

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

AVALIAÇÃO DE ESTRUTURAS BACTERIANAS ENVOLVIDAS  
NO ESTABELECIMENTO DO PADRÃO DE ADERÊNCIA HÍBRIDO  
LOCALIZADO/DIFUSO EM AMOSTRAS DE *ESCHERICHIA COLI*  
ENTEROPATOGÊNICA ATÍPICA PERTENCENTES AO SOROTIPO  
O2:H16

**CANDIDATA: MELISSA ARRUDA VIEIRA**

**ORIENTADOR: PROF. DR. RODRIGO TAVANELLI HERNANDES**

**CO-ORIENTADORA: PROFA. DRA. TÂNIA APARECIDA TARDELLI GOMES DO  
AMARAL**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutora no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia de Parasitas e Microrganismos*

*Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Tavanelli Hernandez*

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Vieira, Melissa Arruda.

Avaliação de estruturas bacterianas envolvidas no estabelecimento do padrão de aderência híbrido localizado/difuso em amostras de *Escherichia coli* enteropatogênica atípica pertencentes ao sorotipo O2:H16 / Melissa Arruda Vieira. - Botucatu, 2020

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu  
Orientador: Rodrigo Tavanelli Hernandez  
Coorientador: Tânia Aparecida Tardelli Gomes do Amaral  
Capes: 21201021

1. *Escherichia coli* enteropatogênica. 2. Patogenicidade. 3. Diarreia. 4. Adesinas de *Escherichia coli*.

Palavras-chave: Adesinas; Diarreia; *Escherichia coli* enteropatogênica atípica; Intimina; Patogenicidade bacteriana.

## **DEDICATÓRIA**

*Aos meus amados pais, Neusa e José, grandes exemplos força e  
superação, por todo amor e carinho, paciência e apoio  
incondicionais.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela força e ânimo para superação dos desafios diários.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo Tavanelli Hernandez, por ter aberto as portas de seu laboratório, no qual tive a oportunidade de construir toda minha carreira acadêmica até o momento.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Tânia Aparecida Tardelli Gomes do Amaral, por todo conhecimento transmitido, sempre com tanta gentileza e respeito.

À Dra. Mônica Aparecida Midolli Vieira pela orientação para realização dos ensaios de conjugação bacteriana.

À Dra. Fernanda Fernandes dos Santos pelo auxílio na realização das análises de polimorfismos.

Ao Prof. Dr. Waldir Pereira Elias Junior e toda sua equipe, por terem aberto as portas de seu laboratório para que eu pudesse realizar os experimentos de clonagem e sequenciamento.

Ao doutorando Paulo Alfonso Schuroff, por todo apoio na realização dos experimentos de clonagem e sequenciamento.

Ao pesquisador científico Dr. Luis Fernando dos Santos, pela cessão das amostras estudadas.

Aos meus companheiros de laboratório e departamento Regiane Dias, Rodrigo Tanabe, Stéfani Dantas, Henrique Orsi, Aline Missio e Juliana Toledo não somente pela troca de conhecimento científico, mas por todos bons momentos compartilhados.

À toda equipe do Departamento de Microbiologia e Imunologia, pela convivência de todos esses anos e aprendizado que vai além da vida acadêmica.

Aos meus pais, que sempre estiveram presentes, me apoiando e incentivando nos bons e maus momentos.

Ao meu namorado Murilo Stanzione, por todo amor, carinho, cuidado e paciência.

Ao meu grande amigo Rodolfo Samadello, por todos os anos de amizade e apoio.

À Capes pela concessão da minha bolsa de estudo.

Muito obrigada por fazerem parte desse momento tão importante da minha vida!

*“Temos de nos tornar a mudança que queremos ver.”*  
(Mahatma Gandhi)

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                                               | Pág. |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                                                                                                                           | 14   |
| 2. OBJETIVO GERAL .....                                                                                                                                                       | 21   |
| 2.1. Objetivos específicos .....                                                                                                                                              | 21   |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS .....                                                                                                                                                  | 22   |
| 3.1. Amostras bacterianas .....                                                                                                                                               | 22   |
| 3.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR) .....                                                                                                                               | 23   |
| 3.3. Cultivo celular.....                                                                                                                                                     | 23   |
| 3.4. Teste de adesão com células epiteliais (HeLa). .....                                                                                                                     | 24   |
| 3.5. Teste quantitativo de adesão .....                                                                                                                                       | 25   |
| 3.6. Teste de invasão em células Caco-2 .....                                                                                                                                 | 25   |
| 3.7. Teste de identificação da polimerização da actina.....                                                                                                                   | 26   |
| 3.8. Detecção de genes responsáveis por codificar adesinas .....                                                                                                              | 26   |
| 3.9. Perfil plasmidial .....                                                                                                                                                  | 27   |
| 3.10. Conjugação bacteriana .....                                                                                                                                             | 27   |
| 3.11. Teste de aglutinação com <i>Saccharomyces boulardii</i> .....                                                                                                           | 28   |
| 3.12. Preparo de células eletrocompetentes e eletroporação.....                                                                                                               | 29   |
| 3.13. Obtenção de uma biblioteca de mutantes deficientes na adesão às<br>células epiteliais (HeLa) e identificação de potenciais adesinas<br>associadas a esse fenótipo ..... | 30   |
| 3.14. Construção e complementação de mutantes não polares nos genes <i>escN</i> e <i>eae</i> .....                                                                            | 32   |
| 3.15. Determinação da curva de crescimento bacteriano.....                                                                                                                    | 34   |
| 3.16. Análise de polimorfismos nas sequências de EspA, EspB e EspD.....                                                                                                       | 34   |
| 3.17. Análise estatística.....                                                                                                                                                | 34   |

|                                                                                                                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4. RESULTADOS .....                                                                                                                                                | 35 |
| 4.1. Amostras pertencentes ao sorotipo O2:H16 exibiram distintos padrões de aderência.....                                                                         | 35 |
| 4.2. Amostras de aEPEC aderem eficientemente a diferentes linhagens celulares, independentemente do padrão de aderência .....                                      | 36 |
| 4.3. Parte das amostras de aEPEC demonstraram potencial de invadir células intestinais polarizadas e diferenciadas <i>in vitro</i> .....                           | 37 |
| 4.4. Todas as amostras testadas apresentam potencial de induzir acúmulo de filamentos de actina no sítio de aderência bacteriano .....                             | 38 |
| 4.5. Amostras de aEPEC estudadas albergam genes responsáveis por codificar estruturas adesivas .....                                                               | 40 |
| 4.6. Amostras de aEPEC do sorotipo O2:H16 produzem fímbria do tipo I.....                                                                                          | 42 |
| 4.7. Fímbria do tipo I altera padrão híbrido AL/AD da amostra 282/14 do sorotipo O2:H16 .....                                                                      | 43 |
| 4.8. A análise do perfil plasmidial revelou a presença de pelo menos dois plasmídeos de alto peso molecular nas amostras estudadas.....                            | 44 |
| 4.9. Identificação de mutantes aleatórios deficientes na interação com células HeLa.....                                                                           | 45 |
| 4.10. Avaliação comparativa dos mutantes nos genes <i>eae</i> e <i>escN</i> , e seus respectivos complementados, com a amostra selvagem 282/14 .....               | 48 |
| 4.11. A interação Intimina-Tir é importante para o estabelecimento do fenótipo AL/AD na amostra de aEPEC 282/14, pertencente ao sorotipo O2:H16.....               | 51 |
| 4.12. As mutações nos genes <i>eae</i> e <i>escN</i> interferem na capacidade das amostras em recrutar filamentos de actina no sítio de aderência bacteriano ..... | 54 |
| 4.13. Alinhamento múltiplo indica variabilidade entre as sequências de EspA, EspB e EspD das amostras estudadas e da amostra protótipo de tEPEC .....              | 56 |
| 4.14. Amostras de aEPEC estudadas apresentam polimorfismos específicos em um domínio funcional de EspD.....                                                        | 59 |

|    |                  |    |
|----|------------------|----|
| 5. | DISCUSSÃO .....  | 61 |
| 6. | CONCLUSÕES ..... | 67 |
| 7. | REFERÊNCIAS..... | 68 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                  | Pág. |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura e transmissão mostrando o pedestal característico da lesão AE após interação com células epiteliais cultivadas <i>in vitro</i> .....                                                                               | 16   |
| Figura 2. Representação esquemática do Sistema de Secreção do Tipo 3 de patógenos capazes de induzir a lesão AE .....                                                                                                                                            | 17   |
| Figura 3. Representação esquemática das etapas de obtenção de mutantes deficientes na adesão às células epiteliais e identificação de potenciais novos genes que codificam estruturas bacterianas associadas ao fenótipo de adesão em uma amostra de aEPEC ..... | 31   |
| Figura 4. Microscopia óptica exibindo os padrões de aderência das amostras pertencentes ao sorotipo O2:H16, em células HeLa cultivadas <i>in vitro</i> .....                                                                                                     | 36   |
| Figura 5. Dados quantitativos de aderência em células HeLa, demonstrando semelhança no potencial de interação com células HeLa nas amostras estudadas .....                                                                                                      | 37   |
| Figura 6. Dados quantitativos dos testes de invasão realizados em células Caco-2 polarizadas e diferenciadas .....                                                                                                                                               | 38   |
| Figura 7. Microscopia de fluorescência exibindo os resultados obtidos no teste de FAS .....                                                                                                                                                                      | 39   |
| Figura 8. Teste de aglutinação com <i>Saccharomyces boulardii</i> .....                                                                                                                                                                                          | 42   |
| Figura 9. Padrões de aderência produzidos pela amostra 282/14 na presença e ausência de D-manopiranosídeo .....                                                                                                                                                  | 43   |
| Figura 10. Gel de agarose resultante do experimento de perfil plasmidial, evidenciando a presença de pelo menos duas bandas plasmidiais de alto peso molecular em cada amostra .....                                                                             | 44   |

|                                                                                                                                                                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 11. Padrões de aderência da amostra selvagem 282/14 e seus respectivos mutantes M1, M232, M236, M246, M259, M265, M276, M277 e M289. ....                                                                                              | 46 |
| Figura 12. Curva de crescimento dos mutantes Tn5 gerados a partir de mutagênese aleatória e da amostra selvagem, 282/14.....                                                                                                                  | 47 |
| Figura 13. Géis de agarose exibindo a ausência do gene <i>eae</i> nos mutantes construídos e posterior amplificação para as amostras complementadas .....                                                                                     | 49 |
| Figura 14. Géis de agarose demonstrando a ausência das bandas referentes à amplificação do gene <i>escN</i> e sua presença nas amostras complementadas.....                                                                                   | 50 |
| Figura 15. Curva de crescimento dos mutantes gerados a partir do sistema Lambda Red com a amostra 282/14.....                                                                                                                                 | 51 |
| Figura 16. Padrão de aderência da amostra selvagem de aEPEC 282/14, do mutante isogênico no gene <i>eae</i> e da amostra complementada, bem como dados de experimentos quantitativos da interação dessas três amostras com células HeLa ..... | 52 |
| Figura 17. Padrões de aderência da amostra selvagem de aEPEC 282/14, do mutante isogênico no gene <i>escN</i> e da amostra complementada com pEscN, bem como dados de experimentos quantitativos dessas três amostras .....                   | 53 |
| Figura 18. Microscopia de fluorescência para detecção do acúmulo de F-actina, no local de aderência bacteriana .....                                                                                                                          | 55 |
| Figura 19. Alinhamento múltiplo entre as sequências de EspA das amostras de aEPEC e da amostra protótipo de tEPEC E2348/69 .....                                                                                                              | 56 |
| Figura 20. Alinhamento múltiplo entre as sequências de EspB das amostras de aEPEC e amostra protótipo de tEPEC E2348/69.....                                                                                                                  | 57 |

|                                                                                                                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 21. Alinhamento múltiplo entre as sequências de EspD das amostras de aEPEC e da amostra protótipo de tEPEC E2348/69 .....                                   | 58 |
| Figura 22. Alinhamento múltiplo entre as sequências do domínio <i>coiled coil</i> (2) de EspD das amostras de aEPEC e da amostra protótipo de tEPEC E2348/69 ..... | 59 |

## LISTA DE TABELAS

Pág.

|                                                                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. aEPEC pertencentes ao sorotipo O2:H16, isoladas de surtos e casos esporádicos de diarreia no Brasil.....                                              | 23 |
| Tabela 2. Plasmídeos e amostras utilizados nos experimentos de mutagênese e complementação .....                                                                | 33 |
| Tabela 3. Sequência dos iniciadores empregados para a mutagênese e confirmação dos eventos de deleção e complementação dos genes <i>eae</i> e <i>escN</i> ..... | 33 |
| Tabela 4. Padrões de aderência e potencial de induzir acúmulo de actina as amostras pertencentes aos sorotipos O2:H16 .....                                     | 40 |
| Tabela 5. Genes responsáveis por codificar estruturas bacterianas adesivas nas amostras de aEPEC do sorotipo O2:H16 .....                                       | 41 |
| Tabela 6. Sítios de inserção do transposon no genoma bacteriano da amostra 282/14.....                                                                          | 48 |

## Resumo

O principal mecanismo de virulência de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) é a capacidade de causar uma lesão histopatológica na mucosa intestinal denominada *attaching and effacing* (AE), caracterizada pela aderência íntima das bactérias, destruição das microvilosidades e formação de estruturas semelhantes a pedestais, ricos em F-actina, nos enterócitos infectados. Genes do *locus of enterocyte effacement* (região LEE) codificam todas as proteínas necessárias para a formação da lesão AE. As EPEC são divididas em típicas (tEPEC) e atípicas (aEPEC), com base na presença do EPEC *adherence factor plasmid* no primeiro grupo. A partir de um conjunto de sete amostras de aEPEC pertencentes ao sorotipo O2:H16, obtidos de surtos e casos esporádicos de diarreia, mostramos que cinco deles produziram uma adesão híbrida localizada/difusa (AL/AD) em células HeLa. Neste estudo, uma amostra de aEPEC deste sorotipo (282/14), que produziu o padrão AL/AD, foi selecionada para investigar as estruturas bacterianas envolvidas em seu fenótipo adesivo. Para este propósito, a amostra de aEPEC 282/14 foi mutagenizada usando o kit EZ::TN <R6K<sub>ori</sub>/KAN-2> Tnp transposome kit, gerando uma biblioteca de inserções Tn5. Esses mutantes de inserção Tn5 foram testados quanto a perda ou redução da capacidade aderente, em ensaios realizados em 6 h de incubação com células HeLa. Dentre 320 clones pesquisados, nove foram considerados deficientes em sua capacidade de interagir com células epiteliais e quatro deles apresentaram a inserção Tn5 em genes da região LEE, como: *tir*, *escV* e *grlR*. Com o intuito de confirmar o papel da interação Intimina-Tir no estabelecimento deste fenótipo híbrido, foram construídos mutantes isogênicos nos genes *eae* e *escN*, que codificam a adesina intimina e a ATPase necessária para a montagem do SST3 (sistema de secreção tipo III), respectivamente. Os mutantes isogênicos gerados na intimina (*eae*) e no translocon do T3SS (*escN*) mostraram uma diminuição no número de bactérias associadas a células ( $P < 0,05$ ), em comparação com a amostra selvagem. A complementação *in trans* restaurou a capacidade dos mutantes *eae* e *escN* em aderirem eficientemente às células HeLa. A busca de polimorfismos em domínios funcionais do SST3 mostrou não interferir na adesão da amostra escolhida para este estudo. Em conclusão, demonstrou-se que o estabelecimento do fenótipo híbrido de adesão AL/AD na amostra de aEPEC 282/14 é dependente exclusivamente da interação Intimina-Tir.

**Palavras-chave:** aEPEC, adesão e sistema de secreção do tipo III (SST3).

## Abstract

The main virulence mechanism of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is the capacity to cause a histopathological lesion on the intestinal mucosa, termed Attaching and Effacing (AE); characterized by intimate bacterial adherence, microvillus destruction and formation of F-actin rich pedestal-like structures, in infected enterocytes. Genes of the locus of enterocyte effacement (LEE region) encode all proteins necessary for AE lesion formation. EPEC are divided in typical (tEPEC) and atypical (aEPEC), based on the presence of the EPEC adherence factor plasmid in the former group. From a collection of seven aEPEC O2:H16, obtained from outbreak and sporadic cases of diarrhea, we showed that five of them produced a hybrid localized/diffuse adherence (LA/DA) in HeLa cells. In this study, we selected one aEPEC isolate of this serotype (282/14) that produced the LA/DA pattern, to investigate the bacterial structures involved in its adhesive phenotype. For this purpose, aEPEC 282/14 was mutagenized using the EZ::TN < R6K<sub>ori</sub>/KAN-2 > Tnp transposome kit, generating a library of Tn5 insertions. These Tn5 insertion mutants were screened for non-adherent or less adherent mutants, in assays performed in 6 h of incubation with HeLa cells. Among the 320 clones screened, nine were considered deficient in their ability to interact with epithelial cells, and four of them presented the Tn5 insertion in genes within the LEE region, such as *tir*, *escV*, and *grlR*. In order to confirm the role of Intimin-Tir interaction in the establishment of this hybrid phenotype, we constructed isogenic mutants in the *eae* and *escN* genes, which encode the adhesin Intimin and the ATPase necessary for the T3SS (type III secretion system) assembly, respectively. The isogenic mutants generated in the Intimin (*eae*) and T3SS translocon (*escN*) showed a decrease in the number of cell-associated bacteria ( $P<0.05$ ), as compared to the wild-type strain. In trans complementation restored the ability of the *eae* and *escN* mutants to adhere efficiently to HeLa cells. The screening for polymorphisms in functional domains of the SST3 demonstrated not to interfere with the adherence of the isolate chosen for this study. In conclusion, it was demonstrated that the establishment of the hybrid LA/DA adhesion phenotype in the aEPEC 282/14 isolate is dependent exclusively on the Intimin-Tir interaction.

**Keywords:** aEPEC, adhesion and type III secretion system (T3SS).

## 1. INTRODUÇÃO

A diarreia infecciosa é considerada um dos grandes problemas de saúde pública mundial, sendo responsável por mais de dois milhões de mortes a cada ano, particularmente, entre crianças abaixo de cinco anos de idade (World Health Organization, 2017). Países subdesenvolvidos como os localizados na África e Ásia são os mais afetados, com essas taxas de mortalidade podendo chegar até a 15% (United Nations Children's Fund, 2016), sendo esse cenário diretamente associado à falta de políticas de saneamento básico apropriadas (World Health Organization, 2017).

A doença diarreica pode ser associada a diferentes patógenos, como bactérias, vírus e protozoários, dentre os quais *Escherichia coli* diarreiogênica, *Shigella* spp, *Salmonella* spp, *Campylobacter jejuni* e *Vibrio cholerae* destacam-se como os principais agentes bacterianos (Kotloff et al., 2013).

*E. coli* compreende um grupo de microrganismos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, os quais são caracterizados como bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, que colonizam o trato gastrointestinal do homem e de outras espécies de animais (Ewing & Edwards, 1986). Esse patógeno faz parte da microbiota intestinal, coexistindo em harmonia com seus hospedeiros. Entretanto, durante o processo evolutivo dessas bactérias, alguns clones adquiriram, através de mecanismo de transferência horizontal de genes, uma série de fatores de virulência, contidos em ilhas de patogenicidade, plasmídeos, transposons e bacteriófagos, que lhes conferiram a capacidade de causar um amplo espectro de doenças tanto em indivíduos saudáveis, como imunocomprometidos (Nataro & Kaper, 1998; Kaper et al., 2004; Robins-Browne et al., 2016). Amostras patogênicas de *E. coli* têm sido associadas a infecções do trato gastrointestinal e a infecções extra-intestinais, tais como infecções urinárias, meningites e infecções sistêmicas (Kaper et al., 2004).

As amostras de *E. coli* associadas à infecções intestinais são denominadas de *E. coli* diarreiogênicas (ECD) e são classificadas em seis patotipos distintos, considerando-se os seus mecanismos específicos de virulência, o tipo de interação com linhagens celulares (HeLa ou HEp-2) cultivadas *in vitro*, e as síndromes clínicas que causam (Nataro & Kaper, 1998). Os patotipos de *E. coli* diarreiogênicas são: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli*

enterohemorrágica (EHEC) e *E. coli* que adere difusamente às células epiteliais (DAEC) (Nataro & Kaper, 1998; Kaper et al., 2004).

Embora essa classificação ainda seja utilizada, a complexidade desses patógenos vem sendo evidenciada pela subdivisão das EPEC e EAEC, em típicas e atípicas, bem como pelas EHEC que passaram a constituir um subgrupo do patotipo denominado *E. coli* produtora da toxina Shiga, STEC. (Croxen et al., 2013). Além do mais, o surgimento de amostras híbridas, com a capacidade de combinar características de virulência de diferentes patotipos, e que são potencialmente mais virulentas, pode ser observada devido à plasticidade do genoma de *E. coli* (Gomes et al., 2016).

O termo “*E. coli* enteropatogênica – EPEC” foi criado com o intuito de distinguir determinados sorogrupos de *E. coli* associados a casos de diarreia, de sorogrupos de *E. coli* encontrados na microbiota intestinal de indivíduos saudáveis (Neter et al., 1955).

A principal característica de patogenicidade de EPEC é a produção de uma lesão histopatológica, denominada lesão *attaching and effacing* (lesão AE) (Moon et al., 1983), caracterizada pela aderência íntima da bactéria à membrana do enterócito, destruição das microvilosidades, além da formação de uma estrutura semelhante a um pedestal, rico em F-actina e outros elementos do citoesqueleto da célula hospedeira. (Knutton et al., 1989; Frankel et al., 1998).

A formação da lesão AE depende da expressão de genes cromossômicos presentes em uma ilha de patogenicidade denominada *locus of enterocyte effacement* ou região LEE (McDaniel et al., 1995), e está organizada em cinco regiões de funções conhecidas: LEE1, LEE2, LEE3, LEE5 e LEE4. Nas regiões LEE1, LEE2 e LEE3 encontram-se os genes que codificam o Sistema de Secreção do tipo 3 (SST3) e a proteína Ler (regulador global de LEE). Na região LEE4 encontram-se os genes que codificam as proteínas Esps (*E. coli secreted proteins*), que formam o translocon do SST3; e em LEE5 localizam-se os genes *eae* (que codificam a adesina Intimina) e *tir* (que codifica a proteína Tir), envolvidos na ligação íntima da bactéria à célula hospedeira, além de *cesT* (que codifica uma chaperona que auxilia na secreção e translocação do receptor Tir para o hospedeiro) (Kenny et al., 1997; Kenny, 1999; Garmendia et al., 2005). A figura 1 ilustra a lesão AE, bem como apresenta uma representação esquemática da região LEE de EPEC.

