

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Investigação da potencial associação entre uma nova adesina autotransportadora (*Eaa: EPEC autotransporter adhesin*) e a fimbria de aderência agregativa II (AAF/II) na formação de biofilme em isolados de *Escherichia coli* enteroagregativa.

LUÍSA PEREIRA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Tavanelli Hernanades
Co-orientador: Me. Iranildo do Amarante Fernandes

BOTUCATU - SP

2025

P436i Pereira, Luísa

 Investigação da potencial associação entre uma nova adesina autotransportadora (Eaa: EPEC autotransporter adhesin) e a fimbria de aderência agregativa II (AAF/II) na formação de biofilme em isolados de Escherichia coli enteroagregativa. / Luísa Pereira. -- , 2025

 32 p. : il., tabs., fotos

 Trabalho de conclusão de curso (-) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu,

 Orientador: Rodrigo Tavanelli Hernandez

 Coorientador: Iranildo do Amarante Fernandes

 1. Biologia. 2. Microbiologia 3. Genética Molecular

 I. Título

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor (a).

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Silvana Fernandes Pereira e José Luiz Pereira, por me apoiarem em cada etapa da minha vida e por me proporcionarem a oportunidade de poder realizar o curso de graduação. Obrigada por, mesmo de uma grande distância, sempre se fazerem presentes em minha vida. Obrigada por me ensinarem sobre valores e responsabilidade. Obrigada por nunca deixarem faltar amor, carinho e cuidado. Sem o suporte vocês, nada disso seria possível.

Agradeço à Raíssa Fernanda Toledo, a pessoa que escolhi para minha vida. Obrigada por me ajudar a passar por todos os momentos de dificuldade e por sempre comemorar comigo todas as conquistas. Obrigada por nunca me deixar desistir e por sempre me fazer ser minha melhor versão.

Agradeço às minhas amigas Ana Luisa e Ana Caroline, que estão comigo desde a época da escola. Obrigada por todas as longas ligações, que apesar de às vezes acontecerem com espaçamento de meses, sempre foram pontos de paz e conforto.

Agradeço à Julia de Lima Lopes, Daiany Ribeiro Paz De Lira e Melissa Ayume Tinen, por dividirem comigo essa jornada de morar em Botucatu. Obrigada por todos os momentos de risada que deixaram as semanas mais leves.

Aos meus amigos da turma LVI de Ciências Biológicas, por me fazerem companhia durante as aulas da graduação.

Agradeço à todas as meninas da república VaiDanada, por me acolherem e se tornarem minha família em Botucatu.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr Rodrigo Tavanelli Hernandes, pela oportunidade de realizar esta pesquisa em seu laboratório. Obrigada por todo auxílio, paciência e ensinamentos, e por ter me guiado em todos os momentos deste trabalho.

Agradeço ao meu co-orientador, Me. Iranildo do Amarante Fernandes, por me ajudar em momentos de dúvida, me auxiliar em diversos experimentos e me mostrar diferentes caminhos para contornar as dificuldades encontradas no laboratório.

Agradeço aos meus amigos do Laboratório de Patogenicidade Bacteriana, Daiany Ribeiro Paz De Lira, Iranildo do Amarante Fernandes, Beatrice Di Virgilio Lopes Souza, Guilherme Frizzarin Ramalhães de Souza, Gustavo Boldrim Bueno, Bruna Mendes Luiz, Henrique Orsi e Francisco José de Moraes Bassetto. Obrigada pela companhia, ajuda e ensinamentos durante os dois anos que frequentei o laboratório, vocês foram essenciais para que este trabalho pudesse ser realizado.

Agradeço à Prof^ª. Dr^ª. Vera Lucia Moraes Rall, ao Prof. Dr. Ary Fernandes Júnior e ao Prof. Dr. Paulo Henrique Fonseca do Carmo, por me permitirem utilizar equipamentos de seus laboratórios durante os experimentos deste trabalho.

Agradeço aos meus colegas de departamento pela companhia durante os almoços e momentos de café na copa do departamento.

Agradeço às técnicas do departamento de Microbiologia e Imunologia do IBB, Larissa, Ivana e Aline por todo apoio e prestatividade.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro, concedido por meio do Processo nº 2024/03219-8.

SUMÁRIO

RESUMO	4
ABSTRACT	6
INTRODUÇÃO	7
OBJETIVO	15
METODOLOGIA	15
1. Isolados de EAEC que foram utilizados nessa pesquisa	15
2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	15
3. Teste de Adesão	16
4. Testes de biofilme	17
4.1. Para classificação inicial das amostras selecionadas	17
4.2. Para a comparação dos isolados que albergam os vetores pIC e pBAD/Myc-His A.	17
5. Transformação dos isolados de EAEC por eletroporação.	18
6. Deleção do operon <i>aafDA</i> em um isolado de EAEC selecionado	18
RESULTADOS	19
1. Seleção inicial dos isolados baseado na presença de marcadores genéticos, padrão de aderência agregativa e susceptibilidade à ampicilina	19
2. Ensaio de formação de biofilme	21
3. Transformação de 10 isolados de EAEC com o vetor pBAD/Myc-His A e o plasmídeo recombinante pIC.	22
4. Eaa aumenta a produção de biofilme em um isolado de EAEC que carrega genes associados a biogênese de AAF/II	24
DISCUSSÃO	26
CONCLUSÃO	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

RESUMO

A formação de biofilme é um atributo de virulência no qual adesinas são essenciais para a adesão bacteriana a superfícies bióticas e abióticas. A *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC), um dos seis patótipos de *E. coli* diarreioagênica, é caracterizada pela produção do padrão de adesão agregativa (AA) em células epiteliais infectadas, definido pela organização bacteriana em um arranjo semelhante a tijolos empilhados. Esse fenótipo é mediado principalmente por uma das cinco variantes das fímbrias de adesão agregativa (AAF/I–V). Dada a natureza multifatorial da produção de biofilme, decidimos investigar se uma nova proteína autotransportadora, denominada Adesina Autotransportadora de EPEC (Eaa), poderia contribuir para a formação de biofilme em diferentes contextos genéticos de EAEC. Dados anteriores de nosso laboratório mostraram que a produção de Eaa por um isolado de EAEC, portador de genes associados à biogênese da AAF/II (P184-1), aumentou significativamente a produção de biofilme. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar a contribuição da Eaa para a formação de biofilme em diferentes isolados de EAEC produtores de AAF/II. Primeiramente, 25 isolados de EAEC (*aggR⁺/aafA⁺*) foram testados quanto à produção do padrão AA em células HeLa e para a suscetibilidade à ampicilina (Amp^S). Em seguida, os isolados de EAEC AA⁺ e Amp^S foram testados quanto à produção de biofilme em superfície de poliestireno. Isolados representativos de EAEC que produziam biofilme foram transformados com o plasmídeo pIC (vetor plasmidial pBAD-Myc/His-A contendo o gene que codifica a Eaa), bem como com o vetor vazio, e submetidos ao ensaio de produção de biofilme. Em seguida, o operon *aafDA* foi deletado de um isolado característico, o qual foi então transformado com os plasmídeos pIC e pBAD, e esses foram submetidos a testes de produção de biofilme. Dos 25 isolados de EAEC testados, 22 produziram o padrão AA em células HeLa e foram suscetíveis à ampicilina. Entre esses 22 isolados, 17 (77,3%) foram classificados como produtores fortes e 5 (22,7%) como produtores moderados de biofilme. A comparação de dez isolados de EAEC (classificados como produtores fortes de biofilme) contendo o plasmídeo pIC com os mesmos isolados contendo o plasmídeo pBAD mostrou que todos os isolados portadores do pIC apresentaram aumento na produção de biofilme, sendo essa diferença considerada estatisticamente significativa em três deles ($P < 0,05$). Os ensaios de biofilme realizados com os isolados IAL 9867 Δ *aafDA* pIC e IAL 9867 Δ *aafDA* pBAD revelaram que não houve diferença na produção de biofilme por esses isolados. Dessa forma, o aumento na produção de biofilme por Eaa, só foi observada quando na presença de genes associado à biogênese de AAF/II. Diante dos resultados observados, o presente estudo conclui que a Eaa

pode contribuir para a produção de biofilme por certos isolados de EAEC portadores de genes associados à biogênese da AAF/II.

Palavras-chave: *Escherichia coli*; virulência; adesina; autotransportadora.

ABSTRACT

Biofilm formation is a virulence attribute in which adhesins are essential for bacterial attachment to biotic and abiotic surfaces. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC), one of the six diarrheagenic *E. coli* pathotypes, is characterized by the production of the aggregative adherence (AA) pattern on infected epithelial cells, defined by bacterial organization in an arrangement resembling stacked bricks. This phenotype is mediated mainly by one of the five variants of the aggregative adherence fimbriae (AAF/I–V). Given the multifactorial nature of biofilm production, we decided to investigate whether a novel autotransporter protein, termed EPEC Autotransporter Adhesin (Eaa), could contribute to biofilm formation in distinct EAEC backgrounds. Previous data from our laboratory showed that the production of Eaa by an EAEC isolate, harboring genes associated with the AAF/II biogenesis (P184-1), significantly increased biofilm production. Thus, the aim of the present study was to investigate the contribution of Eaa to biofilm formation in different AAF/II-producing EAEC isolates. First, 25 EAEC isolates (*aggR*⁺/*aafA*⁺) were tested for the production of the AA pattern on HeLa cells and for susceptibility to ampicillin (Amp^S). Then, EAEC isolates AA⁺ and Amp^S were tested for biofilm production on a polystyrene surface. Representative EAEC isolates that produced biofilm were transformed with the pIC (pBAD-Myc/His-A plasmid vector carrying the gene encoding Eaa), as well as the empty vector, and subjected to the biofilm production assay. Next, the *aafDA* operon was deleted from a characteristic isolate, which was then transformed with the plasmids pIC and pBAD, and these were subjected to biofilm production tests. Of the 25 EAEC isolates tested, 22 produced the AA pattern on HeLa cells and were susceptible to ampicillin. Among these 22 isolates, 17 (77.3%) were classified as strong and 5 (22.7%) as moderate biofilm producers. The comparison of ten EAEC isolates (classified as strong biofilm producers) carrying the pIC with the same isolates carrying the pBAD showed that all isolates harboring pIC had an increase in biofilm production, with this difference being considered statistically significant in three of them ($P < 0.05$). Biofilm assays performed with isolates IAL 9867 Δ *aafDA* pIC and IAL 9867 Δ *aafDA* pBAD revealed no difference in biofilm production by these isolates. Therefore, the increase in biofilm production by Eaa was only observed in the presence of genes associated with AAF/II biogenesis. Given the observed results, the present study concludes that Eaa may contribute to biofilm production by certain EAEC isolates harboring genes associated with AAF/II biogenesis.

Keywords: *Escherichia coli*; virulence; adhesin; autotransporter.

