



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Caracterização funcional de uma nova proteína autotransportadora identificada em um isolado de
Escherichia coli enteropatogênica atípica do sorotipo O2:H16

HENRIQUE ORSI

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

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Tavanelli Hernandez

Coorientador: Prof. Dr. Waldir Pereira Elias Junior

BOTUCATU – SP

2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Caracterização funcional de uma nova proteína autotransportadora identificada em um isolado de
Escherichia coli enteropatogênica atípica do sorotipo O2:H16

HENRIQUE ORSI

RODRIGO TAVANELLI HERNANDES

WALDIR PEREIRA ELIAS JÚNIOR

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

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Tavanelli Hernandez

Coorientador: Prof. Dr. Waldir Pereira Elias Junior

BOTUCATU – SP

2024

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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Orsi, Henrique.

Caracterização funcional de uma nova proteína autotransportadora identificada em um isolado de *Escherichia coli* enteropatogênica atípica do sorotipo O2:H16 / Henrique Orsi. - Botucatu, 2024

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Rodrigo Tavanelli Hernandez
Coorientador: Waldir Pereira Elias Júnior
Capes: 21200009

1. *Escherichia coli* Enteropatogênica. 2. Patogenicidade.
3. Proteínas transportadoras. 4. Virulência.

Palavras-chave: EPEC atípica; Patogenicidade bacteriana; Proteínas autotransportadoras; Virulência.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Rosa Cristina Laurindo Orsi e meu pai, Orsini Orsi Filho, por todo o suporte necessário nesses quatro anos de curso. Sempre tive o privilégio de focar neste trabalho sem ter que me preocupar com qualquer coisa da casa. Amo vocês;

Ao Anderson Carlos Trindade e à Fátima Cardoso, que me acolheram em São Paulo durante um período do desenvolvimento deste projeto;

Aos meus amigos Gabriel Filipe Duarte Amaral, João Vinícius Rodrigues Jacomin e Ulisses Polo Neto, por todo o suporte emocional fornecido desde o ensino médio até hoje;

Ao quase bacharel e atual médico em formação, João Olavo Clemente, por todo o suporte, ensinamentos e inspiração, especialmente durante o período de pandemia;

Aos colegas de laboratório, em especial à Daiany Ribeiro Paz de Lira pela análise dos sequenciamentos e à Bruna Mendes Luiz;

À Beatrice Di Virgilio Lopes Souza, Guilherme Frizzarin Ramalhães de Souza, Laura Beatriz Borim da Silva e João Pedro Garcia Cordeiro que me confortaram e apoiaram nos momentos mais difíceis dos últimos meses deste projeto. Muito obrigado pelo carinho de vocês;

À Professora Titular Dra. Tânia Aparecida Tardelli Gomes do Amaral da Unifesp, por conceber e gerenciar o Projeto Temático FAPESP (processo nº 2017/14821-7), o qual o presente estudo faz parte como subprojeto;

Aos colegas de equipe do Instituto Butantan, tanto do laboratório do Prof. Dr. Waldir Pereira Elias Junior quanto do laboratório da Profa. Dra. Angela Silva Barbosa. Vocês ajudaram bastante na minha passagem por São Paulo. Em especial à Ester Castro Araujo pelas reflexões, conversas e discussões e à Dra. Cláudia Andrade Freire, que sempre foi uma inspiração. Desde que te conheci, lhe tive como referência e lutei para tentar chegar aonde você chegou. Infelizmente, não foi dessa vez que eu levei o cinturão. Mas foi um prazer poder dividir bancada com a ex-top 1 patogenicidade bacteriana do Brasil;

Aos Professores Associados Dra. Vera Lúcia Mores Rall, Dr. Ary Fernandes Junior e Dr. Josias Rodrigues que sempre disponibilizaram itens de consumo e equipamentos quando o nosso laboratório precisou;

Às funcionárias e funcionários do Setor de Microbiologia e Imunologia da Unesp de Botucatu, em especial à Dra. Aline Parisoto que, com seu trabalho, proporcionou um ambiente propício para que este projeto pudesse ser desenvolvido, e à Dra. Ivana Giovanetti Castilho, que iniciou o projeto;

Às funcionárias e funcionários do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, que também proporcionaram o ambiente necessário para o desenvolvimento deste projeto. Em especial aos pesquisadores Dra. Angela Silva Barbosa, Dra. Cecília Mari Abe, Dra. Cláudia Trigo Pedroso de Moraes, Dr. Enéas de Carvalho e Dra. Marcia Regina Franzolin, bem como aos colegas Matilde Costa Lima de Souza, , Míriam Aparecida da Silva e Juliana Moutinho Polatto Yassuda.

À Dra. Rosa Maria Chura-Chambi, por todo o empenho na expressão e purificação da proteína utilizada para obtenção dos anticorpos contra Ema, além de me instruir em meus primeiros géis de SDS-PAGE;

Aos funcionários da Unifesp Caio de Mello Villatore e Cristiane Rodrigues que realizaram as nossas transações referentes ao projeto temático;

Ao Bando de Teatro Científico Siriema, que possibilitou me aproximar mais de uma forma de arte que eu amo, a fotografia;

A todos os membros da banca – Prof. Dr. Rodrigo Tavanelli Hernandez, Profa. Dra. Gislane Lelis Vilela de Oliveira, Profa. Dra. Tânia Aparecida Tardelli Gomes do Amaral, Profa. Dra. Claudia Trigo Pedroso de Moraes e Profa. Dra. Claudia Andrade Freire e suplentes – Profa. Dra. Vera Lúcia Mores Rall, Prof. Dr. Ary Fernandes Júnior, Profa. Dra. Ana Carolina de Mello Santos Gheller e Prof. Dr. Josias Rodrigues.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Waldir Pereira Elias Junior, que me recebeu em seu laboratório e se dispôs a discutir os resultados e a tese comigo. Algum dia voltarei para São Paulo para comermos juntos o milho do metrô;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo Tavanelli Hernandez, que desde o meu mestrado eu o via como o melhor exemplo de imposto bem pago. Uma pessoa completamente apaixonada pelas atividades que desenvolve. Nestes últimos quatro anos, pude entender melhor o que é ser cientista no Brasil graças a você;

FINANCIAMENTO DO PROJETO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 88887.482477/2020-00; e processo n° 2017/14821-7, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

“A vida é uma tragédia quando vista de perto, mas uma comédia quando vista de longe.”

Richard Roud, 1977, parafraseando Charlie Chaplin.

RESUMO

A doença diarreica é uma das principais causas de mortalidade entre crianças com até cinco anos de idade, sendo que dentre os principais causadores dessa doença está a *Escherichia coli* diarreio gênica (DEC). *E. coli* enteropatogênicas (EPEC) é um dos seis patotipos de DEC, sendo seu principal fenótipo de virulência a formação da lesão *attaching and effacing*, que se caracteriza pela destruição das microvilosidades da célula hospedeira por meio do recrutamento de F-actina polimerizada no local de aderência, levando à formação de uma estrutura semelhante a um pedestal. De acordo com a presença ou ausência do operon *bfp*, os isolados de EPEC podem ser classificados como típicos (tEPEC) ou atípicos (aEPEC), respectivamente. Estudos anteriores demonstraram que aEPEC é o principal patotipo de *E. coli* diarreio gênica isolado no Brasil, bem como a associação de sorotipos específicos, incluindo o sorotipo O2:H16, com surtos diarreicos. Uma análise genética comparativa de 106 aEPEC sequenciadas, incluindo 7 aEPEC do sorotipo O2:H16, revelou um conjunto de 31 genes detectados exclusivamente neste sorotipo. Dentre esses genes, identificamos um responsável por codificar uma proteína autotransportadora (AT) não caracterizada. Portanto, o objetivo do presente estudo foi caracterizar molecular e fenotipicamente esta nova proteína AT. O gene que codifica a nova proteína AT foi clonado no vetor pBAD/Myc-His A, gerando o plasmídeo recombinante pIC, que foi transformado na *E. coli* MS427, uma variante de MG1655 deletada no fator de agregação *flu*. Este isolado foi utilizado em ensaios de autoagregação realizados em caldo infusão cérebro coração e ensaio de formação de biofilme realizado em placas de poliestireno com 24, 48 e 72 horas de incubação em caldo de lisogenia. Além disso, a região responsável por codificar o domínio passageiro (aminoácidos 22 a 471) da nova proteína AT foi clonada no vetor pET-28a, que foi transformado na BL21(DE3). A proteína recombinante fusionada à cauda de histidina foi expressa através de indução por isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo, purificada por cromatografia de afinidade com metal imobilizado e utilizada para a produção de um soro policlonal específico em coelho. Este soro foi posteriormente utilizado para confirmar a produção da nova AT na superfície das bactérias MS427(pIC) e selvagem BA92 via microscopia eletrônica de transmissão (MET) com imunomarcagem e para avaliar a sua ligação a macromoléculas da matriz extracelular. Esses experimentos foram realizados utilizando 1 μM do domínio passageiro recombinante purificado contra 1 μg dos colágenos I, III, IV e V, fibronectina celular e plasmática, laminina, fibrinogênio e vitronectina. Ensaio de autoagregação mostraram que o clone contendo o plasmídeo com o gene responsável pela síntese da nova proteína AT – MS427(pIC), promoveu um forte fenótipo de autoagregação, resultando em diferença significativa a partir de 20 minutos ($P < 0,001$) quando comparado a MS427(pBAD). A formação de biofilme em poliestireno também foi significativamente aumentada ($P < 0,0001$) na MS427(pIC) quando comparada com a bactéria controle carregando o vetor pBAD/Myc-His A vazio. Além disso, o domínio passageiro recombinante purificado se ligou ao fibrinogênio ($P = 0,0003$), fibronectina plasmática e celular ($P < 0,0001$), colágeno tipo I ($P = 0,0097$), III e V ($P < 0,0001$) e laminina ($P = 0,0003$). Por fim, a imunomarcagem visualizada por MET mostrou a localização da proteína AT como um componente proteico da membrana externa bacteriana. Em conclusão, demonstramos que a nova proteína AT caracterizada no presente estudo promove autoagregação, formação de biofilme em poliestireno e, devido a capacidade de se ligar a múltiplas moléculas de matriz extracelular, nós a denominamos Ema: Extracellular Matrix-binding Autotransporter.

ABSTRACT

Diarrheal diseases are among the main causes of mortality in children up to 5 years of age, and the diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC) pathotypes are frequently associated as the causative agents of this pathology. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is one of the six DEC pathotypes, characterized by its ability to induce the attaching and effacing lesion, characterized by the destruction of host cell microvilli through the recruitment of polymerized F-actin at the site of adherence, leading to the formation of a pedestal-like structure. According to the presence or absence of the *bfp* operon, EPEC isolates can be classified as typical (tEPEC) or atypical (aEPEC), respectively. Previous studies have shown that EPEC is the main pathotype of diarrheagenic *E. coli* reported in Brazil, as well as the association of specific serotypes, including serotype O2:H16, with diarrheal outbreaks. A comparative genetic analysis of 106 sequenced aEPEC, including 7 aEPEC of serotype O2:H16, revealed a set of 31 genes detected exclusively in this serotype. Among them, we identified one responsible to encode an uncharacterized autotransporter protein (AT). Therefore, the objective of the present study was to characterize this new AT protein molecularly and phenotypically. The gene encoding the new AT protein was cloned into the pBAD/Myc-His A vector, generating the recombinant plasmid pIC, which was transformed into *E. coli* MS427, a variant of MG1655 deleted in the aggregation factor *flu*. This isolate was used in autoaggregation assays carried out in brain heart infusion broth and biofilm formation assay carried out in polystyrene plates with 24, 48 and 72 hours of incubation in lysogeny broth. Furthermore, we cloned the region responsible for encoding the passenger domain (amino acids 22 to 471) of the new AT protein into the pET-28a vector, which was transformed into BL21(DE3). The recombinant protein carrying histidine tail was expressed by Isopropyl-beta-D-thiogalactoside induction, purified by immobilized metal affinity chromatography and used to produce a rabbit serum. This serum was subsequently used to confirm the production of the new AT on the surface of MS427(pIC) and wild-type BA92 bacteria via immunolabeled transmission electron microscopy (TEM) and to evaluate its binding to extracellular matrix macromolecules. These experiments were carried out using 1 μ M of the purified recombinant passenger domain against 1 μ g of collagens I, III, IV and V, cellular and plasmatic fibronectin, laminin, fibrinogen and vitronectin. Autoaggregation assays showed that the clone containing the plasmid with the gene responsible for the synthesis of the new AT protein – MS427(pIC), promoted a strong autoaggregation phenotype, resulting in a significant difference after 20 minutes ($P < 0.001$) when compared to MS427(pBAD). Biofilm formation on polystyrene was also significantly increased ($P < 0.0001$) in MS427(pIC) when compared to control bacteria carrying the empty pBAD/Myc-His A vector. Furthermore, the purified recombinant passenger domain bound to fibrinogen ($P = 0,0003$), plasma and cellular fibronectin ($P < 0,0001$), type I ($P = 0,0097$), III and V collagen ($P < 0.0001$) and laminin ($P = 0.0003$). Finally, TEM immunolabeling localized the protein as a proteinaceous component of the bacterial outer membrane. In conclusion, we demonstrated that the new AT protein characterized in the present study promotes self-aggregation, biofilm formation on polystyrene and, due to its ability to bind to multiple extracellular matrix molecules, we named it Ema: Extracellular Matrix-binding Autotransporter.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo das proteínas autotransportadoras (AT) da família Va.....	13
Figura 2. Mapa ilustrativo do vetor de expressão pET-28a e localização dos sítios reconhecidos pelas enzimas de restrição XhoI e BamHI.....	26
Figura 3. Vetor de expressão pBAD/ <i>Myc</i> -His A e região de restrição das enzimas XhoI e KpnI.....	26
Figura 4. Análise do SignalP mostrando o provável ponto de clivagem do peptídeo sinal, responsável pela passagem da proteína Ema do citoplasma para o espaço periplasmático bacteriano através do sistema de secreção Sec.....	38
Figura 5. Ponto de inserção do gene <i>ema</i> no cromossomo do isolado de <i>E. coli</i> enteropatogênica atípica (aEPEC) BA92.....	39
Figura 6. Domínios proteicos encontrados na proteína Ema.....	40
Figura 7. Árvore de máxima verossimilhança comparando a nova proteína autotransportadora Ema com outras proteínas autotransportadoras já descritas na literatura.....	41
Figura 8. Predição do arranjo estrutural da proteína Ema realizado no caderno ColabFold.....	42
Figura 9. Eletroforese em gel de agarose (1%) corado por solução SYBR Safe para análise dos produtos de amplificação correspondentes ao gene <i>ema</i> completo e de seu domínio passageiro, usando o DNA do isolado selvagem BA92 como molde.....	43
Figura 10. Análise por SDS-PAGE (12%) do conteúdo proteico presente na cultura do isolado BL21(DE3)(pHO) em diferentes tempos após indução por 0,5 mM de IPTG.....	44
Figura 11. Análise por SDS-PAGE (12%) do domínio passageiro da proteína recombinante Ema fusionada à cauda de histidina após sua ressolubilização em alta pressão em diferentes pH.....	45
Figura 12. Curva de absorbância da purificação do domínio passageiro recombinante da proteína Ema fusionada à cauda de histidina, através de cromatografia de afinidade de metais imobilizados utilizando coluna de níquel.....	46
Figura 13. <i>Immunoblotting</i> de detecção do domínio passageiro da proteína Ema fusionada à cauda de histidina em extratos de cultura em caldo LB de BL21(DE3)(pET-28a) e BL21(DE3)(pHO).....	47
Figura 14. Análise por SDS-PAGE (12%) comparando o rendimento das frações de Ema obtidas no novo lote de purificação utilizando curva de BSA como referência.....	48
Figura 15. <i>Immunoblotting</i> de detecção do domínio passageiro da proteína Ema fusionada à cauda de histidina em alíquotas da solução concentrada de Ema purificada..	48

Figura 16. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) com imunomarcaçã mostrando a presença da proteína Ema na superfície bacteriana.....	50
Figura 17. Ensaio de autoagregaçã em caldo BHI contendo 0,2% de L-arabinose com os isolados MS427 carreando o gene que codifica Ema, MS427(pIC), bem como os isolados controle, MS427(pBAD) e MS427(pCO4), que alberga o gene responsável por codificar o antígeno 43 clonado no vetor de expressã pBAD/ <i>Myc</i> -His A.....	51
Figura 18. Ensaio de autoagregaçã visualizados por microscopia de imunofluorescência.....	52
Figura 19. A proteína Ema promove aumento da produçã de biofilme em superfície de poliestireno.....	53
Figura 20. A proteína Ema não promove aumento da formaçã de biofilme em superfície de vidro.....	54
Figura 21. Ensaio de ligaçã à componentes da matriz extracelular utilizando 1 µM da proteína Ema contra 1 µg de cada componente testado.....	55
Figura 22. Curva dose-resposta utilizando diferentes concentraçõs de Ema contra 1 µg de fibronectina celular ou plasmática.....	55
Figura 23. Curva dose-resposta utilizando diferentes concentraçõs de Ema contra 1 µg dos domínios F30 (domínio de ligaçã à heparina e fibrina – HBD) e F45 (domínio de ligaçã à gelatina e colágeno – GBD) da fibronectina.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Patotipos de <i>Escherichia coli</i> diarreio gênica (DEC), seus principais fatores de virulência e marcadores genéticos.....	2
Tabela 2. Efetores de EPEC localizados na região LEE e suas funções celulares e fisiológicas.....	7
Tabela 3. Clusters de genes exclusivos ao sorotipo O2:H16 de <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica atípica.....	19
Tabela 4. Sequências de aminoácidos de proteínas ATs que foram empregadas para determinar a similaridade da proteína Ema com adesinas ATs e SPATEs previamente descritas.....	22
Tabela 5. Lista de plasmídeos e cepas empregadas nos ensaios deste trabalho.....	24
Tabela 6. <i>Primers</i> empregados para a amplificação do gene <i>ema</i> e sua porção correspondente ao domínio passageiro, que foram clonados nos vetores de expressão pBAD/ <i>Myc</i> -His A e pET-28a, gerando os plasmídeos recombinantes pIC e pHO respectivamente.....	25
Tabela 7. <i>Primers</i> que foram empregados no sequenciamento dos vetores pIC e pHO para verificar a integridade dos genes clonados.....	29
Tabela 8. Anotação realizada pelo Prokka dos genes contidos na região genômica contendo o gene <i>ema</i> presente no isolado BA92.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS

- A/E – lesão *attaching and effacing*
- AA – aderência agregativa
- AAF – fímbria de aderência agregativa
- AD – aderência difusa
- aEPEC – *Escherichia coli* enteropatogênica atípica
- AIC – Critério de informação de Akaike
- AIDA-I (família) – família de adesinas autotransportadoras
- AL – aderência localizada
- AL-L – aderência localizada-*like*
- AMP – monofosfato de adenosina
- ANOVA – análise de variância
- APEC – *Escherichia coli* patogênica aviária
- ARF – fator de ribosilação de ADP
- AT – autotransportadoras
- BHI – infusão cérebro coração
- BIC – Critério de informação Bayesiano
- BSA – soroalbumina bovina
- C-terminal – região carboxi-terminal
- DAEC – *Escherichia coli* difusamente aderente
- DAPI - 4',6-Diamidino-2-fenilindol
- DEC – *Escherichia coli* diarreiogênica
- DO – densidade óptica
- EAEC – *Escherichia coli* enteroagregativa
- EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético
- EHEC – *Escherichia coli* enterohemorrágica
- EIEC – *Escherichia coli* enteroinvasora
- ELISA – ensaio de imunoabsorção enzimática
- EPEC – *Escherichia coli* enteropatogênica
- Esp – EPEC-*secreted proteins*
- ETEC – *Escherichia coli* enterotoxigênica
- ExPEC – *Escherichia coli* patogênica extraintestinal