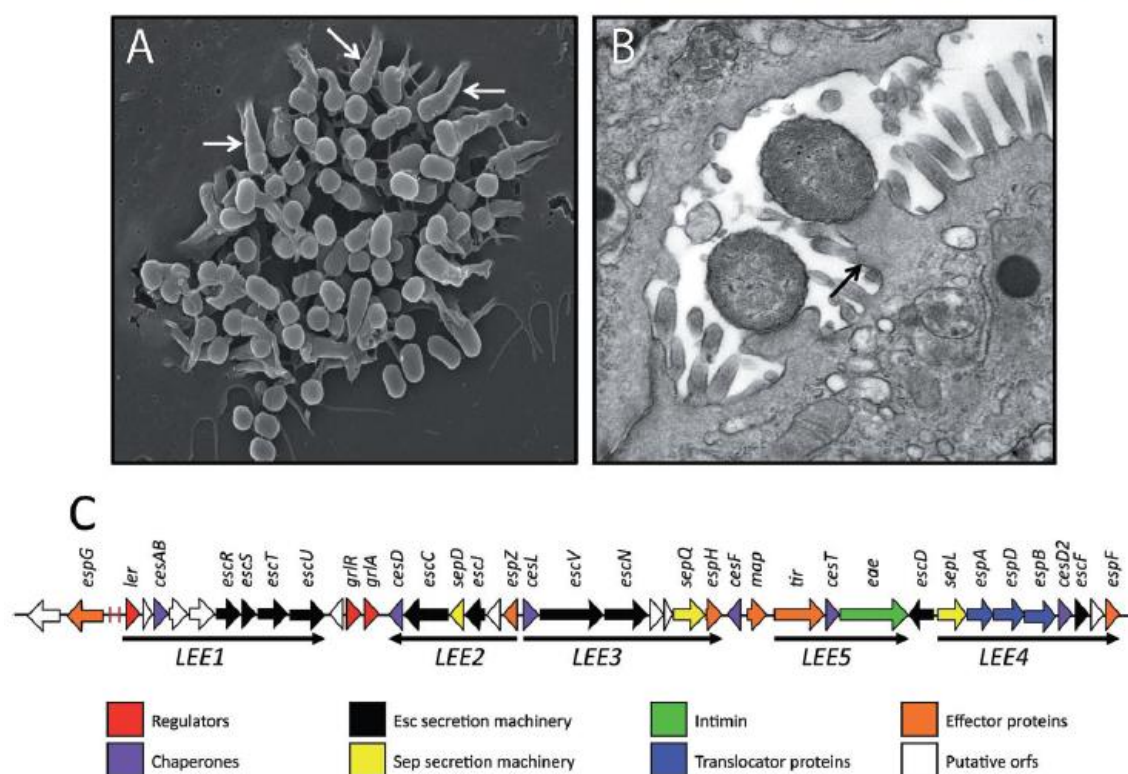


**Figura 1.** Microscopia eletrônica de varredura (A) e transmissão (B) mostrando o pedestal característico da lesão AE (seta) após interação com células epiteliais cultivadas *in vitro*. Representação esquemática da região LEE da amostra protótipo de EPEC típica E2348/69 (C). Extraído de Wong et al., 2011.

Embora essa região pareça ser altamente conservada, um estudo recente evidenciou a presença de 30 subtipos de LEE em 185 amostras de aEPEC provenientes da Ásia e da África, demonstrando que os fatores de virulência albergados nessa ilha de patogenicidade podem ter sido adquiridos por meio de transferência horizontal, em diferentes eventos evolutivos (Ingle et al., 2016).

O SST3 é composto por várias proteínas, entre as quais se destacam EscF e EspA, sendo que a primeira compreende um filamento, e a segunda, uma proteína que o reveste, podendo ter um comprimento variável dependente da quantidade disponível de EspA no citoplasma bacteriano (Knutton et al., 1998; Sekiya et al., 2001; Crepin et al., 2005). As proteínas EspB e EspD, por sua vez, são responsáveis pela formação de um poro na membrana da célula hospedeira para que ocorra a injeção de proteínas efetoras, e que associadas a EspA formam o

translocon do SST3, enquanto EscN funciona como uma ATPase, tendo papel fundamental na geração de energia para a biogênese desse sistema (Ide et al., 2001; Gauthier et al., 2003; Luo & Donnenberg, 2011). (Figura 2).

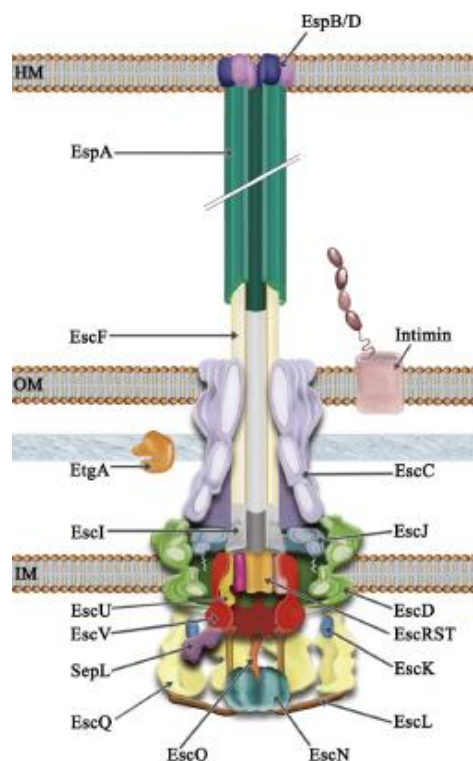


**Figura 2.** Representação esquemática do Sistema de Secreção do Tipo 3 de patógenos capazes de induzir a lesão AE. Extraído de Gaytan et al., 2016.

Diferenças na eficiência de colonização e no tamanho do translocon do SST3 também puderam ser notadas quando domínios de EspB e EspD apresentavam variações nas sequências de alguns aminoácidos (Daniell et al., 2001). Uma diminuição na aderência de EPEC também foi descrita quando havia o bloqueio de determinadas regiões dessas proteínas com pequenos peptídeos (Li et al., 2016).

Intimina, uma proteína de membrana externa de 94 kDa, codificada pelo gene *eae*, é um fator de aderência que tem papel fundamental na colonização intestinal (Jerse et al., 1990). Essa proteína medeia ligação íntima às células epiteliais pela ligação a outra proteína codificada por LEE, o receptor translocado da intimina (Tir), que é injetado na célula do hospedeiro por meio do

SST3 (Kenny *et al.*, 1997). A molécula de Intimina é altamente variável em sua porção C-terminal, sendo que nos diferentes sorotipos de EPEC e STEC, pelo menos 35 variantes antigênicas foram descritas (Mora *et al.*, 2009).

Além de LEE, outras ilhas de patogenicidade (PAI) têm sido encontradas no cromossomo de bactérias capazes de induzir a lesão AE (Perna *et al.*, 2001; Iguchi *et al.*, 2009; Petty *et al.*, 2010). Estudos recentes têm demonstrado claramente que o repertório de proteínas translocadas pelo SST3, da célula bacteriana para a célula hospedeira, não se encontra restrito àquelas codificadas por genes localizados na região LEE. Essas proteínas são atualmente conhecidas como efetores não-LEE e estudos de virulência têm identificado serem esses efetores capazes de subverter vários processos relacionados às células hospedeiras, tais como: inibir o transporte de proteínas pelo retículo endoplasmático (EspI/NleA); inibir a resposta pro-inflamatória (NleB e NleE) e ativar Cdc42 e Rac1 para induzir a formação de *ruffle* de membrana e lamelipódio (EspT) (Vossenkämper *et al.*, 2011; Wong *et al.*, 2011). Outro efector não-LEE, denominado IQGAP1-binding effector (Ibe), foi identificado em uma amostra de EPEC, pertencente ao sorotipo O8:H<sup>-</sup>, e mostrou participar da formação da lesão AE, embora a sua exata contribuição ainda não se encontre perfeitamente esclarecida (Buss *et al.*, 2009).

As EPEC são divididas em típicas (tEPEC) e atípicas (aEPEC) tendo por base a presença do plasmídeo EAF (EPEC *adherence factor*) somente nas tEPEC (Kaper, 1996). O pEAF alberga um conjunto de 14 genes que são responsáveis por codificar as fímbrias BFP (*bundle-forming pilus*), responsáveis pela formação do padrão de adesão localizada (AL), que é caracterizado pela formação de microcolônias compactas na superfície de células epiteliais, após um período de interação de 3 horas (Scaletsky *et al.*, 1984; Girón *et al.*, 1991; Donnenberg *et al.*, 1992).

As aEPEC podem aderir ou não a células epiteliais em cultura, sendo que a maioria das amostras aderentes produz um padrão caracterizado pela presença de microcolônias mais frouxas, denominada AL-like (adesão semelhante à localizada), que são visualizadas somente em períodos de ensaios mais prolongados (Rodrigues *et al.*, 1996). Algumas amostras de aEPEC ainda podem aderir às células epiteliais em padrões característicos de outras categorias de ECD, tais como o padrão difuso (AD) de DAEC, no qual as bactérias aderem de forma randômica às células epiteliais, e o padrão agregativo (AA) de EAEC, onde é possível observar uma organização semelhante a tijolos empilhados tanto nas bactérias aderidas às superfícies epiteliais como na superfície abiótica (Vieira *et al.*, 2001; Dulguer *et al.*, 2003; Abe *et al.*, 2009).

Além da proteína intimina, aEPEC alberga genes responsáveis pela produção de outras adesinas fimbriais e afimbriais, cujas contribuições na interação desse patógeno com o hospedeiro vem sendo elucidada em diferentes estudos. A adesina afimbrial LDA (*locus for diffuse adherence*) foi, até o momento, a única estrutura de adesão descrita em uma amostra de aEPEC do sorotipo O26:H11 e parece ser responsável por produzir o padrão de adesão difuso quando seus determinantes genéticos são clonados em uma amostra laboratorial de *E. coli* não aderente (Scaletsky et al., 2005). Além do locus *lda*, genes responsáveis por codificar adesinas descritas em outros patótipos de ECD, como no patótipo de *E. coli* produtora da toxina Shiga (STEC), também têm sido observados em aEPEC. Dentre esses genes podemos destacar: *paa* (porcine A/E-associated adhesin), *iha* (IrgA homologue adhesin), *toxB* (ToxB de EHEC) e *efa1/lifA* (EHEC factor for adherence), além dos operons *ecp* (*E. coli* common pilus), *fim* (pilus tipo I) e *lpf* (long polar fimbriae) que codificam adesinas fimbriais (Scaletsky et al., 2009; Gomes et al., 2011; Hernandez et al., 2011; Torres et al., 2009). A ocorrência de genes que codificam proteínas autotransportadoras exercendo papel na interação bacteriana com células hospedeiras, também já foi reportada em amostras de aEPEC, dentre os quais podemos citar: *cah* (calcium-binding antigen), que possui papel na formação de biofilme e autoagregação, além *ehaA* (EHEC autotransporter A), *ehaB* (EHEC autotransporter B), *ehaD* (EHEC autotransporter D), *ehaJ* (EHEC autotransporter J) e *sab* (STEC autotransporter), que também atuam na formação de biofilme (Abreu et al., 2013). O gene *paa* tem sido observado mais frequentemente entre amostras de aEPEC provenientes das fezes de indivíduos diarreicos, do que das fezes de indivíduos saudáveis, mostrando uma associação com doença diarreica (Afset et al., 2006; Scaletsky et al., 2009; Gomes et al., 2011). Entre as adesinas fimbriais, pouco sabemos além da distribuição de genes responsáveis por codificar proteínas associadas à biogênese dessas estruturas, apesar do fato da produção da adesina ECP ter sido demonstrada em aEPEC aderidas a células epiteliais (HeLa) cultivadas *in vitro* (Hernandez et al., 2011). Outra estrutura bacteriana que parece contribuir para a interação de aEPEC com os enterócitos é o flagelo, sendo essa ligação mediada pela proteína FliD (Sampaio et al., 2016). Um estudo recente identificou uma amostra de aEPEC do sorotipo O26:H11 capaz de aderir as células epiteliais mesmo na ausência da interação entre a adesina intimina e seu receptor translocado Tir (Santos et al., 2019). Essa aderência, independente da adesina Intimina, foi atribuída ao translocon do SST3 após análise de mutantes nos genes *escN* e *espD* (Santos et al., 2019). O papel do translocon do SST3 na

interação bactéria-célula hospedeira já havia sido descrito em estudos anteriores realizados com uma amostra de *E. albertii* (Hernandes et al., 2013). Embora trabalhos de caracterização já tenham evidenciado a presença de genes responsáveis por codificarem adesinas fimbriais e afimbriais em amostras de aEPEC (Scaletsky et al., 2005; Hernandez et al., 2011), pouco se conhece sobre a produção dessas proteínas e sua importância na colonização intestinal.

Uma vez que o papel das aEPEC na doença diarreica ainda se encontra em fase de importantes questionamentos, esforços para compreender as ferramentas de virulência de amostras que foram responsáveis por surtos, e têm assim seu potencial patogênico claramente evidenciado, são iniciativas de elevada importância. Recordando um surto ocorrido na Alemanha, o qual foi causado por uma amostra do sorotipo O104:H4 capaz de produzir concomitantemente a toxina Stx2a e uma adesina agregativa AAF/I (*Aggregative Adhesion Fimbria*), onde mais de 4000 indivíduos diarreicos foram relatados, dentre os quais 54 foram a óbito (Bielaszewska et al., 2011). Estudos realizados no nosso laboratório contribuíram para identificar potenciais sorotipos de aEPEC envolvidos em surtos ocorridos no Brasil. Nesse estudo reportamos um surto ocorrido em uma creche, localizada na cidade de São José do Rio Preto, causado por aEPEC do sorotipo O2:H16 (Vieira et al., 2016). Posterior caracterização dessas amostras demonstrou que esse patógeno alberga vários fatores de virulência, incluindo genes responsáveis por codificar adesinas fimbriais e afimbriais, bem como interagir eficientemente com células HeLa, produzindo um padrão híbrido de aderência, denominado AL/AD, e promovendo o acúmulo de F-actina abaixo do local de aderência à célula hospedeira (Vieira et al., 2016; Vieira et al., 2019). Dessa forma, capacidade de aderir fortemente às células epiteliais pode reforçar as características de virulência de determinadas amostras de aEPEC, tornando-os capazes de provocar surtos de importância para as autoridades competentes em saúde pública e para toda a população afetada.

## **2. OBJETIVO GERAL**

O objetivo do presente estudo foi identificar potenciais adesinas envolvidas no estabelecimento do padrão híbrido AL/AD, bem como verificar a contribuição de importantes estruturas bacterianas já associadas ao fenótipo adesivo, tais como a adesina intimina e o translocon do SST3.

### **2.1. Objetivos específicos:**

Realizar uma análise comparativa da eficiência de interação da amostra de aEPEC pertencente ao sorotipo O2:H16, produtora do padrão híbrido AL/AD, com outras amostras de aEPEC pertencentes ao mesmo sorotipo e produzindo distintos padrões de aderência em células HeLa.

Investigar a presença de genes plasmidiais associados à produção do padrão AD e/ou AL.

Verificar a presença de genes responsáveis por codificar potenciais adesinas nas amostras de aEPEC do sorotipo O2:H16.

Identificar, por mutagênese aleatória, genes relacionados a potenciais estruturas de adesão em uma amostra do sorotipo O2:H16, produtora do padrão AL/AD, selecionada.

Avaliar a contribuição do translocon do sistema de secreção do tipo 3 e da proteína Intimina na interação da amostra de aEPEC selecionada com células epiteliais.

Verificar a presença de polimorfismos nas proteínas que formam o translocon do SST3, isto é, EspA, EspB e EspD, na tentativa de identificar polimorfismos que possam estar relacionados à eficiência de aderência de aEPEC.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Amostras bacterianas

Para realização do presente estudo foi utilizada uma coleção de aEPEC pertencentes ao sorotipo O2:H16, na qual todas as amostras obtidas, totalizando 7, foram isoladas entre os anos 2009 e 2016. A Tabela 1 apresenta o ano de isolamento e local das amostras estudadas. Parte delas (4) são provenientes da investigação de um surto ocorrido no estado de São Paulo no ano de 2013 (Vieira et al., 2016), enquanto 3 restantes foram obtidas de casos esporádicos de diarreia no Brasil (Abe et al., 2009; Ori et al., 2018). É importante ressaltar que as quatro amostras obtidas do surto mostraram alto grau de similaridade na análise por Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE) (Vieira et al., 2016). Por esse motivo, a amostra 407/13 foi escolhida como representante desse conjunto de amostras.

As amostras de aEPEC 407/13 e 282/14, produtoras de um padrão híbrido de aderência AL/AD, foram selecionadas para a investigação das estruturas de aderência utilizadas no estabelecimento desse fenótipo, quando em contato com células HeLa cultivadas *in vitro*. Contudo, após sucessivas tentativas, a amostra 407/13 não foi permissiva para realização dos experimentos necessários, que foram conduzidos, portanto, somente com a amostra 282/14.

É importante ressaltar que o presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Faculdade de Medicina de Botucatu, sob o número CAAE 83489318.6.0000.5411, e que as etapas envolvendo manipulação de Organismos Geneticamente Modificados foram executadas na área de Biossegurança NB2 (área CIBio 15), do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, sob o CQB (Certificado de Qualidade em Biossegurança) número 039/98.

**Tabela 1.** aEPEC pertencentes ao sorotipo O2:H16, isoladas de surtos e casos esporádicos de diarreia no Brasil.

| <b>Amostras</b>   | <b>Ano</b> | <b>Local</b>             | <b>Referência</b>   |
|-------------------|------------|--------------------------|---------------------|
| BA92              | 2009       | Salvador-BA              | Abe et al., 2009    |
| 407/13 (IAL5437)* | 2013       | São José do Rio Preto-SP | Vieira et al., 2016 |
| 282/14 (IAL5133)  | 2014       | Rio Claro-SP             | Ori et al., 2018    |
| 196/16 (IAL 5132) | 2016       | Santo André-SP           | Ori et al., 2018    |

\*aEPEC isolada de um surto de diarreia ocorrido no estado de São Paulo.

### 3.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A técnica de PCR foi utilizada para obtenção de amplicons empregados nos experimentos de mutagênese. Para tanto foi realizada extração do DNA, na qual aproximadamente 10 colônias bacterianas obtidas do cultivo em placas de ágar MacConkey foram transferidas para um microtubo contendo 200 µL de água MilliQ estéril, que foi submetido à fervura por 10 min, centrifugado à 10.000 RPM (rotações por minuto) durante 1 minuto, de forma que o DNA extraído ficasse contido no sobrenadante, e imediatamente resfriado em banho de gelo. As reações de PCR foram realizadas utilizando-se GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, Wisconsin, USA), seguindo recomendações do fabricante. Em cada reação, foi utilizado 0,34 µM de cada iniciador. As sequências dos iniciadores empregados nas reações de PCR estão na Tabela 3.

### 3.3. Cultivo celular

As células epiteliais (HeLa), adquiridas no Instituto Adolfo Lutz (São Paulo- SP), e as células intestinais Caco-2 foram mantidas através de cultivos sucessivos em frascos apropriados para cultura de células (TPP, Suíça) a 37°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) high glucose (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA), acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco, Brasil) e de 1% de mistura antibiótica (Pen Strep, Gibco, Grand Island, USA), além de 1% de solução de aminoácidos não essenciais (Sigma, United Kingdom), utilizada apenas para o cultivo de Caco-2. É importante ressaltar que o cultivo

celular apresentou resultados negativos para possível contaminação por *Mycoplasma* sp., e alíquotas foram então armazenados em nitrogênio líquido, a uma temperatura de -196°C, e descongeladas sempre que necessário, evitando o uso de células senescentes durante os ensaios.

### **3.4. Teste de adesão com células epiteliais (HeLa)**

Os testes de adesão em células HeLa, cultivadas *in vitro*, foram realizados para determinação dos padrões de aderência das amostras estudadas. Após a formação da monocamada celular na superfície do frasco, as células foram descoladas com adição da solução de dissociação tripsina-versene (ATV), seguida de agitação manual dos frascos. Após descolamento celular, a tripsina foi inativada com adição de DMEM, suplementado com 10% de SFB, e a determinação do número de células foi realizada por contagem em Câmara de Neubauer para posterior diluição em DMEM, de modo a obter uma concentração final de  $1 \times 10^5$  células/mL. As células foram distribuídas em placas de 24 poços, contendo lamínulas de vidro, no volume de 1 mL por orifício, e foram incubadas por aproximadamente 48 horas em estufa a 37°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, até atingirem estágio de semi- confluência (aproximadamente 80%).

O teste de interação foi realizado segundo o descrito por Cravioto et al., (1979) com pequenas modificações. As amostras bacterianas foram inoculadas, a partir de cultura em caldo Luria Bertani (LB) por 18 horas a 37°C, na diluição 1:50, em placas de 24 orifícios, contendo células HeLa em meio DMEM acrescido de 2% de SFB e 2% de D-manopiranosídeo (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA). Após 3 horas de incubação a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, (período de infecção), as placas foram lavadas com PBS estéril e reincubadas por mais 3 horas com meio DMEM fresco (período de multiplicação). Em seguida, foram novamente lavadas por 6 vezes com PBS estéril, e então, as preparações foram fixadas com metanol, para posterior coloração com May-Grünwald/Giemsa para análise do padrão de adesão, em microscopia óptica (aumento de 1.000 X).

### 3.5. Teste quantitativo de adesão

A quantificação da aderência das amostras de aEPEC às células HeLa foi realizada após incubação por 6 horas, como descrito acima, utilizando-se uma diluição 1:50 do inóculo (50 µL) ajustado para uma DO<sub>600</sub> entre 0,5 e 0,8, em uma MOI (*multiplicity of infection*) de 1:100; seguido de lise com Triton X-100 a 1% em PBS por 30 min a 37°C, e diluições seriadas em PBS (phosphate buffered saline) (razão 10). Volumes de 10 µL foram então semeados na forma de *spots* em ágar MacConkey, para posterior contagem das unidades formadoras de colônia (UFC). Todos os ensaios foram realizados em triplicatas biológicas e técnicas, e os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (Hernandes et al., 2013).

### 3.6. Teste de invasão em células Caco-2

Esse teste foi realizado para avaliar o potencial das amostras em invadir células intestinais diferenciadas. Os ensaios de invasão foram realizados da mesma forma que o teste quantitativo de adesão descrito acima, com a diferença que após as 6 horas de incubação, foi acrescentado meio fresco contendo gentamicina (100 µg/mL) durante 1 hora. Dessa forma, após a lise celular com Triton X-100 a 1% em PBS, apenas as bactérias internalizadas puderam ser quantificadas. As amostras testadas foram comparadas com amostras invasoras (*E. albertii* 1551-2) (Hernandes et al., 2008; Pacheco et al., 2014), bem como com uma amostra não-invasora (1551-2*eae*::Km) (Yamamoto et al., 2017). É importante ressaltar que as células Caco-2 tiveram um período de diferenciação celular de 10 dias, com troca do meio de cultivo a cada 2 dias, antes dos ensaios serem realizados, e que as amostras apresentaram sensibilidade a gentamicina na concentração utilizada durante os ensaios. Os testes foram realizados em triplicatas biológicas e técnicas e os resultados foram expressos como média do número de Unidade Formadora de Colônias (UFC) ± desvio padrão.