INTRODUÇÃO

A diarreia infecciosa é a segunda causa de óbitos em crianças de até cinco anos, sendo responsável pelo óbito de 370,000 crianças em 2019 (WHO, 2021). A doença diarreica pode ser transmitida pelo contato com indivíduos infectados que apresentam higiene pessoal escassa ou, mais comumente, a partir do consumo de alimentos e/ou água contaminados, situações observadas com maior frequência em países em desenvolvimento, como o Brasil (WHO, 2017). Os principais agentes infecciosos associados a doença diarreica são os vírus (rotavírus, sapovírus, calicivírus, norovírus, astrovírus e adenovírus), os protozoários (*Cryptosporidium* spp, *Giardia lamblia* e *Entamoeba histolytica*) e as bactérias (diferentes patotipos de *Escherichia coli* diarreio gênica, *Escherichia albertii*, *Shigella* spp, *Salmonella* spp, *Campylobacter* spp, *Vibrio cholerae*, *Aeromonas* spp) (LANATA *et al.* 2013; BHATT *et al.* 2019; KOTLOFF *et al.* 2019)

Pertencente à família *Enterobacteriaceae*, *E. coli* é um bacilo Gram-negativo, geralmente móvel, anaeróbio facultativo, fermenta a glicose, não produz a enzima citocromo C oxidase e pode ou não realizar fermentação da lactose. A bactéria *E. coli* é um dos principais componentes da microbiota anaeróbica intestinal humana de indivíduos saudáveis. Apesar desse fato, alguns isolados dessa espécie adquiriam por mecanismos de transferência horizontal de genes (THG) durante sua existência, um arsenal genético composto por plasmídeos, profagos e ilhas de patogenicidade que conferiram a esses isolados a capacidade de codificar fatores de virulência e causar doenças no seu hospedeiro. Os isolados de *E. coli* que causam doença no seu hospedeiro são denominados de *E. coli* patogênica, e entre as enfermidades mais comumente causadas por esse patógeno estão a doença diarreica, as infecções do trato urinário (cistite e pielonefrite), bacteremia e a meningite neonatal (KAPER *et al.*, 2004). Didaticamente, os isolados patogênicos de *E. coli* são divididos em dois grandes grupos: a *E. coli* diarreio gênica (DEC) e a *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC) (RUSSO & JOHNSON *et al.*, 2000).

Com base na especificidade dos mecanismos de virulência encontrado nos isolados de DEC, esses são classificados em seis diferentes patotipos. O quadro 1 apresenta os distintos patotipos de DEC, e resume seus principais mecanismos de virulência (NATARO e KAPER, 1998; KAPER *et al.*, 2004; CROXEN *et al.*, 2013).

Quadro 1. Distintos patotipos de *Escherichia coli* diarreio gênica (DEC) e seus mecanismos de virulência.

Patotipo	Principal fator de virulência
<i>E. coli</i> enteropatogênica (EPEC)	Produção da Lesão <i>attaching and effacing</i> nas células infectadas (A/E)
<i>E. coli</i> produtora da toxina de Shiga (STEC)	Produção da toxina Shiga (Stx)
<i>E. coli</i> enterotoxigênica (ETEC)	Produção das toxinas Heat-labile (LT) e/ou Heat-stable (ST)
<i>E. coli</i> enteroinvasora (EIEC)	Invasão das células do epitélio intestinal
<i>E. coli</i> difusamente aderente (DAEC)	Adesão difusa (DA) às células epiteliais
<i>E. coli</i> enteroagregativa (EAEC)	Adesão agregativa (AA) às células epiteliais

O termo EAEC foi primeiramente utilizado na literatura científica por Nataro e colaboradores no ano de 1987 (NATARO *et al.*, 1987) para designar isolados de *E. coli* capazes de produzir um padrão de aderência em células epiteliais cultivadas *in vitro* (HEp-2) distinto da aderência localizada (LA) e da aderência difusa (DA). Este padrão identificado é caracterizado pelo arranjo das células bacterianas aderidas tanto às células epiteliais como na superfície das lamínulas de vidro, em uma arquitetura que se assemelha a uma parede de tijolos empilhados (Figura 1). O potencial de virulência dos isolados de EAEC baseia-se na adesão abundante dessas bactérias às células epiteliais, formação de biofilme, liberação de diversas toxinas e inflamação da mucosa intestinal (ESTRADA-GARCIA & NAVARRO-GARCIA, 2012; NAVARRO-GARCIA & ELIAS, 2011)

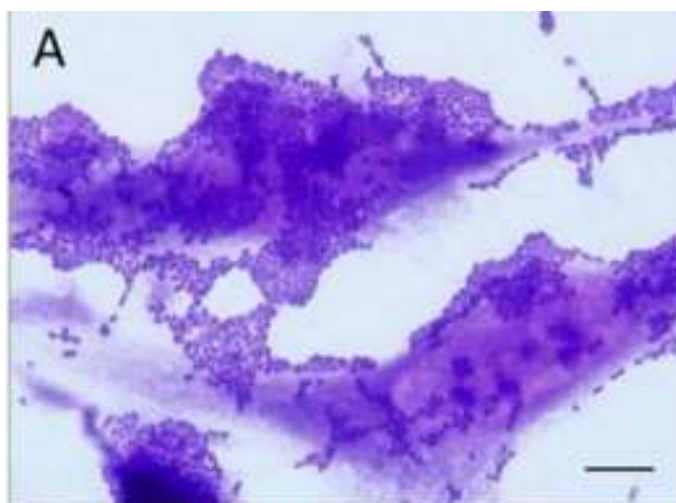


Figura 1. Padrão de Adesão Agregativa (AA) de EAEC em ensaio de aderência realizado com células HeLa utilizando 3 horas de interação bactéria-célula. Barra de aumento = 10 µm. Extraído de DIAS *et al.*, (2020).

Os isolados de EAEC albergam o plasmídeo de alta densidade molecular pAA. Este pode ou não apresentar o gene *aggR*, associado à síntese do regulador transcricional AggR. O AggR é responsável por regular a expressão de genes cromossômicos e plasmidiais capazes de codificar diversos fatores de virulência associados à patogenicidade dos isolados de EAEC (DUDLEY *et al.*, 2006). Isolados de EAEC que apresentam o gene *aggR* são classificadas como EAEC típicas, e, em contrapartida, as que não apresentam tal gene são chamadas de EAEC atípicas (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Ademais, o plasmídeo de alto peso molecular chamado de plasmídeo de aderência agregativa ou pAA, carrega genes associados à biogênese de adesinas fimbriais AAFs (*agregativa adherence fimbriae*) relacionadas ao estabelecimento do padrão AA (CZECZULIN *et al.*, 1999), bem como genes capazes de codificar outros diversos fatores de virulência associados à patogenicidade dos isolados de EAEC (HEBBELSTRUP JENSEN *et al.*, 2014). Até o momento, já foram descritas cinco variantes de AAFs (AAF/I – AAF/V) a partir de diferentes protótipos de EAEC como descritos no quadro 2. As AAFs são codificadas por clusters de quatro genes (NATARO *et al.*, 1992). Os genes responsáveis por codificar as proteínas presentes na AAF/I (chaperona, usher e as proteínas majoritárias e minoritárias) se encontram em um único operon (*aggDCBA*) que alberga os respectivos genes: *aggD* (chaperona), *aggC* (usher), *aggB* (proteína minoritária) e *aggA* (proteína majoritária) (SAVARINO *et al.*, 1994). Os genes que codificam as AAFs III, IV e V se organizam da mesma maneira que os responsáveis por codificar AAF/I (BERNIER, C.; GOUNON, P.; LE BOUGUENEC, C., 2002; BOISEN *et al.*, 2008; JØNSSON *et al.*, 2015). Entretanto, os genes que codificam AAF/II estão organizados em dois diferentes clusters que se encontram em regiões relativamente distantes no pAA: o cluster *aafDA* e o cluster *aafCB* (ELIAS W. P. *et al.*, 1999).

Quadro 2. Principais características dos isolados de EAEC e origem em que os distintos subtipos de fímbrias de aderência agregativa (AAFs) foram descritas.

Tipos de AAF	Isolado de EAEC	Sorotipo	Quadro clínico	Origem	Referência
AAF/I	17-2	O3:H2	Diarreia	Chile	NATARO <i>et al.</i> (1992)
AAF/II	042	O44:H18	Diarreia	Peru	CZECZULIN <i>et al.</i> (1997)
AAF/III	55989	O104:H4	Diarreia	Senegal	BERNIER <i>et al.</i> (2002)
AAF/IV	C1010-00	OR:H1	Diarreia	Dinamarca	BOISEN <i>et al.</i> (2008)
AAF/V	C338-14	-	Diarreia	Dinamarca	JØNSSON <i>et al.</i> (2015)

De forma geral, a biogênese das AAFs utiliza-se da via chaperona-usheer. Nessa via ocorre a secreção das subunidades fimbriais no espaço periplasmático pelo sistema de secreção do tipo Sec. Destarte, estas subunidades responsáveis pela biogênese das fimbrias formam um complexo com uma proteína nomeada chaperona. Assim, a porção N-terminal das subunidades proteicas interage com a proteína bacteriana usheer, que por sua vez age como plataforma para a instalação da plena e coordena o processo de polimerização dos componentes da mesma. Desse modo, o usheer permite a projeção do complexo proteico ao meio extracelular. Este processo resulta em um apêndice filamentos proteico em crescimento, denominado fimbria. Na porção mais distal da fimbria (tip) se inicia a inserção das subunidades no usheer processo que resulta no aumento do tamanho da fimbria. Posteriormente, a proteína majoritária da fimbria (pilina) é adicionada, concluindo o crescimento do filamento fimbrial. (KLEMM *et al.*, 2010).

A formação de biofilme sobre células da mucosa intestinal caracteriza um importante fator de virulência em EAEC (TZIPORI *et al.*, 1992; NATARO *et al.*, 1996). Os biofilmes conferem às bactérias resistência a antibióticos e evasão do sistema imune do hospedeiro (ANDERL *et al.*, 2000; MITTAL *et al.*, 2015; ZUROFF *et al.*, 2010). A formação de biofilme em isolados do patotipo EAEC está intimamente ligada à produção de adesinas fimbriais, principalmente as AAF/I e IV (SHEIKH *ET AL*, 2008; Dados não publicados - Processo FAPESP: 23/04219-9). As adesinas apresentam função essencial na fase inicial da formação do biofilme, permitindo a adesão das células bacterianas planctônicas à superfície abióticas (PRATT, L. A.; KOLTER, R., 2002) . Em um estudo da literatura utilizando o protótipo de EAEC 042, no qual a adesina fimbrial AAF/II foi primeiramente identificada, mostrou que a produção eficiente de biofilme é dependente do produto do gene *aafA*, responsável por codificar a pilina de AAF/II, uma vez que um mutante no gene *aafA* não foi capaz de produzir biofilme em ensaios de interação com superfícies abióticas estendidos por um período de até 72h (SHEIKH *ET AL*, 2008). Ademais, esse mesmo estudo demonstrou que o produto dos genes *fis* e *yafK* é necessário para a produção de biofilme devido ao fato de atuarem como reguladores positivos dos genes responsáveis por codificar AAF/II (SHEIKH *ET AL*, 2008).

Em 2018, Lang e colaboradores descreveram uma nova fimbria em um isolado híbrido de EAEC/STEC (sorotipo O23:H8), o qual apresentava o fenótipo de aderência agregativa mas não albergava os genes responsáveis pela produção das AAFs tampouco o gene regulador das mesmas (*aggR*). A nova fimbria foi designada *aggregate-forming pili* (AFP) e o plasmídio no qual o operon *afp* se encontra, pAFP. No operon *afp* está presente o gene regulador da fimbria

(*afpR*), e um conjunto de 15 genes que codificam proteínas responsáveis pela biogênese de AFP. A deleção dos genes *afpA*, *afpR*, bem como do operon completo resultou em isolados incapazes de produzir o padrão AA em ensaios de interação com células epiteliais HEP-2 (LANG *et al.*, 2018). Genes pertencentes ao operon *afp* foram identificados em isolados de EAEC atípica obtidos de amostras de fezes de adultos e crianças, que apresentavam, ou não, quadro diarreico (DIAS *et al.*, 2020; SCHÜROFF *et al.*, 2021; FREIRE *et al.*, 2022). Ademais, um estudo recente mostrou o papel e a importância de AFP tanto na colonização do trato intestinal como na do trato urinário em modelo murino (SCHÜROFF *et al.*, 2022).