FAK – quinase de adesão focal

Gb3 – globotriaosilceramida

Gb4 – globotetraosilceramida

GEF – fator de troca de nucleotídeo de guanina

GMP – monofosfato de guanosina

HUS – síndrome hemolítica urêmica

IMAC – cromatografia de metais imobilizados

IPTG - isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo

LB – caldo lisogenia

LEE – *locus of enterocyte effacement*

LPS – lipopolissacarídeo

LT – toxina termolábil

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

N-terminal – região amino-terminal

NHE3 – antiportador de sódio-hidrogênio 3

Nle – efetores não-LEE

OPD - dihidroclorato de o-fenilenediamina

PAK – quinases ativadas por p21

PBS – tampão salina fosfato

PBS-BSA – tampão salina fosfato contendo 0,2% de soroalbumina bovina

PBS-T – tampão salina fosfato contendo 0,05% de Tween-20

PCR – reação em cadeia da polimerase

pEAF – plasmídeo do fator de aderência de EPEC

SDS-PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio

SGLT-1 – cotransportador de glicose dependente de sódio – 1

SNX9 – nexina organizadora 9

SPATE – autotransportadoras serinoproteases de *Enterobacteriaceae*

SST5 – Sistema de Secreção do tipo 5

ST – toxina termoestável

STEC – *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga

Stx – toxina Shiga

T3SS – Sistema de Secreção do Tipo 3

TAA: adesinas autotransportadoras triméricas

tEPEC – *Escherichia coli* enteropatogênica típica

UPEC – *Escherichia coli* patogênica do trato urinário

Va – Família “a” de autotransportadoras do sistema de secreção do tipo 5

Vb – Família “b” de autotransportadoras do sistema de secreção do tipo 5

Vc – Família “c” de autotransportadoras do sistema de secreção do tipo 5

Vd – Família “d” de autotransportadoras do sistema de secreção do tipo 5

Ve – Família “e” de autotransportadoras do sistema de secreção do tipo 5

SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA.....	1
1.1 Doença diarreica.....	1
1.2 <i>Escherichia coli</i>	1
1.3 Classificação das <i>Escherichia coli</i>	1
1.3.1 <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC).....	3
1.3.2 <i>Escherichia coli</i> difusamente aderente (DAEC).....	3
1.3.3 <i>Escherichia coli</i> enteroinvasora (EIEC).....	4
1.3.4 <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica (ETEC).....	4
1.3.5 <i>Escherichia coli</i> produtora de toxina Shiga (STEC).....	5
1.3.6 <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica (EPEC).....	6
1.4 Importância dos sorotipos.....	10
1.5 Proteínas autotransportadoras – Sistema de Secreção do Tipo V.....	11
1.5.1 Proteínas autotransportadoras da família Va.....	11
1.5.2 Proteínas autotransportadoras da família Vb.....	12
1.5.3 Proteínas autotransportadoras da família Vc.....	12
1.5.4 Proteínas autotransportadoras da família Vd.....	14
1.5.5 Proteínas autotransportadoras da família Ve.....	14
1.6 Classificação das proteínas autotransportadoras de acordo com seus domínios proteicos.....	15
1.6.1 Família AIDA-I.....	15
1.6.2 Família TAA.....	17
1.6.3 Família SPATE.....	18
2. OBJETIVO.....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 Isolado de aEPEC O2:H16 utilizado no presente estudo.....	21
3.2 Caracterização <i>in silico</i> da sequência deduzida de aminoácidos da proteína Ema.....	21
3.3 Detecção do ponto de inserção do gene <i>ema</i> no cromossomo do isolado selvagem BA92.....	23
3.4 Predição do arranjo molecular da proteína Ema.....	23
3.5 Clonagens do gene <i>ema</i>	24
3.6 Expressão da proteína recombinante contendo apenas o domínio passageiro da proteína Ema fusionada à cauda de histidina.....	29
3.7 Purificação da proteína recombinante contendo apenas o domínio passageiro da proteína Ema.....	30

3.8 <i>Immunoblotting</i>	30
3.9 Produção de soro em coelho contra a proteína Ema.....	32
3.10 Adsorção do soro anti-Ema.....	32
3.11 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) com imunomarcaçã.....	33
3.12 Teste de autoagregaçã.....	34
3.13 Produção de biofilme em superfície de poliestireno.....	35
3.14 Produção de biofilme em superfície de vidro.....	35
3.15 Ensaio de interação da proteína Ema com componentes de matriz extracelular.....	36
4. RESULTADOS	38
4.1 Características gerais da proteína Ema.....	38
4.2 Detecçã do ponto de inserçã do gene <i>ema</i> no cromossomo do isolado selvagem BA92.....	38
4.3 Similaridade com outras proteínas já descritas na literatura.....	40
4.4 Prediçã do arranjo molecular da nova proteína autotransportadora.....	41
4.5 Verificaçã da presençã do gene <i>ema</i> no genoma da BA92 por reaçã em cadeia da polimerase (PCR).....	42
4.6 Expressã e purificaçã da proteína recombinante contendo apenas o domínio passageiro de Ema.....	43
4.7 Confirmaçã da presençã de Ema na superfície bacteriana por MET com imunomarcaçã.....	49
4.8 Ensaio de autoagregaçã.....	51
4.9 Produção de biofilme.....	53
4.10 Ensaio de ligaçã à componentes da matriz extracelular.....	54
5. DISCUSSÃO	57
6. CONCLUSÃO	63
7. REFERÊNCIAS	64

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Doença diarreica

A doença diarreica aparece como uma das principais causas de mortalidade entre crianças com até cinco anos de idade (BRYCE et al. 2005; WHO, 2017). As infecções do trato gastrointestinal são transmitidas pelo consumo de água e/ou alimentos contaminados, e mais raramente, através do contato direto com indivíduos que possuem hábitos precários de higiene pessoal (WHO, 2017). Entre os principais agentes associados às infecções do trato gastrointestinal estão os protozoários (*Cryptosporidium* spp, *Giardia lamblia* e *Entamoeba histolytica*), os vírus (Rotavírus, Calicivírus, Astrovírus, Norovírus GII, Sapovírus e Adenovírus) e as bactérias (*Shigella* spp, *Salmonella* spp, *Campylobacter* spp, *Aeromonas* spp, *Vibrio cholerae*, *Escherichia albertii* e os distintos patotipos de *Escherichia coli* diarreiogênica) (LANATA et al. 2013; PLATS-MILLS et al. 2015; CROXEN et al. 2013; BHATT et al. 2019; KOTLOFF et al. 2019).

1.2 *Escherichia coli*

Sendo inicialmente classificada como *Bacterium coli commune* (ESCHERICH, 1885), esta espécie chegou a receber 12 nomes sinônimos ao longo dos anos até chegar em *Escherichia coli* (COWAN, 1954). É caracterizada por ser um bacilo Gram-negativo, oxidase-negativa da família *Enterobacteriaceae*, anaeróbio facultativo com temperatura ótima de crescimento 37 °C. Esta espécie compreende indivíduos móveis e sésseis, além de fermentadores e não-fermentadores de lactose (CROXEN et al. 2013).

1.3 Classificação das *Escherichia coli*

Com o intuito de diferenciar isolados de *E. coli* causadores de doenças no trato gastrointestinal daqueles isolados responsáveis por causar outras infecções, tais como: meningite, sepse, cistite e pielonefrite, os isolados de *E. coli* são didaticamente divididos em *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC) e *E. coli* diarreiogênica (DEC). Infecções causadas por ExPEC são comuns em todas as idades e normalmente ocorrem quando o tecido afetado está com sua integridade comprometida (RUSSO e JOHNSON, 2000).

Além das implicações causadas em humanos, as ExPEC também podem afetar diversos animais. Existem trabalhos na literatura visando caracterizar patotipos específicos de certos animais. Tais estudos envolvem aves (MALUTA et al. 2014, CUNHA et al. 2017), cães (ELANKUMARAN et al. 2022, XAVIER et al. 2022), gatos

(BROOKS et al. 2013, HUBER et al. 2013) e bovinos (ALVES et al. 2023, ORSI et al. 2023). Com exceção dos trabalhos realizados por Xavier e colaboradores (2022), Brooks e colaboradores (2013) e Alves e colaboradores (2023) que sugerem o potencial zoonótico dos isolados de ExPEC.

Por sua vez, tendo como base as diferentes estratégias de virulência e as doenças que causam no hospedeiro, os isolados de DEC podem ser classificados nos seguintes patotipos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* produtora da toxina Shiga (STEC) incluindo o subgrupo *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC) (NATARO e KAPER, 1998; KAPER et al, 2004; CROXEN et al. 2013). Os principais fatores de virulência associados a cada patotipo de DEC encontram-se resumidos na Tabela 1.

Tabela 1. Patotipos de *Escherichia coli* diarreio gênica (DEC), seus principais fatores de virulência e marcadores genéticos.

Patotipos de DEC	Principais mecanismos de virulência	Principais marcadores genéticos
<i>E. coli</i> enteropatogênica (EPEC)	Produção da lesão <i>attaching and effacing</i> (A/E) na superfície das células infectadas	<i>eae</i>
<i>E. coli</i> enteroagregativa (EAEC)	Produção do padrão de aderência agregativa (AA) na superfície de células infectadas e formação de biofilme	<i>aatA</i> e <i>aggR</i>
<i>E. coli</i> produtora da toxina Shiga (STEC)	Produção das toxinas Shiga	<i>stx1</i> e <i>stx2</i>
<i>E. coli</i> enterotoxigênica (ETEC)	Produção das toxinas termolábil (LT) e/ou termoestável (ST)	<i>estA</i> e <i>eltB</i>
<i>E. coli</i> enteroinvasora (EIEC)	Invasão dos enterócitos	<i>icsA</i>
<i>E. coli</i> difusamente aderente (DAEC)	Produção do padrão de aderência difusa (AD) na superfície de células infectadas	<i>daaC</i> e <i>afaC</i>

NATARO e KAPER, 1998; KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004; SJÖLING et al. 2006; CROXEN et al. 2013.

1.3.1 *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC)

Os isolados de EAEC foram descritos inicialmente sendo chamados de *Escherichia coli* enteroaderente-agregativas, por apresentarem um padrão de aderência até então inédito na literatura - o padrão agregativo, onde as bactérias se aderiam às células HEp-2 (adenocarcinoma de laringe) em um arranjo semelhante a “tijolos empilhados” (NATARO et al. 1987).

O padrão agregativo de aderência está tradicionalmente relacionado às fímbrias de aderência agregativas – AAF, enumeradas de I a V (HEBBELSTRUP JENSEN et al. 2014). Estas fímbrias são reguladas através do regulador transcricional AggR, que além de controlar a expressão das AAFs, também controla a expressão de genes plasmidiais como *aap* - dispersina (HARRINGTON, DUDLEY e NATARO, 2006) e *shf*, que intensifica formação de biofilme nos isolados de EAEC (FUJIYAMA et al. 2008), além de genes cromossômicos, como os responsáveis pelo sistema de secreção do tipo VI (DUDLEY et al. 2006). A dispersina atua como uma proteína que recobre a superfície da bactéria evitando interação entre as AAFs. Dessa maneira, possibilita que a EAEC possa se dispersar pelo epitélio celular (SHEIKH et al. 2002). Além disso, a dispersina modifica a carga da superfície bacteriana, impedindo que as AAFs se colabem ao LPS (VELARDE et al. 2007). Os isolados de EAEC que possuem o gene *aggR* são classificados como típicos, enquanto os que não possuem são classificados como atípicos (HARRINGTON, DUDLEY e NATARO, 2006).

Além das AAF, o padrão de adesão agregativo também pode ser estimulado através da produção da adesina AFP (*aggregate-forming pili*), que não é regulado pelo gene *aggR*, mas sim *afpR*. Além de contribuir para este fenótipo, a AFP também contribui para autoagregação e adesão a células HEp-2 (LANG et al. 2018), bem como adesão a HeLa (adenocarcinoma de colo de útero), HT-29 (adenocarcinoma colorretal) e 5637 (carcinoma de bexiga). Além de aparecer em EAEC, a AFP é capaz de contribuir para estes fenótipos em outros *backgrounds* genéticos, como em *E. coli* uropatogênica (UPEC) (SCHÜROFF et al. 2021) e STEC (LANG et al. 2018).

1.3.2 *Escherichia coli* difusamente aderente (DAEC)

Este grupo compreende as *E. coli* que são capazes de aderir a células HeLa/HEp-2 de forma difusa, isto é, “espalhadas” pela superfície da célula (SCALETISKY, SILVA e TRABULSI, 1984). Os isolados de DAEC produzem adesinas da família Afa/Dr, como a adesina F1845, que se ligam ao fator de aceleração do decaimento (DAF) associado às

microvilosidades, levando ao rearranjo do citoesqueleto, causando rearranjo parcial ou destruição das microvilosidades (CROXEN et al. 2013).

Além disso, a adesina Dr é capaz de se ligar a colágeno IV, levando a infecção renal persistente em modelo murino, indicando um potencial uropatogênico para os isolados de DAEC. Contudo, essa função ainda não é bem esclarecida no intestino, uma vez que as células polarizadas não expressam colágeno do tipo IV em sua região apical (SERVIN, 2005).

1.3.3 *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC)

Os isolados de EIEC possuem diversas semelhanças com os isolados do gênero *Shigella*. Já foi proposto que tanto EIEC quanto *Shigella* devam ser tratadas como sendo o mesmo microrganismo, utilizando o itálico em *Shigella* apenas por razões históricas (LAN e REEVES, 2002). Estima-se que *Shigella*/EIEC evoluíram a partir de uma *E. coli* não invasiva que adquiriu o plasmídeo pINV, que contém os genes necessários para o desenvolvimento da virulência destes microrganismos, e perdeu supressores de virulência – como a lisina descarboxilase CadA, que modula a expressão de intimina em isolados de EHEC (VAZQUEZ-JUAREZ et al. 2008) – e a capacidade de fermentar lactose e motilidade. Contudo, é importante notar que existem isolados de EIEC que possuem motilidade e são capazes de fermentar lactose, sugerindo que EIEC possa ser um intermediário entre *E. coli* não invasiva e *Shigella* (LAN e REEVES, 2002).

Os isolados de EIEC entram nas células M intestinais através de transcitose e quando alcançam a submucosa, são fagocitadas por macrófagos, onde induzem morte celular. No caso de isolados que não possuem motilidade inata, ao alcançarem o citoplasma de células epiteliais, a proteína IcsA desses isolados leva ao aumento da afinidade de N-WASP pelo complexo Arp2/3, levando à formação de um complexo com actina polimerizada que atua como propulsor para a bactéria tanto para sua motilidade intracelular quanto intercelular (EGILE et al. 1999 e CROXEN et al. 2013).

1.3.4 *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC)

Os isolados de ETEC aparecem pela primeira vez na literatura ainda sob o nome de *Bacterium coli*, sendo isolados de um indivíduo com sintomas clássicos de cólera. Após seguidas tentativas falhas de isolar *Vibrio cholerae*, foi constatado que a infecção era de fato causada por *E. coli* (DE, BHATTACHARYA e SARKAR, 1956). Esta

controvérsia se deve ao fato de que ETEC produz duas toxinas: termolábil (LT) e termoestável (ST).

A LT é estruturalmente e funcionalmente semelhante à toxina produzida por *V. cholerae*, sendo composta por uma subunidade A e cinco subunidades B. As subunidades B se ligam aos enterócitos, permitindo a entrada da subunidade A que ativa a adenilato ciclase causando acúmulo de AMP cíclico. Isso leva ao aumento de secreção de fluido rico em eletrólitos e diminuição da absorção dos enterócitos, levando à diarreia aquosa (CLEMENTS e FINKELSTEIN, 1979; LEVINE et al. 1983).

A ST é termoestável por possuir diversas cisteínas conectadas por pontes dissulfeto. Se liga à enzima guanilato ciclase C, levando ao aumento de GMP cíclico celular. Isso leva à secreção de sódio e/ou inibição da captação de cloreto sódio, levando à secreção de líquido intestinal (NATARO e KAPER, 1998). Atualmente, são descritas duas variantes de ST: STa e STb. STa foi a primeira a ser descrita, é solúvel em metanol e é encontrada nos isolados de ETEC de casos humanos, enquanto STb é insolúvel em metanol e causa patogenicidade em suínos (BURGESS et al. 1978; LEVINE et al. 1983).

1.3.5 *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC)

Este grupo compreende as *E. coli* que possuem o gene para uma das variantes da toxina Shiga, ou seja, *stx*₁ ou *stx*₂. Os isolados de STEC podem causar desde diarreia leve à diarreia sanguinolenta e síndrome hemolítica urêmica (CROXEN et al. 2013). A toxina Stx1 é dividida em quatro variantes (a – d) e Stx2 é dividida em sete variantes (a – g) (SCHEUTZ et al. 2012), sendo mais associada a severidade da doença causada em humanos do que Stx1 (BOERLIN et al. 1999).

As toxinas Stx 1 e 2 são compostas de uma subunidade A e cinco subunidades B (FRASER et al. 2004). As subunidades B permitem que a toxina se ligue ao receptor celular Gb3 (com exceção da variante Stx2e, que se liga à Gb4) (LEE, CHERLA e TESH, 2010). Após esta ligação, as toxinas são internalizadas em um endossomo e transportadas do complexo de Golgi ao retículo endoplasmático. Tal fenômeno pode ser confirmado ao realizar incubações à 20 °C, que inibem este tipo de transporte no complexo de Golgi (SANDVIG et al. 2002).

Dentro do retículo endoplasmático, a subunidade A é clivada em A1 e A2 através da ação de furina e redução de pontes dissulfeto. Em seguida, a subunidade A1 alcança o citoplasma através de um fenômeno chamado retrotranslocação e, através de sua atividade

N-glicosidase, remove uma adenina do RNA ribossomal 28S, inibindo a síntese proteica na célula e posteriormente levando à apoptose (LEE, CHERLA e TESH, 2010).

Por fim, existe uma variante bem caracterizada de STEC na literatura que compreende o grupo que produz uma ou mais toxinas de Shiga e possui a ilha de patogenicidade LEE, que contém os genes responsáveis pelas proteínas que causam lesão A/E. Tal variante é denominada EHEC (NATARO, KAPER e MOBLEY, 2004).

1.3.6 *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)

As EPECs compreendem o primeiro grupo de *E. coli* diarreio gênica caracterizado. O termo EPEC aparece pela primeira vez em uma publicação de Neter e colaboradores (NETER et al. 1955), para designar o primeiro grupo de *E. coli* patogênica identificado e associado com a doença diarreica em crianças pelo médico John Bray em 1945 na Inglaterra (BRAY, 1945).

O principal determinante de patogenicidade dos isolados de EPEC é a capacidade em causar uma lesão histopatológica nas células do epitélio infectado conhecida como lesão *attaching and effacing* (A/E) (MOON et al. 1983). A lesão A/E é caracterizada pela ligação íntima das bactérias às células epiteliais, recrutamento de elementos do citoesqueleto no local de aderência, principalmente F-actina, e a formação de uma estrutura semelhante a um pedestal, culminando com a destruição das microvilosidades intestinais e consequente redução da capacidade absorptiva de nutrientes (MOON et al. 1983; KNUTTON et al. 1998).