### 3.7. Teste de identificação da polimerização da actina

O teste de identificação da polimerização da actina (FAS - Fluorescence Actin Staining) é uma medida indireta da capacidade bacteriana em induzir a lesão AE. Para tanto, os ensaios foram realizados segundo o descrito por Knutton et al. (1989). Ao final do ensaio qualitativo descrito no item 3.4, as células HeLa foram fixadas em formaldeído a 3% em PBS, permeabilizadas com Triton X-100 a 1% (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) e incubadas no escuro por 20 min, com faloidina marcada com fluoresceína (Life Technologies, Carlsbad, California, USA) na diluição de 1:125, marcando filamentos de actina, e DAPI (Life Technologies, Carlsbad, California, USA) na diluição de 1:500, marcando ácidos nucleicos tanto da célula hospedeira quanto da bactéria. As lamínulas foram então lavadas em PBS, montadas em glicerol (diluído 1:9 em PBS) e observadas ao microscópio de fluorescência (Olympus BX60) em aumento de 1.000x.

A amostra protótipo de EPEC E2348/69 foi utilizada como controle positivo para polimerização de actina (FAS positivo), enquanto a amostra de EAEC 042, produtora do padrão AA, foi utilizada como controle negativo (FAS negativo).

### 3.8. Detecção de genes responsáveis por codificar adesinas

A detecção de genes responsáveis por codificar adesinas foi realizada com intuito de conhecer o repertório de estruturas adesivas de aEPEC do sorotipo O2:H16. As amostras de aEPEC estudados foram primeiramente sequenciados, em colaboração com o Dr. David A. Rasko (Institute for Genome Sciences, Department of Microbiology and Immunology, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, Maryland, USA) (407/13- PIKA00000000, 282/14- PIKC00000000, 196-16- PIKD00000000, BA92- PIJZ00000000) e a ocorrência de 46 genes responsáveis por codificar estruturas bacterianas adesivas foi investigada utilizando o *pipeline Large-Scale BLAST Score Ratio (LS-BSR)* (Sahl et al., 2014), e valores iguais ou superiores a 0,8 foram considerados para indicar a presença das sequências pesquisadas.

### 3.9. Perfil plasmidial

A análise do perfil plasmidial foi realizada para verificar se as amostras apresentavam plasmídeos que pudessem ser passíveis de conjugação. Foi então realizada a extração dos plasmídios por lise alcalina, método descrito por Birnboim & Doly (1979).

As amostras foram semeadas em caldo LB e incubadas por aproximadamente 18 horas, em estufa a 37°C, sob agitação. Após esse período, as culturas foram centrifugadas, o sobrenadante desprezado e o sedimento ressuspenso em 100 µL de solução lítica. As preparações foram submetidas a incubação em banho de gelo por 30 minutos acrescentadas de 200 µL de solução de lise alcalina e homogeneizadas. Foram então adicionados 150 µL de uma solução de acetato de sódio (3 M, pH 4,8), seguido de homogeneização e incubação overnight a 20°C. As preparações foram centrifugadas à 16.000 g, durante 15 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos, e 1 mL de etanol absoluto gelado foi adicionado. As preparações foram novamente incubadas overnight a -20°C. Após a incubação, as amostras foram então centrifugadas por 10 minutos a 16.000 g, o sobrenadante aspirado e 2 volumes de etanol absoluto gelado foram adicionados, incubando as amostras por 3 horas a -20°C. As preparações foram novamente centrifugadas por 10 minutos e os sobrenadantes aspirados. Depois de secos em temperatura ambiente, os sedimentos foram suspensos em 20 µL de solução Tris EDTA (TE) pH 7,4 (Trizma base 10mM; Na<sub>2</sub>EDTA 1mM). O DNA plasmidial extraído foi analisado através de eletroforese em gel de agarose (0,7%). As bandas de DNA plasmidial da amostra de *E. coli* 39 R861 foram utilizadas como marcadores de pesos moleculares conhecidos.

### 3.10. Conjugação bacteriana

Os experimentos de conjugação bacteriana foram realizados com o intuito de verificar se os plasmídeos contidos nas amostras estudadas albergavam genes relacionados ao padrão de aderência AL/AD, além dos genes da região *tra*, responsáveis pela transferência plasmidial. Dessa forma, poderiam então ser transmitidos para uma amostra de *E. coli* laboratorial incapaz de aderir às células, a qual, após a realização do experimento teria a capacidade de expressar esses mesmos genes, reproduzindo o fenótipo adesivo em questão.

A amostra de *E. coli* MA3456, que apresenta resistência ao ácido nalidíxico, foi utilizada como receptora. As amostras 407/13 e 282/14, utilizados como doadores, tiveram inicialmente sua resistência testada para os seguintes antimicrobianos: ampicilina (100 µg/mL), cloranfenicol (30 µg/mL), gentamicina (100 µg/mL), tetraciclina (10 µg/mL), estreptomicina (20 µg/mL) e kanamicina (20 µg/mL), tendo sido resistentes apenas para ampicilina e tetraciclina.

As amostras foram cultivadas por aproximadamente 18 horas em 3 mL de caldo LB contendo os respectivos antibióticos, em estufa a 37°C. Em seguida, as amostras foram diluídas em caldo LB e incubadas a 37°C até atingirem a concentração de  $2-3 \times 10^8$  células/mL. Foi então colocado 1 mL do caldo contendo a amostra doadora, 1 mL do caldo contendo a amostra receptora e 1 mL de caldo LB, em um erlenmeyer com capacidade de 50 mL, e a suspensão foi incubada a 37°C por aproximadamente 24 horas. Após incubação, a mistura de conjugação foi semeada em placas de MacConkey contendo ácido nalidíxico 20 µg/mL com ampicilina 100 µg/mL e placas contendo ácido nalidíxico 20 µg/mL com tetraciclina 10 µg/mL. Como controle, as amostras parentais e a mistura de conjugação foram semeadas no mesmo meio contendo os antibióticos já citados. Os experimentos foram realizados de forma isolada com cada uma das amostras doadoras.

### **3.11. Teste de aglutinação com *Saccharomyces boulardii***

As fímbrias tipo I, estruturas de adesão produzidas por determinadas bactérias, possuem sítio de ligação para algumas leveduras, dentre elas o *Saccharomyces boulardii*. Baseado nisso, testes de aglutinação foram realizados com o intuito de verificar a produção dessas fímbrias pelas amostras estudadas. As leveduras foram semeadas em ágar Sabouraud e incubadas à 37°C por aproximadamente 48 h, o crescimento foi então adicionado à uma lâmina de vidro contendo cerca de 10 µL do crescimento bacteriano previamente semeado em caldo LB, e submetido a agitação para visualização da aglutinação, como anteriormente descrito por Hancock e colaboradores (2011).

### 3.12. Preparo de células eletrocompetentes e eletroporação

O preparo de células eletrocompetentes seguido de eletroporação consiste no preparo das células bacterianas para receberem pulsos elétricos de alta voltagem, formando poros na bicamada lipídica bacteriana, o que possibilita a transferência de material genético exógeno para o interior da célula.

Um pré-inóculo foi semeado em caldo LB e incubado a 37°C, *overnight*. O crescimento bacteriano foi diluído em caldo LB (1:100) e incubado a 37°C até atingir uma DO<sub>600</sub> entre 0,5 e 0,8. Todo conteúdo foi transferido para 2 tubos falcon de 15mL, que foram deixados no gelo por 30 minutos, submetidos à centrifugação e o pellet ressuspenso em 5 mL de água Milli-Q estéril gelada. O procedimento foi repetido por mais duas vezes, sendo o pellet ressuspenso em 500 µL e 60µL de glicerol 10% gelado, respectivamente. As células que não foram imediatamente eletroporadas foram armazenadas a -80°C para posterior utilização.

As eletroporações foram realizadas em cubetas para eletroporação (Bio-Rad, California, USA) contendo as células competentes adicionadas do material genético de interesse (em torno de 50 ng/µL para plasmídios e 500 ng/µL para fragmentos de DNA purificados), nas seguintes condições: pulso de 2,5 kV e 2,5 ms de tempo, no equipamento MicroPulser™ Electroporator (Bio-Rad, California, USA).

Imediatamente após a eletroporação, foram adicionados 700 µL de meio SOC (triptona 2%; extrato de levedura 0,5%; cloreto de sódio 10 mM; cloreto de potássio 2,5 mM; sulfato de magnésio 20 mM; cloreto de magnésio 10 mM; glicose 20 mM) e a mistura foi homogeneizada e incubada a 37°C por 1 hora (30°C para plasmídeos termossensíveis). Pequenas alíquotas foram semeadas em placas de LB ágar contendo o antibiótico apropriado, para seleção dos transformantes, e incubadas a 37°C, *overnight*.

### **3.13. Obtenção de uma biblioteca de mutantes deficientes na adesão às células epiteliais (HeLa) e identificação de potenciais adesinas associadas a esse fenótipo**

Para obtenção de uma biblioteca de mutantes com a capacidade aderente reduzida e posterior identificação de potenciais adesinas, a amostra de aEPEC 282/14 foi selecionada para os experimentos de mutagênese utilizando o kit Tn5™ <R6Kγori/KAN-2>Tnp Transposome™ (Epicentre), seguindo recomendações do fabricante. Ressalta-se que os experimentos com a amostra 407/13 não foram levados adiante pelo fato dela não ter se mostrado permissiva.

Após eletroporação com 1 µL do transposon, que se insere de forma randômica no genoma bacteriano, os mutantes resultantes foram submetidos a testes de adesão em células HeLa com o intuito de selecionar aqueles que fossem menos aderentes. Esses mutantes tiveram seu DNA extraído com o kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, USA) seguido de clivagem com a enzima de restrição MluI, que não apresentava sítio de clivagem na sequência do transposon inserido, segundo uma lista de enzimas fornecida pelo próprio kit. Os fragmentos que possuíam, além de uma origem de replicação, genes de resistência para kanamicina, foram então recircularizados com auxílio da T4 DNA ligase (Invitrogen, Carlsbad, USA) para que pudessem ser clonados em uma amostra *E. coli* laboratorial (DH5αλpir) (Tabela 2) e posteriormente selecionados em placas com o antibiótico apropriado. Uma extração plasmidial foi então realizada com auxílio do kit QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), para posterior sequenciamento do sítio de inserção do transposon no genoma bacteriano. As etapas descritas encontram-se resumidas na Figura 3.

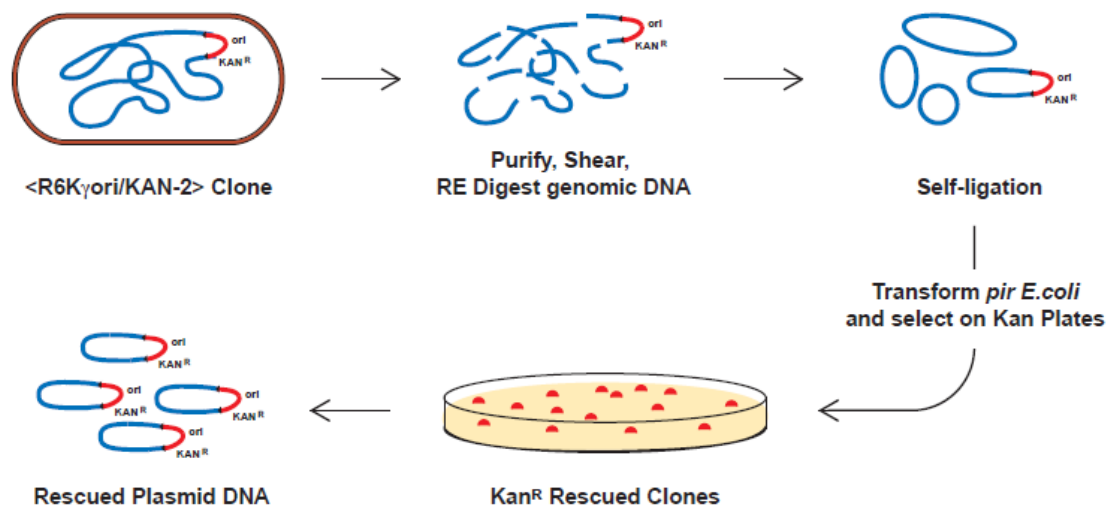


**Figura 3.** Representação esquemática das etapas de obtenção de mutantes deficientes na adesão às células epiteliais e identificação de potenciais novos genes que codificam estruturas bacterianas associadas ao fenótipo de adesão em uma amostra de aEPEC. Extraído de Protocolo EZ-Tn5™ <R6Kγori/KAN-2>Tnp Transposome (Epicentre).

O sequenciamento foi realizado no Instituto Butantã, como serviço terceirizado, utilizando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Austin, USA) e o aparelho de sequenciamento automático ABI 3500 (Applied Biosystems), conforme as instruções do fabricante e utilizando indicadores do kit EZ-Tn5™ <R6Kγori/KAN-2>Tnp Transposome™ (Epicentre). Após o sequenciamento do ponto de inserção do transposon no genoma bacteriano desses mutantes, as sequências foram comparadas com as de amostras já conhecidas, fazendo uso da ferramenta BLAST ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)), para identificação dos genes truncados.

### 3.14. Construção e complementação de mutantes não polares nos genes *escN* e *eae*

A mutagênese nos genes *escN* (que codifica uma ATPase essencial para a montagem do SST3) e *eae* (que codifica a adesina Intimina) foi realizada empregando-se o sistema Lambda Red, descrito por Datsenko & Wanner (2000), com modificações, baseado na recombinação homóloga dos genes de interesse com um gene de resistência ao antimicrobiano zeocina.

Para que os eventos de recombinação ocorressem com eficiência, proteínas codificadas por genes do fago-red, contidos no plasmídeo pKOBEG (Tabela 2) que foi inserido na amostra selvagem pela técnica de eletroporação, foram expressas a partir da presença de arabinose, utilizada como indutor, no meio de cultura.

Os iniciadores *escN*-zeo(F)/*escN*-zeo(R) e *eae*-beta1-zeo(F)/*eae*-beta1-zeo(R) (Tabela 3) foram construídos com cerca de 40 bases homólogas ao gene de interesse na região 5' e com 20 bases homólogas ao gene de resistência à zeocina na região 3', e foram utilizados para amplificação do gene de resistência a zeocina, a partir da amostra de *E. coli* MC4160-maltΔ224::zeo-(F+) (Tabela 2), nas seguintes condições: 95°C/5 min, 35 ciclos: (95°C/30 s, 50°C/30 s, 72°C/1 min), e extensão final de 72°C/7 min. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose, as bandas recortadas do gel e o DNA extraído com o Kit *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN) e purificado com o Kit *QIAquick PCR Purification Kit* (QIAGEN), para que pudesse ser inserido na amostra de aEPEC contendo o plasmídeo pKOBEG, resistente à apramicina, por eletroporação. Os transformantes foram selecionados em ágar LB contendo 60 µg/mL de zeocina, e submetidos a PCR com os primers *escN*(F)/*escN*(R) e *eae*(F)/*eae*(R) (Tabela 3) para verificação do evento de deleção dos genes de interesse.

Os mutantes obtidos foram submetidos a testes de adesão qualitativos e quantitativos e, quando houve diferença estatística entre os resultados obtidos e a amostra selvagem, eles foram complementados empregando-se os plasmídeos pEscN e pCVD438 (Tabela 2), por eletroporação. Esses transformantes foram selecionados em ágar LB contendo 30 µg/mL de cloranfenicol e a confirmação da complementação foi realizada por PCR, com os iniciadores *escN*-F/*escN*-R e *eae*-beta1(F)/*eae*-beta1(R) (Tabela 3).

**Tabela 2.** Plasmídeos e amostras utilizados nos experimentos de mutagênese e complementação.

| Plasmídeos e amostras              | Características                                                                                 | Referências                |
|------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| pCVD438                            | Vetor de expressão pACYC184 carreando o gene <i>eae</i> derivado da E2348/69; Clo <sub>r</sub>  | Donnenberg and Kaper, 1991 |
| pEscN                              | Vetor de expressão pACYC184 carreando o gene <i>escN</i> derivado da E2348/69; Clo <sub>r</sub> | Sampaio et al., 2014       |
| pKOBEG-Apr <sub>r</sub>            | Plasmídeo contendo o operon <i>lambda red</i> e gene de resistência à apramicina                | Chaverroche et al., 2000   |
| DH5 $\alpha$ pir                   | <i>E. coli</i> contendo o gene <i>pir</i> lisogenizado                                          | Elliott & Kaper, 1997      |
| MC4160-malt $\Delta$ 224::zeo-(F+) | Amostra contendo o cassete de resistência a zeocina                                             | Cedida por J. M. Ghigo     |

**Tabela 3.** Sequência dos iniciadores empregados para a mutagênese e confirmação dos eventos de deleção e complementação dos genes *eae* e *escN*

| Primers                   | Sequência dos iniciadores (5'→3')                                   | Referência         |
|---------------------------|---------------------------------------------------------------------|--------------------|
| <i>eae</i> -beta1-zeo (F) | ATGATTACTCATGGTTTTTATGCCCGGACCCGGCACA<br>AGCGTCATCGCTTGCATTAGAAAGG  | Presente<br>estudo |
| <i>eae</i> -beta1-zeo (R) | TTATTTTACACAAACAGAAAAAGCATTCTTATTGTTT<br>ACTGAATGATGCAGAGATGTAAG    |                    |
| <i>escN</i> -zeo (F)      | ATGATTTTCAGAGCATGATTCTGTATTGGAAAAATAC<br>CCACGTCATCGCTTGCATTAGAAAGG | Presente<br>estudo |
| <i>escN</i> -zeo (R)      | TCAGGCAACCACTTTGAATAGGCTTCAATCGTTTTT<br>TCGGAATGATGCAGAGATGTAAG     |                    |
| <i>eae</i> (F)            | CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC                                            | Toma et al.,       |
| <i>eae</i> (R)            | CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATTTCG                                          | 2003               |
| <i>escN</i> (F)           | CGACGACTATTGCAGAGT                                                  | Hernandes          |
| <i>escN</i> (R)           | GCCTTATCTGCTTCAGGA                                                  | et al., 2013       |

### 3.15. Determinação da curva de crescimento bacteriano

As curvas de crescimento foram realizadas com o intuito de verificar a viabilidade dos mutantes gerados. Para tanto, todas as amostras, tanto mutantes quanto a amostra selvagem, foram previamente semeadas em caldo LB a 37 °C, durante 18-24 horas. Posteriormente, as culturas bacterianas foram transferidas para tubos contendo 3 mL de DMEM em uma diluição de 1:50, a mesma utilizada nos testes quantitativos de adesão, e incubadas durante 30 minutos a 37°C em atmosfera 5% CO<sub>2</sub>. Após esse período, foram realizadas leituras de DO de cada cultura a 600 nm. Esse procedimento foi repetido a cada 60 minutos, durante 6 horas, em triplicata experimental.

### 3.16. Análise de polimorfismos nas sequências de EspA, EspB e EspD

A análise de polimorfismos nas sequências relacionadas ao translocon do SST3 foi realizada com o intuito de verificar se possíveis alterações seriam capazes de alterar a funcionalidade das proteínas codificadas por esses genes. As sequências gênicas correspondentes aos genes *espA*, *espB* e *espD* foram traduzidas e comparadas com as da amostra protótipo de tEPEC E2348/69, utilizando-se o programa Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

Posteriormente, o SMART3 foi utilizado para identificar os diferentes domínios funcionais dos genes, seguido de procura de possíveis alterações nesses sítios de mutações específicos, com o auxílio do programa SNAP2 (Bromberg e Rost, 2007).

### 3.17. Análise estatística

As diferenças observadas nos testes quantitativos de aderência foram analisadas através do software *GraphPad Prism 6*, utilizando-se teste *t* de *Student*, não pareado, bi-caudal ou *One-way* ANOVA. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando o valor de *P* for menor que o nível de significância estabelecido, isto é,  $P < 0,05$ .

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Amostras pertencentes ao sorotipo O2:H16 exibiram distintos padrões de aderência**

Para verificar quais os padrões de aderência as amostras produziam quando em contato com células epiteliais, testes de adesão foram realizados em células HeLa cultivadas *in vitro*. A amostra BA92 exibiu uma aderência formando arranjos como tijolos empilhados, característico do padrão AA, enquanto a amostra 196/16 exibiu bactérias associadas às células formando colônias bacterianas mais frouxas, característico do padrão AL-L. Curiosamente, nas amostras 407/13 e 282/14, pôde se observar, além dos clusters bacterianos mais compactos, característicos do padrão AL, bactérias aderidas à superfície da célula de forma randômica, em um arranjo que remete a organização do padrão AD. A Figura 4 exhibe os padrões de aderência observados nas amostras de aEPEC.

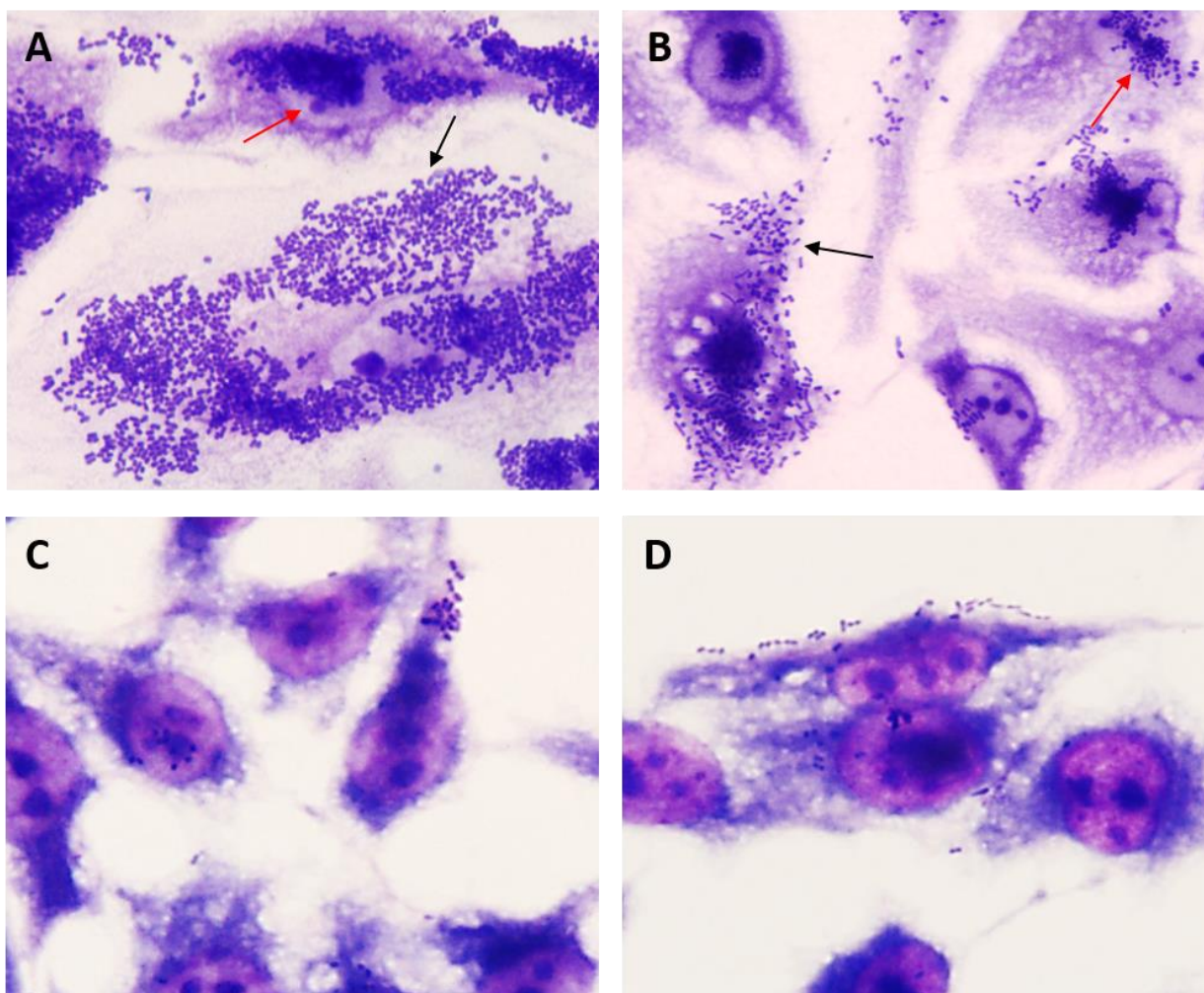


**Figura 4.** Microscopia óptica exibindo os padrões de aderência das amostras pertencentes ao sorotipo O2:H16, em células HeLa cultivadas *in vitro*. O padrão híbrido AL/AD está presente nas amostras 407/13 (A) e 282/14 (B), enquanto os padrões AL-L e AA podem ser observados nas amostras 196/16 (C) e BA92 (D), respectivamente. Setas em vermelho indicam a presença de clusters bacterianos compactos, característicos do padrão AL, enquanto setas pretas indicam um espalhamento semelhante ao observado no padrão AD. Aumento final de 1.000x.