Dentre as toxinas produzidas e secretadas por EAEC podemos destacar: Pic (*protein involved in colonization*), Pet (*plasmid encoded toxin*) e EAST-1 (*enteroaggregative E. coli heat stable enterotoxin*). Pic é uma toxina pertencente ao grupo da SPATE (Serine Protease Autotransporters of Enterobacteriaceae) a qual é codificada pelo gene cromossomal *pic* e tem função na colonização intestinal, evasão do sistema imune e ação mucinolítica (HENDERSON *et al.*, 1999; ABREU, 2015). Outra enterotoxina nomeada Pet é codificada por um gene presente no plasmídeo de alta massa molecular pAA (ESLAVA *et al.*, 1998) e apresenta atividade citotóxica devido a sua capacidade de clivar a espectrina presente no citoesqueleto das células epiteliais (NAVARRO-GARCIA F, *et al.*, 1999). Ademais, EAST-1 é codificada pelo gene *astA* também presente no pAA (SAVARINO *et al.*, 1991). Savarino e colaboradores observaram a partir de ensaios realizados em *Ussing chamber* com fragmentos de tecido de íleo de coelho, que a toxina EAST-1 age alterando a função da guanilato ciclase, elevando assim os níveis de GMP cíclico, que causa a liberação de secreções pelo tecido epitelial intestinal (SAVARINO *et al.*, 1991). Todavia, essa toxina não provocou o aumento nos níveis de GMPc e AMPc em testes *in vitro* em células IPEC-J2 (células do intestino delgado de suíno) ou T84 (células do cólon humano) (RUAN *et al.*, 2012). Outrossim, o gene *astA* não é encontrado em todos os isolados de EAEC e já foi identificado em isolados de *E. coli* não patogênicas (KAPER J. B., NATARO J. P., MOBLEY H. L., 2004).

A dispersina (Aap), codificada pelo gene *aap* (anti-aggregation protein) encontrado no pAA (SHEIKH, J. *et al.*, 2002) é um importante fator de virulência para EAEC, atuando como uma proteína antiagregativa que proporciona motilidade da bactéria pelo epitélio intestinal sem formar aglomerados (VELARDE *et al.*, 2007). Isso se dá, pois, essa proteína altera a carga negativa da superfície da célula bacteriana, permitindo que as AAF se projetem e que a bactéria seja capaz de colonizar outras regiões do trato gastrointestinal (VELARDE *et al.*, 2007). A secreção da dispersina para o meio extracelular foi descrita por Nishi e colaboradores em 2003

no isolado de EAEC 042 e ocorre a partir do complexo ABC (*ATP-binding cassette*), sendo as proteínas desse aparato de secreção codificadas por um conjunto de cinco genes: *aatP*, *aatA*, *aatB*, *aatC* e *aatD*. O processo de secreção da proteína dispersina tem início com o reconhecimento da sequência sinal pelo sistema Sec, o qual transporta a proteína do citoplasma ao espaço periplasmático. Em seguida, a proteína AatA, ligada à membrana externa, tem função de poro e transporta a dispersina madura do espaço periplasmático ao meio extracelular, como esquematizado na figura 2. O gene *aatC* é responsável por codificar uma ATPase, chamada AatC, e o gene *aatP* codifica a permease AatP, ambas presente no complexo ABC (NISHI *et al*, 2003). Outrossim, o gene *aatA* é correspondente a sonda CVD432 utilizada inicialmente por Baudry *et al* (1990) como instrumento para identificação de isolados de EAEC.

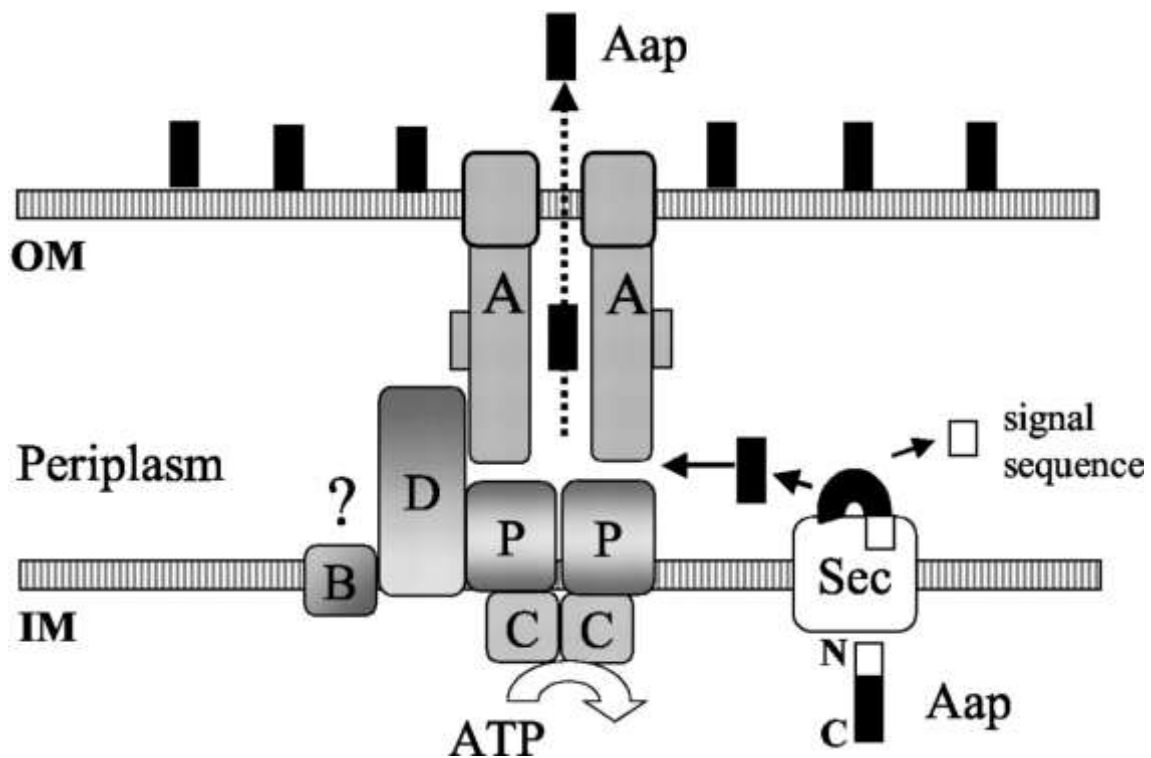


Figura 2. Transporte da dispersina para o meio extracelular por meio do sistema Sec e do complexo ABC (NISHI *et al*, 2003).

Isolados de *E. coli* patogênicas podem produzir um conjunto de importantes fatores de virulência conhecido como proteínas autotransportadoras (AT) ou sistema de secreção do tipo V (SST5) (LEYTON *et al*. 2012; MEUSKENS *et al*. 2019). Tais proteínas têm a capacidade de realizar diferentes ações durante a progressão do processo infeccioso, como: estimular a agregação bacteriana, formação de biofilme, aderência e/ou invasão das células do hospedeiro e escape do sistema imunológico (MEUSKENS *et al*. 2019). As proteínas autotransportadoras

são constituídas por três domínios funcionais, o peptídeo sinal, o domínio passageiro e o domínio C-terminal translocador (β -barril). Localizado na porção N-terminal da proteína, o peptídeo sinal é responsável pela passagem da proteína do citoplasma para o espaço periplasmático através do sistema de secreção Sec. No espaço periplasmático, o domínio C-terminal translocador (β -barril) se insere na membrana bacteriana externa formando um poro, o qual, permite a passagem do domínio passageiro para o meio extracelular (HENDERSON, NAVARRO-GARCIA e NATARO, 1998; LEYTON *et al.* 2012; DROBNAK *et al.* 2015).

Em um estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa com a *University of Maryland* o genoma de 106 isolados de aEPEC foram sequenciados, dentre os quais 7 isolados de aEPEC eram pertencentes ao sorotipo O2:H16 (HERNANDES *et al.*, 2020). Em colaboração com o Prof. Dr. Luis Fernando dos Santos, do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, nosso grupo de pesquisa mostrou a associação desse sorotipo com um surto de diarreia ocorrido no estado de SP (VIEIRA *et al.*, 2016). A busca por novos fatores de virulência em isolados de aEPEC levou a identificação de uma nova adesina autotransportadora que foi geneticamente e funcionalmente caracterizada pelo doutorando do nosso grupo de pesquisa Henrique Orsi. Essa adesina foi designada Eaa (EPEC *autotransporter adhesin*) e até o momento tem se mostrado importante para os fenótipos de autoagregação bacteriana, formação de biofilme e ligação a elementos da matriz extracelular tais como: fibronectina e laminina.

Como a aderência das células bacterianas as superfícies abióticas durante a formação do biofilme é um processo multifatorial, durante a iniciação científica do graduando do curso de ciências biológicas Guilherme F. R. de Souza (processo: 21/12754-6) foi investigada o papel da adesina Eaa na formação de biofilme em diferentes isolados de EAEC albergando genes responsáveis por codificar as proteínas envolvidas na produção dos cinco distintos tipos de AAF (AAF/I – AAF/V). Surpreendentemente, pudemos observar que somente um isolado de EAEC (P184-1), albergando os genes que codificam proteínas associadas a biogênese de AAF/II, a nova adesina Eaa conseguiu potencializar a formação de biofilme (figura 3).

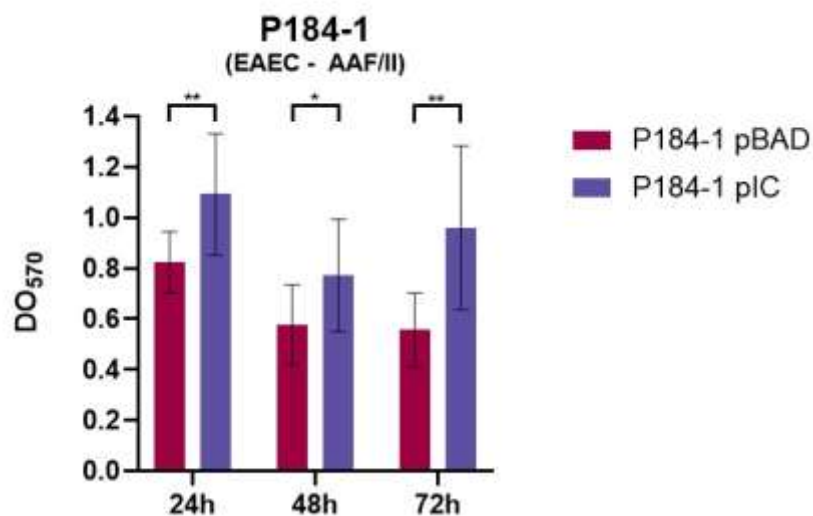


Figura 3. Comparação da formação de biofilme pelos isolados de P184-1 transformantes com vetor vazio pBAD-Myc/His-A (vermelho) e pIC (azul). * Diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$). Gentilmente cedido por Guilherme F. R. de Souza, aluno de iniciação científica do Laboratório de Patogenicidade Bacteriana - LPB (Processo FAPESP: 21/12754-6).