Os genes responsáveis por codificar proteínas necessárias para o estabelecimento da lesão A/E nas células hospedeiras infectadas estão localizados em uma ilha de patogenicidade conhecida como *Locus of enterocyte effacement*, ou região LEE (MCDANIEL et al. 1995). Essa ilha de patogenicidade contém 41 genes organizados em cinco operons (LEE1 – LEE5), além de unidades mono- ou bicistrônicas (GAYTÁN et al. 2016). Os genes localizados nos operons LEE1, 2 e 3 codificam um sistema de secreção do tipo 3 (T3SS), responsável por translocar diversas proteínas efetoras para a célula hospedeira infectada. A região LEE5 alberga os genes *eae* e *tir* responsáveis por codificar a adesina intimina, bem como seu receptor Tir (*translocated intimin receptor*), respectivamente (JERSE et al. 1990a; KENNY et al. 1997b).

Na região LEE4 encontram-se os genes *espA*, *espB* e *espD* responsáveis por codificar as EPEC-*secreted proteins* (EspA, EspB e EspD) que compõem o translocon do SST3. Enquanto a proteína EspA recobre a agulha do SST3 (EscF), EspB e EspD

localizam-se na extremidade do translocon e são responsáveis pela formação do poro de translocação na célula hospedeira infectada (KNUTTON et al. 1998; IDE et al. 2001). O SST3 de EPEC é capaz de translocar para a célula infectada efetores codificados por genes localizados na região LEE (Tabela 2), assim como efetores codificados por genes localizados em outras ilhas de patogenicidade e profagos, que são coletivamente conhecidos como efetores não-LEE, capazes de interferir com vários processos da célula hospedeira, tais como: modulação do ciclo celular (Cif), inibição da exportação de proteínas pelo retículo endoplasmático (NleA), inibição da sinalização pró-inflamatória (NleC e NleE), inibição da apoptose (NleB1, NleD, NleH1, NleH2 e NleF) e invasão (EspT) (DEAN e KENNY, 2009; WONG et al. 2011, PEARSON et al. 2016).

Tabela 2. Efetores de EPEC localizados na região LEE e suas funções celulares e fisiológicas. Adaptado de WONG et al. 2011. (continua)

Efector	Funções celulares e fisiológicas
EspB	Componente de translocação do poro Disrupção de ligações celulares adjacentes Ligação da miosina para inibir fagocitose
Tir	Receptor para a intimina Formação do pedestal de actina Regulação negativa da formação de filopódios dependente de Map Inativação do cotransportador de glicose dependente de sódio - 1 (SGLT-1)
EspF	Disrupção mitocondrial Inativação do antiportador de sódio-hidrogênio 3 (NHE3) Inativação de SGLT-1 Disrupção de nucléolo Disrupção de filamentos intermediários Ativação da nexina organizadora 9 (SNX9) para induzir remodelamento da membrana, se liga e ativa N-WASP, inibição de fagocitose dependente de fagócitos
Map	Disrupção mitocondrial, inativação de SGLT-1, disrupção de <i>tight junction</i> e atividade de GEF (fator de troca de nucleotídeo de guanina) ao Cdc42 induzindo formação de filopódio transiente

Tabela 2. Efeitores de EPEC localizados na região LEE e suas funções celulares e fisiológicas. Adaptado de WONG et al. 2011. (continuação)

EspG	Disrupção de microtúbulos, bloqueia sinalização das GTPase ARF (fator de ribosilação de ADP) e estimula as PAKs (quinases ativadas por p21) a inibir o tráfego endomembranoso
EspH	Bloqueia sinalização de Rho GTPase e fagocitose mediada por FCyR e promove aumento do comprimento do pedestal de actina
EspZ	Aprimora sinalização de β 1-integrina e FAK (quinase de adesão focal) para inibir apoptose e citotoxicidade celular

Os isolados de EPEC podem ser divididos em típicos (tEPEC) ou atípicos (aEPEC), com base no plasmídeo EAF (EPEC *adherence factor*), presente apenas na tEPEC (TRABULSI, KELLER e GOMES, 2002; HERNANDES et al. 2009). Em tEPEC, a produção de uma fímbria do tipo IV, denominada *bundle-forming pilus* (BFP), é responsável pelo estabelecimento do padrão de aderência localizada (AL), que é caracterizado pela formação de grupos bacterianos compactos na superfície de células epiteliais (HeLa ou HEp-2) infectadas (SCALETSKY, SILVA e TRABULSI, 1984; GIRÓN, HO e SCHOOLNIK, 1991; DONNENBERG et al. 1992).

Diferencialmente de tEPEC, isolados de aEPEC não possuem o plasmídeo EAF, e, portanto, são incapazes de produzir o padrão AL em ensaios realizados utilizando um período de 3 horas de infecção das células epiteliais (VIEIRA et al. 2001; HERNANDES et al. 2009). Em ensaios de aderência utilizando períodos mais prolongados de infecção (6 horas), a maioria dos isolados de aEPEC produz um padrão de aderência similar a AL que é conhecido como aderência localizada-*like* (AL-L), caracterizado pela formação de microcolônias frouxas na superfície das células infectadas (RODRIGUES et al. 1996). Alternativamente, alguns isolados são capazes de produzir os padrões de aderência difusa (AD) e agregativa (AA), característico dos patotipos DAEC e EAEC, ou mais raramente o padrão AL₆, caracterizado pela formação de microcolônias compactas em ensaios de aderência realizados com períodos de incubação estendidos (6 horas) (VIEIRA et al. 2001; HERNANDES et al. 2006; ABE et al. 2009; SCALETSKY et al. 2010; DIAS et al. 2016; VIEIRA et al. 2019).

A principal estrutura responsável pela interação de aEPEC com as células epiteliais é a adesina intimina, codificada pelo gene *eae* localizado no operon 5 da região LEE (PELAYO et al. 1999; CARVALHO et al. 2005). Além de intimina, várias outras

adesinas fimbriais e afimbriais têm sido identificadas em isolados de aEPEC (HERNANDES et al. 2009).

Genes identificados em outros patótipos de DEC, principalmente STEC, responsáveis por codificar adesinas também tem sido observados em aEPEC, tais como: *E. coli common pilus (ecpA)*, *E. coli laminin binding fimbriae (elfA)*, *Long Polar Fimbriae (lpfA)*, *Hemorrhagic coli pilus (hcpA)*, *Vibrio cholerae IrgA homologue adhesin (iha)*, *Porcine attaching and effacing-associated adhesin (paa)*, *EHEC factor for adherence (efaI/lifA)*, *ToxB (toxB)* e adesinas da família Afa-Dr (*afaBC*) (GOMES et al. 2004; SCALETSKY et al. 2009; VIEIRA et al. 2010; GOMES et al. 2011; HERNANDES et al. 2011; GOMES et al. 2016; MUNHOZ et al. 2018).

As EPEC são hoje o patótipo mais prevalente de DEC no Brasil, seguido de EAEC (ORI et al. 2019). Contudo, este quadro não foi sempre assim. Anteriormente, EAEC era mais prevalente (RODRIGUES et al. 2004). Ainda no Brasil, infecções por EPEC atípicas são frequentemente mais reportadas do que EPEC típicas, chegando à proporção de 358:1 (ORI et al. 2019) e sendo capazes de promover surto (VIEIRA et al. 2016). Fora do Brasil, já foram relatados surtos de aEPEC nos Estados Unidos (HEDBERG et al. 1997), Japão (YATSUYANAGI et al. 2003), na China (HAO et al. 2012), Inglaterra (WEDLEY, ELAJNEF e FLETCHER, 2013) e Coreia do Sul (PARK et al. 2014). Destes eventos fora do Brasil, todos foram causados pelo consumo de água ou alimento contaminado.

Anualmente, novos trabalhos mostram que os fatores de virulência clássicos de cada grupo de DEC estão cada vez mais distribuídos dentro da espécie. Desta maneira, torna-se cada vez mais desafiador classificar uma DEC num único grupo (CROXEN et al. 2013), dando origem aos isolados classificados como híbridos (SANTOS et al. 2020).

Entre maio e julho de 2011, um híbrido de EAEC (*attA*⁺, *aggA*⁺, *aggC*⁺, *aggR*⁺, *aap*⁺) e STEC (*stx_{2a}*) causou um surto na Alemanha, afetando 3816 indivíduos, incluindo adultos e crianças e levou a 54 mortes. Um total de 88% dos pacientes que tiveram o patógeno diagnosticado em laboratório sofreram com diarreia sanguinolenta e dores abdominais (FRANK et al. 2011). Posteriormente, a mesma cepa foi isolada em pacientes na França no mês de junho (KING et al. 2012). O provável veículo destes surtos foi revelado como sendo um lote de sementes de feno grego (*Trigonella foenum-graecum*) importado do Egito (EFSA, 2011). Em 2021, um novo surto brasileiro foi caracterizado como sendo causado por um híbrido de aEPEC/EAEC do sorotipo O3:H2 (DE LIRA et al. 2021).

1.4 Importância dos sorotipos

Visando diferenciar isolados patogênicos de não-patogênicos, foi proposto em 1947 uma metodologia sorológica na qual eram analisados os antígenos somático O, flagelar H e capsular K (KAUFFMANN, 1947). Em 1987, a expressão “sorogrupos clássicos de EPEC” aparece na literatura (LEVINE, 1987). Neste trabalho, são definidos como sorogrupos clássicos os sorogrupos O18, O26, O44, O55, O86, O111, O112, O114, O119, O125, O126, O127, O128 e O142.

Ao analisar trabalhos mais recentes que o de Levine, como o de Bokete e colaboradores (1997) onde foram analisadas culturas de *E. coli* advindas de fezes de pacientes neonatos a 11 anos em um hospital em Seattle, é possível notar o aparecimento expressivo de isolados de EPEC que não se encaixam nesses sorogrupos clássicos. Esta história é reforçada com outro estudo, realizado no Brasil, onde foram obtidas a partir de crianças com diarreia aguda e crianças sem diarreia, *E. coli* que carregavam *eae*, não possuíam o plasmídeo pEAF e não produziam toxina Shiga. Nenhum destes isolados pertenciam aos sorogrupos clássicos de EPEC e foram obtidos tanto a partir de crianças com diarreia quanto do grupo controle assintomático (VIEIRA et al. 2001).

Conforme demonstrado por Hernandez e colaboradores (2009), em uma compilação de dados advindos de publicações diversas de 2003 a 2008, somente 18,63% (139/746) dos isolados analisados de EPEC pertencem aos sorogrupos citados como clássicos por Levine (1987). Dessa maneira, foi se tornando cada vez menos importante a utilização dos sorogrupos para classificar as EPEC em detrimento de outras técnicas, moleculares e fenotípicas, para melhor caracterizar estes isolados.

Contudo, apesar das limitações da metodologia de sorogrupos, ainda é possível designar alguns isolados como patogênicos pelo seu sorotipo, como por exemplo, EHEC O157:H7 (WHITTAM et al. 1993). Isolados de O157:H7 já foram responsáveis por surtos no passado, como o ocorrido entre dezembro de 1981 e junho de 1982, em uma rede de fast-food nos estados de Oregon e Michigan, nos Estados Unidos (RILEY et al. 1983).

Em 1993, este sorotipo ganhou notoriedade mundial por ser responsável por um surto veiculado por hambúrgueres utilizados em uma cadeia de fast-food nos Estados Unidos. Além de pessoas com síndrome hemolítica urêmica (HUS), o surto causou mortes (CDC, 1993). Desde 2006, pelo menos um surto multi-estadual de O157:H7 ocorre por ano nos Estados Unidos desde 2006 (CDC, 2022).

No Brasil, isolados patogênicos de um sorotipo específico também já foram associados a surtos. É o caso das O2:H16 que, apesar de já terem sido isoladas em um

estudo anterior (ABE et al. 2009), foi apenas em 2016 que o sorotipo foi caracterizado como potencial causador de surtos no Brasil (VIEIRA et al. 2016).

1.5 Proteínas autotransportadoras – Sistema de Secreção do Tipo V

Dentre os fatores de virulência que podem ser produzidos pela *E. coli* patogênica, existe o grupo de proteínas denominadas autotransportadoras (AT) (LEYTON et al. 2012; MEUSKENS et al. 2019). Este termo foi utilizado pela primeira vez quando Klauser e colaboradores (1993) buscaram detalhar a via de secreção da proteína IgA produzida por *Neisseria*.

Essas proteínas apresentam três domínios funcionais distintos: 1) o peptídeo sinal (região N-terminal), responsável pela passagem da proteína através do sistema de secreção Sec localizado na membrana interna da célula bacteriana; 2) o domínio passageiro, que irá atravessar a membrana externa da parede celular bacteriana e se projetar para o meio extracelular; e 3) o domínio C-terminal translocador (β -barril), responsável pela formação de um poro na membrana externa da célula bacteriana, necessário para que o domínio passageiro alcance o espaço extracelular (HENDERSON, NAVARRO-GARCIA e NATARO, 1998; LEYTON et al. 2012; DROBNAK et al. 2015).

Estas proteínas podem desempenhar funções distintas durante o estabelecimento do curso do processo infeccioso, tais como: promover a autoagregação bacteriana, formação de biofilme, adesão e/ou invasão das células hospedeiras e evasão do sistema imune (MEUSKENS et al. 2019). As proteínas AT, também conhecidas como sistema de secreção do tipo 5 (SST5), foram originalmente classificadas em três famílias: Va, Vb e Vc (HENDERSON et al. 2004). Atualmente, mais duas famílias foram caracterizadas: Vd e Ve (LEO et al. 2015; MEUSKENS et al. 2019).

1.5.1 Proteínas autotransportadoras da família Va

As proteínas AT do tipo Va foram as primeiras proteínas AT a serem descritas. Neste grupo, após o peptídeo sinal da proteína se ligar ao sistema Sec presente na membrana interna das bactérias Gram-negativas, a proteína atravessa para o periplasma e o peptídeo sinal é clivado no final do processo. No periplasma, chaperonas como Skp, FkpA, SurA e DegP irão impedir o dobramento prematuro da proteína. O complexo Bam (BamA, BamB, BamC, BamD e BamE) auxilia na inserção do β -barril (C-terminal) na membrana externa das bactérias Gram-negativas e um fragmento responsável por

conectar o domínio passageiro (N-terminal) ao β -barril se dobra dentro do poro formado, levando ao transporte da proteína do periplasma ao meio extracelular (LEO et al. 2015) (Figura 1).

Nas proteínas AT do tipo Va, o domínio passageiro (N-terminal) é clivado através de um processo autocatalítico, que ocorre após sua completa passagem pelo poro formado pelo domínio translocador (C-terminal) no caso das SPATEs (*Serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae*), ou permanece ancorado na superfície da célula bacteriana no caso das adesinas. São exemplos de proteínas AT do tipo Va as adesinas: AIDA-I, EhaA, EhaB, EhaC, EhaD, EhaJ, TibA e o antígeno 43, bem como as SPATEs: EspC, EspP e Pic (MEUSKENS et al. 2019).

No caso de algumas proteínas, o peptídeo sinal é extenso, permitindo que a porção da proteína responsável pelo β -barril se ligue ao complexo Bam com a proteína ainda conectada ao sistema Sec. Só então ocorre a clivagem do peptídeo sinal, liberando a proteína no periplasma. Isto ocorre em algumas proteínas para evitar o dobramento incorreto do domínio passageiro no periplasma (SZABADY et al. 2005).

1.5.2 Proteínas autotransportadoras da família Vb

Nas proteínas AT do tipo Vb, o domínio passageiro e o domínio de translocação compreendem proteínas distintas, mas que são codificadas por genes localizados no mesmo operon (VO et al. 2017). Normalmente sua função está associada ao processo de aderência, como é o caso da proteína EtpA identificada em ETEC (ROY et al. 2009), mas também é um grupo que pode compreender proteínas secretadas, como a hemolisina Sh1A de *Serratia marcescens* (BRAUN, ONDRACZEK e HOBBIE, 1993).

1.5.3 Proteínas autotransportadoras da família Vc

Proteínas AT do tipo Vc são triméricas e se organizam em forma de “pirulito”. Possuem um domínio que se ancora na membrana externa da bactéria e forma um poro, um domínio que forma uma longa haste e, por fim, um domínio que forma a “cabeça” da proteína (HOYCZYK et al. 2000; LINKE et al. 2006). A grande maioria atua como

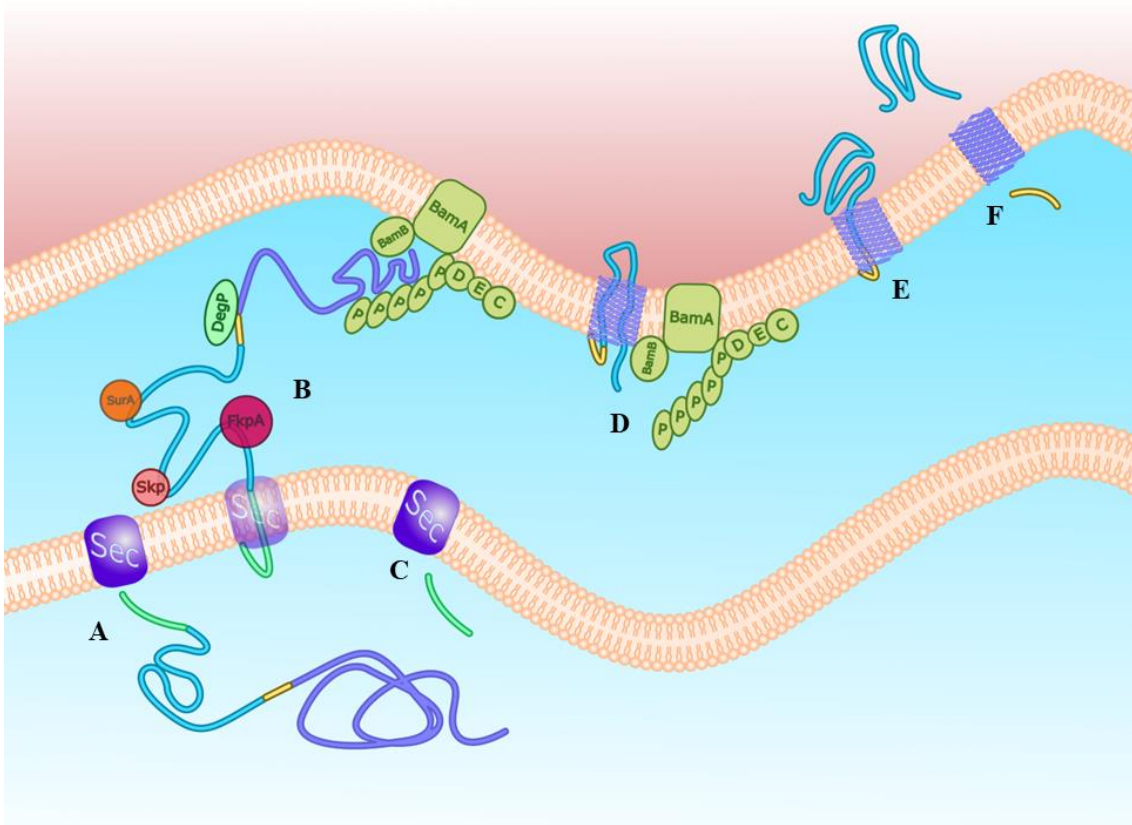


Figura 1. Modelo das proteínas autotransportadoras (AT) da família Va. (A) As proteínas autotransportadoras são divididas em quatro domínios: peptídeo sinal (verde), domínio passageiro (azul), domínio ligante (amarelo – exclusivo de SPATEs) que conecta o domínio passageiro ao domínio transportador e o domínio transportador (roxo). O peptídeo sinal se liga ao sistema Sec presente na membrana interna da bactéria, permitindo a passagem da proteína para o periplasma. (B) Dentro do periplasma, as chaperonas FkpA, Skp, SurA e DegP se ligam à proteína, evitando seu dobramento prematuro incorreto enquanto o domínio transportador se dirige ao complexo Bam. (C) Após a total passagem da proteína para o periplasma, o peptídeo sinal é clivado. Em caso de proteínas que possuem um peptídeo sinal estendido, essa clivagem só acontece após o domínio transportador alcançar o complexo Bam. (D) As proteínas do complexo Bam auxiliam na montagem do poro formado pelo domínio transportador na membrana externa, e o domínio passageiro inicia a translocação para o meio extracelular em formato de grampo. (E) O domínio passageiro atravessa o poro e é corretamente dobrado. (F) No caso das SPATEs, o domínio ligante sofre uma ação autocatalítica enquanto o domínio passageiro atravessa o poro. Dessa forma, o domínio passageiro é secretado no meio extracelular. Adaptado de LEO, GRIN e LINKE, 2012.

adesinas, como por exemplo, YadA (TERTTI et al. 1992), Eib (LEO e GOLDMAN, 2009), EhaG (TOTSIKA et al. 2012) e UpaG (VALLE et al. 2008), sendo, portanto, coletivamente conhecidas como adesinas AT triméricas (TAA: *Trimeric Autotransporter Adhesins*). Apesar de serem conhecidas majoritariamente por esta função, algumas TAAs podem desempenhar outros papéis. No caso da YadA, já foi demonstrado que ela é capaz de proteger a bactéria do sistema complemento (PILZ et al. 1992).