#### **4.2. As amostras de aEPEC aderem eficientemente a diferentes linhagens celulares, independentemente do padrão de aderência**

Apesar das diferenças fenotípicas observadas na interação dessas amostras com células HeLa, ensaios quantitativos de aderência utilizando a mesma linhagem celular demonstraram que

todas as amostras estudadas exibiram uma eficiência semelhante no potencial de interação com as células epiteliais, não havendo diferença estatística entre eles (Figura 5).

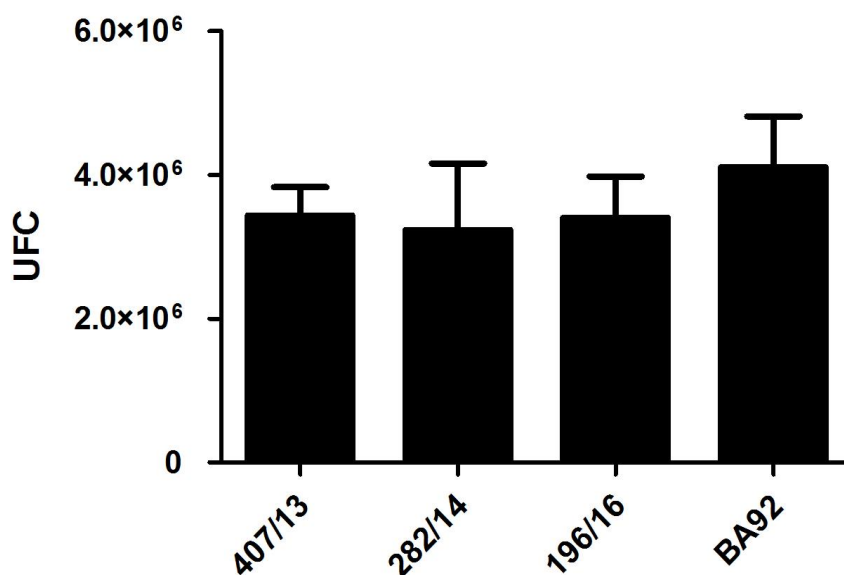


**Figura 5.** Dados quantitativos de aderência em células HeLa, demonstrando semelhança no potencial de interação com células HeLa nas amostras estudadas.

#### **4.3. Parte das amostras de aEPEC demonstraram potencial de invadir células intestinais polarizadas e diferenciadas *in vitro***

Além dos testes quantitativos de adesão, o potencial das amostras em invadir células intestinais também foi analisado. Os números de células bacterianas internalizadas de cada amostra foram comparados aos números obtidos com os controles para invasão utilizados. Apenas as amostras 282/14 e 196/16 apresentaram diferença estatística significativa ( $P > 0,05$ ), quando comparados com a amostra não invasora 1551-2 *eae::Km* ( $P < 0,05$ ), tendo portanto, seu potencial de invadir células intestinais evidenciado (Figura 6).

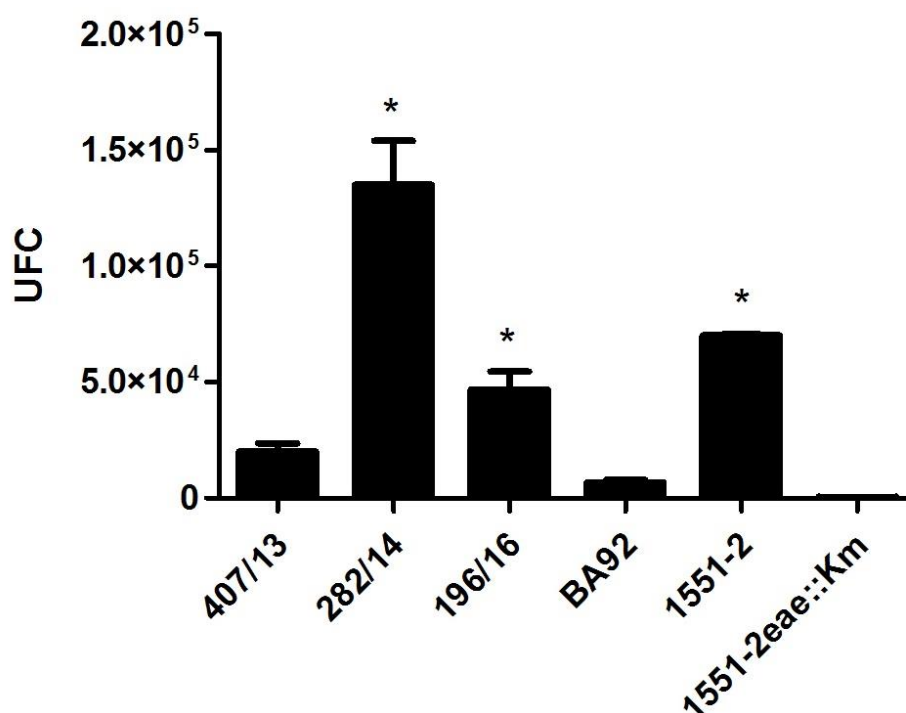


**Figura 6.** Dados quantitativos dos testes de invasão realizados em células Caco-2 polarizadas e diferenciadas. (\*) Indica diferença estatística das amostras 282/14, 196/16 e 1551-2 (controle positivo), quando comparados à amostra não invasora 1551-2 *eae::Km* ( $P < 0,05$ ).

#### 4.4. Todos as amostras testadas apresentam potencial de induzir acúmulo de filamentos de actina no sítio de aderência bacteriano

Após caracterização sobre os padrões de aderência e potencial das amostras em aderirem e invadirem linhagens celulares, seu potencial de induzir a lesão AE nas células epiteliais também foi avaliado, por meio do teste de FAS. Todas as amostras testadas foram capazes de promover o acúmulo de F-actina no sítio de aderência bacteriano, indicando, de forma indireta, o potencial dessas amostras em induzir a lesão AE nas células epiteliais infectadas (Figura 7).

**DAPI**

**FAS**

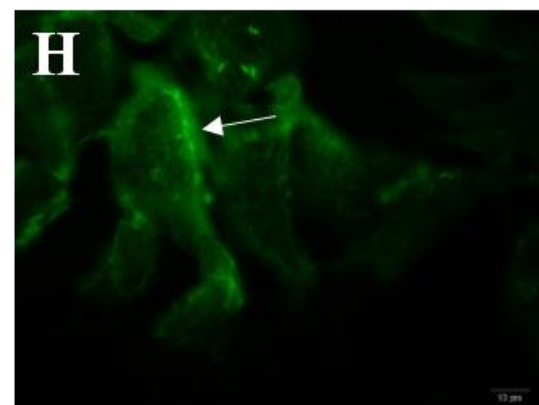
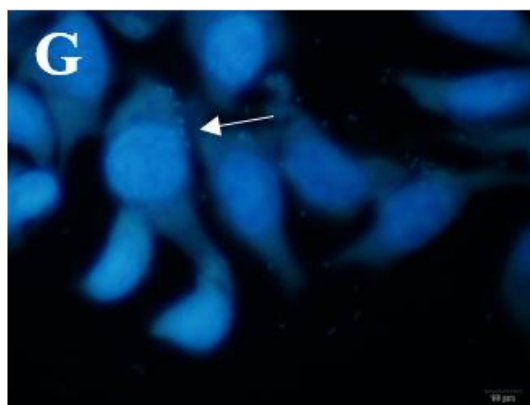
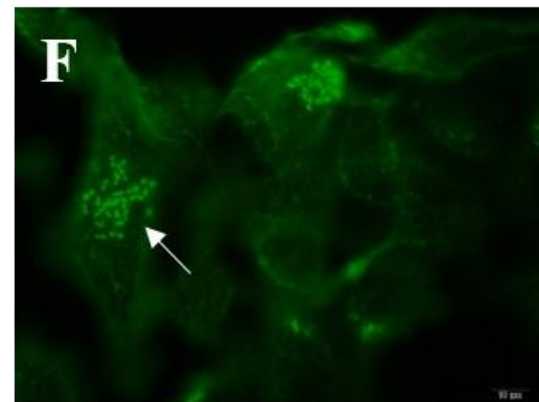
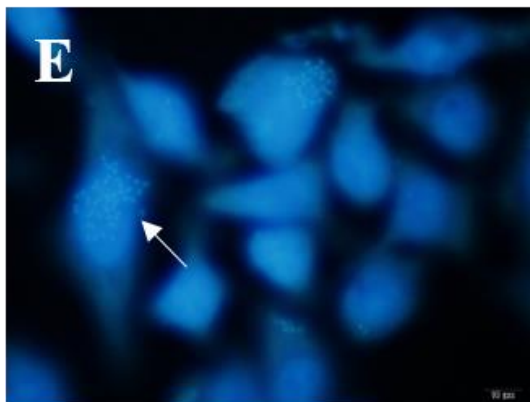
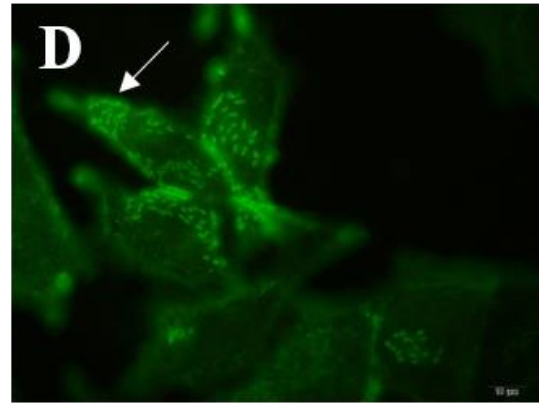
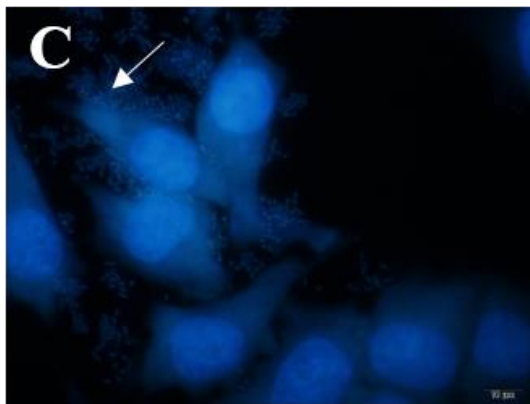
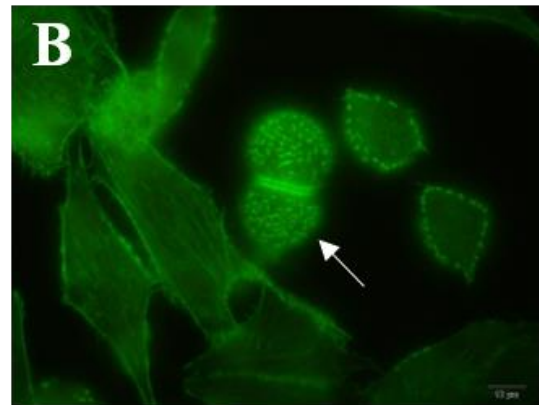
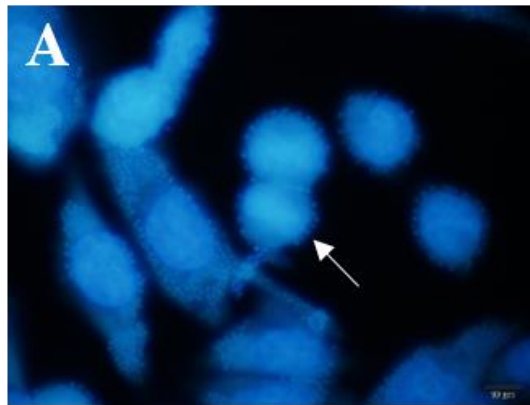


**Figura 7.** Microscopia de fluorescência exibindo os resultados obtidos no teste de FAS. Em azul observa-se o DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride), marcando ácidos nucleicos e, em verde, a faloidina marcando os filamentos de F-actina. O padrão AL/AD está representado pelas amostras 407/13 (A) e 282/14 (E), enquanto os padrões AL e AA são representados pelas amostras 196/16 (C) e BA92 (G), respectivamente. As setas indicam o acúmulo de F-actina no sítio de aderência bacteriano. Aumento final de 1000 x.

Os padrões de aderência, bem como o potencial de cada amostra em induzir a lesão AE, estão resumidos na Tabela 4.

**Tabela 4.** Padrões de aderência e potencial de induzir acúmulo de actina das amostras pertencentes aos sorotipos O2:H16

| Amostras       | Padrão de aderência | FAS | Número de amostras |
|----------------|---------------------|-----|--------------------|
| 407/13, 282/14 | AL/AD               | +   | 2                  |
| 196/16         | AL-L                | +   | 1                  |
| BA92           | AA                  | +   | 1                  |

#### 4.5. Amostras de aEPEC estudadas albergam genes responsáveis por codificar estruturas adesivas

Uma busca pelos principais genes responsáveis por codificar proteínas com provável função de adesinas também foi realizada. Essa análise revelou que, além da adesina intimina, codificada pelo gene *eae* do subtipo  $\beta 1$ , todas as amostras apresentaram os genes responsáveis por codificar as adesinas fimbriais da família chaperone-usher: fimbria do tipo I (*fimH*), *E. coli* common pilus (*ecpA*), *E. coli* laminin binding fimbriae (*elfA*); a fimbria do tipo IV: Hemorrhagic *coli* pilus (*hcpA*); as adesinas autotransportadoras: EHEC autotransporter encoding gene (*ehaC* e *ehaD*), Factor adherence *E. coli* (*fdeC/eaeH*) e Curli (*csgB*); além da adesina EHEC factor for adherence (*efa1/lifA*) (Tabela 5). A amostra BA92, além dos genes previamente descritos acima, também apresentou o gene *pilS*<sub>Ec404/03</sub>, associado a produção de fímbrias tipo IV Pil.

**Tabela 5.** Genes responsáveis por codificar estruturas bacterianas adesivas nas amostras de aEPEC do sorotipo O2:H16

| Adesinas                                                     | Genes            | Número de acesso | Amostras |        |        |      |
|--------------------------------------------------------------|------------------|------------------|----------|--------|--------|------|
|                                                              |                  |                  | 407/13   | 282/14 | 196/16 | BA92 |
| Adesinas Afa/Dr                                              | <i>daaE</i>      | AAA23661.1       | -        | -      | -      | -    |
|                                                              | <i>draE</i>      | AAK16480.1       | -        | -      | -      | -    |
|                                                              | <i>dra2E</i>     | AAB65153.1       | -        | -      | -      | -    |
|                                                              | <i>afaE1</i>     | CAA48941.1       | -        | -      | -      | -    |
|                                                              | <i>afaE2</i>     | CAA59767.1       | -        | -      | -      | -    |
|                                                              | <i>afaE3</i>     | CAA48847.1       | -        | -      | -      | -    |
|                                                              | <i>afaE5</i>     | CAA62863.1       | -        | -      | -      | -    |
|                                                              | <i>afaE7</i>     | AAD44028.1       | -        | -      | -      | -    |
|                                                              | <i>afaE8</i>     | AAD44024.1       | -        | -      | -      | -    |
| EHEC factor for adherence                                    | <i>efa1/lifA</i> | CAS10782.1       | +        | +      | +      | +    |
| Adesinas autotransportadoras                                 | <i>aidA</i>      | EII49574.1       | -        | -      | -      | -    |
|                                                              | <i>cah</i>       | AAG55356.1       | -        | -      | -      | -    |
|                                                              | <i>ehaA</i>      | AAG54657.1       | -        | -      | -      | -    |
|                                                              | <i>ehaB</i>      | AAG54720.1       | -        | -      | -      | -    |
|                                                              | <i>ehaC</i>      | AAG57362.1       | +        | +      | +      | +    |
|                                                              | <i>ehaD</i>      | AAG57760.1       | +        | +      | +      | +    |
|                                                              | <i>ehaJ</i>      | WP_001082402.1   | -        | -      | -      | -    |
|                                                              | <i>agn43</i>     | YP_026164.1      | -        | -      | -      | -    |
| Factor adherence <i>E. coli</i> (FdeC)                       | <i>eaeH</i>      | ADE88959.1       | +        | +      | +      | +    |
| Immuno-globulin-binding protein G                            | <i>eibG</i>      | BAF32938.1       | -        | -      | -      | -    |
| <i>Vibrio cholerae</i> IrgA homologue adhesin (Iha)          | <i>iha</i>       | AAF36432.2       | -        | -      | -      | -    |
| Porcine attaching and effacing-associated (Paa) adhesion     | <i>paa</i>       | AAB48445.4       | -        | -      | -      | -    |
| STEC autoagglutinating adhesin (Saa)                         | <i>saa</i>       | AAZ76520.1       | -        | -      | -      | -    |
| STEC autotransporter contributing to biofilm formation (Sab) | <i>sab</i>       | YP_308797.1      | -        | -      | -      | -    |
| ToxB                                                         | <i>toxB</i>      | NP_052665.1      | -        | -      | -      | -    |
| Aggregative adherence fimbriae (AAF) – AAF/I                 | <i>aggA</i>      | AAA57454.1       | -        | -      | -      | -    |
| AAF/II                                                       | <i>aafA</i>      | AAB82330.1       | -        | -      | -      | -    |
| AAF/III                                                      | <i>agg3A</i>     | AAM88298.1       | -        | -      | -      | -    |
| AAF/IV                                                       | <i>hdaA</i>      | ACF05260.1       | -        | -      | -      | -    |
| AAF/V                                                        | <i>agg5A</i>     | KP202151.1       | -        | -      | -      | -    |
| Curli                                                        | <i>csgB</i>      | CAS08680.1       | +        | +      | +      | +    |
| <i>E. coli</i> common pilus (ECP)                            | <i>ecpA</i>      | CAS07797.1       | +        | +      | +      | +    |
| Type 1 pilus (T1P)                                           | <i>fimH</i>      | CAS12175.1       | +        | +      | +      | +    |
| Locus for diffuse adherence (LDA)                            | <i>ldaH</i>      | AAX78190.1       | -        | -      | -      | -    |

|                                               |                    |            |   |   |   |   |
|-----------------------------------------------|--------------------|------------|---|---|---|---|
| Long Polar Fimbriae (LPF)                     | <i>lpfA1.1</i>     | CAS11346.1 | - | - | - | - |
|                                               | <i>lpfA1.2</i>     | AAO22843.1 | - | - | - | - |
|                                               | <i>lpfA1.3</i>     | AAG58695.1 | - | - | - | - |
|                                               | <i>lpfA2.1</i>     | AAL18161.1 | - | - | - | - |
|                                               | <i>lpfA2.2</i>     | AAG58930.1 | - | - | - | - |
| Hemorrhagic <i>coli</i> pilus (HCP)           | <i>hcpA</i>        | AAG54412.1 | + | + | + | + |
| <i>E. coli</i> laminin binding fimbriae (ELF) | <i>elfA</i>        | AAG55423.1 | + | + | + | + |
| Bundle-forming pilus (BFP)                    | <i>bfpA</i>        | CAS07441.1 | - | - | - | - |
| type IV fimbriae Pil                          | <i>pilS</i> -C1096 | AAT94194.1 | - | - | - | - |
|                                               | <i>pilS</i> -O119  | BAU62233.1 | - | - | - | + |
|                                               | <i>pilS</i> -O113  | AAL05523.1 | - | - | - | - |
| Sorbitol-fermenting EHEC O157 fimbriae (Sfp)  | <i>sfpA</i>        | AAR00401.1 | - | - | - | - |

#### 4.6. Amostras de aEPEC do sorotipo O2:H16 produzem fímbria do tipo I

As amostras do presente estudo foram testadas indiretamente, por aglutinação com *Saccharomyces boulardii*, quanto a produção de fímbria tipo I. As 4 amostras estudadas foram capazes de aglutinar na presença de leveduras indicando a produção dessa fímbria. A Figura 8 ilustra os testes de aglutinação realizados.

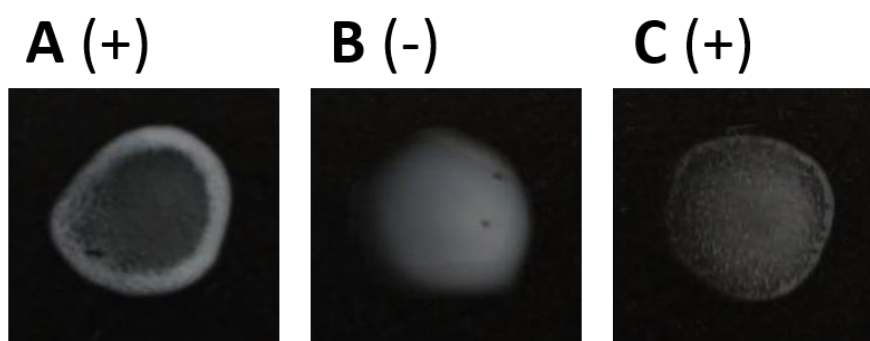


**Figura 8.** Teste de aglutinação com *Saccharomyces boulardii*. Na imagem, observa-se o resultado do teste de aglutinação realizado com a amostra 282/14 (A), uma amostra de *E. albertii* mutada no gene *fimA* (1551-2Δ*fimA*), e portanto, não produtora da fímbria do tipo I (B), além do protótipo de tEPEC E2348/69 (C), utilizado como controle positivo. Observa-se que a amostra 282/14 e a amostra E2348/69 foram capazes de aglutinar *Saccharomyces boulardii* *in vitro*.

#### 4.7. Fímbria do tipo I altera padrão híbrido AL/AD da amostra 282/14 do sorotipo O2:H16

Como as amostras pertencentes ao sorotipo O2:H16 mostraram-se capazes de produzir fímbria do tipo I, testes de adesão em células HeLa foram realizados tanto na presença quanto na ausência de D-manopiranosídeo. Como esse açúcar possui sítios de ligação com as fímbrias tipo I, ele normalmente é utilizado nos testes de adesão para inibir a ação dessas fímbrias, possibilitando uma classificação do padrão de adesão produzido pela bactéria.