Esse resultado sugere uma possível associação entre a nova adesina Eaa e AAF/II. No entanto, como o estudo mencionado acima avaliou apenas um isolado de EAEC albergando os genes responsáveis por codificar AAF/II o questionamento sobre se Eaa teria uma associação positiva para a formação de biofilme com essa fimbria ou com outra adesina produzida pelo isolado de EAEC 184-1 se fez pertinente. Frente ao questionamento exposto, pretendemos no presente estudo contribuir para o esclarecimento da dúvida apresentada através de diversas abordagens metodológicas e utilizando uma coleção de isolados de EAEC *aggA*⁺ que nos permitirão melhor compreender essa potencial associação entre Eaa e AAF/II.

OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo esclarecer a existência de uma possível associação sinérgica entre Eaa (*EPEC autotransporter adhesin*) e AAF/II em isolados de EAEC *aafA*⁺ na formação de biofilme.

METODOLOGIA

1. Isolados de EAEC que foram utilizados nessa pesquisa

No presente estudo foram inicialmente selecionados 30 isolados de EAEC obtidos de dois distintos estudos conduzidos no laboratório de Patogenicidade Bacteriana do Instituto de Biociências – UNESP - Botucatu (DIAS *et al.*, 2020; Gustavo B. Bueno - Dados não publicados - Processo FAPESP: 23/04219-9). Os isolados selecionados apresentam os marcadores genéticos *aatA*, *aggR* e *aafA*, responsáveis por codificar o poro na membrana externa do sistema de secreção do tipo I (SST1), o regulador transcricional AggR e a pilina da fímbria de aderência agregativa II (AAF/II), respectivamente.

2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As reações de PCR foram realizadas para verificar a presença dos marcadores genéticos especificados no Quadro 3. Para a extração do DNA, parte do crescimento bacteriano, obtido a partir do cultivo dos isolados em ágar MacConkey (*Becton Dickinson*, EUA) foi transferido para tubos estéreis de polipropileno de 1,5 mL contendo 200 µL de água MilliQ estéril, os quais foram submetidos a 10 minutos de fervura em banho maria. As reações de PCR foram realizadas utilizando 7,5 µL de GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, USA), de acordo com recomendações do fabricante. Em cada reação, foi utilizado 4,0 µL de H₂O livre de nucleases, 2 µL do DNA molde e 0,34 µM de cada *primer*.

Quadro 3. Genes e seus respectivos iniciadores que foram utilizados nas reações de PCR.

Gene	Proteína	Sequência dos <i>primers</i>	Temperatura de anelamento	Tamanho do fragmento	Referência
<i>aatA</i>	Poro do SST1	CTGGCGAAAGACTGTATCAT	55 °C	630 pb	Schmidt <i>et al.</i> , 1995
		CAATGTATAGAAATCCGCTGTT			
<i>aggR</i>	Regulador Transcricional AggR	CAGCGATACATTAAGACG	52 °C	326 pb	Laboratório de Patogenicidade Bacteriana – IBB
		CATCTGCAATAATAGCTAGAG			
<i>aafA</i> -LPB	Pilina da AAF/II	CAAGTGGAGCCGCTATTAATGC	56 °C	401 pb	Laboratório de Patogenicidade Bacteriana – IBB
		TCCTGGTCGTAGTGCCATAG			
<i>aafC</i>	Usher da AAF/II	AACGGATACGCCAAGTGTTTC	55 °C	496 pb	Boisen <i>et al.</i> , (2008)
		GCACCTGTGGTGAGAGGAAT			

3. Teste de Adesão

A identificação do padrão de aderência dos isolados de EAEC foi realizada seguindo o protocolo descrito originalmente por Cravioto *et al.*, (1979), com algumas alterações (Hernandes *et al.*, 2013). As células da linhagem HeLa (célula epitelial de câncer de colo de útero) foram mantidas em atmosfera com 5% de CO₂ a 37°C em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma, MO, EUA) contendo 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Sigma, MO, EUA) e de 1% de PenStrep (10.000 U penicilina + 10 mg estreptomicina/mL) (Sigma, MO, EUA).

Posterior à formação da monocamada de células na superfície do frasco, a cultura foi lavada com solução PBS (tampão fosfato-salino: 8 g de NaCl; 0,2 g de KCl; 1,44 g de Fosfato de sódio dibásico; 0,24 g de fosfato de potássio monobásico; 1000 mL de água destilada) e descolada por meio da adição de 1mL de tripsina (0,25% de EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid* – Nova Biotecnologia, Brasil). Em seguida, foi feita a agitação manual dos frascos, e a garrafa foi levada à estufa por aproximadamente 2 minutos. Depois do descolamento, foram adicionados 4mL de DMEM, suplementado com 10% SFB e 1% PenStrep, e o número de células eucarióticas determinado após contagem em câmara de Neubauer.

Em seguida, as células epiteliais foram diluídas em meio DMEM na concentração 1×10^5 células/mL e distribuídas em microplacas de 24 poços contendo lamínulas de vidro com volume de 1mL cada. Posteriormente, as células foram incubadas a 37°C, em atmosfera com 5% de CO₂, por aproximadamente 48 horas, até atingirem cerca de 70-90% de confluência. Após o período de incubação, o meio foi descartado e a placa foi lavada com solução PBS, seguindo a adição de 1mL de meio DMEM suplementado com 2% de D-manose e 2% de SFB. Em seguida, as células HeLa foram infectadas com cerca de $1,0 \times 10^7$ unidades formadoras de colônia (UFC), gerando assim uma taxa de infecção de 100 UFC para cada célula HeLa (*Multiplicity of infection*-MOI de 100:1). Os isolados bacterianos foram crescidos em caldo *Lysogenic Broth* (LB) a 37°C por um período de aproximadamente 18 horas. As placas de poliestireno, contendo as células epiteliais infectadas, foram incubadas a 37°C, em estufa com 5% de CO₂ por um período de 3 horas. Após o período de infecção, os poços foram lavados seis vezes com PBS e fixados com metanol por 18 horas. A seguir as preparações foram coradas com May-Grünwald (para coloração das células eucarióticas) e Giemsa (para coloração das células bacterianas). Por fim os corantes foram descartados e as lamínulas de vidro coladas em lâminas para exame em microscopia de luz.

4. Testes de biofilme

4.1. Para classificação inicial das amostras selecionadas

O teste de formação de biofilme foi feito seguindo o descrito por Oliveira-Garcia *et al.*, (2003), com algumas alterações. Os isolados foram cultivados em caldo LB a 37°C, por aproximadamente 18 horas. Em seguida, 10µL das culturas foram realocados para cada poço de uma microplaca de 96 poços contendo 200µL de DMEM com concentração elevada de glicose (Cultilab Materiais Cultura Células, Brasil) suplementado com D-manopiranosídeo. As preparações foram incubadas à 37°C por aproximadamente 24 horas. Após o período de incubação, as preparações foram lavadas com PBS para remoção das células bacterianas não aderidas e, posteriormente, fixadas com formaldeído 3% por 1 hora. Assim, as preparações foram novamente lavadas com água destilada, secadas e coradas por 10 minutos com cristal violeta 0,1%. As preparações foram novamente lavadas até que não tinham mais corante saindo dos poços. As placas foram secas e então foi feita a ressuspensão do corante em metanol por 10 minutos. A leitura foi realizada em leitor de Elisa a 570 nm (HERNANDES *et al.*, 2013). Para comparar o fenótipo, foram utilizados os controles de produção de biofilme 042 (controle positivo) e HB101 (controle negativo).

Os isolados de EAEC foram classificados quanto à capacidade de formar biofilme, de acordo com a metodologia aplicada por Yang *et al.* (2018), no qual o ponto de corte da densidade óptica (DOpc) foi determinado como 3 vezes o desvio padrão somado da média da densidade óptica (DO) do controle negativo HB101. De acordo com sua densidade óptica média, os isolados foram denominados: não produtor (\leq DOpc), fraco produtor ($>$ DOpc \leq 2 * DOpc), moderado produtor ($>$ 2 * DOpc \leq 4 DOpc), forte produtor ($>$ 4 * DOpc \leq 8 * DOpc), muito forte produtor ($>$ 8 * DOpc \leq 16 * DOpc) e extremamente forte produtor ($>$ 16 * DOpc).

4.2. Para a comparação dos isolados que albergam os vetores pIC e pBAD/Myc-His A.

Os ensaios de biofilme para a comparação entre os isolados transformantes foram feitos de acordo com o protocolo acima, com algumas alterações. Após o crescimento dos isolados em caldo LB a 37°C por 18h, foram realocados 10µL da cultura para cada poço de uma microplaca de 96 poços contendo 200µL de caldo LB suplementado com 0,2% de L-arabinose (Sigma-Aldrich, MO, EUA) e 100 µg/ml de ampicilina (Sigma-Aldrich, MO, EUA).

Para a análise estatística dos resultados, os dados obtidos foram compilados no software GraphPad Prism 8.0.1 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com). Em sequência, os valores foram submetidos a um *Student's T Test* não-

pareado com intervalo de confiança de 95% para avaliar a diferença de produção de biofilme por cada isolado contendo o vetor pBAD/*Myc*-His A, comparado com o mesmo contendo o plasmídeo pIC (pBAD-*Mic*/His-A albergando o gene *Eaa*).

5. Transformação dos isolados de EAEC por eletroporação.

Os plasmídeos pBAD/*Myc*-His A (Invitrogen, Vilnius, Lituânia) e pIC (pBAD-*Mic*/His-A albergando o gene *Eaa*) foram introduzidos pela técnica de eletroporação em 10 isolados de EAEC selecionados. Para o preparo das células competentes, os isolados de EAEC foram inoculados em caldo LB e incubados a 37°C, por aproximadamente 18 horas. O crescimento foi diluído 1/100 em 30 mL de caldo LB e incubado a 37°C, com agitação de 4 *xg*, até atingir a DO₆₀₀ de aproximadamente 0,8. Em seguida, as bactérias foram mantidas em banho de gelo por 30 minutos e centrifugadas a 2348 *xg* por 15 minutos, a 4°C. Após isso, o conteúdo precipitado foi lavado com 5 mL de água ultrapura autoclavada e gelada, e novamente centrifugada nas mesmas condições. O precipitado foi ressuspensão em 500 µL de glicerol estéril 10% e transferido para um microtubo de 1,5 mL, e essa suspensão centrifugada a 2348 *xg* por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi novamente descartado e o material precipitado ressuspensão em 60 µL de glicerol estéril à concentração 10% e a 4 °C.

Após isso, 60 µL da célula bacteriana competente e 50 ng de DNA plasmidial foram transferidos para uma cubeta de eletroporação de 0,2 cm previamente gelada. A preparação foi submetida ao procedimento de eletroporação a 2,5 quilovolts (kV) e 700 µL de solução de LB (complementada com glicose 2M e magnésio 2M) foram adicionados à cubeta. A partir disso, a preparação foi incubada com agitação de 6 *xg* a 37°C por uma hora. Considerando que o vetor pBAD/*Myc*-His A alberga o cassete de resistência à ampicilina, os transformantes foram selecionados em placas de ágar LB contendo ampicilina (100 µg/mL).