1.5.4 Proteínas autotransportadoras da família Vd

As proteínas AT do tipo Vd foram recentemente descritas e sua estrutura se assemelha a um híbrido entre os tipos Va e Vb. Os principais exemplos desse tipo de AT são as proteínas PlpD e FplA identificadas em *Pseudomonas aeruginosa* e *Fusobacterium nucleatum*, respectivamente (SALACHA et al. 2010; CASASANTA et al. 2017). Quando levado em consideração o domínio passageiro das proteínas do tipo Vd, um grande diferencial em relação às do tipo Va é a sua atividade: apesar da grande diversidade de funções das proteínas do tipo Va, as do tipo Vd funcionam exclusivamente como lipases/esterases (SALACHA et al. 2010; DA MATA MADEIRA et al. 2016; CASASANTA et al. 2017).

1.5.5 Proteínas autotransportadoras da família Ve

As AT do tipo Ve são também chamadas de autotransportadoras invertidas por se assemelharem as AT do tipo Va (clássica), mas terem a ordem das cadeias de proteínas invertida, i.e., o domínio translocador (β -barril) corresponde à região N-terminal, enquanto o domínio passageiro corresponde à região C-terminal da proteína. Normalmente as AT invertidas estão associadas à aderência e invasão, sendo os principais exemplos de AT do tipo Ve a adesina intimina de EPEC (JERSE et al. 1990a), bem como as adesinas FdeC e YeeJ (NESTA et al. 2012; MARTINEZ-GIL et al. 2017), e a invasina InvA de *Yersinia* spp. (LEO et al. 2015). Recentemente, quatro genes responsáveis por codificar novas proteínas AT invertidas foram identificados no genoma de uma coleção de 126 isolados de *E. coli* sequenciados, sendo estes genes denominados *iatA*, *iatB*, *iatC* e *iatD*. A análise funcional da proteína codificada por estes genes mostrou que IatB, IatC e IatD participam da formação de biofilme em *E. coli*, contribuindo assim para sua patogenicidade (GOH et al. 2019).

Já foi demonstrado que, no caso da intimina, a proteína não pode ser dobrada no periplasma. A formação de pontes dissulfeto no processo de dobra gera uma conformação

que impossibilita a proteína de atravessar o poro formado pelo β -barril (ADAMS et al. 2005). Desta maneira, assim como as proteínas das demais famílias, as proteínas da família Ve são auxiliadas por proteínas periplasmáticas responsáveis por manter a proteína não dobrada ou apenas parcialmente dobrada até que ela seja translocada para o meio extracelular. No caso de ATs como a intimina, sua inserção na membrana externa é auxiliada pelo complexo Bam, que permite sua passagem em uma conformação parcialmente dobrada, algo que seria impossível considerando o diâmetro do poro gerado pelo β -barril. Além disso, na ausência das proteínas periplasmáticas SurA e DegP (responsáveis pelas vias SurA e Skp/DegP respectivamente), um acúmulo de proteína mal dobrada é gerado no periplasma (BODELÓN, MARÍN e FERNÁNDEZ, 2009).

1.6 Classificação das proteínas autotransportadoras de acordo com seus domínios proteicos

Análises filogenéticas das sequências de aminoácidos dos domínios passageiros das proteínas AT têm permitido dividir essas proteínas em três grandes grupos: os genes que codificam as adesinas da família AIDA-I (*Adhesin Involved in Diffuse Adherence*), os genes que codificam as TAAs e os genes que codificam as SPATEs, que são enzimas que possuem o motivo característico GDSGS das serinoproteases (WELLS et al. 2010).

1.6.1 Família AIDA-I

A família AIDA-I é definida pelo domínio COG3468 composto por 644 aminoácidos, que aparece em menor ou maior nível de conservação em diversas espécies além de *E. coli*, como *Brucella melitensis*, *Mesorhizobium loti*, *Haemophilus influenzae*, *Pasteurella multocida*, *Neisseria meningitidis*, *Salmonella typhimurium* e outras (HENDERSON et al. 2004). Dentre as autotransportadoras bem caracterizadas dessa família, é possível citar AIDA-I, antígeno 43 e TibA (VO et al. 2017).

A proteína que dá nome à família (AIDA-I) foi identificada em 1989 como sendo responsável por promover o padrão de aderência difusa em *E. coli* (BENZ e SCHMIDT, 1989), mas só passou a ser mais bem compreendida e considerada uma autotransportadora em 1996 (SUHR, BENZ e SCHMIDT, 1996). A proteína promove autoagregação, formação de biofilme (SHERLOCK et al. 2004) e colonização do trato intestinal (RAVI et al. 2007). Além de seu papel como adesina em células HeLa (BENZ e SCHMIDT, 1989; LAARMANN e SCHMIDT 2003), HT-29 (SCHEMBRI, DALSGAARD e

KLEMM, 2004) e em HEp-2, é capaz também de promover invasão (CHARBONNEAU BERTHIAUME e MOUREZ 2006).

Ademais, é capaz de promover autoagregação de uma maneira particular: além de haver interação entre AIDA-I e AIDA-I, é possível também observar autoagregação através da interação AIDA-I e Antígeno 43 (SHERLOCK et al. 2004). Por fim, por se tratar de uma adesina curta, pode ter seus fenótipos bloqueados quando a bactéria produz cápsula (SCHEMBRI, DALSGAARD e KLEMM, 2004).

Inicialmente descrito como produto do gene *flu*, o antígeno 43 também pode ser encontrado na literatura como produto do gene *agn43* e foi caracterizado como sendo uma proteína responsável por promover autoagregação e alteração na morfologia das colônias. Culturas que majoritariamente expressavam *flu* formavam “penugens” (ou “*fluffs*”, como o próprio artigo cita) após um tempo em repouso em meio líquido. Estas “penugens” se tornavam mais densas com o passar do tempo e sedimentavam. Quando cultivadas em meio sólido, as colônias expressando *flu* eram crespas e rugosas, enquanto as que não expressavam eram brilhantes e lisas. Neste estudo, já foi destacado o fato de que uma mesma cultura poderia dar origem a subculturas que expressassem *flu* ou não, ou seja, foi sugerido que o fenótipo possuía algum tipo de variação de fase (DIDERICHSEN, 1980).

O antígeno 43 aparece nominalmente na literatura pela primeira vez em 1987 quando se inicia sua caracterização molecular (OWEN, CAFFREY e JOSEFSSON, 1987), tendo continuidade dois anos após (CAFFREY e OWEN, 1989). Em 1999, o seu mecanismo de variação de fase veio a ser esclarecido. Quando os motivos GATC do antígeno 43 são metilados por moléculas de deoxiadenosina metiltransferase (Dam), o gene é devidamente expresso. Quando estes sítios estão ocupados por OxyR, um ativador transcricional, o isolado não expressa antígeno 43.

Foi demonstrado experimentalmente que cepas deletadas em *dam* nunca expressam o antígeno 43, enquanto as deletadas em *oxyR* sempre expressam a proteína (HENDERSON e OWEN, 1999). Um mecanismo de regulação semelhante ocorre em *pap*, onde Dam regula dois sítios GATC (VAN DER WOUDE, BRAATEN e LOW, 1996). É importante ressaltar que, em isolados selvagens, uma população nunca será 100% produtora ou não produtora de antígeno 43, visto que estes nunca alcançam os resultados fenotípicos demonstrados por mutantes em *dam* e *oxyR* (CHAUHAN et al. 2013).

Por fim, o antígeno 43 é capaz de promover agregação intra e interespecífica (KJÆRGAARD et al. 2000a), formação de biofilme em *E. coli* e *Pseudomonas*

fluorescens (KJÆRGAARD et al. 2000b), internalização por neutrófilos fornecendo proteção aos componentes do soro humano (FEXBY et al. 2007) e persistência de UPEC em modelo murino de infecção do trato urinário (ULETT et al. 2007).

TibA foi descrito pela primeira vez em 1994, a partir da ETEC H10407. Enquanto o isolado selvagem era capaz de invadir células HCT-8 e HCT-116 (ambas linhagens intestinais), quando o *locus tib* foi inserido através de um vetor de expressão na *E. coli* HB101, esta passou a invadir não só HCT-8 e HCT-116, como também HEp-2 e HuTu 80 (laringe e intestino respectivamente), fenótipo que não foi exibido pela selvagem (ELSINGHORST e WEITZ, 1994).

Além de ser uma invasina, já foi demonstrado que TibA atua também como adesina, como no caso de células HCT-8 (LINDENTHAL e ELSINGHORST, 2001). Esta habilidade de se ligar à diferentes linhagens intestinais sugerem que TibA interage com motivos compartilhados entre diversas células do trato intestinal (KLEMM, VEJBORG e SHERLOCK, 2006).

Assim como AIDA-I e antígeno 43, TibA também é capaz de promover os fenótipos de autoagregação e produção de biofilme. Da mesma maneira, TibA também pode ter o fenótipo de autoagregação bloqueado através da expressão de fímbria do tipo I ou produção de cápsula, por se tratar de uma proteína relativamente curta (SHERLOCK, VEJBORG e KLEMM, 2005).

1.6.2 Família TAA

Conforme citado anteriormente, as TAAs compreendem o conjunto de proteínas pertencentes ao grupo Vc. Seu primeiro membro descrito na literatura foi YadA, que além de atuar como adesina, possui uma função atípica dentro deste grupo de proteínas, que é mediar a evasão ao sistema complemento (TERTTI et al. 1992; PILZ et al. 1992). Estas proteínas possuem um domínio translocador caracteristicamente curto (SURANA et al. 2004) e seu domínio passageiro é bem heterogêneo dentro das diferentes proteínas contidas neste grupo (DAUTIN e BERSTEIN 2007). Enquanto o domínio passageiro de UpaG possui 1778 aminoácidos, Saa e Eib por exemplo variam entre 392 e 535 aminoácidos. Além disso, todas as TAAs possuem em seu domínio passageiro o domínio YadA (WELLS, TOTSIKA e SCHEMBRI, 2010).

1.6.3 Família SPATE

As SPATEs são proteínas que possuem uma tríade catalítica formada pelos resíduos H, D e S, onde o motivo GDSGS alberga uma serina catalítica. São proteínas autotransportadoras que possuem um peptídeo sinal caracteristicamente extenso (de 48 a 59 aminoácidos). Além dos três domínios já citados para as outras famílias, nas SPATEs o domínio responsável pela formação do poro na membrana e o domínio responsável pela ação da proteína (domínio passageiro) são conectados por uma região chamada de “*linker*”. Neste, há um sítio de clivagem contendo uma ponte composta por duas asparaginas consecutivas (N-N). Esta ponte sofre um processo autocatalítico na proteína madura, liberando o domínio passageiro para o meio extracelular. Além disso, existem motivos contendo de cinco a dez resíduos muito conservados tanto no domínio passageiro quanto no domínio translocador (RUIZ-PEREZ e NATARO, 2014).

O primeiro membro desta família a ser caracterizado foi Tsh, encontrado em uma *E. coli* patogênica aviária (APEC) e sendo responsável por hemaglutinação em eritrócitos de galinha (PROVENCE e CURTIS 3RD, 1994), clivagem de Fator V (DUTTA et al. 2002) e caseína (KOSTAKIOTI e STATHOPOULOS 2004) e atividade mucinolítica (KOBAYASH, GAZIRI e VIDOTTO, 2010).

Hoje, sabemos que as SPATEs não se restringem às APECs, aparecendo também em outros patótipos de *E. coli* como EspC em EPEC (STEIN et al. 1996), EspP em EHEC (BRUNDER, SCHMIDT e KARCH, 1997), Pet e Pic em EAEC (ESLAVA et al. 1998) e Sat em UPEC (GUYER et al. 2000).

Um estudo anterior do nosso grupo de pesquisa identificou alguns sorotipos de aEPEC associados a surtos de diarreia no nosso país, sendo esses os sorotipos: O2:H16, O33:H34, O39:H9, O108:H e ONT:H19 (VIEIRA et al. 2016). Num estudo posterior, um total de 106 isolados de aEPEC provenientes de estudos realizados no Brasil e pertencente a diversos sorotipos, incluindo os sorotipos associados aos surtos de diarreia, foram sequenciados e posteriormente comparados quanto às suas relações filogenéticas e ao conteúdo gênico (HERNANDES et al. 2020). Esta análise revelou um conjunto de 31 genes que foram exclusivamente identificados em isolados do sorotipo O2:H16 (n = 6). Entre esses, se destaca um gene (provisoriamente denominado 282_14_25_77) cuja anotação revelou ser responsável por codificar uma proteína AT (Tabela 3). Tanto a análise da sequência de nucleotídeos (*Nucleotide BLAST*), como a análise da sequência deduzida de aminoácidos (*Protein BLAST*), revelaram se tratar de um gene capaz de codificar uma proteína AT ainda não caracterizada.

Tabela 3. Clusters de genes exclusivos ao sorotipo O2:H16 de *Escherichia coli* enteropatogênica atípica. Fonte: Hernandes et al. 2020.

Identificação do cluster de genes	Número de isolados de aEPEC	Anotação
196_16_11_30	1	proteína hipotética
196_16_11_31	1	proteína hipotética
196_16_1_109	1	proteína hipotética
196_16_49_2	6	proteína da família DNA (citosina-5-)-metiltransferase
196_16_56_2	7	proteína da família fago integrase
282_14_12_17	3	proteína hipotética conservada
282_14_13_10	3	proteína hipotética
282_14_25_43	1	proteína da família DNA (citosina-5-)-metiltransferase
282_14_25_44	1	proteína de domínio AAA ATPase
282_14_25_77	6	proteína de domínio autotransportador de membrana externa
BA92_15_31	1	proteína hipotética conservada
BA92_3_110	1	proteína putativa de membrana
BA92_3_111	1	lipoproteína putativa
BA92_3_112	1	proteína hipotética
BA92_3_138	1	proteína hipotética conservada
BA92_3_139	1	proteína da família do gene D de controle tardio de fago
BA92_3_140	1	proteína hipotética
BA92_3_141	1	proteína hipotética conservada
BA92_3_143	1	proteína hipotética conservada
BA92_3_144	1	proteína hipotética
BA92_3_145	1	proteína hipotética
BA92_3_146	1	proteína hipotética
BA92_3_150	1	proteína hipotética
BA92_3_151	1	proteína da família ativadora transcricional perC
BA92_3_152	1	proteína hipotética
BA92_3_153	1	proteína hipotética conservada
BA92_3_154	1	proteína da família beta
BA92_3_155	1	proteína hipotética
BA92_3_156	1	proteína hipotética
BA92_3_157	1	proteína hipotética
BA92_67_5	1	proteína hipotética conservada

2. OBJETIVO

Caracterizar molecular e funcionalmente uma nova proteína autotransportadora identificada em um isolado de *Escherichia coli* enteropatogênica atípica do sorotipo O2:H16.

3. MATERIAL E MÉTODOS:

3.1 Isolado de aEPEC O2:H16 utilizado no presente estudo

O isolado bacteriano utilizado no presente estudo para a caracterização do gene 282_14_25_77, bem como da nova proteína codificada por esse gene, foi o isolado de aEPEC BA92 (sorotipo O2:H16), obtido durante o desenvolvimento de um estudo epidemiológico realizado em Salvador, BA (BUERIS et al. 2007). Esse isolado foi posteriormente sequenciado (*accession number*: PIJZ00000000) em um estudo recentemente publicado pelo nosso grupo de pesquisa (HERNANDES et al. 2020). Durante o desenvolvimento deste projeto o gene 282_14_25_77 foi renomeado como *ema*, codificando a proteína *Extracellular Matrix-binding Autotransporter* (Ema).

3.2 Caracterização *in silico* da sequência deduzida de aminoácidos da proteína Ema

A sequência de nucleotídeos do gene *ema* presente na amostra de aEPEC BA92 (sorotipo O2:H16), foi traduzida em sequência de aminoácidos utilizando o *software* CLC Main Workbench 7 (Qiagen, NW, Alemanha) e sua massa molecular foi calculada empregando a ferramenta disponível no *site* ExPASy (https://web.expasy.org/compute_pi/) (GASTEIGER et al. 2003). O peptídeo sinal, necessário para o transporte da proteína do citoplasma até o espaço periplasmático da célula bacteriana, foi deduzido com o auxílio do *site* SignalP 6.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/>) (TEUFEL et al. 2022), e os domínios passageiro e translocador da proteína Ema foram analisados utilizando-se os bancos de dados Pfam e InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) (MISTRY et al. 2021; PAYSAN-LAFOSSE et al. 2022).

Para avaliar a similaridade da sequência de aminoácidos deduzida a partir da sequência do gene *ema* com a sequência de aminoácidos de outras proteínas ATs previamente descritas na literatura (Tabela 4), foi utilizado o *software* MEGA11 (TAMURA, STECHER e KUMAR, 2021) em conjunto com o algoritmo ClustalW (LARKIN et al. 2007) para alinhamento. Em seguida, foi utilizada a ferramenta IQ-TREE 1.6.12 (NGUYEN et al. 2015) em conjunto com o algoritmo ModelFinder (KALYAANAMOORTHY et al. 2017) para encontrar o melhor modelo para a criação da árvore de máxima verossimilhança. O modelo que obteve melhor pontuação BIC (SCHWARZ, 1978), AIC (AKAIKE 1998) e AICc (SUGIURA, 1978) foi PMB (*Probability Matrix from Blocks*, VEERASSAMY SMITH e TILLIER, 2003) com os

parâmetros +F+G4 e Γ shape alpha = 7,1547. Para o cálculo da máxima verossimilhança, este modelo e estes parâmetros foram utilizados em conjunto com o algoritmo UFBoot2 (HOANG et al. 2017) utilizando 1000 *bootstraps*. Com o resultado obtido, a árvore foi visualmente construída utilizando o resultado em formato Newick gerado pelo IQ-TREE como entrada na ferramenta *online* iTOL (<https://itol.embl.de/>) (LETUNIC e BORK, 2021).