Os testes de adesão sem D-manopiranosídeo foram realizados com a amostra 282/14, produtora do padrão de adesão híbrido de aderência AL/AD, com o intuito de investigar se essa fímbria poderia influenciar na produção desse padrão de adesão. Os ensaios revelaram um espalhamento considerável, diferente do visto anteriormente em ensaios realizados na presença de açúcar, com bactérias aderindo preferencialmente sobre o vidro, em um arranjo que remete ao padrão AA, produzido por amostras de EAEC.

Padrões de aderência observados em testes realizados com e sem a presença de D-manopiranosídeo podem ser observados na Figura 9.

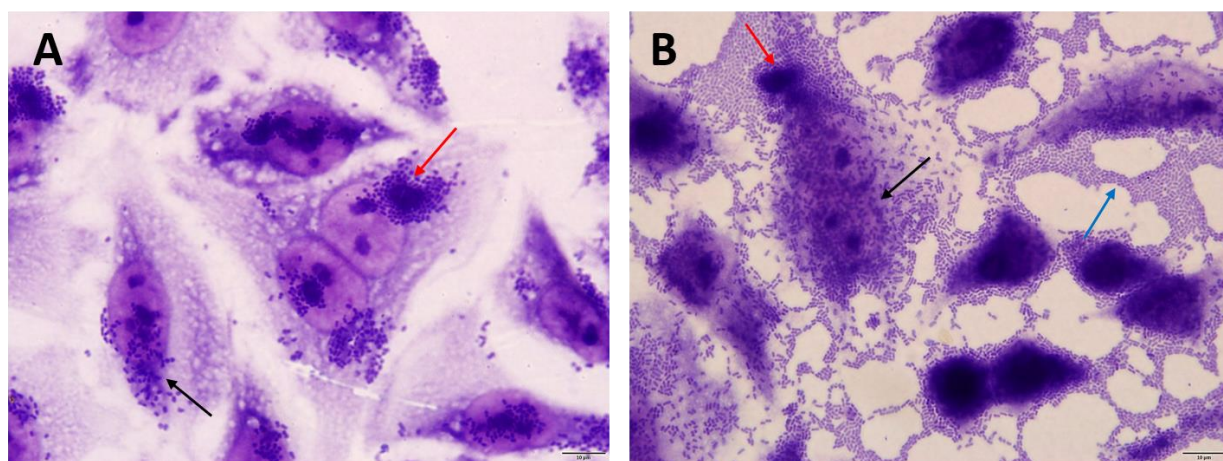


**Figura 9.** Padrões de aderência produzidos pela amostra 282/14 na presença (A) e ausência de D-manopiranosídeo (B). Pode se observar um aumento expressivo do espalhamento bacteriano no teste realizado na ausência de D-manopiranosídeo. Setas pretas indicam a presença do espalhamento semelhante ao observado na aderência difusa (AD), setas vermelhas indicam a formação de cluster compactos, observados no padrão AL, enquanto a seta azul indica um espalhamento com bactérias aderidas preferencialmente sobre o vidro, característico do padrão

AA, que não era anteriormente observado em testes realizados na presença de D-manopiranosídeo.

#### 4.8. A análise do perfil plasmidial revelou a presença de pelo menos dois plasmídeos de alto peso molecular nas amostras estudadas

Como muitos genes responsáveis por codificar adesinas estão localizados em plasmídeos, um dos objetivos do presente estudo foi avaliar a ocorrência de plasmídeos em amostras do sorotipo O2:H16, bem como verificar se esses plasmídeos poderiam ser transferidos, por conjugação, para uma amostra de *E. coli* não aderente. Embora a amostra BA92 apresente plasmídeos com diferentes pesos moleculares, todos as amostras estudadas exibiram a presença de pelo menos dois plasmídeos de alto peso molecular, com potencial para transportar a região *tra*, que alberga genes de transferência plasmidial (Figura 10).

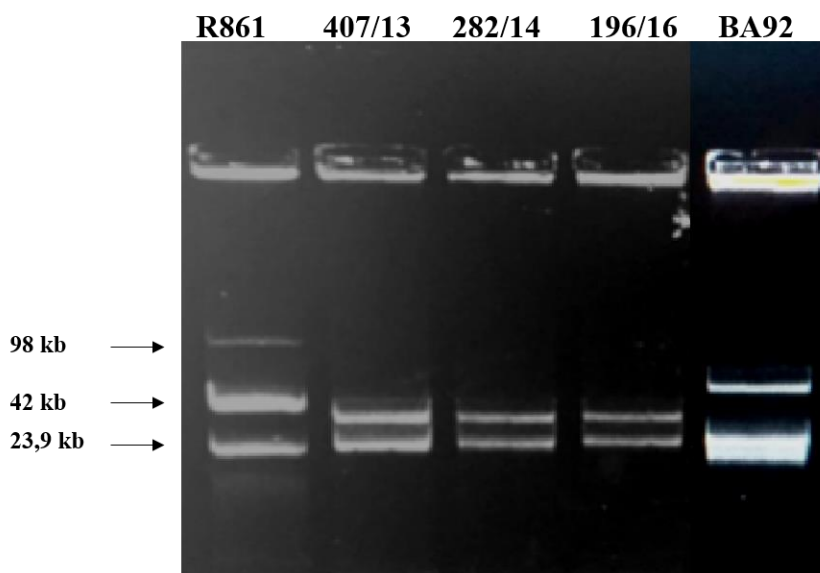


**Figura 10.** Gel de agarose resultante do experimento de perfil plasmidial, evidenciando a presença de pelo menos duas bandas plasmidiais de alto peso molecular em cada amostra. A amostra de *E. coli* 39 R861 foi utilizada como marcador de massa molecular.

Dessa forma, ensaios de conjugação foram realizados com as amostras produtoras dos padrões híbridos de aderência AL/AD (407/13 e 282/14) para verificar se alguma potencial

adesina, que pudesse estar mediando esse padrão, estaria localizada nesses plasmídeos. Dessa forma, a amostra de *E. coli* MA3456, incapaz de aderir às células epiteliais, passaria a ter potencial de interagir com as linhagens celulares testadas. Contudo, após muitas tentativas de conjugação terem sido realizadas, nenhum transconjugante foi obtido, provavelmente indicando que esses plasmídeos possam apresentar alguma deleção na região de transferência (*tra*) e não sejam passíveis de conjugação.

#### **4.9. Identificação de mutantes aleatórios deficientes na interação com células HeLa**

Com o intuito de identificar se outras adesinas, além da Intimina, poderiam influenciar a produção do padrão de aderência híbrido AL/AD, uma técnica de mutagênese baseada na inserção aleatória de um transposon no genoma bacteriano foi utilizada para gerar uma biblioteca de mutantes não aderentes ou menos aderentes. A amostra 282/14 foi utilizada para realização desses experimentos e um total de 320 mutantes, provenientes de dois distintos eventos de mutagênese, foram gerados e avaliados, sendo que 9 deles apresentaram uma diminuição considerável em sua capacidade de interagir com as células HeLa, ou se tornaram não aderentes. Os padrões de adesão dos mutantes em questão são exibidos na Figura 11.

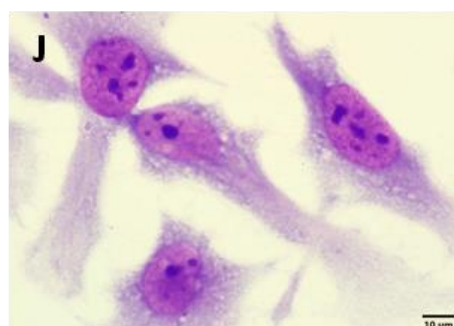
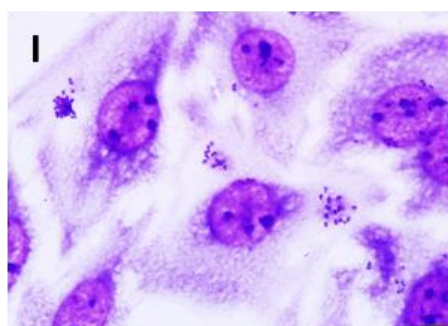
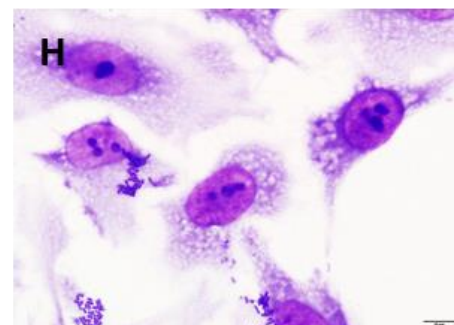
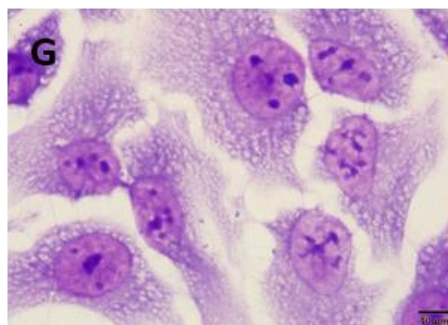
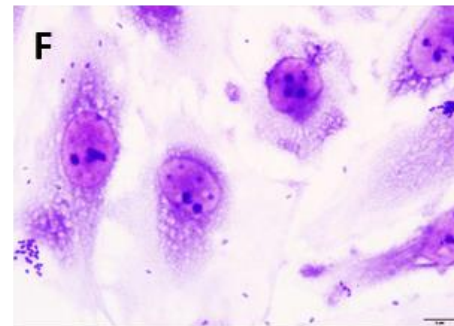
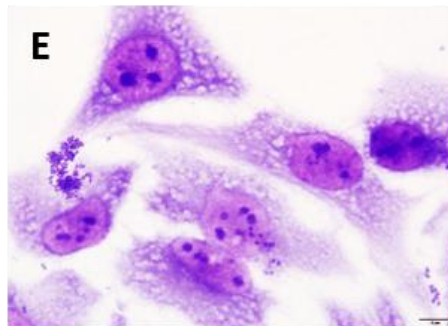
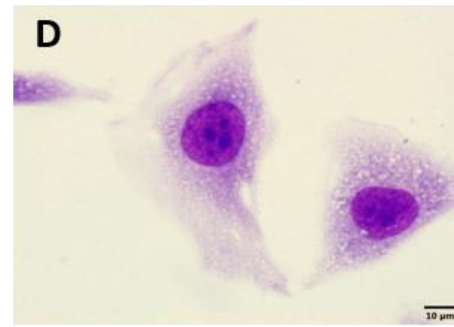
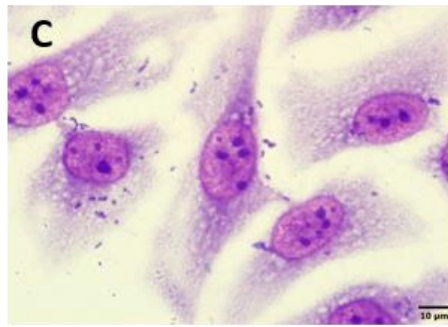
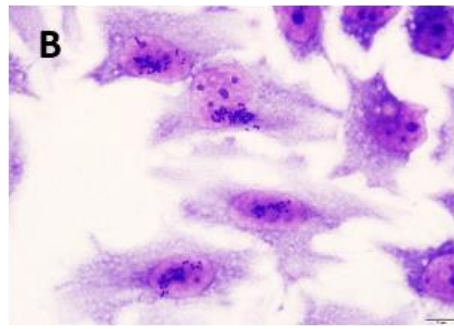
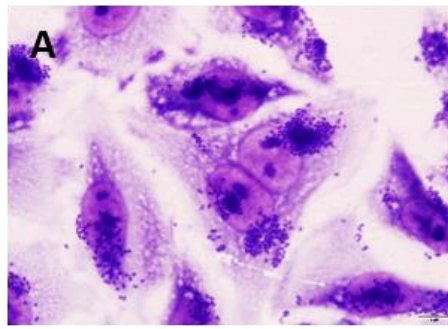


**Figura 11.** Padrões de aderência da amostra selvagem 282/14 (A) e seus respectivos mutantes M1 (B), M232 (C), M236 (D), M246 (E), M259 (F), M265 (G), M276 (H), M277 (I) e M289 (J). Observa-se que os mutantes M1, M246, M259, M276 e M277 apresentaram uma redução no número de bactérias associadas às células HeLa, havendo somente a presença de bactérias aderidas de forma esporádica, enquanto os outros mutantes não foram capazes de aderir às células epiteliais.

Uma curva de crescimento foi feita nas mesmas condições em que os testes de aderência com células HeLa são rotineiramente realizados, e que o padrão de aderência híbrido AL/AD foi identificado, de forma a verificar a capacidade de multiplicação dos mutantes gerados. Os resultados da curva de crescimento mostraram que dentre os 9 mutantes testados, apenas um (M1) foi deficiente na sua capacidade de se multiplicar de forma semelhante a amostra selvagem ( $P=0,003$ ) (Figura 12) e, portanto, descartado das etapas futuras do presente estudo.

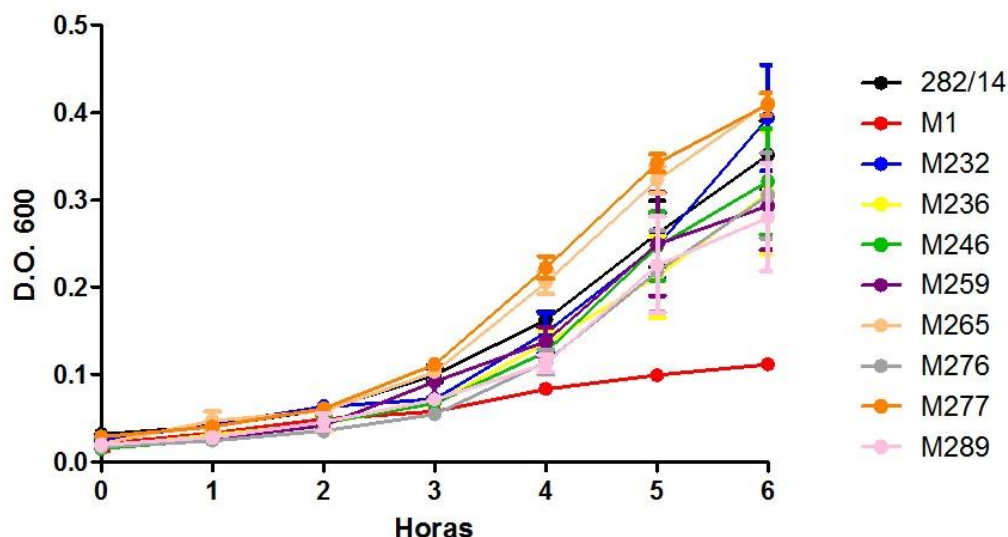


**Figura 12.** Curva de crescimento dos mutantes Tn5 gerados a partir de mutagênese aleatória e da amostra selvagem, 282/14. Pode-se observar que apenas o mutante M1 foi incapaz de crescer de forma semelhante à amostra selvagem.

Dessa forma, os 8 mutantes restantes tiveram os pontos de inserção do transposon Tn5 sequenciados, seguido de identificação dos genes truncados. Os dados obtidos estão descritos na Tabela 6.

**Tabela 6.** Sítios de inserção do transposon no genoma bacteriano da amostra 282/14.

| <b>Mutante</b> | <b>Fenótipo adesivo</b> | <b>Inserção</b>                 | <b>Função</b>                            | <b>Evento</b> |
|----------------|-------------------------|---------------------------------|------------------------------------------|---------------|
| <b>M232</b>    | NA                      | LEE ( <i>tir</i> )              | Receptor da Intimina                     | 2             |
| <b>M236</b>    | NA                      | LEE ( <i>escV</i> )             | Componente do SST3                       | 2             |
| <b>M246</b>    | AL-L                    | Entre <i>rpsB</i> e <i>map</i>  | Desconhecida                             | 2             |
| <b>M259</b>    | ND                      | Entre <i>acrB</i> e <i>tomB</i> | Desconhecida                             | 2             |
| <b>M265</b>    | NA                      | LEE ( <i>grlR</i> )             | Regulador transcricional negativo de LEE | 2             |
| <b>M276</b>    | ND                      | <i>yebC</i>                     | Regulador transcricional                 | 2             |
| <b>M277</b>    | AL-L                    | <i>ahpF</i>                     | Proteção contra danos ao DNA             | 2             |
| <b>M289</b>    | NA                      | LEE ( <i>escV</i> )             | Componente do SST3                       | 2             |

ND: Padrão de aderência não determinado. NA: Não aderente.

Dentre os pontos de inserção obtidos, pôde-se observar que quatro mutantes tiveram genes pertencentes à região LEE truncados, sendo eles *tir*, que codifica o receptor translocado da adesina intimina, *escV* que codifica um componente do SST3, ou até mesmo *grlR*, um regulador transcricional de LEE, podendo inferir-se assim que essas proteínas desempenham importantes papéis no estabelecimento do fenótipo adesivo da amostra 282/14.

#### **4.10. Avaliação comparativa dos mutantes nos genes *eae* e *escN*, e seus respectivos complementados, com a amostra selvagem 282/14**

Com base nos resultados de mutagênese aleatória, anteriormente obtidos, mutantes em genes selecionados da região LEE, como *eae* e *escN*, e respectivas amostras complementadas, foram construídos com o intuito de endossar o papel da adesina Intimina, do translocon do SST3, bem como da interação Intimina-Tir na formação do padrão híbrido AL/AD.

Após os eventos de eletroporação, reações de PCR para os genes *eae* e *escN* foram realizadas com o intuito de averiguar a presença dos genes em questão. Os géis, exibindo as bandas referentes à amplificação dos genes *eae* e *escN*, podem ser observados nas Figuras 13 e 14, respectivamente.

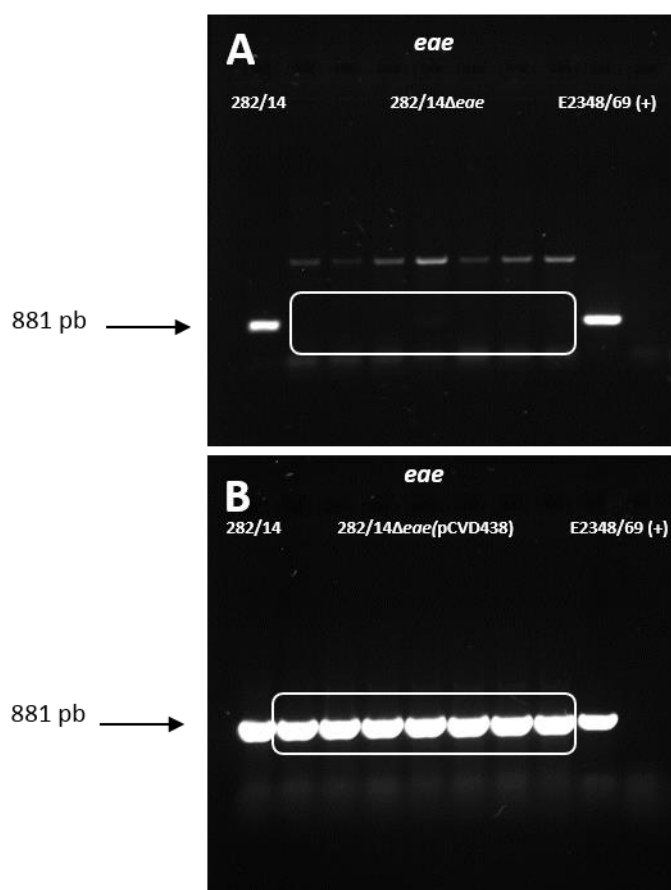


**Figura 13.** Géis de agarose exibindo a ausência do gene *eae* nos mutantes construídos (A) e posterior amplificação para as amostras complementadas (B).

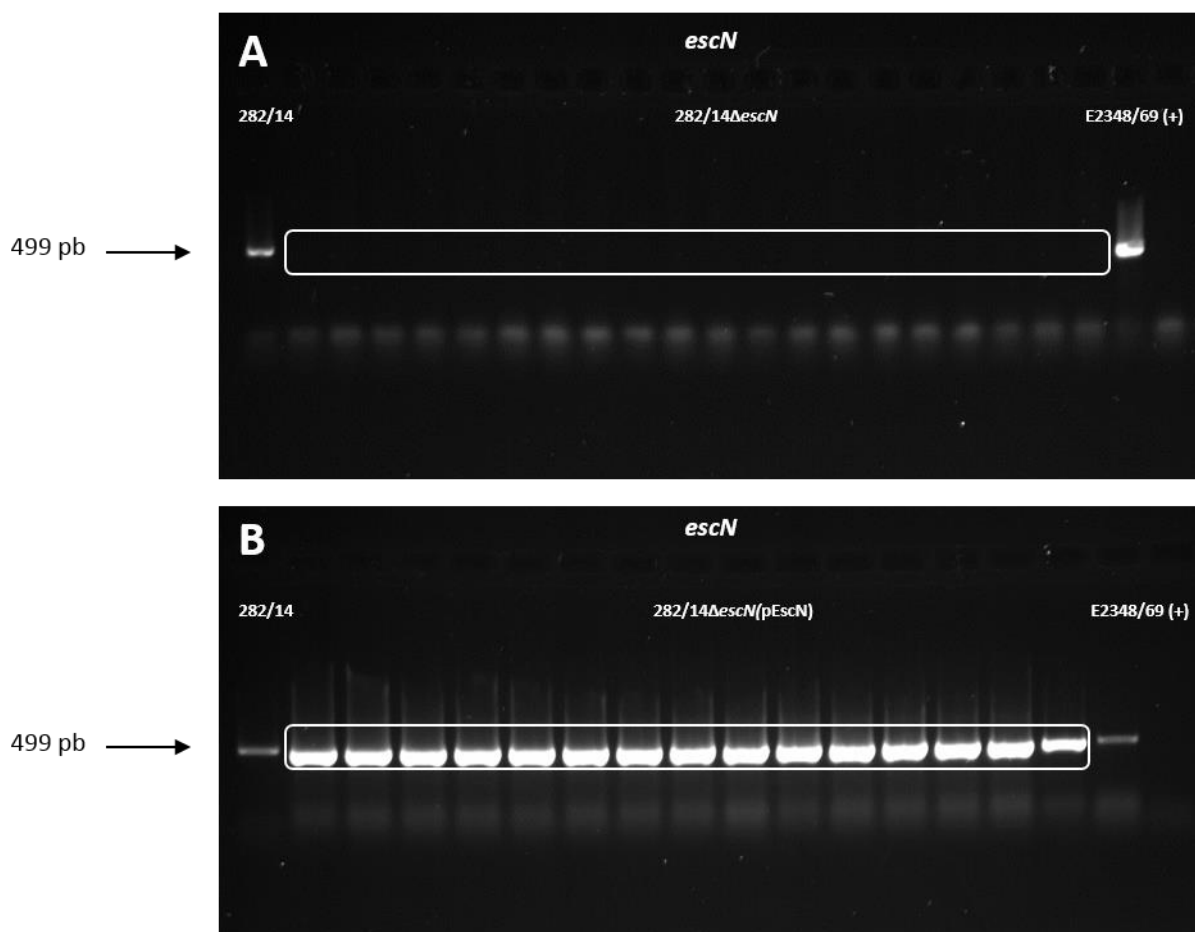


**Figura 14.** Géis de agarose demonstrando a ausência das bandas referentes à amplificação do gene *escN* (A) e sua presença nas amostras complementadas (B).