6. Deleção do operon *aafDA* em um isolado de EAEC selecionado

Os ensaios de mutagênese foram baseados na metodologia descrita por Datsenko & Wanner (2000) com adaptações, aplicando o sistema *Lambda Red*. Dessa forma, foi feita uma recombinação homóloga da região de interesse (operon *aafDA*) com um gene de resistência ao antimicrobiano zeocina. Para que ocorresse a mutagênese, foi realizada primeiramente a eletroporação no isolado selecionado com plasmídeo pKOBEG (CHAVEROUCHE *et al*, 2020),

o qual alberga os genes responsáveis por codificar proteínas do fago-*red*, cuja expressão foi induzida com a adição de 0,1% de L-arabinose (Sigma-Aldrich, MO, EUA).

Para a amplificação do gene de resistência a zeocina que foi inserido por recombinação homóloga, foram utilizados os *primers aafDA-zeo-F* e *aafDA-zeo-R* (Quadro 4) com a região 5' composta por 50 pb homólogas ao operon *aafDA*, e 22 pb homólogas ao gene de resistência antimicrobiana na região 3'. A reação de PRC foi feita nas condições a seguir: 95°C/5 min, 35 ciclos (95°C/30 s, 55°C/30 s, 72°C/45 s), e 72°C/7 min de extensão final. Em seguida, foi realizada uma eletroforese em gel 1% de agarose visando separar os amplicons, os quais foram então recortados do gel e extraídos com o QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Alemanha). A partir disso, o amplicon purificado foi inserido no isolado selecionado que alberga o plasmídeo pKOBEG, por meio da técnica de eletroporação conforme descrito anteriormente. Os transformantes foram selecionados em ágar LB contendo zeocina (60 µg/mL), e submetidos à reação de PCR com os iniciadores *aafA-LPB-F/aafA-LPB-R*, *ampli-zeo-F/ampli-zeo-R* e *aafDA-flank-F/aafDA-flank-R* para verificação do evento de deleção do gene de interesse, e inserção do gene *ble* no operon *aafDA*.

Quadro 4. Iniciadores utilizados durante o processo de mutagênese.

Gene	Sequência dos <i>primers</i>	Anelamento	Referência
<i>aafDA-zeo-F</i>	ATGAAAATACGGAGAATTCGACTAGTACTAATATTAG CTCTAGTTTTTTTGTGCATCGCTTGCATTAGAAAGG	55 °C	Este estudo
<i>aafDA-zeo-R</i>	TTAATTTGTCACAAGCTCAGCATTTAATACTACTT CATATATTCCTGGTCGAATGATGCAGAGATGTAAG		
<i>aafA-LPB-F</i>	CAAGTGGAGCCGCTATTAATGC	56°C	Este estudo
<i>aafA-LPB-R</i>	TCCTGGTCGTAGTGGCATAG		
Ampli-zeo-F	GTCATCGCTTGCATTAGAAAGG	55°C	Chaveroyche <i>et al</i> , 2000
Ampli-zeo-R	GAATGATGCAGAGATGTAAG		
<i>aafDA-flank-F</i>	AGGATGCTATCTCACCTGAT	51°C	Este estudo
<i>aafDA-flank-R</i>	TCCATCGAGTCGCTAAACAGT		

RESULTADOS

1. Seleção inicial dos isolados baseado na presença de marcadores genéticos, padrão de aderência agregativa e susceptibilidade à ampicilina

Os 30 isolados iniciais selecionados para o presente estudo foram submetidos a reações de PCR com os primers citados no quadro 3 para confirmar a presença de marcadores genéticos de EAEC e de genes associados às proteínas responsáveis pela biogênese de AAF/II. Contudo, cinco isolados não foram recuperados dos estoques originais. Dos 25 isolados restantes, constatou-se que todos apresentaram resultado positivo para os genes *aatA*, *aggR*, *aafA* e *aafC* (Tabela 1).

A respeito da identificação do padrão de aderência dos 25 isolados de EAEC, tem-se que, apesar de serem portadores dos genes associados à AAF/II e serem classificados como EAEC típica (*aggR*⁺), os isolados IAL 5710 e P170-6 não apresentaram o padrão de aderência agregativa (AA). O isolado IAL 5710 apresentou um padrão de aderência não característico (NC), e o isolado P170-6 foi classificado como não aderente (NA). Os demais isolados (23/25) apresentaram o padrão de aderência agregativa (AA) característico de EAEC (Tabela 1; Figura 2).

Os 25 isolados foram submetidos à testes para averiguar a susceptibilidade à ampicilina (100µg/ml). Dessa forma, 22 dos 25 isolados apresentaram susceptibilidade ao antimicrobiano, contudo, três isolados (IAL 5710, P170-6, IAL 9840) foram classificados como resistentes (tabela 1)

Tabela 1. Características genotípicas e fenotípicas dos 25 isolados de EAEC utilizados neste estudo.

Isolados de EAEC (n=25)	Marcadores moleculares				Padrão de aderência	Susceptibilidade à ampicilina (100 µg/ml)
	<i>aggR</i>	<i>aatA</i>	<i>aafA</i>	<i>aafC</i>		
IAL 5710	+	+	+	+	NC	Resistente
IAL5743	+	+	+	+	AA	Suscetível
IAL5801	+	+	+	+	AA	Suscetível
IAL5812	+	+	+	+	AA	Suscetível
IAL5813	+	+	+	+	AA	Suscetível
IAL5824	+	+	+	+	AA	Suscetível
IAL5829	+	+	+	+	AA	Suscetível
IAL5831	+	+	+	+	AA	Suscetível
IAL5834	+	+	+	+	AA	Suscetível
IAL5856	+	+	+	+	AA	Suscetível
IAL5877	+	+	+	+	AA	Suscetível
IAL5999	+	+	+	+	AA	Suscetível
P170-6	+	+	+	+	NA	Resistente
P184-1	+	+	+	+	AA	Suscetível
IAL 9840	+	+	+	+	AA	Resistente
IAL 9849	+	+	+	+	AA	Suscetível
IAL 9855	+	+	+	+	AA	Suscetível
IAL 9856	+	+	+	+	AA	Suscetível
IAL 9867	+	+	+	+	AA	Suscetível
IAL 9877	+	+	+	+	AA	Suscetível
IAL 9878	+	+	+	+	AA	Suscetível
IAL 9888	+	+	+	+	AA	Suscetível
IAL 9889	+	+	+	+	AA	Suscetível
IAL 9892	+	+	+	+	AA	Suscetível
IAL 9925	+	+	+	+	AA	Suscetível

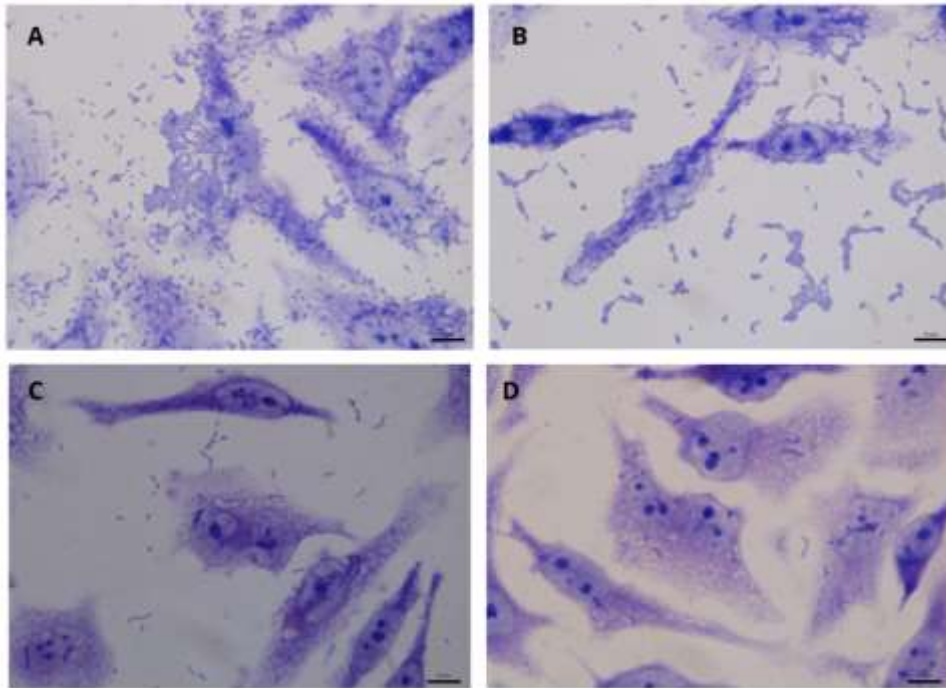


Figura 2. Teste de adesão de três horas de interação com células HeLa para classificação do padrão de aderência dos isolados. Um total de 23 dos 25 isolados de EAEC (92%) apresentaram o padrão de aderência agregativa (AA), representado nas imagens A e B. O isolado IAL 5710 exibiu o padrão de adesão não característico (NC), como pode ser visto na imagem C. Em D, tem-se o isolado p170-6, classificado como não aderente (NA).

2. Ensaio de formação de biofilme

Ensaio de formação de biofilme foram realizados para a classificação dos 22 isolados de EAEC *aafA*⁺, *aafC*⁺, *aggR*⁺, *AA*⁺ e *AmpS*. A partir da análise dos resultados obtidos, os isolados foram classificados como: forte produtores (77.3%; 17/22) e moderados produtores (22.7%; 5/22) (Figura 3).

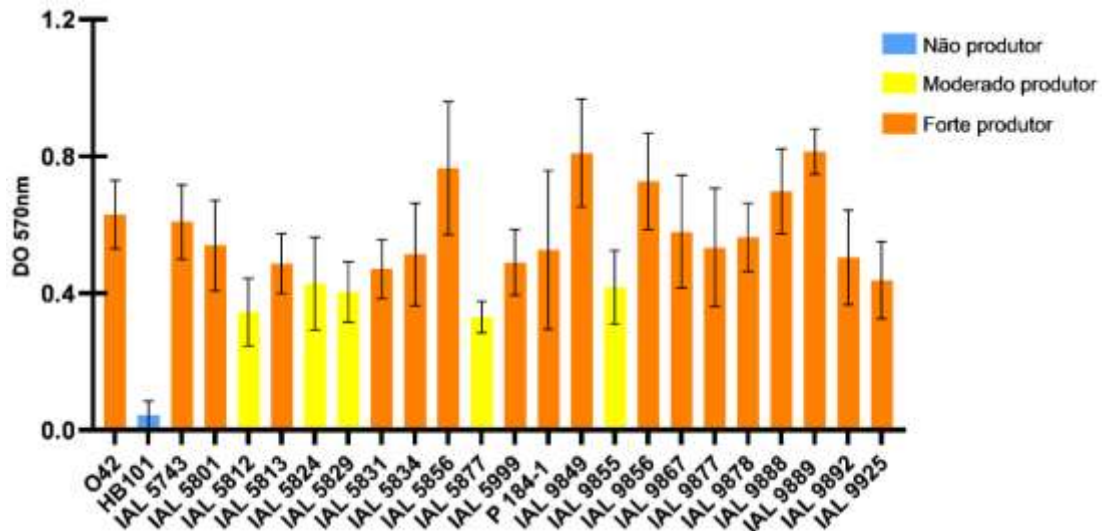


Figura 3. Produção de biofilme por 22 isolados de EAEC *aggR*⁺, *aafA*⁺, *AA*⁺ e *Amp*^S. Ensaio de formação de biofilme realizados em superfície de poliestireno revelaram que, entre os 22 isolados, 17 (77,3%) foram classificados como fortes produtores de biofilme e 5 (22,7%) como produtores moderados. Controles utilizados no experimento: 042 (positivo) e HB101 (negativo).