Tabela 4. Sequências de aminoácidos de proteínas ATs que foram empregadas para determinar a similaridade da proteína Ema com adesinas ATs e SPATEs previamente descritas. (continua)

Proteínas AT	Protein identification
Adesinas AT da família AIDA-I	
AIDA-I	EII49574.1
Antigen 43	YP_026164.1
Calcium-binding antigen 43 homologue – Cah	AAG55356.1
EHEC autotransporter encoding gene (Eha) – EhaA	AAG54657.1
EhaB	AAG54720.1
EhaC	AAG57362.1
EhaD	AAG57760.1
EhaJ	WP_137526983.1
Toxigenic invasion loci A (TibA)	AAD41751.1
APEC autotransporter gene (AatA)	ADJ53351.1
Uropathogenic <i>E. coli</i> autotransporter (Upa) – UpaB	AAN78907.1
UpaC	AAN78956.1
UpaD	AAN79747.1
UpaE	AAN81345.1
UpaF	AAN82103.1
UpaH	ACX47353
UpaI	ABG70270.1
Adesinas AT triméricas (TAA)	
EhaG	AIG71007.1
UpaG	AAN82860.1
UpaJ	ABG71675.1
EibG	BAF32938.1
STEC autoagglutinating adhesin (Saa)	AAZ76520.1
STEC AT contributing to biofilm formation (Sab)	WP_011310120.1
Adesinas AT inversas	
Factor adherence <i>E. coli</i> (FdeC)	ADE88959.1
YeeJ	ACB16711.1
Inverse autotransporter (IAT) – IatA	ACB19099.1
IatB	ACB17431.1
IatC	ACB17037.1
IatD	ACB20062.1
Intimin	WP_000627890.1

Tabela 4. Sequências de aminoácidos de proteínas ATs que foram empregadas para determinar a similaridade da proteína Ema com adesinas ATs e SPATEs previamente descritas. (continuação)

SPATEs	
Sat	VWQ04413.1
SigA	WP_175055659.1
Pet	SJK83553.1
Pic	ALT57188.1
SepA	WP_175283799.1
Tsh	QEG96830.1
Vat	WP_170836563.1
EatA	WP_175284389.1
EspP	NP_052685.1
EspC	WP_133142151.1

3.3 Detecção do ponto de inserção do gene *ema* no cromossomo do isolado selvagem BA92

Com a finalidade de elucidar a localização do gene *ema* no genoma do isolado selvagem BA92, o DNA deste isolado foi comparado ao DNA de uma O2:H16 que não possui o gene. Para tanto, foi utilizado o sequenciamento de *short reads* obtidos em Illumina HiSeq 4000 (Illumina, CA, EUA) para a BA92 e o isolado IAL 5132, dados que foram obtidos previamente em um estudo do nosso grupo (HERNANDES et al. 2020). Além disso, para a BA92 foi realizado também sequenciamento de *long reads*, obtidos através de MinION (Oxford Nanopore Technologies, OX4, Inglaterra). A montagem híbrida do genoma da BA92 foi realizada através do programa Unicycler (WICK et al. 2017). O genoma foi anotado com o auxílio da ferramenta Prokka (SEEMANN, 2014) e o resultado foi representado visualmente com a ferramenta Easyfig (SULLIVAN, PETTY e BEATSON, 2011).

Posteriormente, para melhor compreender o mecanismo de inserção de *ema* junto aos 19 genes que o seguem e que não apareceram no isolado IAL 5132, foi realizada uma análise pelo programa PHASTER (ARNDT et al. 2016).

3.4 Predição do arranjo molecular da proteína Ema

Para realizar a predição da maneira como a nova proteína autotransportadora se organiza, foi utilizado o caderno *online* ColabFold (<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb>) (MIRDITA et al. 2022).

3.5 Clonagens do gene *ema*

Foram realizadas as seguintes clonagens: (1) utilizando apenas a porção do gene responsável por codificar o domínio passageiro (1350 pb) da proteína no vetor de expressão pET-28a (Merck, DA, Alemanha), permitindo assim a produção de uma proteína recombinante carregando uma cauda de polihistidina, para que a proteína expressa pudesse ser posteriormente purificada por cromatografia de metais imobilizados (IMAC); e (2) outra contendo o gene *ema* no vetor de expressão pBAD/*Myc*-His A (Invitrogen, Vilnius, Lituânia). Como controle dos ensaios, foram utilizadas as bactérias MS427(pBAD) como controle negativo e MS427(pCO4), que carrega o gene responsável pela síntese do antígeno 43 (*flu*), como controle comparativo (Tabela 5).

Tabela 5. Lista de plasmídeos e cepas empregados nos ensaios deste trabalho.

Plasmídeo ou cepa	Origem	Referência
Plasmídeos		
pET-28a	Comercialmente disponível	Comercialmente disponível
pHO	Vetor de expressão pET-28a com a porção do gene responsável por codificar o domínio passageiro de Ema	Este trabalho
pBAD/ <i>Myc</i> -His A	Comercialmente disponível	Comercialmente disponível
pIC	Vetor de expressão pBAD/ <i>Myc</i> -His A com o gene <i>ema</i>	Este trabalho
pCO4	Vetor de expressão pBAD/ <i>Myc</i> -His A com o gene <i>flu</i>	ULETT et al. 2007
Cepas		
BL21(DE3)	Comercialmente disponível	Comercialmente disponível
BL21(DE3)(pET-28a)	BL21(DE3) carregando o vetor de expressão pET-28a	Este trabalho
BL21(DE3)(pHO)	BL21(DE3) carregando o vetor de expressão pET-28a contendo o gene responsável por codificar o domínio passageiro de Ema	Este trabalho
MS427	MG1655 Δ <i>flu</i>	KJÆRGAARD et al. 2000b
MS427(pBAD)	MS427 carregando o vetor de expressão pBAD/ <i>Myc</i> -His A	WELLS et al. 2008
MS427(pIC)	MS427 carregando o vetor de expressão pBAD/ <i>Myc</i> -His A contendo o gene <i>ema</i>	Este trabalho

As clonagens foram realizadas utilizando a enzima Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Vilnius, Lituânia) e a enzima GoTaq Master Mix (Promega, Fitchburg, WI, EUA) foi utilizada para detecção do gene *ema* na bactéria selvagem e no clone obtido. Em ambos os casos, foram utilizados os *primers* descritos abaixo na Tabela 6. Para a clonagem do gene *ema*, foram empregados os *primers* *Forward*-(XhoI) e *Reverse*-(KpnI). Para a clonagem do fragmento responsável por codificar o domínio passageiro foram utilizados os *primers* pet28a-XhoI e pet28a-BamHI. As condições utilizadas para amplificação do gene *ema* foram um ciclo de desnaturação de 95 °C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, 48 °C por 30 segundos para anelamento e 72 °C por 2 minutos e 30 segundos para extensão. Por fim, foi realizada extensão final de 7 minutos a 72 °C. Para a clonagem, foi utilizado 94 °C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 15 segundos, 48 °C para anelamento por 30 segundos e extensão a 68 °C por 2 minutos e 30 segundos.

Para amplificação do domínio passageiro apenas, foi utilizado um ciclo de desnaturação de 95 °C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, 53 °C por 30 segundos para anelamento e 72 °C por 1 minuto e 30 segundos para extensão. Por fim, foi realizada extensão final de 7 minutos a 72 °C. Para a clonagem, foi utilizado 94 °C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 15 segundos, 53 °C para anelamento por 30 segundos e extensão a 68 °C por 1 minuto e 30 segundos.

Tabela 6. *Primers* empregados para a amplificação do gene *ema* e sua porção correspondente ao domínio passageiro, que foram clonados nos vetores de expressão pBAD/*Myc*-His A e pET-28a, gerando os plasmídeos recombinantes pIC e pHO respectivamente.

<i>Primers</i>	Sequência (5' → 3')
<i>Forward</i> -(XhoI)	CGCGCTCGAGATAATAAGGATTCATTATGCTTAATAAAAAAAAAACAATTGC
<i>Reverse</i> -(KpnI)	CGCGCGGGTACCTTAAAAGAGGACTCGAACACCAG
pET28a-XhoI	CGCGCGCTCGAGATGATTCCCTTCAATATCGGTCAAA
pET28a-BamHI	CGCGCGGGATCCGCATCATTTACTCAAATATTACAAAAGG

Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando o kit QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, NW, Alemanha), e o vetor de expressão pBAD/*Myc*-His A foi

extraído da amostra bacteriana hospedeira (MS1187 – WELLS et al. 2008) utilizando o kit QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen, NW, Alemanha). A digestão dos insertos e dos vetores foi realizada utilizando as enzimas de restrição XhoI e BamHI (Invitrogen, Vilnius, Lituânia) para o pET-28a (Figura 2) e XhoI e KpnI (Invitrogen, Vilnius, Lituânia) para o pBAD (Figura 3), conforme recomendação dos fabricantes. A ligação dos fragmentos de DNA digeridos foi realizada com a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen, Vilnius, Lituânia) gerando os plasmídeos recombinantes pHO e pIC, respectivamente.

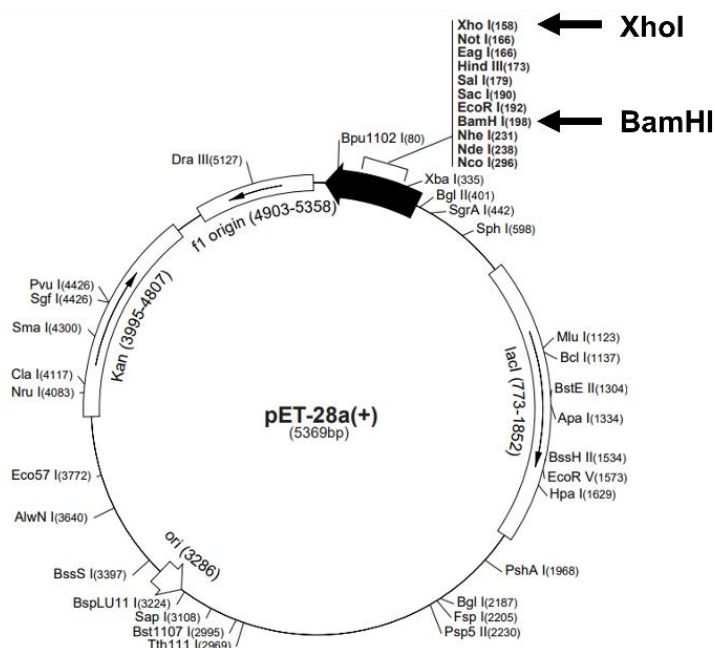


Figura 2. Mapa ilustrativo do vetor de expressão pET-28a e localização dos sítios reconhecidos pelas enzimas de restrição XhoI e BamHI.

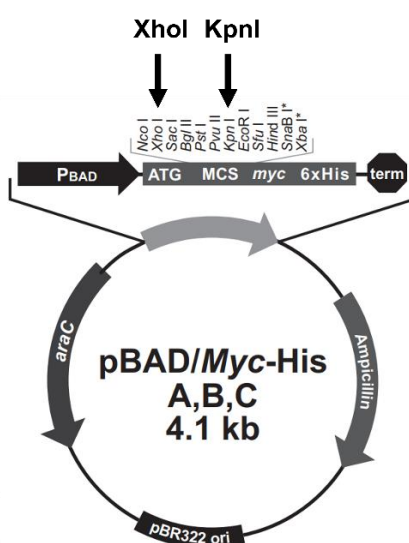


Figura 3. Vetor de expressão pBAD/Myc-His A e região de restrição das enzimas XhoI e KpnI.

Para o preparo das células competentes para a clonagem com o vetor pET-28a, foi realizado o processo de preparo de células quimiocompetentes e posterior transformação por choque térmico (SAMBROOK, FRITSCH E MANIATIS 1989). A hospedeira *E. coli* BL21(DE3) foi cultivada em 50 ml de caldo lisogenia (LB) sob agitação de 250 rpm a 37 °C até atingir a densidade óptica DO_{600nm} 0,6. O inóculo foi transferido para um tubo cônico de 50 ml e incubado em banho de gelo por 30 minutos. Em seguida, o tubo foi centrifugado a 2057 x g por 15 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. O sedimento obtido foi então lavado com 50 ml de uma solução gelada de cloreto de cálcio 100 mM e incubado em banho de gelo por 20 minutos.

Foi realizada nova centrifugação e lavagem, dessa vez utilizando 25 ml de cloreto de cálcio 100 mM. Após uma nova centrifugação, o sedimento foi ressuscitado em 2 ml de solução de cloreto de cálcio 100 mM contendo 15% de glicerol. Alíquotas de 100 µl dessa suspensão bacteriana foram feitas em microtubos de 1,5 ml e rapidamente congeladas em banho de etanol (70%) e gelo seco, para posterior armazenamento a -80 °C até o momento do uso.

Para a transformação, 2 µl do vetor contendo o fragmento do gene responsável por codificar o domínio passageiro de Ema foi adicionado a 50 µl da alíquota de célula quimiocompetente. O tubo com a mistura foi então incubado em banho de gelo por 30 min, em seguida a 42 °C por 95 segundos e novamente em banho de gelo por 2 minutos. A mistura foi então recuperada em 500 µl de caldo LB e incubada a 37 °C sob agitação de 250 rpm por uma hora. Após esse período de incubação, os transformantes foram selecionados em placas de ágar LB contendo canamicina (50 µg/ml), para posterior seleção de colônias com o genótipo de interesse para a realização dos testes propostos neste trabalho.

Para o preparo das células eletrocompetentes, a bactéria MS427 foi inoculada em caldo LB e incubadas por 18 horas a 37 °C. O crescimento foi diluído na proporção 1:100 e incubados a 37 °C com agitação (aproximadamente 200 rpm) até atingirem DO_{600nm} entre 0,5 e 0,8. Após atingir a DO_{600nm} esperada, as bactérias foram centrifugadas a 5000 x g a 4 °C, seguindo-se duas lavagens com água gelada, e após uma nova centrifugação o conteúdo precipitado foi ressuscitado em 2 ml de glicerol estéril à 10%. Aproximadamente, um ml da suspensão bacteriana foi transferido para um microtubo de 1,5 ml que foi submetido à outra centrifugação a 5000 x g a 4 °C por 10 minutos.

O sobrenadante foi descartado e o material precipitado foi ressuscitado com 60 µl de glicerol estéril (10%) a 4 °C. Posteriormente, foi transferida a quantidade equivalente

a 50 ng da reação de ligação em 60 µl da célula competente para um microtubo de 1,5 mL estéril e gelado, o conteúdo foi delicadamente homogeneizado, e posteriormente, transferido para uma cubeta de eletroporação de 0,2 cm em gelo. Foi então realizada a eletroporação a 2,5 quilovolts (kV) e, em seguida, a solução de LB suplementado com glicose 2 M e magnésio 2 M foi adicionada a cubeta de eletroporação e a reação foi incubada com agitação leve (150 rpm) a 37 °C por uma hora.

Após esse período de incubação, os transformantes foram selecionados em placas de ágar LB contendo ampicilina (100 µg/ml) para posterior seleção de colônias com o genótipo de interesse para a realização dos testes propostos neste trabalho.

As reações de PCR para a detecção dos genes *ema* na amostra hospedeira MS427 e o gene responsável pelo domínio passageiro na amostra hospedeira BL21(DE3) foram realizadas utilizando 7,5 µl de GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, WI, USA), 5,5 µl de água destilada ultra-pura, 1 µl do DNA extraído da bactéria e 0,34 µM dos *primers* Forward-(XhoI) e Reverse-(KpnI) e pET28a-XhoI e pET28a-BamHI respectivamente. Os géis foram preparados utilizando 1% de agarose (Kasvi, PR, Brasil) em tampão Tris-Borato-EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 1X e corado com solução SYBR Safe (Invitrogen, Vilnius, Lituânia).

As bactérias selecionadas como hospedeiras foram a MS427 (KJÆRGAARD et al. 2000b), que compreende a *E. coli* K-12 MG1655 deletada no gene *flu*, responsável por codificar a adesina autotransportadora conhecida como Antígeno 43; e a BL21(DE3), que também compreende uma K-12, sendo comumente utilizada para expressão de proteínas recombinantes (KIM et al. 2017). A MS427 foi selecionada por já possuir os mecanismos necessários para a produção de uma proteína autotransportadora e posterior transporte dessa proteína para o meio extracelular. É importante ressaltar que todos os experimentos com os clones obtidos a partir da clonagem com a MS427 foram realizados na presença de 0,2% de L-arabinose, para induzir a expressão do promotor *araBAD* (P_{BAD}) localizado antes do sítio múltiplo de clonagem.

Para assegurar a integridade dos genes de interesse nos plasmídeos recombinantes a serem obtidos, foi realizado uma PCR para o vetor, cujo produto foi purificado com o uso de AMPure XP (Beckman Coulter, CA, EUA) utilizando recomendações do fabricante. Este produto purificado foi submetido a sequenciamento Sanger (SANGER, NICKLEN E COULSON, 1977). Para a PCR e sequenciamento, foram utilizados os *primers* indicados nos manuais dos respectivos vetores, conforme descrito na Tabela 7.

Tabela 7. *Primers* que foram empregados no sequenciamento dos vetores pIC e pHO para verificar a integridade dos genes clonados.

Vetor	<i>Primers</i>	Sequência (5' → 3')
pIC	pBAD – F	ATGCCATAGCATTTTTATCC
	pBAD – R	GATTTAATCTGTATCAGG
pHO	<i>T7 promoter</i>	TAATACGACTCACTATAGGG
	<i>T7 terminator</i>	GCTAGTTATTGCTCAGCGG

3.6 Expressão da proteína recombinante contendo apenas o domínio passageiro da proteína Ema fusionada à cauda de histidina

Posteriormente, o transformante foi cultivado em meio 2HKII (JENSEN e CARLSEN, 1990) contendo canamicina (50 ug/ml) sob agitação a 150 rpm a 37 °C até atingirem densidades ópticas (DO_{600nm}) entre 2 e 3. A indução foi então realizada pela adição de IPTG (isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo - Invitrogen, Vilnius, Lituânia) 0,5 mM marcando o tempo zero, onde foi realizada a primeira coleta do sobrenadante. Outra coleta foi realizada nos tempos 1, 2, 3 e 16 horas enquanto as culturas continuaram sob agitação a 150 rpm a 30 °C.

As culturas foram centrifugadas a 13523 x g por 10 minutos a 4 °C, enquanto a fração insolúvel foi ressuspensa em tampão de lise (Tris HCl 0,1 M, pH 7,0, 5mM EDTA e 0,1% de deoxicolato de sódio) e lisada em sonicador Bandelin Sonopuls HD 2070 (Bandelin, BE, Alemanha) utilizando ciclo de 90% por 5 minutos com 45% de potência. Os corpúsculos de inclusão foram lavados mais uma vez no mesmo tampão e depois mais duas vezes em tampão Tris HCl 0,05 M e 1 mM de EDTA para retirada do detergente. Tanto o sobrenadante quanto os corpúsculos de inclusão foram mantidos congelados a -20 °C até o momento do uso.