Tendo confirmado a deleção dos genes de interesse e posterior complementação dos mutantes, curvas de crescimento também foram realizadas com os mutantes obtidos e respectivas amostras complementadas, com o intuito de verificar sua capacidade de multiplicação em DMEM. Todos as amostras mostraram-se capazes de se multiplicar de forma semelhante à amostra selvagem ( $P > 0,05$ ), estando, portanto, aptos para as próximas etapas desse estudo (Figura 15).

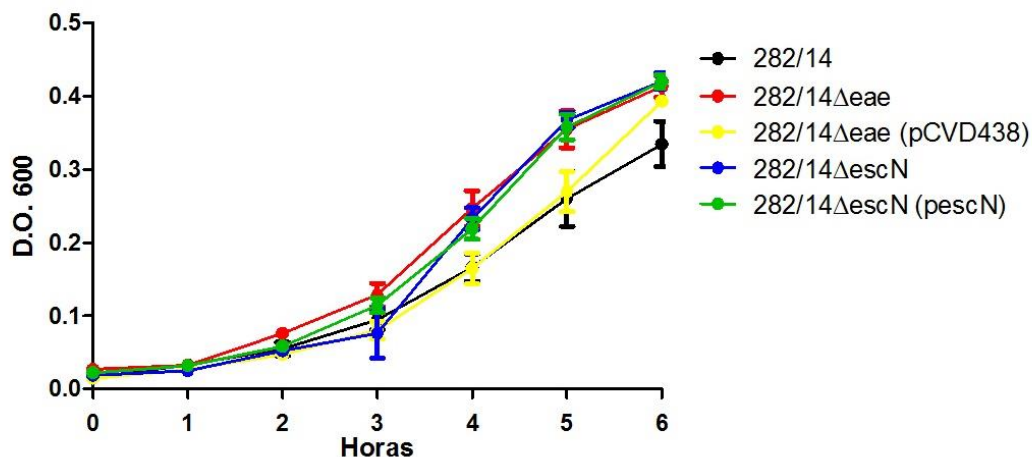


**Figura 15.** Curva de crescimento dos mutantes gerados a partir do sistema Lambda Red com a amostra 282/14. Todas as amostras, tanto mutantes como complementados, não apresentam diferenças estatisticamente significantes quando comparados à amostra selvagem.

#### 4.11. A interação Intimina-Tir é importante para o estabelecimento do fenótipo AL/AD na amostra de aEPEC 282/14, pertencente ao sorotipo O2:H16

Os mutantes construídos foram então testados com o intuito de confirmar a contribuição das estruturas deletadas na formação do padrão AL/AD. O mutante no gene *eae* teve suas propriedades adesivas testadas em ensaios qualitativos e quantitativos de aderência, em células HeLa cultivadas *in vitro*. Essa mutação causou uma redução de 82,0% no número de bactérias capazes de interagir com células epiteliais ( $P < 0,0001$ ) (Figura 16). Como o mutante mostrou uma diminuição estatisticamente significativa no número de bactérias associadas às células epiteliais ( $P < 0,0001$ ), quando comparado à amostra selvagem, a complementação foi realizada com a inserção do plasmídeo pCVD438, que alberga o gene *eae* da amostra protótipo de tEPEC E2348/69 (Donnenberg and Kaper, 1991). A complementação *in trans* não somente restaurou o potencial de aderência dessa amostra, como também a capacidade de produzir o padrão híbrido AL/AD (Figura 16).

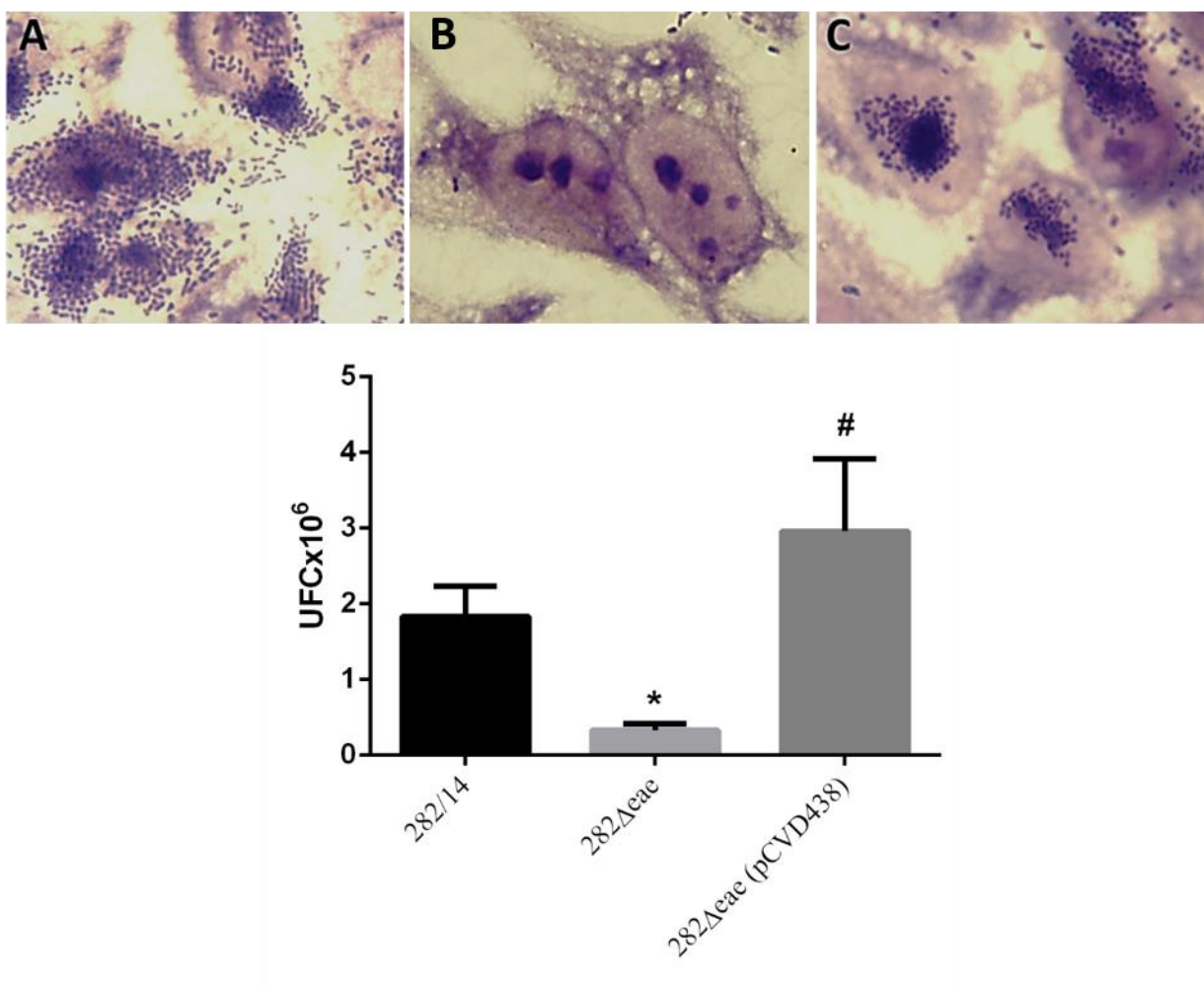


**Figura 16.** Padrão de aderência da amostra selvagem de aEPEC 282/14 (A), do mutante isogênico no gene *eae* (B) e da amostra complementada (C), bem como dados de experimentos quantitativos da interação dessas três amostras com células HeLa (D). Nota-se que a amostra 282/14Δ*escN* apresentou uma drástica redução na sua capacidade de interagir com células HeLa, não sendo capaz de formar o padrão híbrido AL/AD. (\*) indica diferença estatística entre as amostras 282/14 e 282/14Δ*eae* ( $P < 0,0001$ ), enquanto (#) indica diferença estatística entre o mutante 282/14Δ*eae* e a amostra complementada com o plasmídeo pCVD438 ( $P < 0,0001$ ). Não foi encontrada diferença estatística entre a amostra 282/14 e o mutante complementado ( $P = 0,1084$ ).

De forma semelhante ao observado nos resultados acima descritos, a mutação no gene *escN*, que impossibilita a montagem do SST3 e consequentemente a translocação do receptor da

adesina intimina (Tir) para a célula hospedeira, causou uma diminuição de aproximadamente 74,3% no número de bactérias aderidas às células (p=0,0002), com uma abolição do padrão de aderência AL/AD, em ensaios com células HeLa. Diante desses resultados, a complementação desse mutante foi realizada com o plasmídio pEscN, que alberga o gene *escN* da amostra protótipo de tEPEC E2348/69 (Gauthier et al., 2003). O mutante complementado recuperou a capacidade de interagir com as células HeLa, bem como o fenótipo adesivo AL/AD (Figura 17).

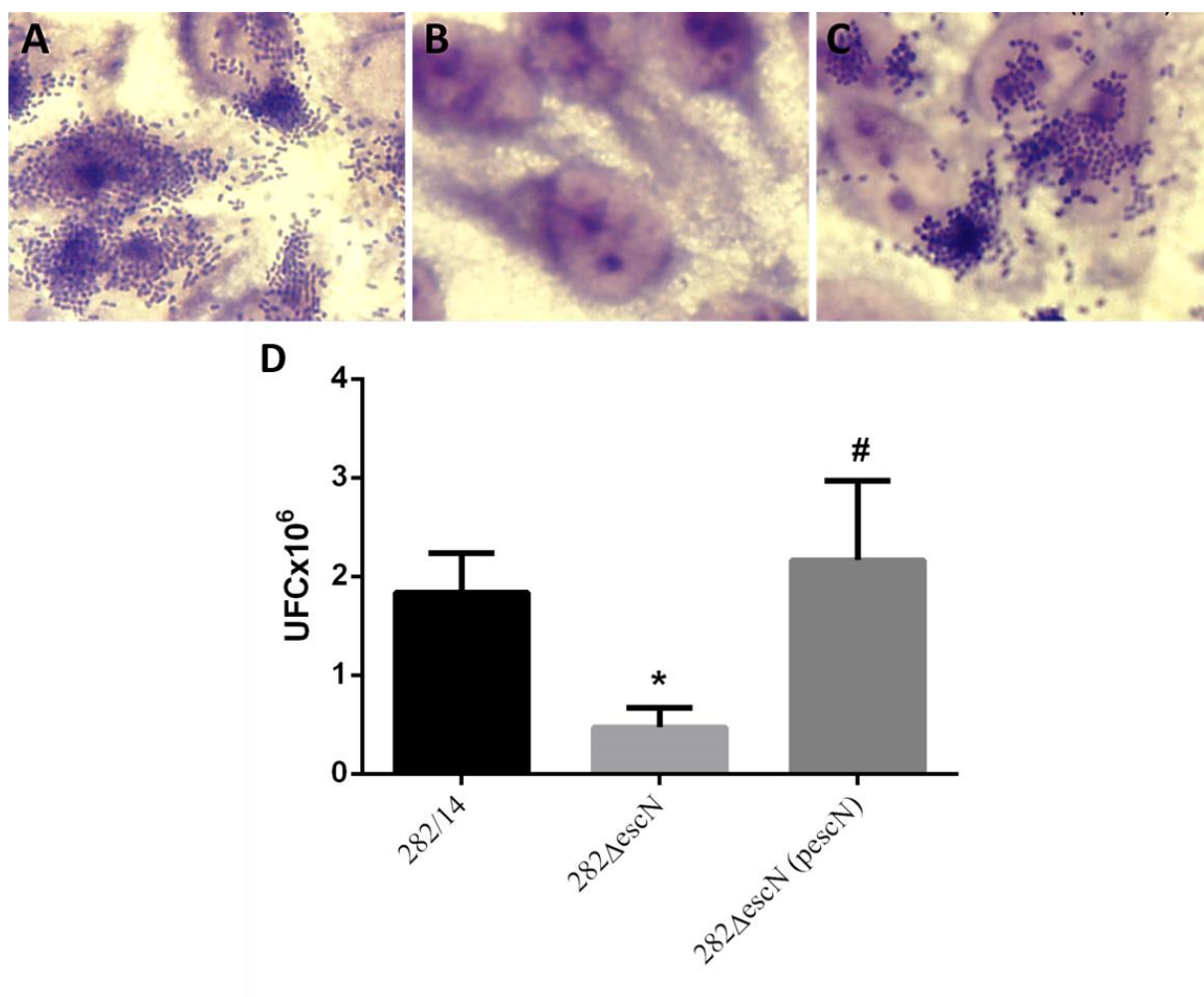


**Figura 17.** Padrões de aderência da amostra selvagem de aEPEC 282/14 (A), do mutante isogênico no gene *escN* (B) e da amostra complementada com pEscN (C), bem como dados de experimentos quantitativos dessas três amostras (D). Nota-se que a amostra 282/14Δ*escN* apresentou uma drástica redução na sua capacidade de interagir com células HeLa, mostrando-se igualmente incapaz de produzir o padrão híbrido AL/AD. (\*) indica diferença estatística entre as amostras 282/14 e 282/14Δ*escN* ( $P=0,0002$ ), enquanto (#) indica diferença estatística entre o

mutante 282/14 $\Delta$ *escN* e a amostra complementada com o plasmídio pEscN ( $P=0,0005$ ). Não foi encontrada diferença estatística entre a amostra 282/14 e o mutante complementado ( $P=0,5286$ ).

#### **4.12. As mutações nos genes *eae* e *escN* interferem na capacidade das amostras em recrutar filamentos de actina no sítio de aderência bacteriano**

Após a certificação de que as mutações geradas influenciaram não somente o fenótipo adesivo dessa amostra, bem como sua capacidade de interagir com células epiteliais cultivadas *in vitro*, fez-se importante uma análise do potencial desses mutantes em induzir a lesão AE, através do teste de FAS, em células HeLa.

Conforme esperado, as mutações nos genes *eae* e *escN* resultaram em amostras incapazes de causar um acúmulo de F-actina da célula hospedeira no sítio de aderência bacteriano. A complementação de ambos os mutantes restaurou esse fenótipo, confirmando que as mutações foram pontuais e não interferiram com a transcrição dos outros genes presentes nos *operons* onde os genes *eae* (LEE5) e *escN* (LEE3) encontram-se localizados (Figura 18).

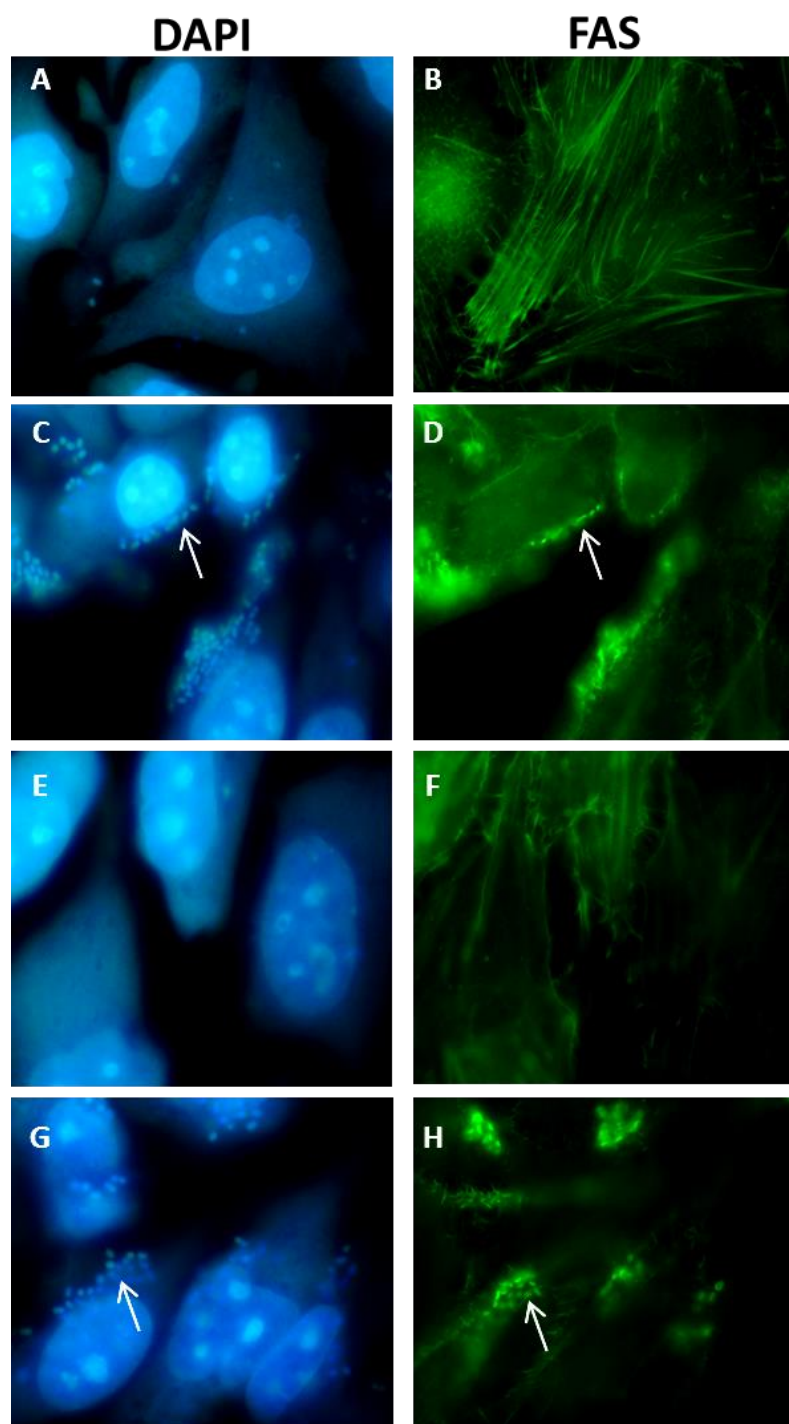


**Figura 18.** Microscopia de fluorescência para detecção do acúmulo de F-actina, no local de aderência bacteriana. O DAPI marca os ácidos nucleicos tanto das células epiteliais, como das células bacterianas, nas amostras 282/14Δeae (A), 282/14Δeae(pCVD438) (C) 282/14ΔescN (E) e 282/14ΔescN(pEscN) (G), enquanto a fluoresceína marca a actina da célula hospedeira. As setas em D e H indicam o acúmulo de F-actina no sítio de aderência bacteriano.

#### 4.13. Alinhamento múltiplo indica variabilidade entre as sequências de EspA, EspB e EspD das amostras estudadas e da amostra protótipo de tEPEC

Após análise dos resultados anteriores demonstrando a importância da interação Intimina-Tir para a adesão da amostra 282/14, buscou-se verificar se essa amostra apresentava a presença de polimorfismos específicos nos genes responsáveis por codificar as proteínas que compõem o translocon do SST3, já que esses polimorfismos poderiam ser relacionados a uma maior eficiência adesiva em uma amostra de aEPEC (Santos et al., 2019).

Um alinhamento múltiplo entre as sequências de EspA, EspB e EspD das 4 aEPEC estudados e da amostra protótipo de tEPEC E2348/69 revelou que todos as amostras pertencentes ao sorotipo O2:H16 apresentavam as sequências idênticas entre si. Regiões com a presença de polimorfismos, em relação à amostra protótipo de tEPEC E2348/69 também puderam ser visualizadas. As Figuras 19, 20 e 21 exibem os alinhamentos múltiplos nas sequências proteicas de EspA, EspB e EspD, respectivamente.

```

EspA_E2348/69      MDTSTTASVASANASTSTSMAYDLGSMKSKDDVIDLFLNKLGVFQAALLMFAYMYQAQSDLS 60
EspA_196            -----YDLGSMKDEVVQLFNKVGVFQAALLMFAYMYQAQSDLS 39
EspA_282            -----YDLGSMKDEVVQLFNKVGVFQAALLMFAYMYQAQSDLS 39
EspA_407            -----YDLGSMKDEVVQLFNKVGVFQAALLMFAYMYQAQSDLS 39
EspA_BA92           -----YDLGSMKDEVVQLFNKVGVFQAALLMFAYMYQAQSDLS 39
                    *****,:*:****:*****:*****

EspA_E2348/69      IAKFADMNEASKESTTAQKMANLVDAKIADVQSSSDKNNAKQLPDEVISYINDPRNDITI 120
EspA_196            IAKFADMNEASKESTTAQKMANLVDAKIADVQSSSDKNKKAKLPQEVIDYINDPRNDITV 99
EspA_282            IAKFADMNEASKESTTAQKMANLVDAKIADVQSSSDKNKKAKLPQEVIDYINDPRNDITV 99
EspA_407            IAKFADMNEASKESTTAQKMANLVDAKIADVQSSSDKNKKAKLPQEVIDYINDPRNDITV 99
EspA_BA92           IAKFADMNEASKESTTAQKMANLVDAKIADVQSSSDKNKKAKLPQEVIDYINDPRNDITV 99
                    *****,:*:****:*****:*****

EspA_E2348/69      SGIDNINAQLGAGDLQTVKAAISAKNNLTTTVNNSQLEIQQMSNTLNLLTSARSDMQSL 180
EspA_196            SGISDLNAELGAGDLQTVKAAISAKSNNLTTTVNNSQLEIQQMSNTLNLLTSARSDIQSL 159
EspA_282            SGISDLNAELGAGDLQTVKAAISAKSNNLTTTVNNSQLEIQQMSNTLNLLTSARSDIQSL 159
EspA_407            SGISDLNAELGAGDLQTVKAAISAKSNNLTTTVNNSQLEIQQMSNTLNLLTSARSDIQSL 159
EspA_BA92           SGISDLNAELGAGDLQTVKAAISAKSNNLTTTVNNSQLEIQQMSNTLNLLTSARSDIQSL 159
                    ***,:*:****:*****:*****:*****:*****

EspA_E2348/69      QYRTISGISL GK 192
EspA_196            QYRTISAISL GK 171
EspA_282            QYRTISAISL GK 171
EspA_407            QYRTISAISL GK 171
EspA_BA92           QYRTISAISL GK 171
                    ***** *****