3. Transformação de 10 isolados de EAEC com o vetor pBAD/*Myc*-His A e o plasmídeo recombinante pIC

Dos 17 isolados classificados como forte produtores, foram escolhidos 10 isolados representativos para serem transformados com o plasmídeo recombinante pIC e o vetor vazio pBAD/*Myc*-His A. Após os ensaios de transformação, os transformantes carregando os diferentes plasmídeos foram testados por PCR para confirmar a presença do gene *eaa* (responsável por codificar a nova proteína autotransportadora) naqueles que carregam o plasmídeo pIC (Figura 4).

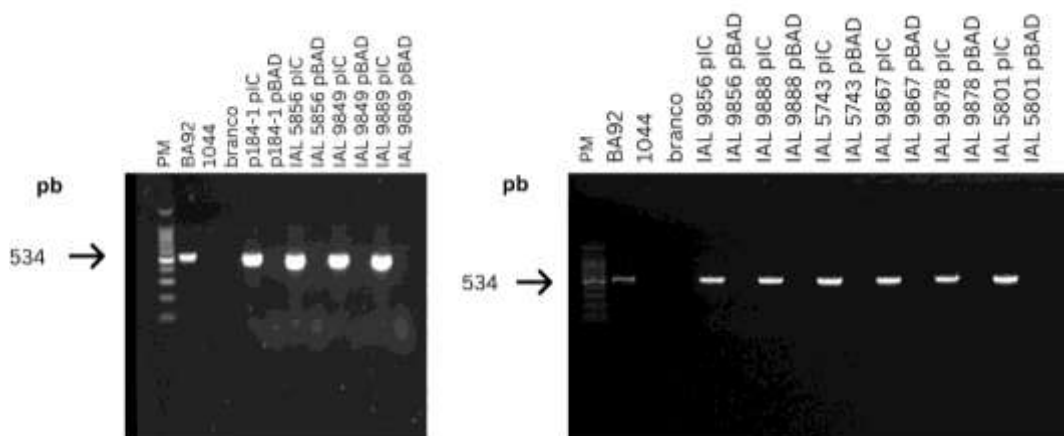


Figura 4: Confirmação da presença do gene *eaa* nos isolados que carregam o plasmídeo pIC. Eletroforese em gel de agarose para confirmação da presença do gene de interesse nos isolados transformados com o plasmídeo recombinante pIC, e a ausência do mesmo nos isolados transformados com o vetor vazio. Marcador de peso molecular (PM) de 100pb (Kasvi, Paraná, BR).

Após a confirmação do genótipo esperado, os transformantes foram submetidos a ensaios de formação de biofilme de 24h. Observou-se que, todos os isolados contendo o pIC apresentaram aumento na produção de biofilme quando comparados com o mesmo carregando o vetor vazio, sendo essa diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) nos isolados p184-1, IAL 9856 e IAL 9867 (30%; 3/10) (Figura 5).

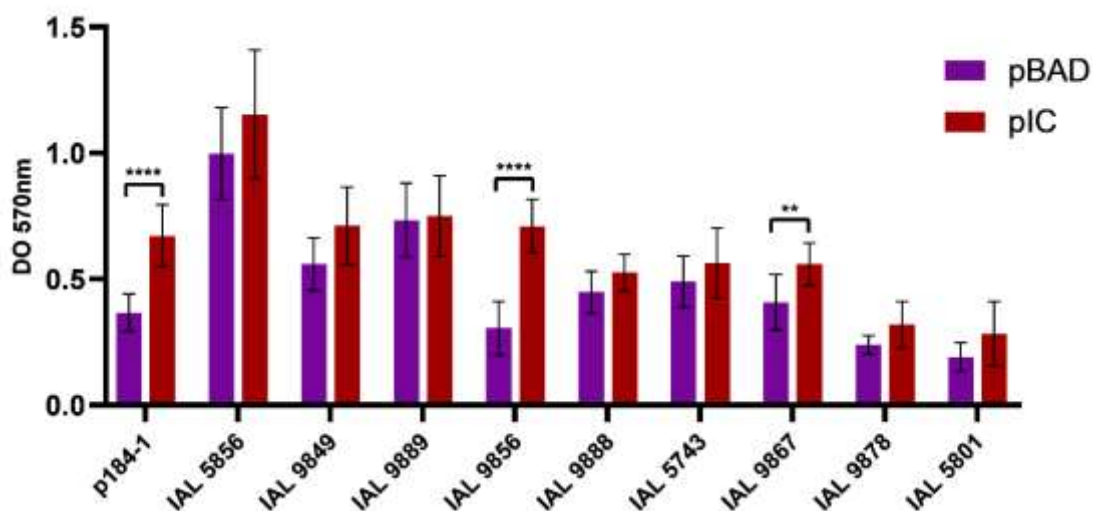


Figura 5: Influência da adesina Eaa na produção de biofilme por isolados *aafA*⁺ e forte produtores de biofilme. Comparação de dez isolados de EAEC portadores do plasmídeo pIC (pBAD/*Myc*-His A contendo o gene *eaa*) com os mesmos isolados portando apenas o plasmídeo pBAD mostrou que: todos os isolados com pIC apresentaram aumento na produção de biofilme, sendo essa diferença estatisticamente significativa em três deles ($P < 0,05$). ** $P < 0,01$, **** $P < 0,0001$

4. Eaa aumenta a produção de biofilme em um isolado de EAEC que carrega genes associados a biogênese de AAF/II

Baseado nos dados obtidos, o isolado IAL 9867, o qual apresentou um aumento significativo na produção de biofilme quando em associação com Eaa, foi submetido a ensaios de mutagênese para a deleção do operon *aafDA*. Para tal, foi aplicado o sistema Lambda-*red*, proporcionando a obtenção de um isolado IAL 9867 Δ *aafDA*, que carrega o cassete de resistência à zeocina (gene *ble*). Para a confirmação da deleção do operon *aafDA* e inserção do gene *ble*, foi realizado o sequenciamento *Sanger* do fragmento de DNA gerado com os *primers* desenhados em regiões que circundam o operon *aafDA* (*aafDA*-flank-F; *aafDA*-flank-R) (Figura 6).

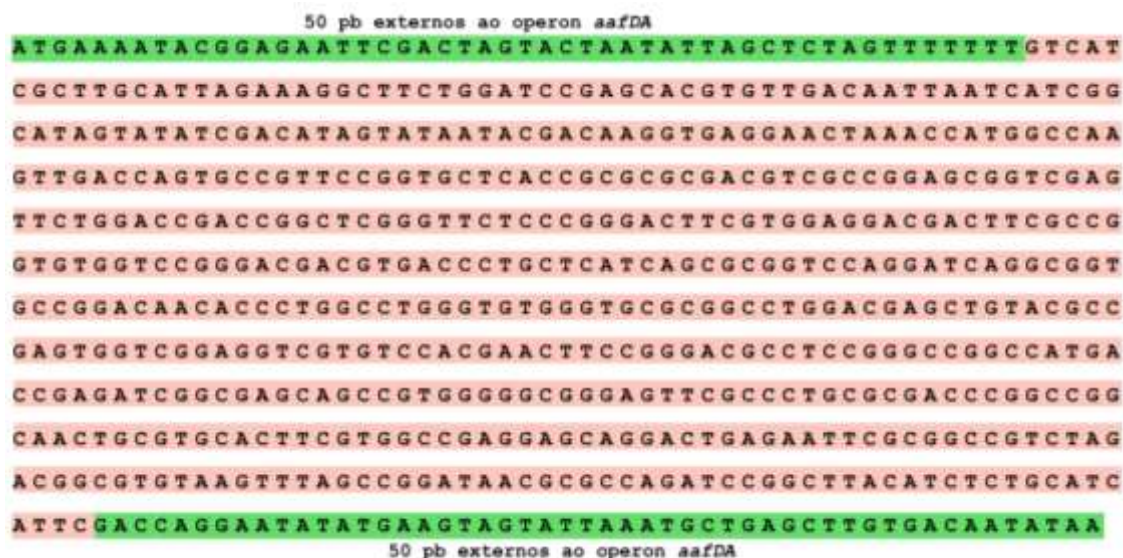


Figura 6. Sequenciamento do isolado IAL 9867 Δ *aafDA* na região do operon *aafDA*. O sequenciamento possibilitou evidenciar a troca alélica que inseriu o gene *ble* (rosa) na região onde estava presente o operon *aafDA* no isolado mutante IAL 9867 Δ *aafDA*. Os nucleotídeos em verde correspondem aos fragmentos de DNA conservados na mutagênese (50 pares de bases externos ao operon *aafDA*).

Para avaliar a existência de uma associação entre AAF/II e Eaa, o isolado mutante IAL 9867 Δ *aafDA*, foi transformado com os plasmídeos pIC e pBAD/*Myc*-His A por eletroporação. Dessa forma, foram obtidos os transformantes IAL 9867 Δ *aafDA* pIC e IAL 9867 Δ *aafDA* pBAD. As características moleculares e os perfis de resistência dos isolados de interesse foram averiguados. (Tabela 2 e Figura 7)

Tabela 2. Características genóticas e perfil de resistência dos isolados de EAEC.

Isolados de EAEC	Marcadores moleculares				Resistência	
	<i>aggR</i>	<i>aafA</i>	<i>ea</i>	<i>Ble</i>	Amp 100µg/ml	Zeo 60µg/ml
IAL 9867	+	+	-	-	S	S
IAL 9867 pBAD	+	+	-	-	R	S
IAL 9867 pIC	+	+	+	-	R	S
IAL 9867Δ <i>aafDA</i>	+	-	-	+	S	R
IAL 9867Δ <i>aafDA</i> pBAD	+	-	-	+	R	R
IAL 9867Δ <i>aafDA</i> pIC	+	-	+	+	R	R

