.

WADÅS, B. *et al.* Biochemical phenotypes of *Escherichia coli* in dogs: comparison of isolates isolated from bitches suffering from pyometra and urinary tract infection with isolates from faeces of healthy dogs. **Veterinary microbiology**, v. 52, n. 3-4, p. 293-300, out. 1996.

WATTS, J. R.; WRIGHT, P. J.; WHITHEAR, K. C. Uterine, cervical and vaginal microflora of the normal bitch throughout the reproductive cycle. **Journal of small animal practice**, Oxford, v. 37, n. 2, p. 54-60, fev. 1996.

WILES, T. J.; KULESUS, R. R.; MULVEY, M. A. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. **Experimental and molecular pathology**, Amsterdam, v. 85, n. 1, p. 11-19, ago. 2008.

WOODFORD, N.; TURTON, J. F.; LIVERMORE, D. M. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. **FEMS microbiology reviews**, Amsterdam, v. 35, n. 5, p. 736-755, set. 2011.

XAVIER, R. G. C. *et al.* Characterization of *Escherichia coli* in Dogs with Pyometra and the Influence of Diet on the Intestinal Colonization of Extraintestinal Pathogenic *E. coli* (ExPEC). **Veterinary Sciences**, v. 9, n. 5, p. 245, abr. 2022.

ZALEWSKA-PIĄTEK, B. *et al.* A shear stress micromodel of urinary tract infection by the *Escherichia coli* producing Dr adhesin. **PLoS pathogens**, San Francisco, v. 16, n. 1, p. e1008247, jan. 2020.

ZHENG, H. *et al.* A study on the correlation between intrauterine microbiota and uterine pyogenesis in dogs. **Theriogenology**, New York, v. 196, p. 97-105, jan. 2023.