Na sequência, foram desnaturados com 2-mercaptoetanol (Bio-Rad, CA, EUA) e tampão de amostra 2X Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad, CA, EUA) a 98 °C por 5 minutos. Em seguida, foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 12%, utilizando Tris-Glicina (Tris [hidroximetil amino metano] 3% e ácido aminoacético 14%) pH 8,3 como tampão de corrida. As amostras foram submetidas a tensão de 80 V até o corante dos tampões de amostra alcançar a extremidade do gel. Posteriormente, o gel foi corado por solução de *Coomassie* Azul Brilhante R (INLAB, SP, Brasil) e descorado em solução contendo 30% etanol e 7% ácido acético em água destilada.

A proteína foi detectada nos corpúsculos de inclusão. Portanto, 1 ml desta suspensão (1 mg) foi diluído em tampão 50 mM CAPS pH 7 a 12, 1 mM EDTA. A suspensão de agregados proteicos foi colocada em compartimentos plásticos que foram selados, colocados dentro de outros compartimentos plásticos, que foram selados a vácuo e colocados em vaso de pressão (R4-6-40, High Pressure Equipment, USA). O vaso foi fechado e pressurizado a 2,4 kbar por 90 minutos com o auxílio de uma bomba (PS-50, High Pressure Equipment, USA) e um compressor de ar, utilizando-se mistura de óleo em água como fluido de transmissão.

Após a descompressão, as amostras foram retiradas dos compartimentos plásticos, centrifugadas a 12000 x g por 15 minutos, dialisadas em membrana contra tampão contendo 25 mM Tris pH 7,0 por 18 horas em geladeira com auxílio de agitador magnético, novamente centrifugadas e, por fim, estocadas a -20 °C. As amostras obtidas foram submetidas a SDS-PAGE 12%, coradas por solução de *Coomassie* Azul Brilhante R (INLAB, SP, Brasil) e descoradas por solução contendo 30% etanol e 7% ácido acético em água destilada para verificação do pH ideal para o redobramento da proteína.

3.7 Purificação da proteína recombinante contendo apenas o domínio passageiro da proteína Ema

A proteína foi purificada em coluna cromatográfica de níquel de afinidade HisTrap FF (GE Healthcare, MA, USA). Esta coluna acoplada ao sistema de purificação Äkta (GE Healthcare, MA, USA) foi equilibrada com tampão contendo 25 mM Tris pH 7,0 e 150 mM NaCl. A eluição foi realizada em tampão contendo 25 mM Tris pH 7,0, 150 mM NaCl e 1 M de Imidazol aplicando um gradiente 0 – 1 M de Imidazol (30 minutos, 1 ml/minuto). As frações eluídas foram dialisadas contra 25 mM de fosfato de sódio pH 7,0. Posteriormente, foi realizado SDS-PAGE a 12% conforme o item 4.6 e o gel foi corado por *Coomassie* Azul Brilhante R (INLAB, SP, Brasil) e descorado por solução contendo 30% etanol e 7% ácido acético em água destilada.

3.8 Produção de soro em coelho contra a proteína Ema

A proteína purificada obtida foi utilizada para imunização de um coelho seguindo o protocolo de experimentação animal aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (Protocolo CEUAIB: 9452010316). Um coelho New Zealand White fêmea de 2 kg foi inoculado com 100 µg da proteína Ema em conjunto com 200 µl de Montanide ISA 50 V2 (lote: 190301019150 - Instituto Butantan, SP,

Brasil) como adjuvante. Foram realizadas três imunizações com intervalos de 15 dias. Uma sangria de prova foi realizada 15 dias após a última imunização para titulação de anticorpos específicos. Para isso, foi empregado o seguinte protocolo de ELISA:

Em uma placa de 96 poços, foi distribuído por poço 100 µl contendo 0,5 µg de Ema diluído em tampão carbonato de sódio 0,1 M pH 9,6. Esta placa ficou a 4 °C por 18 horas. Em seguida, os poços foram lavados três vezes com tampão de lavagem (PBS + 0,05% Tween 20) e bloqueados com 200 µl de solução de bloqueio (tampão de lavagem + 10% leite desnatado em pó) por uma hora a 37 °C. Após lavagem com tampão de lavagem, foi adicionado 100 µl de tampão de diluição (PBS + 0,01% Tween-20 + 1% de leite desnatado em pó) em cada poço e 100 µl do soro pré-imune foram adicionados ao primeiro poço. O conteúdo foi homogeneizado com pipeta e posteriormente foi realizada diluição seriada. O mesmo procedimento foi realizado para as duas linhas seguinte da placa de 96 poços, porém utilizando o soro obtido na sangria de prova. Após incubar por uma hora a 37 °C, os poços foram lavados três vezes com tampão de lavagem. Em seguida, 100 µl de solução de tampão de diluição contendo anticorpo secundário anti-*rabbit* (1:5000) produzido em cabra conjugado a peroxidase (Sigma-Aldrich, HE, Alemanha) foi adicionada aos poços e a placa foi incubada por uma hora a 37 °C.

Após este período, os poços foram lavados três vezes com tampão de lavagem e a revelação foi feita entre 10 e 15 minutos com solução de revelação. Para o preparo desta solução, foram utilizados 8 mg de dihidroclorato de o-fenilenediamina (OPD) (Sigma-Aldrich, HE, Alemanha) como substrato, 20 ml de tampão citrato-fosfato (Citrato 0,1 M + Fosfato 0,2 M, pH 5,0) e 10 µl de H₂O₂ 30%. Após este período, a reação foi interrompida com 50 µl de solução de parada (H₂SO₄ 8N) e a leitura da absorbância foi feita a 492 nm utilizando o aparelho Multiskan EX (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA).

A partir do resultado obtido nesta titulação, tornou-se evidente que o esquema inicial de imunização foi suficiente, prosseguindo então para a sangria final. Cerca de 50 ml de sangue foram coletados e transferidos para tubos cônicos para centrifuga de 50 ml. Este sangue foi incubado em estufa a 37 °C por duas horas, centrifugado a 1157 x g a 4 °C por 30 minutos e o soro foi coletado e transferido para tubos de 15 ml que foram novamente centrifugados nas mesmas condições. O soro foi mantido a -20 °C até o momento do uso. Esses experimentos foram realizados no Biotério de Experimentação do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan sob supervisão da veterinária Dra. Renata Gemio.

3.9 Adsorção do soro anti-Ema

Para minimizar ligações inespecíficas do soro, uma cultura de BL21(DE3)(pET-28a) foi cultivada por 18 horas em meio LB com canamicina (50 µg/ml) à 37 °C. No dia seguinte, a cultura foi inoculada em 200 ml de LB com canamicina (50 µg/ml) a 37 °C e mantida em agitação até atingir a DO_{600nm} entre 0,5 e 0,8, quando foi adicionado 0,5 mM de IPTG. A cultura retornou para agitação a 37 °C por 3 horas e, após este período, foram coletadas alíquotas de 10 ml que foram transferidas para tubos cônicos de centrífuga de 15 ml. Após centrifugar por 15 minutos a 1157 x g, o sobrenadante foi descartado e os *pellets* resultantes foram congelados a -20 °C. O soro obtido no item anterior foi homogeneizado em um tubo contendo um *pellet* congelado. Após 12 horas em baixa agitação e temperatura ambiente, o tubo foi centrifugado e o soro foi transferido para um novo *pellet*. Ao todo, foram realizados 20 ciclos de adsorção e ao final desses ciclos o soro foi filtrado em membrana filtrante de 20 µm acoplada em seringa e mantido a -20 °C.

3.10 Immunoblotting

As bactérias BL21(DE3)(pET-28a) e BL21(DE3)(pHO) foram pré-cultivadas em 3,0 ml de meio LB por aproximadamente 18 horas. No dia seguinte, foram inoculadas em outros dois tubos na proporção 1:100, onde foram mantidas em agitação a 37 °C até atingir DO_{600nm} entre 0,5 e 0,8. Em seguida, a expressão foi induzida através da adição de 0,5 mM de IPTG. Após três horas, um dos tubos de cada uma das bactérias foi centrifugado a 2500 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O conteúdo restante foi ressuspensão em 200 µl de PBS (Tampão Salina Fosfato pH 7,4) e congelado até o momento do uso. Após 18 horas de crescimento, os outros dois tubos também foram centrifugados, tiveram o sobrenadante descartado e o precipitado foi ressuspensão em PBS.

Em seguida, uma alíquota desta suspensão foi adicionada a um microtubo contendo tampão de amostra e submetida a desnaturação em banho seco a 98 °C por 5 minutos. As proteínas foram separadas através de SDS-PAGE 12%, conforme descrito no item 4.6 e posteriormente foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose por *western blot*, utilizando o sistema semiseco Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, CA, EUA), em tampão de transferência (Tris-Glicina 10X 10%, etanol absoluto 20%) à 10 V por 45 minutos.

Após a transferência, as membranas foram bloqueadas por 18 horas a 4 °C com leite desnatado a 10% em PBS contendo Tween-20 0,05% (PBS-T). No dia seguinte, foram feitas três lavagens com PBS-T por 5 minutos, seguido de incubação com o anticorpo primário anti-His (Sigma-Aldrich, HE, Alemanha) produzido em camundongo na proporção 1:6000 ou anti-Ema (1:200) em leite desnatado a 10% em PBS-T por uma hora. Em seguida, foram feitas três lavagens com PBS-T e a membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti-*mouse* (1:4000) (Sigma-Aldrich, HE, Alemanha) produzido em cabra para His ou anti-*rabbit* (Sigma-Aldrich, HE, Alemanha) produzido em cabra para a proteína Ema (1:10000) em leite desnatado a 10% em PBS-T por uma hora. Após este período, foram realizadas três lavagens com PBS-T e o resultado foi revelado com o auxílio do *kit* SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) e visualizado no transiluminador Amersham Imager 600 (GE Healthcare, MA, EUA) ou UVITEC 4.7 Cambridge (Cambridge, GB-CAM, Inglaterra).

3.11 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) com imunomarcação

Os ensaios de MET foram realizados pela Dra. Cecilia Mari Abe, pesquisadora científica do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan. As bactérias MS427(pBAD), MS427(pIC) e BA92 foram previamente cultivadas em LB por 18 h a 37 °C. Após o cultivo, as amostras foram centrifugadas (2348 x g por 5 minutos) e o sobrenadante foi descartado. Em seguida foram realizadas quatro lavagens com PBS. Após este procedimento, as bactérias foram fixadas com paraformaldeído a 4% em PBS pH 7,4 por 30 minutos em temperatura ambiente. Após cinco lavagens com PBS contendo soroalbumina bovina (BSA) (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) a 0,2% (PBS-BSA), as amostras foram bloqueadas na mesma solução por 60 minutos em temperatura ambiente.

Em seguida, as amostras foram novamente lavadas e posteriormente incubadas com soro pré-imune ou soro anti-Ema, ambos na diluição 1:25 por 18 horas a 4 °C. Após esse período, as amostras foram lavadas cinco vezes com PBS-BSA e incubadas com anticorpo secundário (anti-IgG de coelho produzido em cabra [Bio-Rad, CA, EUA] na diluição de 1:25, conjugado com partículas de ouro coloidal de 10 nm) à temperatura ambiente por cinco horas.

Após cinco lavagens com PBS-BSA, as preparações foram aplicadas sobre telas de cobre (200 mesh) para microscopia eletrônica (Electron Microscopy Sciences, PA,

EUA) previamente preparadas com Formvar (Sigma-Aldrich, HE, Alemanha). Após secarem em temperatura ambiente, as preparações foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão LEO 906E (Zeiss, BW, Alemanha) a 80 kV no Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional do Instituto Butantan.

3.12 Teste de autoagregação

O potencial de autoagregação mediado pela proteína Ema foi avaliado de acordo com o descrito por Kjærgaard e colaboradores (2000a), com algumas modificações. As bactérias foram cultivadas em tubo *falcon* com 40 ml de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) acrescido de 0,2% de L-arabinose. Como controle positivo, foi utilizada a bactéria MS427(pCO4). Após incubação a 37 °C sob agitação de 150 a 200 rpm por 18 horas, o conteúdo foi centrifugado a 5000 x g por 10 minutos. O *pellet* resultante foi ressuspensão em 10 ml de caldo BHI acrescido de 0,2% de L-arabinose. Posteriormente, 200 µl de cada cultura foram transferidos para placa de 96 poços, tendo sua DO_{600nm} ajustada próxima à 1, correspondendo ao T₀ do experimento de autoagregação.

Após este ajuste, 5 ml foram transferidos para tubos estéreis de vidro que foram mantidos na bancada durante todo o período experimental (duas horas). A cada 20 minutos, 200 µl foram cuidadosamente coletados do topo de cada cultura bacteriana e tiveram sua DO_{600nm} medida. Ao final dos ensaios, uma alíquota de 10 µl do fundo do tubo foi coletada e pipetada em uma lâmina de microscopia, que foi fixada por calor e posteriormente corada por 4',6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI; Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) (1:500 em PBS) e mantidas sob o abrigo de luz por 20 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas 10 vezes mergulhando-as em água destilada, secas com auxílio de papel absorvente e levadas ao microscópio de fluorescência BX60 (Olympus, Kanto, Japão) para observação dos agregados bacterianos.

Para leitura da densidade óptica, foi utilizado o leitor BioTek Epoch 2 em conjunto com o programa Gen5 (Agilent, CA, EUA). Ao todo foram realizadas nove replicatas deste experimento. Para análise estatística, foram realizados ajustes de regressões polinomiais de segundo grau para todas as repetições para cada grupo e posteriormente foram realizadas análises de variâncias referentes a cada parâmetro.

3.13 Produção de biofilme em superfície de poliestireno

O teste de formação de biofilme foi realizado de acordo com de Oliveira-Garcia e colaboradores (2003), com algumas modificações. Em cada poço da microplaca de 96 poços foram adicionados 200 µl de caldo LB contendo 2% de D-manopiranosídeo (Sigma-Aldrich, HE, Alemanha), 0,2% de L-arabinose, 100 µg/ml de ampicilina e 10 µl de suspensão bacteriana cultivada em caldo LB à 37 °C por 18 horas. Após 24, 48 e 72 horas de incubação à 37 °C, cada poço foi lavado uma vez com 200 µl de PBS e foi adicionado 200 µl de formaldeído à 3%. Após uma hora, foi realizada uma lavagem adicionando 200 µl de água destilada.

Então, foi adicionado 200 µl de cristal violeta à 1% em cada poço. Depois de 20 minutos, os poços foram lavados com água destilada até que não houvesse mais corante saindo dos poços e a placa foi seca em temperatura ambiente, para então adicionar 200 µl de metanol por 10 minutos. A leitura foi realizada em leitor ELISA BioTek Epoch 2 com o programa Gen5, na densidade óptica de 570 nm. Como controles, foram utilizadas MS427(pCO4), EAEC 042 (controle positivo) e *E. coli* HB101 (controle negativo). Tanto a 042 quanto a HB101 foram incubadas sem ampicilina.

Os ensaios fenotípicos quantitativos de autoagregação e formação de biofilme foram realizados em triplicatas técnicas e triplicatas biológicas que foram realizadas em dias distintos. Para avaliação dos dados, foi realizado uma ANOVA seguida por teste de Tukey. Foram considerados significativos os resultados de $P < 0,05$.

3.14 Produção de biofilme em superfície de vidro

A metodologia para produção de biofilme em poliestireno foi adaptada com algumas modificações para a avaliação da produção de biofilme em lamínulas de vidro. Lamínulas de vidro autoclavadas foram inseridas em placas de poliestireno de 24 poços estéreis. Posteriormente, 950 µl de caldo LB contendo 2% de D-manopiranosídeo, 0,2% de L-arabinose e 100 µg/ml de ampicilina. Em seguida, 50 µl do crescimento bacteriano em caldo LB por 18 horas foram adicionados aos poços. As placas foram então incubadas à 37 °C por 24, 48 e 72 horas. Após este período, os poços foram lavados uma vez com 1 ml de PBS, seguido de fixação com 1 ml de formaldeído à 3% por uma hora.

Em seguida, os poços foram lavados com água destilada e as lamínulas foram transferidas para uma nova placa de 24 poços, a fim de evitar que o biofilme produzido nas paredes dos poços interfira na leitura. Nesta nova placa, as lamínulas foram coradas com 1 ml de cristal violeta a 0,1% por 20 minutos. Em seguida, foram lavadas com água

destilada até remover todo o corante não aderido e a placa foi deixada para secar em temperatura ambiente.

Após este período, o corante foi ressuspensão com ácido acético glacial 33% por 10 minutos e a leitura da DO_{570nm} foi realizada em leitor ELISA BioTek Epoch 2 com o auxílio do programa Gen5. Para avaliação dos dados, foi realizado uma ANOVA seguida por teste de Tukey. Foram considerados significativos os resultados de $P < 0,05$.

3.15 Ensaios de interação da proteína Ema com componentes de matriz extracelular

Para avaliar a interação da proteína Ema com componentes de matriz extracelular foram realizados ensaios de ELISA. Os componentes de matriz colágeno tipo I, III, (Corning, NI, EUA), IV e V, fibronectina celular e plasmática, laminina, fibrinogênio e vitronectina (Sigma-Aldrich, HE, Alemanha) ($1\mu\text{g}/\text{poço}$) diluídos em PBS foram imobilizados em placas de 96 poços a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 18 horas. Os poços foram lavados três vezes com PBS-T (0,05%) entre cada etapa que se segue. Os sítios não específicos de ligação foram bloqueados usando $100\ \mu\text{l}$ de BSA 1% por duas horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após o bloqueio, os componentes foram incubados com $100\ \mu\text{l}$ da proteína recombinante a $0,1\ \mu\text{M}$ em PBS por uma hora e 30 minutos a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após lavagens, os poços foram incubados com o soro anti-Ema (1:1000) por uma hora a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Após este período, segundo anticorpo anti-IgG de coelho produzido em cabra conjugado a peroxidase (Sigma-Aldrich, HE, Alemanha) na diluição de 1:5000 foi adicionado e incubado por uma hora a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. A revelação foi feita entre 10 e 15 minutos com solução de revelação usando 8 mg de OPD (Sigma-Aldrich, HE, Alemanha) como substrato, 20 ml de tampão Citrato-Fosfato e $10\ \mu\text{l}$ de H_2O_2 30%, e interrompida com $50\ \mu\text{l}$ de solução de parada (H_2SO_4 8N). A leitura da absorbância foi feita a 492 nm utilizando o aparelho Multiskan EX (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA). Os ensaios foram realizados com duas replicatas técnicas e três replicatas biológicas. Para análise estatística, foi realizado uma ANOVA seguida de teste de Dunnett.

Visando calcular a constante de dissociação de Ema com as formas de fibronectinas, foi realizada uma curva dose-resposta utilizando o mesmo procedimento descrito acima, porém imobilizando apenas fibronectina celular e plasmática ($1\ \mu\text{g}/\text{poço}$) na placa de 96 poços. Em seguida, ao invés de incubar com $1\ \mu\text{g}$ de Ema, foi realizada uma diluição seriada da proteína partindo de 2 a $0,125\ \mu\text{M}$. Neste ensaio, $1\ \mu\text{g}$ de fetuína diluída em PBS foi utilizada como controle negativo. A fetuína foi obtida por expressão

heteróloga pelo Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan sob supervisão da Dra. Angela Silva Barbosa.