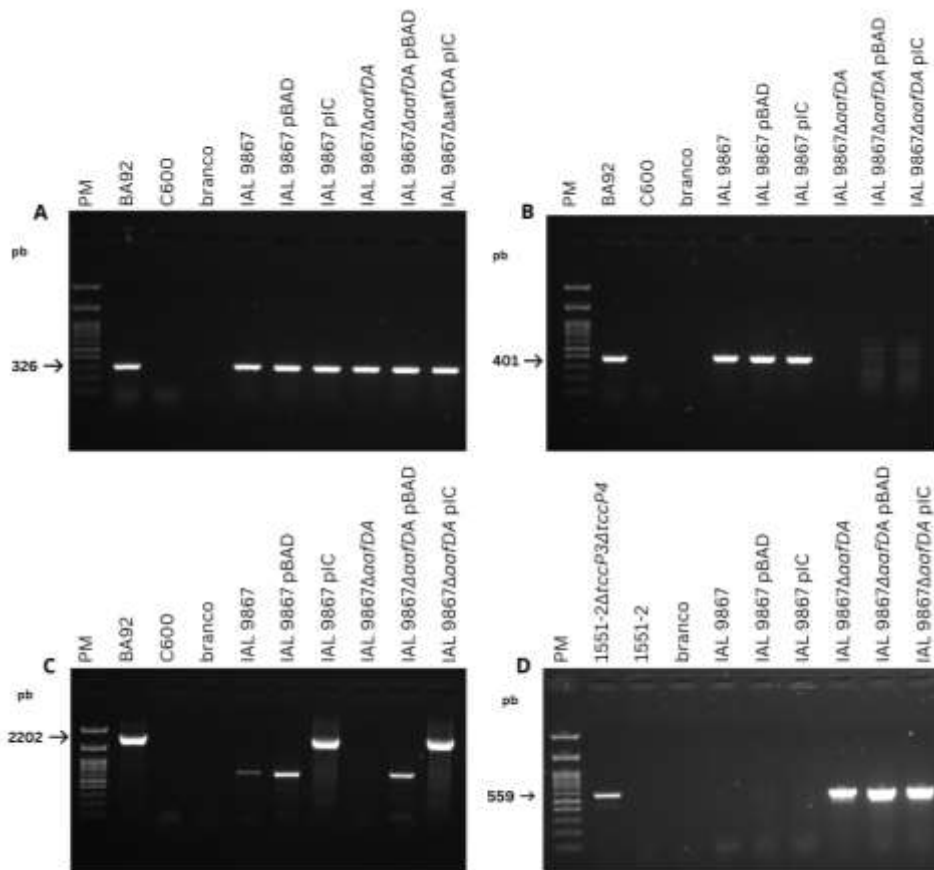


Figura 7. Confirmação das características genóticas do isolado IAL 9867 e suas variações. Eletroforese em gel de agarose para averiguar a presença dos genes (A) *aggR*, (B) *aafA*, (C) *ea*, (D) *ble*. Marcador de peso molecular (PM) de 100pb (KASVI, Paraná, BR)

Com intuito de avaliar a produção de biofilme pelos isolados que carecem de AAF/II na presença de Eaa, os isolados IAL 9867Δ*aafDA* pIC e IAL 9867Δ*aafDA* pBAD foram submetidos a testes de produção de biofilme de 24h em superfície de poliestireno. A análise

não mostrou diferença estatística na produção de biofilme pelo isolado deletado no operon *aafDA* na presença de Eaa, quando comparado com o mesmo carregando vetor vazio. Dessa forma, um aumento na produção de biofilme por Eaa em um isolado de EAEC, só foi observada quando na presença de genes associado à biogênese de AAF/II (Figura 8).

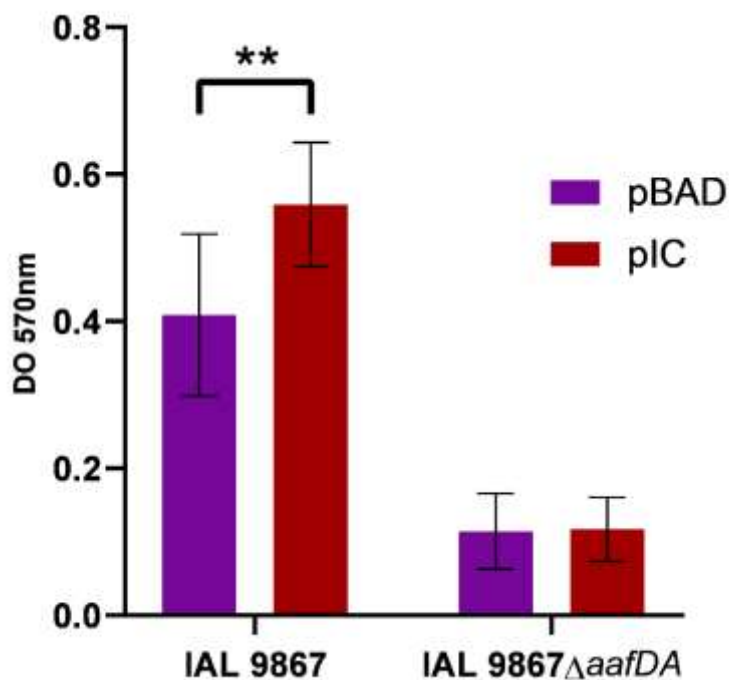


Figura 8. Eaa aumenta a produção de biofilme em um isolado de EAEC que carrega genes associados a biogênese de AAF/II. A comparação da produção de biofilme entre os isolados IAL 9867 carregando os diferentes plasmídeos demonstrou um aumento significativo na produção de biofilme na presença de Eaa ($P = 0,002$).

DISCUSSÃO

Escherichia coli é encontrada na microbiota humana como microrganismo comensal e tem papel importante na saúde intestinal. Contudo, essa espécie pode passar a ser patogênica, de forma que apresenta grande plasticidade genômica e pode adquirir genes de virulência a partir de elementos genéticos móveis, como ilhas de patogenicidade, plasmídeos e profagos. Dessa forma, a mobilização de atributos de virulência dentre as diferentes cepas de *E. coli* resulta em combinações variadas de fatores de virulência. As combinações mais vantajosas persistiram, e resultaram na formação de diferentes patótipos de *E. coli* (KAPER *et al.*, 2004).

Dentre os patótipos de *Escherichia coli*, importantes atributos de virulência são classificados como elementos genéticos móveis, como a região LEE (*Locus of Enterocyte*

Effacement), uma ilha de patogenicidade cromossomal responsável por codificar proteínas associadas a formação da lesão A/E (*attaching and effacing*) presente em isolados de EPEC e EHEC (MCDANIEL, T. K. *et al.*, 1995). Em isolados de STEC, o principal fator de virulência é a presença de genes responsáveis pela produção de toxinas Shiga (Stx), os quais são encontrados em profagos que integrados no DNA cromossomal dessas bactérias (O'BRIEN, AD *et al.*, 1984; RODRÍGUEZ-RUBIO, L. *et al.*, 2021). Adicionalmente, o plasmídeo de alto peso molecular pAA é um fator de virulência chave em EAEC, apresentando genes que codificam as adesinas fimbriais conhecidas como fimbrias de aderência agregativa (AAFs) responsáveis pelo estabelecimento do padrão AA, além do regulador transcricional *aggR* (CZECZULIN *et al.*, 1999).

Uma nova proteína autotransportadora identificada em um isolado de EPEC foi descrita pelo nosso grupo de pesquisa. Em um primeiro momento, essa proteína foi nomeada Ema (*EPEC matrix-binding autotransporter*), contudo seu nome foi alterado devido à existência de uma proteína descrita em um isolado de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* em 2004 (MINTZ, K. P. 2004) denominada EmaA (*extracellular matrix protein adhesin*). Dessa forma, a nova proteína autotransportadora foi renomeada Eaa (*EPEC autotransporter adhesin*). Durante sua caracterização genotípica, Eaa foi localizada em um profago cromossomal, possibilitando sua mobilidade entre diferentes isolados de *E. coli*. Além disso, Eaa apresentou grande importância para o estabelecimento de distintos fenótipos, dentre eles a produção de biofilme (ORSI, H. *et al.*, *in press*). A capacidade de Eaa aumentar a produção de biofilme está também associada ao fato desta pertencer a família de proteínas autotransportadoras AIDA-I, as quais estão envolvidas em distintos fenótipos, dentre eles a produção de biofilme (VO *et al.*, 2017).

Dados ainda não publicados do nosso laboratório realçam a capacidade de mobilidade dessa proteína entre diferentes patótipos de *E. coli*, de forma que Eaa já foi identificada em uma amostra de *E. coli* isolada de um caso de infecção do trato urinário, sendo então classificada como UPEC. Além disso, Eaa também foi identificada em um isolado de *E. coli* causadora de mastite bovina, acentuando a hipótese de como essa proteína pode participar da virulência de diversos isolados (dados não publicados).

Considerando a vasta plasticidade genômica de *E. coli* e que a adesão das células bacterianas a superfícies bióticas e abióticas durante a formação de biofilme é um processo multifatorial, um trabalho de Iniciação Científica realizado em nosso laboratório (processo: 21/12754-6) estudou o papel de Eaa na formação de biofilme em diferentes isolados de EAEC

albergando genes responsáveis por codificar as proteínas envolvidas na produção dos cinco tipos de AAF (AAF/I – AAF/IV). Dentre os resultados obtidos, foi observado que Eaa potencializou a formação de biofilme quando em associação ao isolado de EAEC P184-1, o qual alberga os genes associados à AAF/II.

Os ensaios de biofilme realizados no presente estudo com os dez isolados de EAEC *aafA*⁺ selecionados albergando os plasmídeos pIC e pBAD, corroboraram os dados prévios obtidos em nosso laboratório, de forma que, um aumento na produção de biofilme foi observado em todos os isolados que albergam AAF/II quando na presença de Eaa, sendo esse aumento significativo em três destes (p184-1, IAL 9867, IAL 9856). Um estudo realizado por Soria-Bustos e colaboradores (2022) descreveu a fimbria YDF (YehD Fimbriae) presente em isolados de EAEC, e avaliou sua contribuição na produção de biofilme em diferentes cepas de EAEC carreando as cinco fimbrias de aderência agregativa já identificadas (AAF/I-V). Dentre seus resultados, foi observado que o isolado produtor de AAF/I e mutante em *YehD* (gene que codifica proteínas associadas à biogênese de YDF), apresentou redução na produção de biofilme quando comparado com o isolado selvagem, indicando uma associação positiva entre essas duas estruturas na produção de biofilme.

Os testes de formação de biofilme com os isolados IAL 9867 Δ *aafDA* albergando os plasmídeos pIC e pBAD revelaram que Eaa aumentou a produção de biofilme neste isolado somente na presença de AAF/II, de forma que não houve diferença na produção de biofilme pelo isolado mutante em *aafDA* na presença de Eaa quando comparado ao mesmo carreando o plasmídeo vazio. Esse resultado indica uma possível associação sinérgica entre as proteínas Eaa e AAF/II na produção de biofilme. Devido a propriedade multifatorial do biofilme, outros estudos realizados mostram como estruturas distintas contribuem de forma sinérgica para a formação desse fenótipo. Um estudo realizado por Saldaña e colaboradores em 2009 mostrou que, em dois isolados de *E. coli* formadores da lesão A/E, a adesina fimbrial Curli e a celulose apresentaram um papel sinérgico na produção de biofilme (SALDAÑA *et al.*, 2009b)

A ação em conjunto de adesinas para o estabelecimento de fenótipos relacionados à adesão foi também descrita por Saldaña e colaboradores em outro trabalho publicado no mesmo ano (2009). Nesse estudo, foi observada a associação positiva entre as fimbrias BFP (*bundle-forming pilus*) e ECP (*E. coli* common pilus) na implementação do padrão de aderência localizada (AL) de EPEC quando em interação com células HeLa (SALDAÑA, *et al.* 2009a)

Além disso, a deleção do operon *aafDA*, responsável por codificar proteínas associadas à biogênese de AAF/II, reduziu drasticamente a capacidade de produção de biofilme por parte do isolado mutante. A forte associação de AAF/II com a formação eficiente de biofilme pelos isolados de EAEC *aafA*⁺, foi descrita previamente por Sheikh e colaboradores em 2008. Neste estudo, a deleção do gene *aafA* de um isolado de EAEC mostrou que, o isolado mutante não foi capaz de produzir biofilme em ensaios de interação com superfícies abióticas estendidos por um período de até 72h (SHEIKH *et al*, 2008).

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo nos levam a concluir que uma adesina autotransportadora de EPEC (Eaa) pode contribuir para a produção de biofilme em isolados de *Escherichia coli* enteroagregativa que albergam os genes associados à biogênese de AAF/II, potencializando este importante atributo de virulência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, A. G. *et al.* The Serine Protease Pic From Enteroaggregative *Escherichia coli* Mediates Immune Evasion by the Direct Cleavage of Complement Proteins. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 212, n. 1, p.106-115, 2015.