```



propriedades fracamente similares e; (-) indica a ocorrência de gaps. As cores indicam as propriedades dos aminoácidos: (Vermelho) pequenos, hidrofóbicos e aromáticos, exceto Y; (Azul) ácidos, (Magenta) básicos, exceto H; (Verde) com grupamentos hidroxil, sulfidril e amina, e G.

```

EspD_E2348/69      MLNVNNDIQSVRSGASAAATATSGINQSEVTSALDLQLVKSTAPSASWTESTALPTPPAGH 60
EspD_282           MLNVNNDIQSMRSGASAAATATSGINQPEVTSALDLQLVKSTAPSASWTESTALPTPPAGH 60
EspD_196           MLNVNNDIQSMRSGASAAATATSGINQPEVTSALDLQLVKSTAPSASWTESTALPTPPAGH 60
EspD_BA92          MLNVNNDIQSMRSGASAAATATSGINQPEVTSALDLQLVKSTAPSASWTESTALPTPPAGH 60
EspD_407           MLNVNNDIQSMRSGASAAATATSGINQPEVTSALDLQLVKSTAPSASWTESTALPTPPAGH 60
*****

EspD_E2348/69      SLVTPSAAEDVLSKLFGGISGEVTSRTEGTEPQRSTQNASSGYPYLSQVNNVDPQAMMM 120
EspD_282           SLVTPSVAEDVLSKLFGGISGEVRSRTEGTEPQRSTQNASSGYPYLSQVNNVDPQAMMM 120
EspD_196           SLVTPSVAEDVLSKLFGGISGEVRSRTEGTEPQRSTQNASSGYPYLSQVNNVDPQAMMM 120
EspD_BA92          SLVTPSVAEDVLSKLFGGISGEVRSRTEGTEPQRSTQNASSGYPYLSQVNNVDPQAMMM 120
EspD_407           SLVTPSVAEDVLSKLFGGISGEVRSRTEGTEPQRSTQNASSGYPYLSQVNNVDPQAMMM 120
*****

EspD_E2348/69      ATLLSLDASAQKVASMKNSNEIYTDGQNKALDNKTLEFKKQLEEQQAEEKAQKSKILGQ 180
EspD_282           VTLLSLDASAQKVASMKNSNEIYTDGQNKALDNKTLEFKKQLEEQQAEEKAQKSKILGQ 180
EspD_196           VTLLSLDASAQKVASMKNSNEIYTDGQNKALDNKTLEFKKQLEEQQAEEKAQKSKILGQ 180
EspD_BA92          VTLLSLDASAQKVASMKNSNEIYTDGQNKALDNKTLEFKKQLEEQQAEEKAQKSKILGQ 180
EspD_407           VTLLSLDASAQKVASMKNSNEIYTDGQNKALDNKTLEFKKQLEEQQAEEKAQKSKILGQ 180
*****

EspD_E2348/69      VFGHLGVAATAIAAIFNPALWAVVAISATAMALQTAVDVMGDKAPQALKTAQVFGGSL 240
EspD_282           VFGHLGVAATAIAAIFNPALWAVVAISATAMALQTAVDVMGDKAPQALKTAQVFGGSI 240
EspD_196           VFGHLGVAATAIAAIFNPALWAVVAISATAMALQTAVDVMGDKAPQALKTAQVFGGSI 240
EspD_BA92          VFGHLGVAATAIAAIFNPALWAVVAISATAMALQTAVDVMGDKAPQALKTAQVFGGSI 240
EspD_407           VFGHLGVAATAIAAIFNPALWAVVAISATAMALQTAVDVMGDKAPQALKTAQVFGGSI 240
*****

EspD_E2348/69      AAGILTAGIGGVSSLSKVGDVANKVGSNIVKVTTLADTFVDNVASKISAVANGLTTSS 300
EspD_282           AASILTAGIGGVSSLSKVGDVANKVGSNIVKTVTKLADVFVENVWSKVAATANGFTTSA 300
EspD_196           AASILTAGIGGVSSLSKVGDVANKVGSNIVKTVTKLADVFVENVWSKVAATANGFTTSA 300
EspD_BA92          AASILTAGIGGVSSLSKVGDVANKVGSNIVKTVTKLADVFVENVWSKVAATANGFTTSA 300
EspD_407           AASILTAGIGGVSSLSKVGDVANKVGSNIVKTVTKLADVFVENVWSKVAATANGFTTSA 300
** *****

EspD_E2348/69      RSIGTTVLNNDAAAYNVLSQVSFAVENLTRQSEYLSQSAKAELEKATLELQNKANYIQS 360
EspD_282           RSIGTTVLNNDAAQYSILAQLSAYAVQNLTQSENLGESAKVELDKAAAEELRNQASYLQN 360
EspD_196           RSIGTTVLNNDAAQYSILAQLSAYAVQNLTQSENLGESAKVELDKAAAEELRNQASYLQN 360
EspD_BA92          RSIGTTVLNNDAAQYSILAQLSAYAVQNLTQSENLGESAKVELDKAAAEELRNQASYLQN 360
EspD_407           RSIGTTVLNNDAAQYSILAQLSAYAVQNLTQSENLGESAKVELDKAAAEELRNQASYLQN 360
*****

EspD_E2348/69      ASQLMSDSARVNIIRIVSGRV 380
EspD_282           ASQLISDSARVNSRIVSGRV 380
EspD_196           ASQLISDSARVNSRIVSGRV 380
EspD_BA92          ASQLISDSARVNSRIVSGRV 380
EspD_407           ASQLISDSARVNSRIVSGRV 380
*****

```

**Figura 21.** Alinhamento múltiplo entre as sequências de EspD das amostras de aEPEC e da amostra protótipo de tEPEC E2348/69. (\*) indica posições que possuem um resíduo conservado; (:) indica conservação entre grupos de propriedades similares; (.) indica conservação entre grupos

de propriedades fracamente similares e; (-) indica a ocorrência de gaps. As cores indicam as propriedades dos aminoácidos: (Vermelho) pequenos, hidrofóbicos e aromáticos, exceto Y; (Azul) ácidos, (Magenta) básicos, exceto H; (Verde) com grupamentos hidroxil, sulfidril e amina, e G.

#### 4.14 Amostras de aEPEC estudadas apresentam polimorfismos específicos em um domínio funcional de EspD

Para verificar se os polimorfismos encontrados poderiam estar localizados em regiões já associadas ao papel do translocon do SST3 como uma potencial adesina, foi realizada uma análise comparativa do domínio funcional *coiled coil* (2) de EspD, diretamente envolvido na formação do poro na célula do hospedeiro, e que já havia sido sugerido como necessário para a adesão da amostra de aEPEC 2012-1 (sorotipo O26:H11) em um estudo anterior (Santos et al., 2019).

Essa análise mostrou que as sequências de aminoácidos das amostras pertencentes ao sorotipo O2:H16, referente a esses domínios, diferem da amostra protótipo de tEPEC E2348/69, e são idênticas à da amostra 2012-1, quanto a suas características bioquímicas. As 4 amostras do sorotipo O2:H16 estudados também exibiram a presença do aminoácido arginina (R), carregado positivamente, na posição 352, na região correspondente ao aminoácido glutamina (Q), não carregado, na amostra protótipo de tEPEC E2348/69 (Figura 22), apesar das discrepâncias fenotípicas associadas a contribuição do translocon do SST3 como uma potencial adesina.

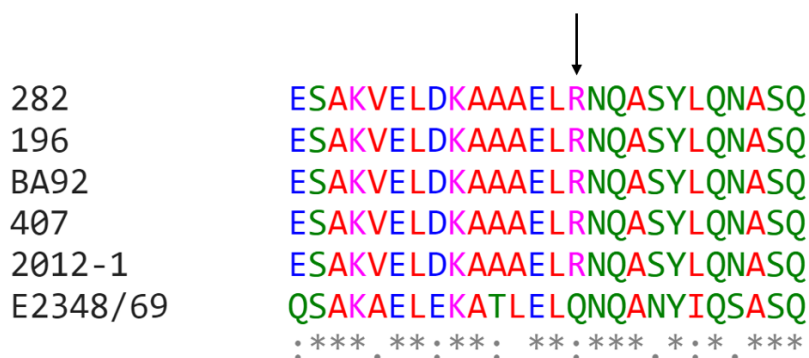


**Figura 22.** Alinhamento múltiplo entre as sequências do domínio *coiled coil* (2) de EspD das amostras de aEPEC e da amostra protótipo de tEPEC E2348/69. (\*) indica posições que possuem

um resíduo conservado; (:) indica conservação entre grupos de propriedades similares; (.) indica conservação entre grupos de propriedades fracamente similares; e (-) indica a ocorrência de *gaps*. As cores indicam as propriedades dos aminoácidos: (Vermelho) pequenos, hidrofóbicos e aromáticos, exceto Y; (Azul) ácidos, (Magenta) básicos, exceto H; (Verde) com grupamentos hidroxil, sulfidril e amina, e Glicina (G). A seta indica a presença do aminoácido arginina (R) no sítio correspondente ao aminoácido glutamina (Q), na amostra protótipo de tEPEC E2348/69.

## 5. DISCUSSÃO

Um estudo anterior do nosso laboratório identificou um surto de diarreia que acometeu crianças que frequentavam uma creche na cidade de São José do Rio Preto, sendo o patógeno associado a esse surto uma aEPEC do sorotipo O2:H16 (Vieira et al., 2016). Posteriormente, foi demonstrado que as amostras provenientes desse surto eram capazes de formar microcolônias compactas, características do padrão AL, na superfície das células epiteliais; bem como aderir de forma randômica, em um padrão de aderência semelhante ao padrão AD, tendo sido esse fenótipo de aderência denominado “padrão híbrido AL/AD” (Vieira et al., 2019). Dado o envolvimento de amostras pertencentes ao sorotipo O2:H16 em um surto de diarreia, e seu potencial em produzir um padrão híbrido de aderência AL/AD, buscou-se compreender qual seria o perfil de virulência em amostras pertencentes a esse sorotipo no Brasil.

Sabe-se que a aderência bacteriana constitui o primeiro passo para a infecção do hospedeiro por enteropatógenos, que colonizam as células epiteliais do intestino delgado ou grosso, e posteriormente causam danos aos enterócitos, levando ao estabelecimento da doença diarreica (Torres et al., 2005; Kline et al., 2009). Até o momento, a adesina Intimina é descrita como uma das mais importantes estruturas bacterianas associadas à aderência das amostras de aEPEC às células epiteliais (Pelayo et al., 1999; Carvalho et al., 2005; Santos et al., 2019). Na ausência da Intimina, amostras de tEPEC ainda são capazes de formar microcolônias e aderir a células epiteliais *in vitro*, por meio de BFP, sendo essa fimbria importante nos estágios iniciais de aderência de tEPEC, na qual a interação Intimina-Tir ainda não aconteceu (Cleary et al., 2004). Contudo, devido ao fato de aEPEC ser desprovida de BFP, pouco sabe-se sobre os estágios iniciais de aderência desse patógeno às células epiteliais, fato esse, que tem levantado curiosidade dos pesquisadores para uma melhor compreensão de quais adesinas estariam presentes nessas amostras, e como essas estruturas participariam do processo de interação com a célula hospedeira.

Uma análise dos resultados obtidos através de ensaios de adesão evidenciaram que mesmo na ausência das fímbrias BFP as amostras estudadas ainda apresentaram potencial para interagir de forma eficiente com células HeLa cultivadas *in vitro*, além de se mostrarem capazes de induzir um recrutamento de F-actina no sítio de aderência bacteriano, característico da lesão A/E. Dados dos ensaios realizados em células Caco-2 polarizadas e diferenciadas demonstraram

ainda um possível potencial de algumas amostras, pertencentes ao sorotipo O2:H16, em invadir células intestinais, uma vez que as amostras 282/14 e 196/16 apresentaram contagem do número de bactérias internalizadas significativamente maior dos encontrados para a amostra de *E. albertii* mutado no gene *eae*, previamente caracterizado como não-invasor (Yamamoto et al., 2017).

É importante ressaltar que os quatro amostras empregadas nesse estudo apresentaram Intimina subtipo  $\beta 1$  (R. T. Hernandez, dados não publicados) e que, em um estudo anterior, observou-se que embora aEPEC com a capacidade de invadir células Caco-2 sejam incomuns, esse fenótipo foi observado em uma amostra de aEPEC do sorotipo O119:H2 portador de Intimina subtipo  $\beta 1$ , muito embora, o mesmo estudo tenha identificados amostras de aEPEC do sorotipo O128:H2 e O177:H11, também portadores de intimina do subtipo  $\beta 1$ , mas incapazes de invadirem eficientemente células intestinais Caco-2 polarizadas e diferenciadas (Pacheco et al., 2014). Essa heterogeneidade também foi observada em nosso estudo, uma vez que nem todas as amostras portadoras de intimina do subtipo  $\beta 1$  mostraram-se capazes de atingir o compartimento intracelular.

A busca por genes responsáveis por codificar adesinas revelou a presença de genes codificadores de fímbrias, proteínas autotransportadoras e proteínas de membrana externa associadas à interação de distintos patótipos de ECD com células epiteliais cultivadas *in vitro*. Embora essas amostras apresentem potencial para a produção de um arsenal de proteínas relacionadas à adesão, somente esses dados, analisados de forma isolada, não são suficientes para indicar quais seriam os genes expressos, e quais proteínas estariam sendo produzidas para posteriormente servirem como estruturas adesivas.

Outro dado interessante é a mudança no padrão de adesão exibido pela amostra 282/14 em testes realizados na ausência de D-manopiranosídeo. Foi possível observar a presença de um espalhamento semelhante ao encontrado em amostras produtoras do padrão AA, diferente do que já havia sido visualizado em ensaios anteriores, na presença de D-manopiranosídeo. Esse resultado nos leva a acreditar que a fímbria do tipo I possa estar envolvida, de alguma maneira, nos estágios de adesão dessa amostra. Moreira e colaboradores (2003) observaram uma acentuação no padrão AA, produzidos por amostras de EAEC, em ensaios realizados na ausência de D-manose, além de uma inibição relevante na formação do padrão AA em mutantes não polares no gene *fimD*, responsável por codificar o *usher* da fímbria do tipo I. Estudos recentes também vêm implicando a fímbria do tipo I como um importante fator para formação de

biofilme, em superfícies abióticas, por amostras de aEPEC, podendo também essa característica fenotípica ser uma vantagem para a persistência desse patógeno no meio ambiente (Moreira et al., 2003; Hernandez et al., 2013; Nascimento et al., 2014).

A primeira hipótese do presente estudo foi de que amostras de aEPEC do sorotipo O2:H16 pudessem albergar plasmídeos conjugativos que tivessem genes capazes de codificar adesinas, visto que vários autores têm reportado a presença de genes que codificam adesinas em plasmídios de amostras de aEPEC. Um estudo recentemente publicado mostrou o resultado do sequenciamento de um plasmídio presente na amostra de aEPEC E110019, responsável por causar um surto de diarreia na Finlândia (Viljanen et al., 1990), levando a identificação de um operon responsável por codificar uma adesina fimbrial nesse patógeno (Hazen et al., 2019).

Outros exemplos de genes plasmidiais codificando adesinas em amostras de *E. coli* patogênica seriam: o gene *toxB*, localizado no pO157 identificado na amostra de EHEC O157:H7 EDL933, o gene *saa*, no pO113 de uma amostra de STEC O113:H11, os genes que codificam as adesinas agregativas, localizadas no pAA (Tatsuno et al., 2001; Paton et al., 2001; Jønsson et al., 2015), e o operon *pil<sub>Ec404/03</sub>*, associado a produção da fímbria do tipo IV Pil (Garcia et al., 2016). Assim, embora nossos resultados tenham demonstrado que todas as amostras do sorotipo O2:H16, incluídas nesse estudo, albergam plasmídios de alto peso molecular, não se obteve êxito nos experimentos de transferência de DNA plasmidial. A ausência da obtenção de transconjugantes, nesses experimentos, poderia ser explicada pela presença de plasmídios defectivos nos genes *tra*, que é a região responsável por codificar proteínas envolvidas na transferência de plasmídios da célula doadora para a célula receptora, como observado em um estudo anterior (Garcia et al., 2016).

A próxima etapa da investigação envolveu então a obtenção de mutantes aleatórios com o intuito de identificar amostras com a capacidade adesiva reduzida, ou ainda, que apresentassem uma modificação no padrão de interação com células epiteliais, a fim de avaliar quais estruturas bacterianas seriam indispensáveis para a formação do fenótipo híbrido AL/AD. Um total de 320 mutantes foi avaliado, sendo que em quatro deles a mutação aleatória ocorreu em genes da região LEE, enquanto os outros mutantes tiveram a inserção do transposon em genes associados ao metabolismo, ou ainda em genes com função desconhecida. O fato do mutante no gene *tir* ter seu potencial de aderência reduzido em relação à amostra selvagem aponta fortemente para a importância da interação Intimina-Tir no processo de aderência da amostra 282/14 com células

epiteliais. Outros mutantes que tiveram a inserção do transposon na região LEE, especificamente nos genes *escV* e *grlA*, reforçam a importância da interação Intimina-Tir, uma vez que a montagem do SST3 é indispensável para a translocação do receptor Tir para a célula hospedeira.

Com o intuito de confirmar os resultados obtidos, mutantes em genes selecionados da região LEE, tais como *eae*, que codifica a adesina intimina, e *escN*, que codifica uma ATPase para montagem do SST3, foram construídos. Ambos os mutantes obtidos tiveram sua aderência às células epiteliais drasticamente reduzidas. Primeiramente, observamos que o mutante pontual no gene *eae* corrobora os resultados obtidos previamente, através da técnica de mutagênese aleatória, evidenciando a importância da interação Intimina-Tir, mas não do translocon do SST3, para a formação do padrão híbrido AL/AD. A deleção no gene *escN* apenas confirma esses achados, uma vez que na ausência do SST3, o receptor da Intimina (Tir) não pode ser translocado para a célula hospedeira e a ausência dessa interação de Intimina com seu receptor causou um decréscimo considerável na adesão desse mutante com células epiteliais.

Um estudo anterior realizado com a amostra protótipo de tEPEC avaliou um duplo mutante nos genes *eae* e *bfpA* que mostrou uma adesão fraca às células epiteliais e atribuída ao translocon do SST3 (Cleary et al., 2004). Em contrapartida, um estudo mais recente mostrou que uma amostra de aEPEC do sorotipo O26:H11 mutado no gene *eae* teve seu padrão de aderência à células HeLa alterado, sem comprometer a sua capacidade de interação (Santos et al., 2019), isto é, não havendo redução no número de bactérias associadas a células epiteliais, diferentemente do observado em nosso estudo. Essa adesão Intimina-independente tem sido atribuída a componentes estruturais do SST3, entre os quais as proteínas EspB e EspD aparecem como os principais candidatos (Santos et al., 2019).

As contradições apresentadas refletem a discrepância na eficiência do SST3 como uma potencial adesina. Enquanto em algumas amostras, como na amostra 282/14 desse estudo, essa estrutura parecer mediar uma aderência escassa, conforme observado nos ensaios quantitativos, em outras amostras ela parece ser suficiente para uma eficiente colonização das células hospedeiras. No estudo realizado por Santos e colaboradores (2019), foi demonstrado que a amostra que apresentou uma adesão Intimina-independente super-expressava os genes da região LEE4 (*espA*, *espB* e *espD*) em comparação a amostras que não apresentavam esse fenótipo (Santos et al., 2019). Nesse mesmo estudo, foi observado que a super-expressão dos genes do operon LEE4 levaram a formação de bactérias com translocons significativamente mais longos

do que o observado em outras bactérias, o que poderia favorecer a interação dessa estrutura com as células epiteliais. É importante destacar que resultados semelhantes já haviam sido observados em uma amostra de *Escherichia albertii* (1551-2), onde o translocon do SST3 foi implicado no estabelecimento do padrão AD em uma amostra selecionada e mutada no gene *eae* (Hernandes et al., 2013). Ainda é possível observar na literatura a ocorrência de amostras de aEPEC que permanecem aderentes mesmo na ausência do translocon do SST3, embora esse fenótipo seja raro entre as aEPEC (Santos et al., 2019). No entanto, esses dados são conflitantes com o observado na amostra 282/14, uma vez que a mutação no gene *escN*, que codifica a ATPase para a montagem do SST3, aboliu completamente a capacidade dessa amostra em aderir às células epiteliais.

As proteínas do translocon do SST3 apresentam domínios funcionais importantes para inserção e formação do poro na membrana de células epiteliais. EspD possui duas regiões anfipáticas (Amph I e Amph II), dois domínios *coiled coil* (COIL I e COIL II) e dois domínios transmembrana, sendo que a deleção dos domínios anfipáticos gera uma estrutura instável que é rapidamente degradada, enquanto a deleção dos outros domínios geram proteínas truncadas que apesar de capazes de serem secretadas, podem ter sua funcionalidade afetada, interferindo na formação do poro na célula hospedeira (Dasanayake et al., 2011; Chatterjee et al. 2015; Zambelloni et al., 2017). Um estudo observou que polimorfismos na sequência proteica de domínios funcionais de EspD, poderiam levar a diferenças na eficiência de adesão via translocon SST3 em diferentes amostras (Daniell et al. 2001).

Assim, a busca por polimorfismos em sequências proteicas do translocon do SST3 das amostras estudadas trouxe importantes reflexões. Primeiramente, pôde-se observar que as quatro amostras possuem sequências idênticas entre si e que diferem da amostra protótipo de tEPEC E2348/69. O alinhamento do domínio funcional *coiled-coil* de EspD também mostrou a presença de polimorfismos específicos, com a troca do aminoácido glutamina (Q), por um aminoácido arginina (R), na posição 352. Como já descrito, variações em aminoácidos específicos desse domínio levaram à redução na capacidade um mutante de tEPEC E2348/69 em aderir às células HEp-2, em relação à amostra selvagem (Daniell et al., 2001). Essa variação específica de aminoácidos na posição 352 também já havia sido potencialmente relacionada ao aumento da eficiência adesiva da amostra de aEPEC 2012-1, que apresentava capacidade aderente adicional, independente da Intimina (Santos et al., 2019). É importante ressaltar que apesar da amostra

282/14 apresentar uma sequência de proteínas idêntica à da amostra 2012-1 para o domínio *coiled-coil* de EspD (Santos et al., 2019), a presença desse polimorfismo parece não interferir em sua adesão.

Em resumo, nossos resultados demonstraram que apesar da amostra de aEPEC 282/16 produzir um padrão de aderência relativamente diferenciado, quando comparado a demais amostras desse patotipo de *E. coli* diarreiogênica (Abe et al., 2009; Scaletsky et al., 2010; Vieira et al., 2019), esse fenótipo parece depender exclusivamente da interação Intimina-Tir. Embora o SST3 tenha sido implicado como uma estrutura adesiva em estudos realizados com tEPEC, *E. albertii* e aEPEC (Daniell et al., 2001; Hernandez et al., 2013; Santos et al., 2019), essa função não pôde ser observada para o translocon do SST3 da amostra de aEPEC, selecionada como modelo para esse estudo. Ademais, mesmo com a presença de vários polimorfismos nas proteínas que compõem o translocon do SST3 (EspA, EspB e EspD), um conhecimento mais profundo sobre os mecanismos pelos quais o SST3 atua na patogenicidade das amostras ou o quanto a expressão elevada dessas proteínas poderiam interferir na interação do translocon com as células epiteliais, ainda se faz necessário.

De certa forma, é surpreendente que amostras de aEPEC, que albergam tantos genes responsáveis por codificar adesinas fimbriais e afimbriais, tenham seu potencial de interação com as células epiteliais completamente dependente de uma única estrutura, como o observado no presente estudo. No entanto, reflexões realizadas durante esse estudo levam a acreditar que novas condições de ensaio possam ser propostas para o futuro, de modo que, condições ambientais possam vir a favorecer a expressão de outras possíveis adesinas, em detrimento da expressão dos genes localizados na região LEE, em especial, dos genes *eae* e *tir*, localizados na região LEE5, e dos genes *espA*, *espB* e *espD*, localizados na região LEE4.

## 6. CONCLUSÕES

Este estudo mostrou o potencial de amostras de aEPEC do sorotipo O2:H16 em interagir, invadir e induzir o acúmulo de actina, característico da lesão AE, em células epiteliais infectadas. Ademais, pôde-se evidenciar a importância da interação intimina-Tir para o estabelecimento do fenótipo híbrido de adesão AL/AD, observado em uma amostra selecionada de aEPEC, do sorotipo O2:H16, quando em contato com células epiteliais cultivadas *in vitro*.