Para posterior análise do domínio de maior interação para ligação com Ema, foi realizado o procedimento descrito acima substituindo as fibronectinas celular e plasmática por 1 μ g dos domínios F30 (domínio de ligação à heparina e fibrina – HBD) e F45 (domínio de ligação a gelatina e colágeno – GBD) (Sigma-Aldrich, HE, Alemanha).

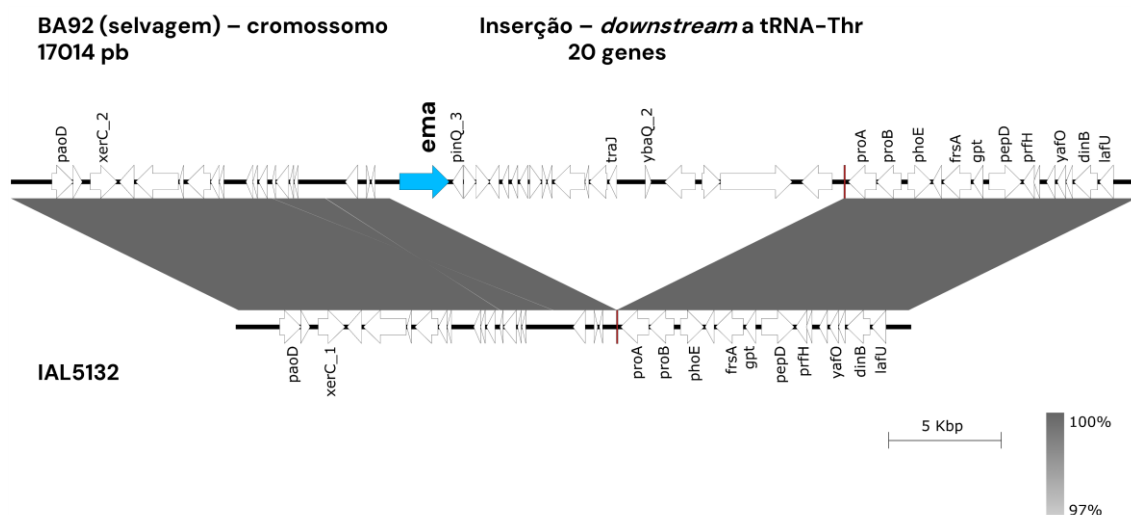


Figura 5. Ponto de inserção do gene *ema* no cromossomo do isolado de *E. coli* enteropatogênica atípica (aEPEC) BA92. Através da comparação do genoma de um isolado de aEPEC do sorotipo O2:H16 com o gene *ema* com outra aEPEC O2:H16 que não possui *ema* em seu genoma, foi possível detectar que *ema* se insere *downstream* a sequência de DNA que codifica o RNA transportador do aminoácido treonina e integra um profago, totalizando 20 genes compreendendo 17014 pb. A escala de cinza indica o percentual de identidade genética entre as sequências.

Tabela 8. Anotação realizada pelo Prokka dos 19 genes contidos na região genômica contendo o gene *ema* presente no isolado BA92.

Gene	Anotação
<i>pinQ_3</i>	Proteína da família recombinase
Locus 3	Proteína de cauda de fago
Locus 4	Proteína de montagem de fibra de cauda
Locus 5	Proteína hipotética
Locus 6	Transposase da família IS1
Locus 7	Transposase da família IS1
Locus 8	Transposase da família IS1
Locus 9	Proteína hipotética
Locus 10	Proteína hipotética
Locus 11	Proteína hipotética
Locus 12	Proteína hipotética
Locus 13	Proteína hipotética
Locus 14	Proteína hipotética
<i>traJ</i>	TraJ
<i>ybaQ_2</i>	Regulador transcricional YbaQ tipo HTH putativo
Locus 17	Proteína hipotética
Locus 18	Proteína hipotética
Locus 19	Proteína hipotética
Locus 20	Proteína hipotética

4.3 Similaridade com outras proteínas já descritas na literatura

Comparações com os bancos de proteínas Pfam e InterPro mostraram similaridade com o domínio translocador, conservado entre as autotransportadoras, repetições AIDA-I característico das proteínas da família AIDA-I e o domínio pertactina, também comumente encontrado em proteínas da família AIDA-I (Figura 6).

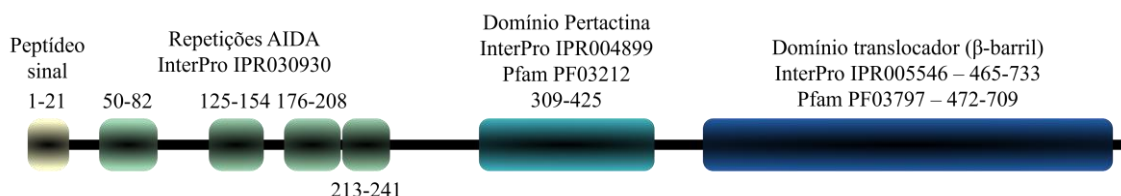


Figura 6. Domínios proteicos encontrados na proteína Ema. Análise pelo InterPro mostrou semelhanças entre domínios presentes na sequência da proteína Ema com outros já descritos na literatura. As repetições AIDA e o domínio pertactina são comumente encontrados em proteínas da família AIDA-I. O domínio β -barril é comumente encontrado na literatura para proteínas autotransportadoras.

No filograma construído comparando a proteína Ema com outras já descritas na literatura, a nova proteína se situou mais relacionada às proteínas da família AIDA-I (Figura 7), sugerindo assim que ela também seja integrante desta família de proteínas autotransportadoras.

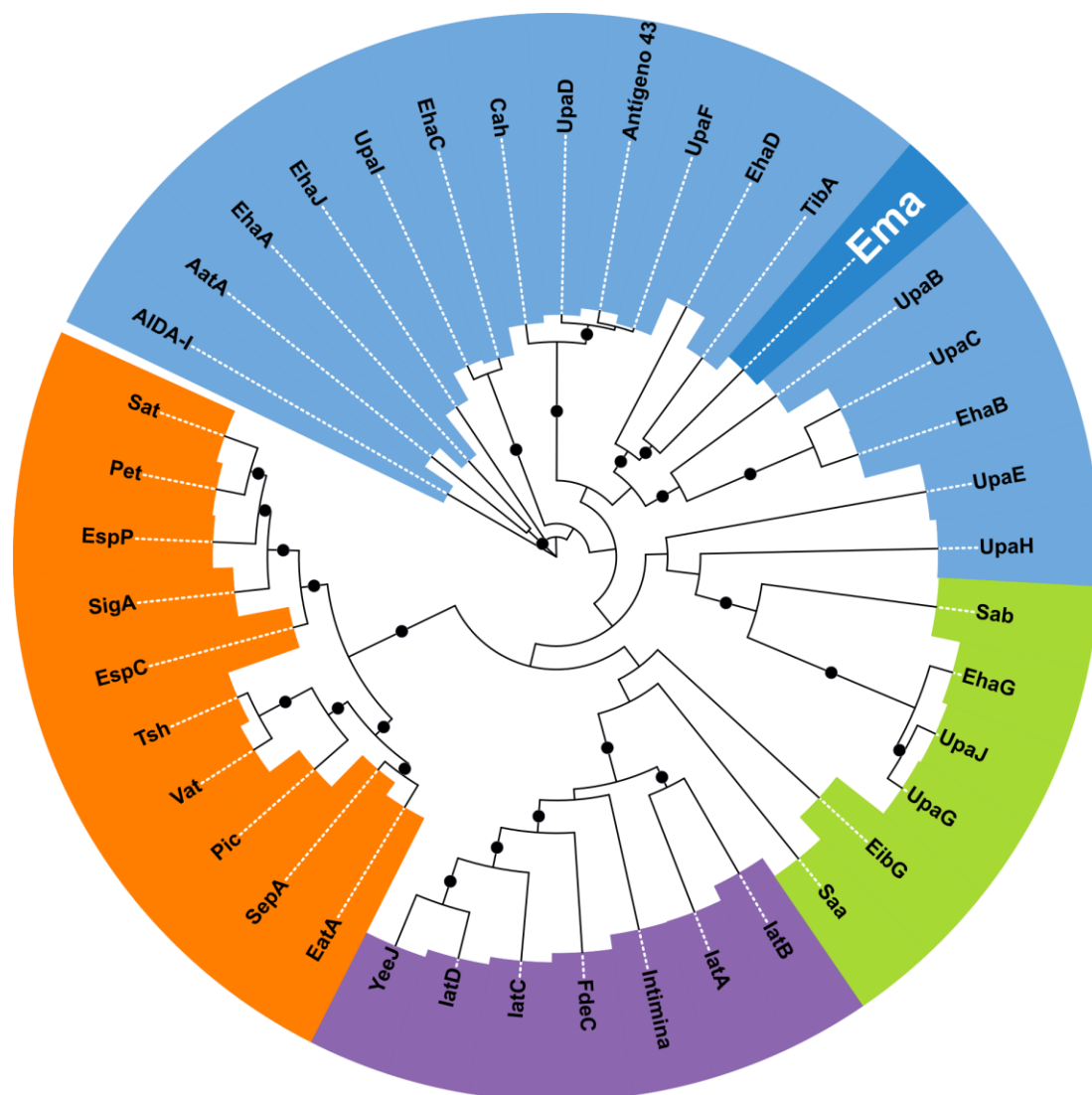


Figura 7. Árvore de máxima verossimilhança comparando a nova proteína autotransportadora Ema com outras proteínas autotransportadoras já descritas na literatura. A análise mostra que Ema está muito relacionada às proteínas da família AIDA-I. Os nódulos nos ramos indicam *bootstraps* $\geq 80\%$. Azul = AIDA-I; Verde = Adesinas autotransportadoras triméricas; Roxo = Autotransportadoras inversas e Vermelho = SPATES. Árvore calculada utilizando IQ-TREE empregando o modelo de substituição PMB+F+G4, *Gamma shape alpha* = 7.1547 e o parâmetro *ultrafast bootstrap* com 1000 *bootstraps*. Os dados resultantes em formato Newick foram utilizados para construir a árvore na ferramenta *online iTOL*.

4.4 Predição do arranjo molecular da nova proteína autotransportadora

De acordo com a predição, a proteína é estruturalmente organizada como uma autotransportadora convencional da família Va, tendo um domínio translocador (β -barril) C-terminal e um domínio passageiro N-terminal bem evidentes (Figura 8).

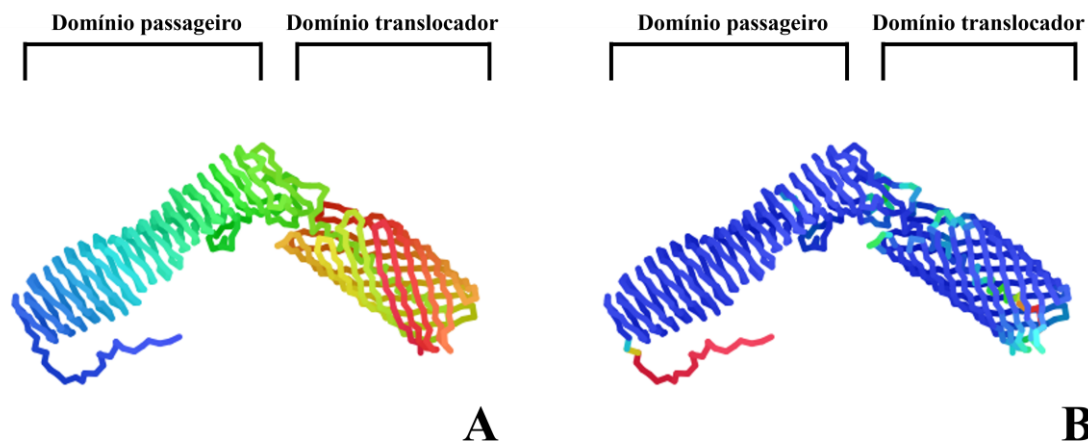


Figura 8. Predição do arranjo estrutural da proteína Ema realizado no caderno ColabFold. Em (A), a coloração indica o gradiente das regiões amino-terminal – em azul – para carboxi-terminal – na cor vermelha; em (B), o gradiente de coloração indica a confiabilidade da predição da estrutura através de sua pontuação IDDT (*local Distance Difference Test*), onde azul indica as regiões mais prováveis de corresponderem ao modelo real e vermelho indica as estruturas com menor confiabilidade.

4.5 Verificação da presença do gene *ema* no genoma da BA92 por reação em cadeia da polimerase (PCR)

Conforme evidenciado na análise eletroforética em gel de agarose apresentada na Figura 9, houve amplificação por PCR do fragmento correspondente ao gene *ema* usando o DNA do isolado selvagem BA92 como molde (Figura 9A). O mesmo ocorreu para o fragmento responsável por codificar o domínio passageiro da nova proteína autotransportadora (Figura 9B).

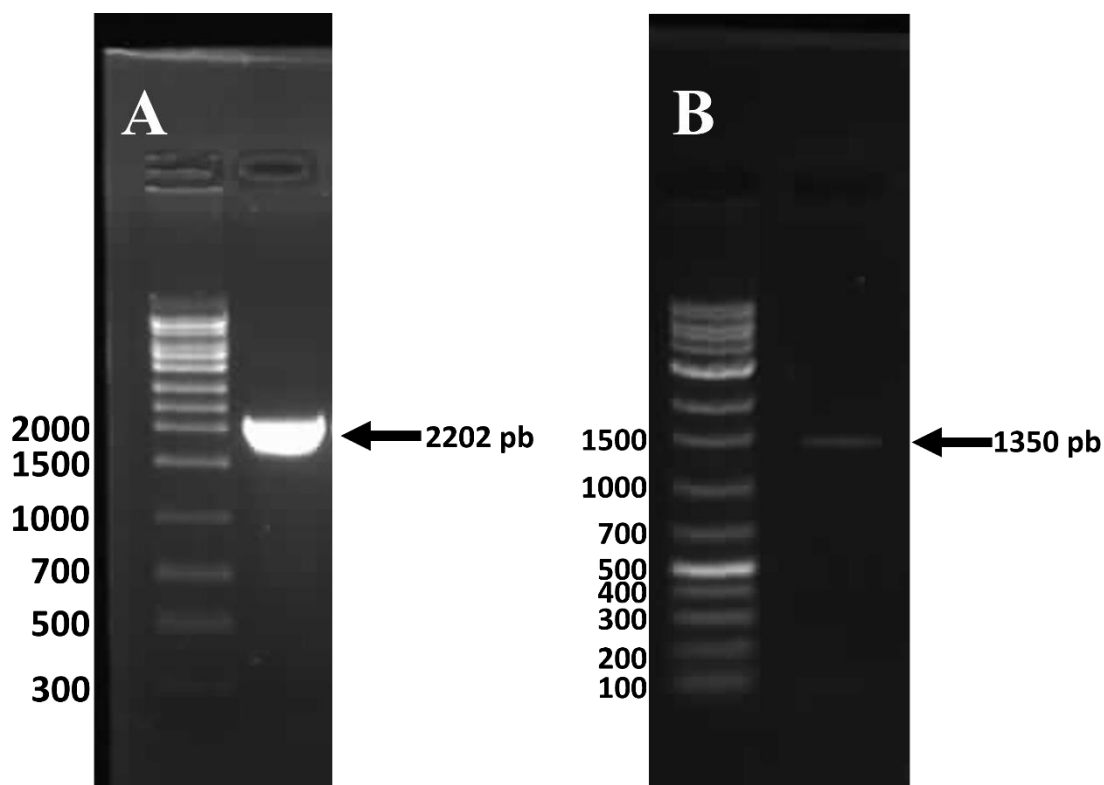


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose (1%) corado por solução SYBR Safe para análise dos produtos de amplificação correspondentes ao gene *ema* completo e de seu domínio passageiro, usando o DNA do isolado selvagem BA92 como molde. (A) amplificação do gene *ema* completo (~2,2 kb), marcador de peso molecular: HighRanger 1kb DNA Ladder (Norgen Biotek, ON, Canada); (B) amplificação da região responsável por codificar o domínio passageiro do gene *ema* (~1,3 kb), marcador de peso molecular: 1 kb ladder plus M1191 (Sinapse, SP, Brasil).

4.6 Expressão e purificação da proteína recombinante contendo apenas o domínio passageiro de Ema

A proteína recombinante foi produzida agregada em corpúsculos de inclusão, como pode ser observado na figura 10. Apesar de ter seu peso predito de aproximadamente 48,3 kDa, observa-se que a proteína apresentou mobilidade eletroforética relativa maior, ou seja, aproximadamente 51 kDa. De acordo com o que foi publicado por Guan e colaboradores (2015), a quantidade de aminoácidos acídicos interfere na migração eletroforética da proteína analisada por SDS-PAGE. De acordo com a função proposta por estes autores, tem-se:

$$y = 276,5x - 31,33$$

onde y = diferença do peso observado em eletroforese de SDS-PAGE e x = porcentagem de aminoácidos acídicos da proteína, ou seja, proporção de aspartatos e glutamatos. Segundo o ProtParam (<https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>), o domínio passageiro da proteína possui 5,9% (27/456) de aspartato e 4,6% (21/456) de glutamato. Aplicando estes valores à função:

$$y = 276,5 * 10,5 - 31,33$$

$$y = 2871,92 \text{ Da}$$

Somando este valor ao peso predito do domínio passageiro, tem-se:

$$48354,61 \text{ Da} + 2871,92 \text{ Da} = 51226,53 \text{ Da}$$

Este resultado é mais fiel a mobilidade eletroforética relativa observada nos ensaios de SDS-PAGE.

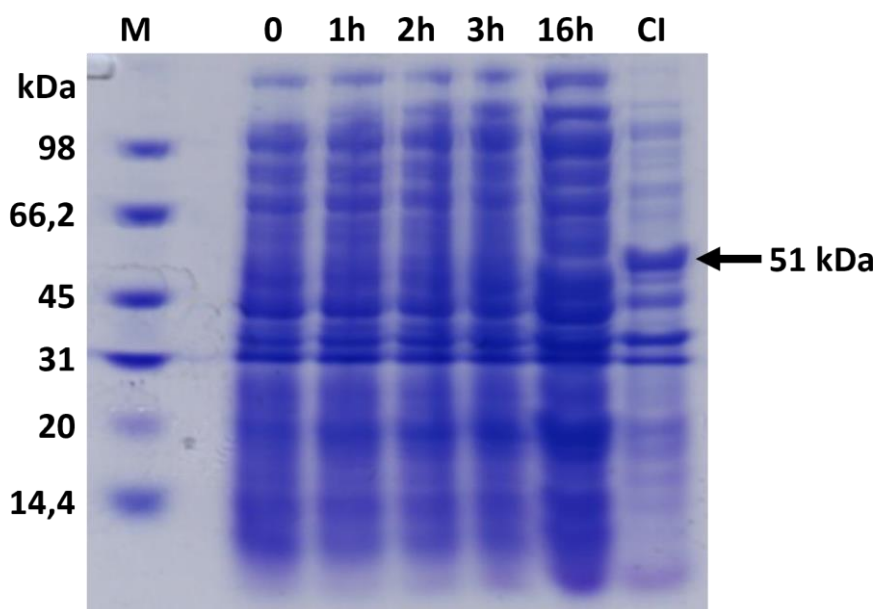


Figura 10. Análise por SDS-PAGE (12%) do conteúdo proteico presente na cultura do isolado BL21(DE3)(pHO) em diferentes tempos após indução por 0,5 mM de IPTG. As canaletas 0, 1, 2, 3 e 16 indicam os intervalos de tempo em horas em que uma alíquota do sobrenadante de cultura foi coletada após indução com 0,5 mM de IPTG. Os corpúsculos de inclusão (CI) (*pellet* da cultura) foram coletados apenas 16 horas após a indução por IPTG. Os resultados mostram que o domínio passageiro da proteína Ema fusionado à cauda de histidina não foi secretado, mas sim produzido agregado em corpúsculos de inclusão. M = marcador de massa molecular – Recombinant Unstained Protein Ladder (14-98 kDa) (Novus Biologicals, CO, EUA). Gel corado por *Coomassie* Azul Brilhante R.