ANDERL, J. N.; FRANKLIN, M. J. ; STEWART, P. S. Role of Antibiotic Penetration Limitation in *Klebsiella pneumoniae* Biofilm Resistance to Ampicillin and Ciprofloxacin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 7, p. 1818–1824, 2000.

BERNIER, C.; GOUNON, P.; LE BOUGUENEC, C. Identification of an Aggregative Adhesion Fimbria (AAF) Type III-Encoding Operon in Enteroaggregative *Escherichia coli* as a Sensitive Probe for Detecting the AAF-Encoding Operon Family. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 8, p. 4302–4311, 1 ago. 2002.

BHATT, S. *et al.* The evasive enemy: Insights into the virulence and epidemiology of the emerging attaching and effacing pathogen *Escherichia albertii*. **Infection and immunity**, v. 87, n. 1, 2019.

BOISEN, N. *et al.* New Adhesin of Enteroaggregative *Escherichia coli* Related to the Afa/Dr/AAF Family. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 7, p. 3281–3292, jul. 2008.

CHAVEROUCHE, M K *et al.* A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. **Nucleic acids research**, vol. 28, Nov. 2000.

CROXEN, M. A. *et al.* Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 822–880, 1 out. 2013.

CZECZULIN, J. R. *et al.* Phylogenetic Analysis of Enteroaggregative and Diffusely Adherent *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 6, p. 2692–2699, jun. 1999.

DATSENKO, K. A.; WANNER, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 12, p. 6640–6645, 2000.

DIAS, R. C. B. *et al.* Analysis of the Virulence Profile and Phenotypic Features of Typical and Atypical Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) Isolated From Diarrheal Patients in Brazil. **Frontiers in cellular and infection microbiology** v. 10 144. 22 Apr. 2020.

DROBNAK, I. *et al.* Of linkers and autochaperones: an unambiguous nomenclature to identify common and uncommon themes for autotransporter secretion. **Molecular microbiology**, v. 95, n. 1, p. 1-16, 2015.

DUDLEY, E. G. *et al.* Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a pheU pathogenicity island in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 61, n. 5, p. 1267–1282, 1 set. 2006.

ELIAS, W. P. *et al.* Organization of Biogenesis Genes for Aggregative Adherence Fimbria II Defines a Virulence Gene Cluster in Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 6, p. 1779–1785, 15 mar. 1999.

ESTRADA-GARCIA, T.; NAVARRO-GARCIA, F. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathotype: a genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 281–298, 1 dez. 2012.

ESLAVA, C. *et al.* Pet, an Autotransporter Enterotoxin from Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 7, p. 3155–3163, 1 jul. 1998.

FREIRE, C. A. *et al.* Adhesin related genes as potential markers for the enteroaggregative *Escherichia coli* category. **Frontiers in cellular and infection microbiology** vol. 12997208. 8 Nov. 2022.

HEBBELSTRUP JENSEN, B. *et al.* Epidemiology and Clinical Manifestations of Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 3, p. 614–630, 2014.

HERNANDES, R. T. *et al.* Comparative genomic analysis provides insight into the phylogeny and virulence of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains from Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 6, p. e0008373, 2020.

HERNANDES, R. T. *et al.* Dissection of the role of pili and type 2 and 3 secretion systems in adherence and biofilm formation of an atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strain. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 10, p. 3793–3802, 2013

HENDERSON, I. R.; NAVARRO-GARCIA, F.; NATARO, J. P.; The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. **Trends in microbiology**, v. 6, n. 9, p. 370-378, 1998.

HENDERSON, I. R. *et al.* Involvement of the Enteroaggregative *Escherichia coli* Plasmid-Encoded Toxin in Causing Human Intestinal Damage. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 10, p. 5338–5344, 1 out. 1999.

JØNSSON, R. *et al.* Novel Aggregative Adherence Fimbria Variant of Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 4, p. 1396–1405, abr. 2015.

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

KLEMM, P.; HANCOCK, V.; SCHEMBRI, M. A. Fimbrial adhesins from extraintestinal *Escherichia coli*. **Environmental Microbiology Reports**, v. 2, n. 5, p. 628–640, 23 abr. 2010.

KOTLOFF, K. L. *et al.* The incidence, aetiology, and adverse clinical consequences of less severe diarrhoeal episodes among infants and children residing in low-income and middle-income countries: a 12-month case-control study as a follow-on to the Global Enteric Multicenter Study (GEMS). **The Lancet Global Health**, v. 7, n. 5, p. e568-e584, 2019.

LANATA C.F.; *et al.* Child Health Epidemiology Reference Group of the World Health Organization and UNICEF. Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: a systematic review. **PLoS One**. 2013 Sep 4;8(9):e72788.

LANG, C. *et al.* Novel type of pilus associated with a Shiga-toxigenic *E. coli* hybrid pathovar conveys aggregative adherence and bacterial virulence. **Emerging Microbes and Infections**, v. 7, n. 1, p.1-16, 2018.

LEYTON, D. L.; ROSSITER, A. E.; HENDERSON, I. R. From self sufficiency to dependence: mechanisms and factors important for autotransporter biogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 213-225, 2012.

MCDANIEL, T K *et al.* A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** vol. 92, 28 Feb. 1995.

MEUSKENS, I. *et al.* Type V Secretion Systems: An Overview of Passenger Domain Functions. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 31 maio 2019.

MITTAL, Seema; SHARMA, Madhu ; CHAUDHARY, Uma. Biofilm and multidrug resistance in uropathogenic *Escherichia coli*. **Pathogens and Global Health**, v. 109, n. 1, p. 26–29, 2015.

MINTZ, K. P. Identification of an extracellular matrix protein adhesin, EmaA, which mediates the adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to collagen. **Microbiology (Reading)**, v. 150 p. 2677-2688. Ago. 2004.

NATARO, J. P. *et al.* Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 6, n. 9, p. 829–831, set. 1987.

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

NATARO, J. P. *et al.* T84 cells in culture as a model for enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. **Infection and immunity**, v. 64, n. 11, p. 4761–4768, 1996.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 1, p.142-201, 1998. Erratum in: *Clinical Microbiology Reviews*. 11(2):403.

NAVARRO-GARCIA, F, *et al.* Cytoskeletal effects induced by pet, the serine protease enterotoxin of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect Immun** 1999; 67:2184-92

NAVARRO-GARCIA, F ; ELIAS, W. P. Autotransporters and virulence of enteroaggregative *E. coli*, **Gut Microbes**, v. 2, n. 1, p. 13

NISHI, Junichiro *et al.* The Export of Coat Protein from Enteroaggregative *Escherichia coli* by a Specific ATP-binding Cassette Transporter System. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 46, p. 45680–45689, 2003

O'BRIEN, A D *et al.* Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. **Science**. vol. 226,4675. Nov. 1984.

OLIVEIRA-GARCIA, D *et al.* Fimbriae and adherence of *Stenotrophomonas maltophilia* to epithelial cells and to abiotic surfaces. **Cellular microbiology** vol. 5, Sep. 2003.

ORSI, H *et al.* EPEC Autotransporter Adhesin (Eaa): A novel adhesin identified in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Frontiers in cellular and infection microbiology**. *In press*

PRATT, L. A.; KOLTER, R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. **Molecular Microbiology**, v. 30, n. 2, p. 285–293, 2002.

RODRÍGUEZ-RUBIO, L. Bacteriophages of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and Their Contribution to Pathogenicity. **Pathogens**. V. 10, 4 404. Mar. 2021.

RUAN, X. *et al.* *Escherichia coli* Expressing EAST1 Toxin Did Not Cause an Increase of cAMP or cGMP Levels in Cells, and No Diarrhea in 5-Day Old Gnotobiotic Pigs. **Plos One**, v. 7, n. 8, 2012.

RUSSO, THOMAS A.; JOHNSON, JAMES R. Proposal for a New Inclusive Designation for Extraintestinal Pathogenic Isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 5, p. 1753–1754, maio 2000.

SALDAÑA, Z. et al. The *Escherichia coli* common pilus and the bundle-forming pilus act in concert during the formation of localized adherence by enteropathogenic *E. coli*. **Journal of bacteriology** vol. 191, 11 Feb. 2009a

SALDAÑA, Z. et al. Synergistic role of curli and cellulose in cell adherence and biofilm formation of attaching and effacing *Escherichia coli* and identification of Fis as a negative regulator of curli. **Environmental microbiology**, vol. 11, 4. Nov. 2009b

SAVARINO, S. J. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an in vitro rabbit intestinal model. **Journal of Clinical Investigation**, v. 87, n. 4, p. 1450–1455, 1 abr. 1991.

SAVARINO, S. J. et al. Identification and characterization of a gene cluster mediating enteroaggregative *Escherichia coli* aggregative adherence fimbria I biogenesis. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 16, p. 4949–4957, ago. 1994.

SHEIKH, J.; et al. Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 983–997, 2008.

SHEIKH, J. et al. A novel dispersin protein in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Investigation**, v. 110, n. 9, p. 1329–1337, 2002.

SCHILLER, P. et al. The Superior Adherence Phenotype of *E. coli* O104:H4 is Directly Mediated by the Aggregative Adherence Fimbriae Type I. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 346–359, 15 jan. 2021.

SCHMIDT, H. et al. Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Journal of clinical Microbiology** v. 33 n. 3. Mar. 1995.

SCHÜROFF P.A. et al. Role of aggregate forming pilus (AFP) in adherence and colonization of both intestinal and urinary tracts. **Virulence**. 2022 Dec;13(1):1423-1433.

SCHÜROFF P.A. et al. The aggregate-forming pili (AFP) mediates the aggregative adherence of a hybrid-pathogenic *Escherichia coli* (UPEC/EAEC) isolated from a urinary tract infection. **Virulence**. 2021 Dec;12(1):3073-3093.

SORIA-BUSTOS, J. et al. Role of the YehD fimbriae in the virulence-associated properties of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Environmental microbiology** vol. 24, 3. 2022

STZIPORI et al. Studies with enteroaggregative *Escherichia coli* in the gnotobiotic piglet gastroenteritis model. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 12, p. 5302–5306, 1992.

VELARDE, J. J. *et al.* Solution structure of the novel dispersin protein of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 66, n. 5, p.1123-1135, 2007.

VIEIRA, M. A. *et al.* Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* as aetiologic agents of sporadic and outbreak-associated diarrhoea in Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 65, n. 9, p. 998-1006, 2016.

VO, J. L. *et al.* Autotransporter adhesins in *Escherichia coli* pathogenesis. **Proteomics**, v. 17, n. 23-24, p. 1600431, 2017.

WHO, World Health Organization. Diarrhoeal disease. 2017. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>. Acessado em 10 dez. 2023.

WHO, World Health Organization. Diarrhoea. 2021. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/diarrhoea#tab=tab_1. Acessado em 16 jan. 2024.

YANG, X. *et al.* Biofilm formation and susceptibility to biocides of recurring and transient *Escherichia coli* isolated from meat fabrication equipment. **Food Control**, v. 90, p. 205–211, ago. 2018

ZUROFF, T. R. *et al.* Robustness analysis of culturing perturbations on *Escherichia coli* colony biofilm beta-lactam and aminoglycoside antibiotic tolerance. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 185, 2010.