## 7. REFERÊNCIAS

- 1.Abe CM, Trabulsi LR, Blanco J, Blanco M, Dahbi G, Blanco JE, Mora A, Franzolin MR, Taddei CR, Martinez MB, Piazza RM, Elias WP (2009) Virulence features of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* identified by the *eae*<sup>+</sup> EAF-negative *stx*<sup>-</sup> genetic profile. *Diagn Microbiol Infect Dis* 64:357-365.
- 2.Abreu AG, Bueris V, Porangaba TM, Sircili MP, Navarro-Garcia F, Elias WP (2013) Autotransporter protein-encoding genes of diarrheagenic *Escherichia coli* are found in both typical and atypical enteropathogenic *E. coli* strains. *Appl Environ Microbiol* 79:411-414.
- 3.Afset JE, Bruant G, Brousseau R, Harel J, Anderssen E, Bevanger L, Bergh K (2006) Identification of virulence genes linked with diarrhea due to atypical enteropathogenic *Escherichia coli* by DNA microarray analysis and PCR. *J Clin Microbiol* 44:3703-3711.
- 4.Baldini MM, Kaper JB, Levine MM, Candy DC, Moon HW (1983) Plasmid mediated adhesion in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2:534-538.
- 5.Bielaszewska M, Mellmann A, Zhang W, Köck R, Fruth A, Bauwens A, Peters G, Karch H (2011) Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *Lancet Infect Dis* 11:671-676
- 6.Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 24:1513-1523.
- 7.Black RE, Morris SS, Bryce J (2003) Where and why are 10 million children dying every year? *Lancet*. 361:2226-34.
- 8.Blanco M, Blanco JE, Dahbi G, Alonso MP, Mora A, Coira MA, Madrid C, Juárez A, Bernárdez MI, González EA, Blanco J (2006) Identification of two new intimin types in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Int Microbiol* 9:103-110.

9. Bromberg Y, Rost B (2007) SNAP: predict effect of non-synonymous polymorphisms on function. *Nucleic Acids Res* 35:3823–3835.
10. Buss C, Müller D, Rüter C, Heusipp G, Schmidt MA (2009) Identification and characterization of Ibe, a novel type III effector protein of A/E pathogens targeting human IQGAP1. *Cell Microbiol* 11:661-677.
11. Campellone KG, Robbins D, Leong JM (2004) EspFU is a translocated EHEC effector that interacts with Tir and N-WASP and promotes Nck-independent actin assembly. *Dev Cell* 7:217-228.
12. Carvalho HM, Teel LD, Kokai-Kun JF, O'Brien AD (2005). Antibody against the carboxyl terminus of intimin alpha reduces enteropathogenic *Escherichia coli* adherence to tissue culture cells and subsequent induction of actin polymerization. *Infect Immun* 73:2541-2546.
13. Chatterjee A, Caballero-Franco C, Bakker D, Totten S, Jardim A (2015) Pore-forming Activity of the *Escherichia coli* Type III Secretion System Protein EspD. *J Biol Chem* 290:25579-25594.
14. Chaverroche MK, Ghigo JM, d'Enfert C (2000) A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res* 28:E97.
15. Cleary J, Lai LC, Shaw RK, Straatman-Iwanowska A, Donnenberg MS, Frankel G, Knutton S (2004) Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. *Microbiology* 150:527-538.
16. Cravioto A, Gross RJ, Scotland SM, Rowe B (1979) An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr Microbiol* 3:95–99.

- 17.Crepin VF, Shaw R, Abe CM, Knutton S, Frankel G (2005) Polarity of enteropathogenic *Escherichia coli* EspA filament assembly and protein secretion. J Bacteriol 187:2881-2889.
- 18.Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 26:822-880.
- 19.Daniell SJ, Delahay RM, Shaw RK, Hartland EL, Pallen MJ, Booy F, Ebel F, Knutton S, Frankel G (2001) Coiled-coil domain of enteropathogenic *Escherichia coli* type III secreted protein EspD is involved in EspA filament-mediated cell attachment and hemolysis. Infect Immun 69:4055-4064.
- 20.Dasanayake D, Richaud M, Cyr N, Caballero-Franco C, Pittroff S, Finn RM, Ausió J, Luo W, Sonnenberg MS, Jardim A (2011) The N-terminal amphipathic region of the *Escherichia coli* type III secretion system protein EspD is required for membrane insertion and function. Mol Microbiol 81:734-750.
- 21.Datsenko KA, Wanner BL (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc Natl Acad Sci USA 97:6640-6645.
- 22.DeVinney R, Puente JL, Gauthier A, Goosney D, Finlay BB (2001) Enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* use a different Tir-based mechanism for pedestal formation. Mol Microbiol 41:1445-1458.
- 23.Sonnenberg MS, Girón JA, Nataro JP, Kaper JB (1992) A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localized adherence. Mol Microbiol 6:3427-3437.
- 24.Dulguer MV, Fabbriotti SH, Bando SY, Moreira-Filho CA, Fagundes-Neto U, Scaletsky IC (2003) Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains: phenotypic and genetic profiling reveals a strong association between enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin and diarrhea. J Infect Dis 188:1685-1694.

25. Elliott SJ, Kaper JB (1997) Role of type 1 fimbriae in EPEC infections. *Microb Pathog* 23:113-118.
26. Ewing WH, Edwards PR (1986) *Edwards & Ewing's Identification of Enterobacteriaceae*. New York: Elsevier 4 ed:536.
27. Frankel G, Philips AD, Rosenshine I, Dougan G, Kaper JB, Knutton S (1998) Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*; more subversive elements. *Mol Microbiol* 30:911-921.
28. Garcia BG, Ooka T, Gotoh Y, Vieira MA, Yamamoto D, Ogura Y, Girão DM, Sampaio SC, Melo AB, Irino K, Hayashi T, Gomes TA (2016) Genetic relatedness and virulence properties of enteropathogenic *Escherichia coli* strains of serotype O119:H6 expressing localized adherence or localized and aggregative adherence-like patterns on HeLa cells. *Int J Med Microbiol* 306:152-164.
29. Garmendia J, Frankel G, Crepin VF (2005) Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. *Infect Immun* 73:2573-2585.
30. Garmendia J, Phillips AD, Carlier MF, Chong Y, Schüller S, Marches O, Dahan S, Oswald E, Shaw RK, Knutton S, Frankel G (2004) TccP is an enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 type III effector protein that couples Tir to the actin-cytoskeleton. *Cell Microbiol* 6:1167-1183.
31. Gauthier A, Puente JL, Finlay BB (2003) Secretin of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system requires components of the type III apparatus for assembly and localization. *Infect Immun* 71:3310-3319.

32. Gaytán MO, Martínez-Santos VI, Soto E, González-Pedrajo B (2016) Type Three Secretion System in Attaching and Effacing Pathogens. *Front Cell Infect Microbiol* 21:6-129.
33. Girón JA, Ho AS, Schoolnik GK (1991) An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 254:710-713.
34. Gomes TAT, Hernandez RT, Torres AG, Salvador FA, Guth BE, Vaz TM, Irino K, Silva RM, Vieira MAM (2011) Adhesin-encoding genes from shiga toxin-producing *Escherichia coli* are more prevalent in atypical than in typical enteropathogenic *E. coli*. *J Clin Microbiol* 49:3334-3337.
35. Gomes TAT, Yamamoto D, Vieira MAM, Hernandez RT. *Escherichia coli* in the Americas: Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Editado por: Alfredo G. Torres (2016) Springer 1 ed 4:77-96.
36. Hancock V, Witsø IL, Klemm P (2011) Biofilm formation as a function of adhesin, growth medium, substratum and strain type. *Int J Med Microbiol* 301:570–576.
37. Hazen TH, Rasko, DA (2019). Complete genome of the atypical enteropathogenic *Escherichia coli* archetype isolate E110019 highlights a role of plasmids in dissemination of the type III secreted effector EspT. *Infect Immun* [Epub ahead of print].
38. Hernandez RT, Silva RM, Carneiro SM, Salvador FA, Fernandes MC, Padovan AC, Yamamoto D, Mortara RA, Elias WP, da Silva Briones MR, Gomes TA (2008) The localized adherence pattern of an atypical enteropathogenic *Escherichia coli* is mediated by intimin omicron and unexpectedly promotes HeLa cell invasion. *Cell Microbiol* 10:415-425
39. Hernandez RT, Velsko I, Sampaio SC, Elias WP, Robins-Browne RM, Gomes TA, Girón JÁ (2011) Fimbrial adhesins produced by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol* 77:8391-8399.

40. Hernandez RT, De la Cruz MA, Yamamoto D, Girón JA, Gomes TA (2013) 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. *Infect Immun* 81:3793-3802.
41. Ide T, Laarmann S, Greune L, Schillers H, Oberleithner H, Schmidt MA (2001) Characterization of translocation pores inserted into plasma membranes by type III-secreted Esp proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* 3:669-679.
42. Iguchi A, Thomson NR, Ogura Y, Saunders D, Ooka T, Henderson IR, Harris D, Asadulghani M, Kurokawa K, Dean P, Kenny B, Quail MA, Thurston S, Dougan G, Hayashi T, Parkhill J, Frankel G (2009) Complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6 strain E2348/69. *J Bacteriol* 191:347-354.
43. Ingle DJ, Tauschek M, Edwards DJ, Hocking DM, Pickard DJ, Azzopardi KI, Amarasena T, Bennett-Wood V, Pearson JS, Tamboura B, Antonio M, Ochieng JB, Oundo J, Mandomando I, Qureshi I, Ramamurthy T, Hossain A, Kotloff KL, Nataro JP, Dougan G, Levine MM, Robins-Browne RM, Holt KE (2016) Evolution of atypical enteropathogenic *E. coli* by repeated acquisition of LEE pathogenicity island variants. *Nat Microbiol* 1:15010.
44. Jerse AE, Yu J, Tall BD, Kaper JB (1990) A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:7839–7843.
45. Jønsson R, Struve C, Boisen N, Mateiu RV, Santiago AE, Jenssen H, Nataro JP, Krogfelt KA (2015) A novel Aggregative Adherence Fimbriae (AAF/V) of Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC). *Infect Immun* 83:1396-1405.
46. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2:123–140.
47. Kaper JP (1996) Defining EPEC. *Rev Microbiol* 27:130–133.

- 48.Kaper JB & O'Brien AD (2014) Overview and Historical Perspectives. Microbiol 2.
- 49.Kenny B (1999) Phosphorylation of tyrosine 474 of the enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule is essential for actin nucleating activity and is preceded by additional host modifications. Mol Microbiol 31:1229-1241.
- 50.Kenny B, DeVinney R, Stein M, Reinscheid DJ, Frey EA, Finlay BB (1997) Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. Cell 91:511-520.
- 51.Kline KA, Fälker S, Dahlberg S, Normark S, Henriques-Normark B (2009) Bacterial adhesins in host-microbe interactions. Cell Host Microbe 18:580-592.
- 52.Knutton S, Phillips AD, Smith HR, Gross RJ, Shaw R, Watson P, Price E (1989) Screening for enteropathogenic *Escherichia coli* in infants with diarrhea by the fluorescent-actin staining test. Infect Immun 59:365-371.
- 53.Knutton S, Rosenshine I, Pallen MJ, Nisan I, Neves BC, Bain C, Wolff C, Dougan G, Frankel G (1998) A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. EMBO J 17:2166-2176.
- 54.Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, Nasrin D, Farag TH, Panchalingam S, Wu Y, Sow SO, Sur D, Breiman RF, Faruque AS, Zaidi AK, Saha D, Alonso PL, Tamboura B, Sanogo D, Onwuchekwa U, Manna B, Ramamurthy T, Kanungo S, Ochieng JB, Omore R, Oundo JO, Hossain A, Das SK, Ahmed S, Qureshi S, Quadri F, Adegbola RA, Antonio M, Hossain MJ, Akinsola A, Mandomando I, Nhampossa T, Acácio S, Biswas K, O'Reilly CE, Mintz ED, Berkeley LY, Muhsen K, Sommerfelt H, Robins-Browne RM, Levine MM (2013) Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. Lancet 382:209-222.

55. Levine MM, Nataro JP, Karch H, Baldini MM, Kaper JB, Black RE, Clements ML, O'Brien AD (1985) The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. J Infect Dis 152:550-559.
56. Li D, Chen Z, Cheng H, Zheng JX, Pan WG, Yang WZ, Yu ZJ, Deng QW (2016) Inhibition of Adhesion of Enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 Cells by Binding of a Novel Peptide to EspB Protein. Curr Microbiol 73:361-365.
57. Luo W, Donnenberg MS (2011) Interactions and predicted host membrane topology of the enteropathogenic *Escherichia coli* translocator protein EspB. J Bacteriol 193:2972-2980.
58. McDaniel TK, Jarvis KG, Donnenberg MS, Kaper JB (1995) A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. Proc Natl Acad Sci U S A 92:1664-1668.
59. Moon HW, Whipp SC, Argenzio RA, Levine MM, Giannella RA (1983) Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. Infect Immun 41:1340-1351.
60. Mora A, Blanco M, Yamamoto D, Dahbi G, Blanco JE, López C, Alonso MP, Vieira MA, Hernandez RT, Abe CM, Piazza RM, Lacher DW, Elias WP, Gomes TA, Blanco J (2009) HeLa-cell adherence patterns and actin aggregation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga-toxin-producing *E. coli* (STEC) strains carrying different *eae* and *tir* alleles. Int Microbiol 12:243-251.
61. Moreira CG, Carneiro SM, Nataro JP, Trabulsi LR, Elias WP (2003) Role of type I fimbriae in the aggregative adhesion pattern of enteroaggregative *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett 226:79-85.

62. Munhoz DD, Nara JM, Freitas NC, Moraes CTP, Nunes KO, Yamamoto BB, Vasconcellos FM, Martínez-Laguna Y, Girón JA, Martins FH, Abe CM, Elias WP, Piazza RMF (2018) Distribution of Major Pilin Subunit Genes Among Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* and Influence of Growth Media on Expression of the ecp Operon. *Front Microbiol* 15:9-942.
63. Nataro JP, Kaper JB (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 11:142-201.
64. Neter E, Westphal O, Luderitz O, Gino RM, Gorzynski EA (1955) Demonstration of antibodies against enteropathogenic *Escherichia coli* in sera of children of various ages. *Pediatrics* 16:801-808.
65. Ooka T, Vieira MA, Ogura Y, Beutin L, La Ragione R, van Diemen PM, Stevens MP, Aktan I, Cawthraw S, Best A, Hernandez RT, Krause G, Gomes TA, Hayashi T, Frankel G (2007) Characterization of tccP2 carried by atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 271:126-135.
66. Ori EL, Takagi EH, Andrade TS, Miguel BT, Cergole-Novella MC, Guth BEC, Hernandez RT, Dias RCB, Pinheiro SRS, Camargo CH, Romero EC, Dos Santos LF (2018) Diarrhoeagenic *Escherichia coli* and *Escherichia albertii* in Brazil: pathotypes and serotypes over a 6-year period of surveillance. *Epidemiol Infect* 19:1-9.
67. Pacheco VC, Yamamoto D, Abe CM, Hernandez RT, Mora A, Blanco J, Gomes TA (2014) Invasion of differentiated intestinal Caco-2 cells is a sporadic property among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains carrying common intimin subtypes. *Pathog Dis* 70: 167–175.
68. Paton AW, Srimanote P, Woodrow MC, Paton JC (2001). Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infect Immun* 69:6999-7009.

69. Pelayo JS, Scaletsky IC, Pedroso MZ, Sperandio V, Girón JA, Frankel G, Trabulsi LR (1999) Virulence properties of atypical EPEC strains. *J Med Microbiol* 48:41-49.
70. Perna NT, Plunkett G. 3rd, Burland V, Mau B, Glasner JD, Rose DJ, Mayhew GF, Evans PS, Gregor J, Kirkpatrick HA, Pósfai G, Hackett J, Klink S, Boutin A, Shao Y, Miller L, Grotbeck EJ, Davis NW, Lim A, Dilamanta ET, Potamousis KD, Apodaca J, Anantharaman TS, Lin J, Yen G, Schwartz DC, Welch RA, Blattner FR (2001) Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O:157:H7. *Nature* 409:529-533.
71. Petty NK, Bulgin R, Crepin VF, Cerdeño-Tárraga AM, Schroeder GN, Quail MA, Lennard N, Corton C, Barron A, Clark L, Toribio AL, Parkhill J, Dougan G, Frankel G, Thomson NR (2010) The *Citrobacter rodentium* genome sequence reveals convergent evolution with human pathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 192:525-538.
72. Phillips AD, Frankel G (2000) Intimin-mediated tissue specificity in enteropathogenic *Escherichia coli* interaction with human intestinal organ cultures. *J Infect Dis* 181:1496-1500.
73. Robins-Browne RM, Holt KE, Ingle DJ, Hocking DM, Yang J, Tauschek M (2016) Are *Escherichia coli* Pathotypes Still Relevant in the Era of Whole-Genome Sequencing? *Front Cell Infect Microbiol* 18:6-141.
74. Rodrigues J, Scaletsky IC, Campos LC, Gomes TA, Whittam TS, Trabulsi LR (1996) Clonal structure and virulence factors in strains of *Escherichia coli* of the classic serogroup O55. *Infect Immun* 64:2680-2686.
75. Sahl JW, Caporaso JG, Rasko DA, Keim P (2014) The large-scale blast score ratio (LS-BSR) pipeline: a method to rapidly compare genetic content between bacterial genomes. *Peer J* 2:e332.
76. Sampaio SCF, Moreira FC, Liberatore AMA, Vieira MAM, Knobl T, Romão FT, Hernandez RT, Ferreira CSA, Ferreira AP, Felipe-Silva A, Sinigaglia-Coimbra R, Koh IHJ, Gomes TAT

(2014) Analysis of the Virulence of an Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Strain *in vitro* and *in vivo* and the influence of Type Three Secretion System. Biomed Res Int 2014:1-9.

77.Sampaio SC, Luiz WB, Vieira MA, Ferreira RC, Garcia BG, Sinigaglia-Coimbra R, Sampaio JL, Ferreira LC, Gomes TA (2016) Flagellar Cap Protein FliD Mediates Adherence of Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* to Enterocyte Microvilli. Infect Immun 84:1112-1122.

78.Santos FF, Yamamoto D, Abe CM, Bryant JA, Hernandez RT, Kitamura FC, Castro FS, Valiatti TB, Piazza RMF, Elias WP, Henderson IR, Gomes TAT (2019) The Type III Secretion System (T3SS)-Translocon of Atypical *Enteropathogenic Escherichia coli* (aEPEC) Can Mediate Adherence. Front Microbiol 9:10-1527.

79.Scaletsky IC, Aranda KR, Souza TB, Silva NP (2010) Adherence factors in atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains expressing the localized adherence-like pattern in HEp-2 cells. J Clin Microbiol 48:302–306.

80.Scaletsky IC, Aranda KR, Souza TB, Silva NP, Moraes MB (2009) Evidence of pathogenic subgroups among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. J Clin Microbiol 47:3756-3759.

81.Scaletsky IC, Silva ML, Trabulsi LR (1984) Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. Infect Immun 45:534-536.

82.Scaletsky IC, Michalski J, Torres AG, Dulguer MV, Kaper JB (2005) Identification and characterization of the locus for diffuse adherence, which encodes a novel afimbrial adhesin found in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect Immun 73:4753-4765.

83.Sekiya K, Ohishi M, Ogino T, Tamano K, Sasakawa C, Abe A (2001) Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. Proc Natl Acad Sci U S A. 25:11638-11643.

84. Tatsuno I, Horie M, Abe H, Miki T, Makino K, Shinagawa H, Taguchi H, Kamiya S, Hayashi T, Sasakawa C (2001) *tox*B gene on pO157 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for full epithelial cell adherence phenotype. *Infect Immun* 69:6660-6669.
85. Toma C, Lu Y, Higa N, Nakasone N, Chinen I, Baschkier A, Rivas M, Iwanaga M (2003) Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 41:2669-2671.
86. Torres AG, Blanco M, Valenzuela P, Slater TM, Patel SD, Dahbi G, López C, Barriga XF, Blanco JE, Gomes TA, Vidal R, Blanco J (2009) Genes related to long polar fimbriae of pathogenic *Escherichia coli* strains as reliable markers to identify virulent isolates. *J Clin Microbiol* 47:2442-2451.
87. Torres AG, Zhou X, Kaper JB (2005) Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. *Infect Immun* 73:18-29.
88. United Nations Children's Fund- UNICEF. One is too many: Ending child deaths from pneumonia and diarrhoea (2016). <https://data.unicef.org/wp-content/uploads/2016/11/UNICEF-Pneumonia-Diarrhoea-report2016-web-version.pdf>
89. Vieira MA, Dias RCB, Dos Santos LF, Rall VLM, Gomes TAT, Hernandez RT (2019) Diversity of strategies used by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* to induce attaching and effacing lesion in epithelial cells. *J Med Microbiol* 68:940-951.
90. Vieira MA, Dos Santos LF, Dias RC, Camargo CH, Pinheiro SR, Gomes TA, Hernandez RT (2016) Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* as aetiological agents of sporadic and outbreak-associated diarrhoea in Brazil. *J Med Microbiol* 65:998-1006.
91. Vieira MAM, Andrade JR, Trabulsi LR, Rosa AC, Dias AM, Ramos SR, Frankel G, Gomes TAT (2001) Phenotypic and genotypic characteristics of *Escherichia coli* strains of non-

enteropathogenic *E. coli* (EPEC) serogroups that carry *eae* and lack the EPEC adherence factor and Shiga toxin DNA probe sequences. *J Infect Dis* 183:762-772.

92. Viljanen MK, Peltola T, Junnila SY, Olkkonen L, Jarvinen H, Kuistila M, Huovinen P (1990) Outbreak of diarrhoea due to *Escherichia coli* O111:B4 in schoolchildren and adults: association of Vi antigen-like reactivity. *Lancet* 336:831-834.

93. Vossenkämper A, Macdonald TT, Marchès O (2011) Always one step ahead: how pathogenic bacteria use the type III secretion system to manipulate the intestinal mucosal immune system. *J Inflamm (LOND)* 3:8–11.

94. Whale AD, Hernandez RT, Ooka T, Beutin L, Schüller S, Garmendia J, Crowther L, Vieira MA, Ogura Y, Krause G, Phillips AD, Gomes TA, Hayashi T, Frankel G (2007) TccP2-mediated subversion of actin dynamics by EPEC 2 - a distinct evolutionary lineage of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* 153:1743-1755.

95. Wong AR, Pearson JS, Bright MD, Munera D, Robinson KS, Lee SF, Frankel G, Hartland EL (2011) Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: even more subversive elements. *Mol Microbiol* 80:1420-1438.

96. World Health Organization- WHO. Diarrhoeal disease/ Fact sheet (2017). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/>

97. Yamamoto D, Hernandez RT, Liberatore AM, Abe CM, Souza RB, Romão FT, Sperandio V, Koh IH, Gomes TA (2017) *Escherichia albertii*, a novel human enteropathogen, colonizes rat enterocytes and translocates to extra-intestinal sites. *PLoS One* 12:e0171385.

98. Zambelloni R, Connolly JPR, Huerta Uribe A, Burgess K, Marquez R, Roe AJ (2017) Novel compounds targeting the enterohemorrhagic *Escherichia coli* type three secretion system reveal insights into mechanisms of secretion inhibition. *Mol Microbiol* 105:606-619.