A curva de pH após o redobramento em diferentes pH mostrou que a melhor condição para ressolubilizar a proteína foi em pH 10 (Figura 11), de acordo com a espessura e intensidade observada da banda. A partir desta amostra, a proteína foi submetida a cromatografia de metais imobilizados por afinidade, gerando a curva apresentada na Figura 12. A partir desta purificação, foram geradas frações de 1 ml da proteína purificada.

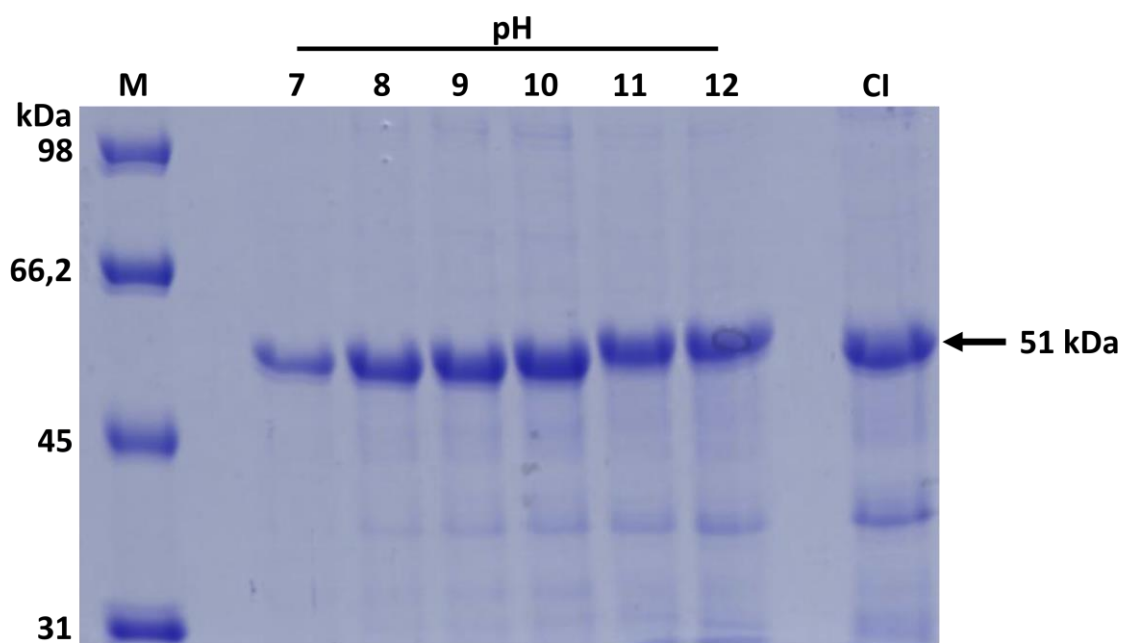


Figura 11. Análise por SDS-PAGE (12%) do domínio passageiro da proteína recombinante Ema fusionada à cauda de histidina após sua ressolubilização em alta pressão em diferentes pH. Os dados mostram que o pH 10 foi a melhor condição encontrada para a ressolubilização em alta pressão da proteína recombinante, devido a espessura e intensidade da banda observada. M = marcador de massa molecular – Recombinant Unstained Protein Ladder (14-98 kDa) (Novus Biologicals, CO, EUA); pH = pH utilizado no tampão antes de submeter a proteína a alta pressão; CI = corpúsculo de inclusão. Gel corado por *Coomassie* Azul Brilhante R.

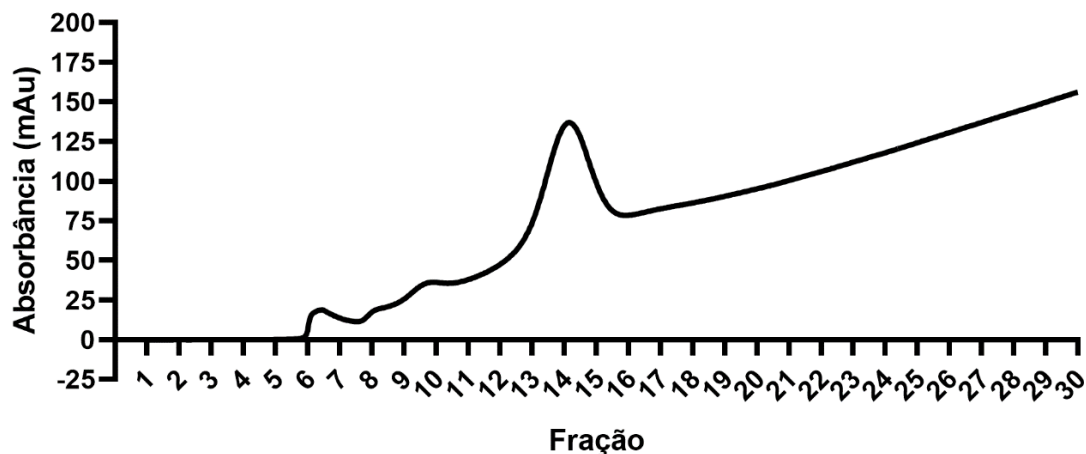


Figura 12. Curva de absorvância do processo de purificação do domínio passageiro recombinante da proteína Ema fusionada à cauda de histidina, através de cromatografia de afinidade de metais imobilizados utilizando coluna de níquel. A proteína foi purificada em coluna cromatográfica de afinidade HisTrap FF (GE Healthcare, MA, USA). Esta coluna acoplada ao sistema de purificação Äkta (GE Healthcare, MA, USA) foi equilibrada com tampão contendo 25 mM Tris pH 7,0 e 150 mM NaCl. A eluição foi realizada em tampão contendo 25 mM Tris pH 7,0, 150 mM NaCl e 1M de Imidazol) aplicando um gradiente 0 – 1 M de Imidazol (30 minutos, 1 ml/minuto).

Estas frações foram analisadas por SDS-PAGE 12% e submetidas a um *immunoblotting* utilizando soro anti-His para confirmação da identidade das mesmas (dados não mostrados). Após a confirmação da reatividade com o soro anti-His, este primeiro lote de proteínas foi utilizado para produzir em coelho o soro policlonal contra a proteína Ema. O soro obtido foi empregado em um novo *immunoblotting* contra os lisados totais das bactérias BL21(DE3)(pET-28a) e BL21(DE3)(pHO) em diferentes intervalos de tempo de indução com 0,5 mM IPTG (Figura 13).

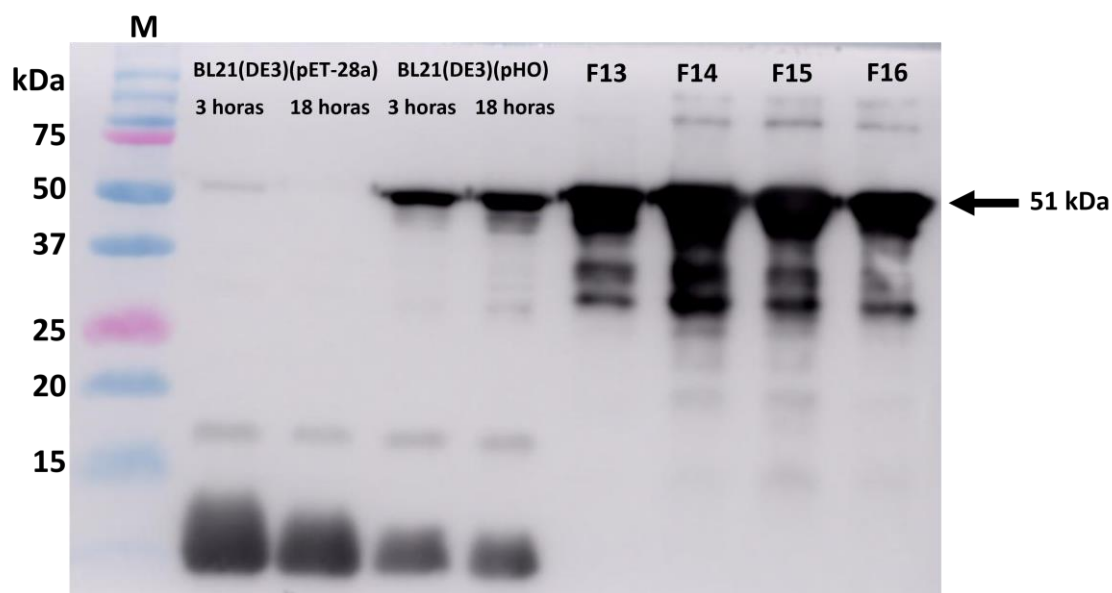


Figura 13. *Immunoblotting* de detecção do domínio passageiro da proteína Ema fusionada à cauda de histidina em extratos de cultura em caldo LB de BL21(DE3)(pET-28a) e BL21(DE3)(pHO). Os extratos foram coletados após 3 e 18 h da indução com 0,5 mM de IPTG. Para a imunodeteção, após corrida eletroforética (SDS-PAGE a 12%), o conteúdo proteico foi transferido para uma membrana de nitrocelulose pela técnica de *Western Blotting*, seguido do *immunoblotting* com o soro anti-Ema (1:500) como anticorpo primário e o soro anti-IgG de coelho produzido em cabra (1:2000) como anticorpo secundário. F13 a 16 indicam frações coletadas da Figura 11. A reatividade do soro foi detectada pelo sistema de quimioluminescência ECL. M = marcador de massa molecular (kDa) – Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad, CA, EUA).

Posteriormente, um novo lote de purificação foi produzido da mesma maneira e as frações mais concentradas foram homogeneizadas e distribuídas em alíquotas de 200 μ l. Estas frações foram analisadas por SDS-PAGE (12%) juntamente com uma curva de diferentes concentrações de BSA para verificação do rendimento da purificação, estimando a concentração da proteína recombinante obtida (Figura 14). Em seguida, um novo *immunoblotting* foi realizado utilizando os soros anti-His e anti-Ema (Figura 15).

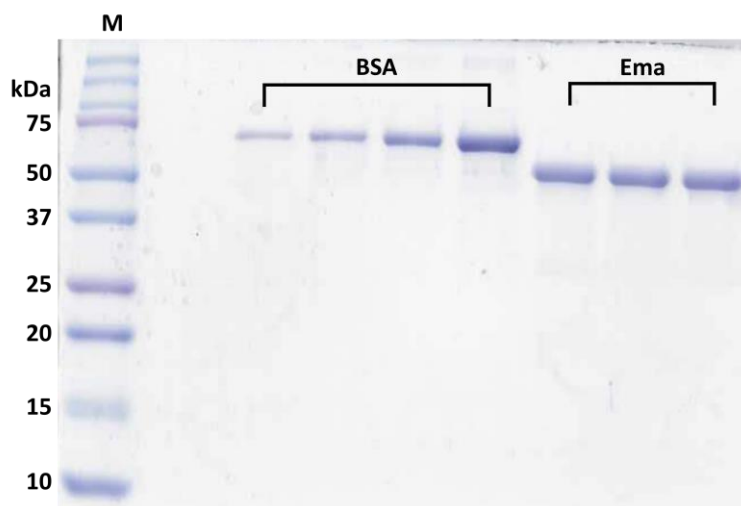


Figura 14. Análise por SDS-PAGE (12%) comparando o rendimento de três alíquotas distintas da homogeneização das frações da purificação de Ema obtidas no novo lote de purificação utilizando curva de BSA como referência. As quantidades de BSA utilizadas, da esquerda para direita, foram: 0,2, 0,4, 0,8 e 1,6 μg . M = marcador de massa molecular (kDa) – Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad, CA, EUA).

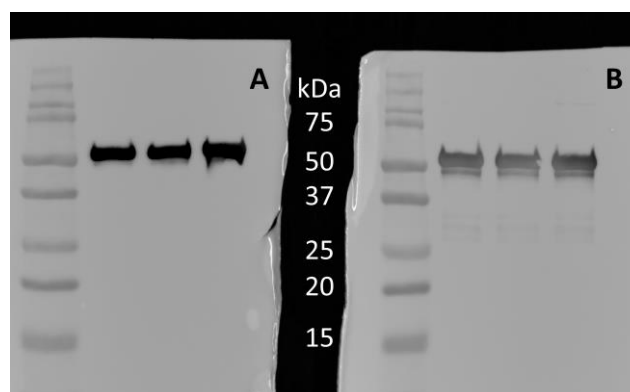


Figura 15. *Immunoblotting* de detecção do domínio passageiro da proteína Ema fusionada à cauda de histidina em três alíquotas distintas da homogeneização da solução concentrada do domínio passageiro de Ema purificado. O conteúdo proteico foi transferido para uma membrana de nitrocelulose pela técnica de *Western Blotting*, seguido de *immunoblotting* com o soro (A) anti-His (1:6000) como anticorpo primário e anti-IgG de camundongo (1:4000) conjugado com peroxidase produzido em cabra como secundário; e (B) anti-Ema (1:500) como anticorpo primário e soro anti-IgG de coelho produzido em cabra (1:2000) como anticorpo secundário. A proteína recombinante foi detectada com ambos os soros. A reatividade do soro foi detectada pelo sistema de quimioluminescência ECL. M = marcador de massa molecular (kDa) – Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad, CA, EUA).

4.7 Confirmação da presença de Ema na superfície bacteriana por MET com imunomarcação

A produção da proteína Ema na superfície das bactérias foi confirmada quando os isolados selvagem BA92 e MS427(pIC) foram incubados com o soro anti-Ema adsorvido, conforme evidenciado pela deposição das partículas de ouro coloidal (10 nm) complexadas à anti-IgG de coelho produzido em cabra, visualizadas como marcações pretas em formato esférico (Figura 15). Por outro lado, quando o isolado controle negativo MS427(pBAD) foi incubado com este soro, não houve deposição das partículas de ouro, indicando a ausência de Ema na sua superfície. Quando incubadas com o soro pré-imune do coelho, nenhum dos isolados apresentou marcação na sua superfície, indicando a especificidade do antissoro (Figura 16).

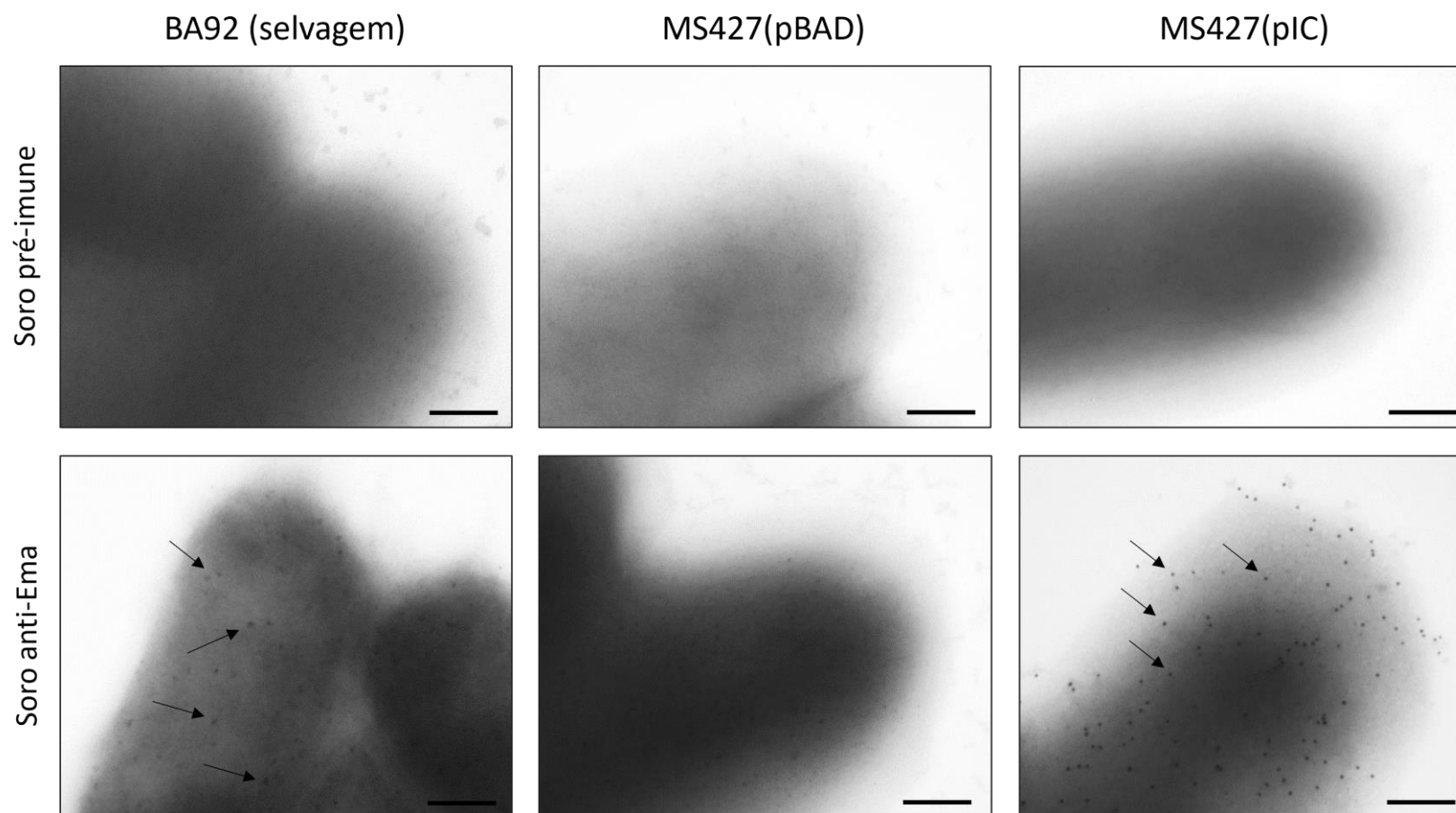


Figura 16. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) com imunomarcção mostrando a presença da proteína Ema na superfície bacteriana. As setas indicam a deposição das partículas de ouro coloidal (10 nm) na superfície dos isolados selvagem BA92 e no clone de expressão de Ema MS427(pIC), quando incubados com anticorpo primário anti-Ema (1:500) e secundário anti-IgG de coelho produzido em cabra acoplado a partículas de ouro coloidal (1:2000). Não foi observada marcação na MS427(pBAD), controle negativo de expressão de Ema. Barra = 200 nm.

4.8 Ensaio de autoagregação

A proteína Ema promoveu fenótipo de autoagregação em tubos que não sofreram agitação ao longo de 120 minutos, sendo mais evidente do que o clone carregando o antígeno 43, utilizado como controle positivo (Figura 17). Foi observada diferença estatística entre a MS427(pBAD) e a MS427(pIC) a partir de 20 minutos ($P < 0,001$). Ao longo do ensaio, o fenótipo de autoagregação foi mais expressivo na MS427(pIC) do que na MS427(pCO4). Ao término de um ensaio de autoagregação, foi coletada uma alíquota do fundo do tubo para coloração por DAPI. A microscopia de fluorescência revelou que o isolado MS427(pBAD) (Figura 18A) apresentava bactérias dispersas, enquanto os isolados MS427(pIC) e MS427(pCO4) apresentaram agregados bacterianos massivos (Figura 18B e C).

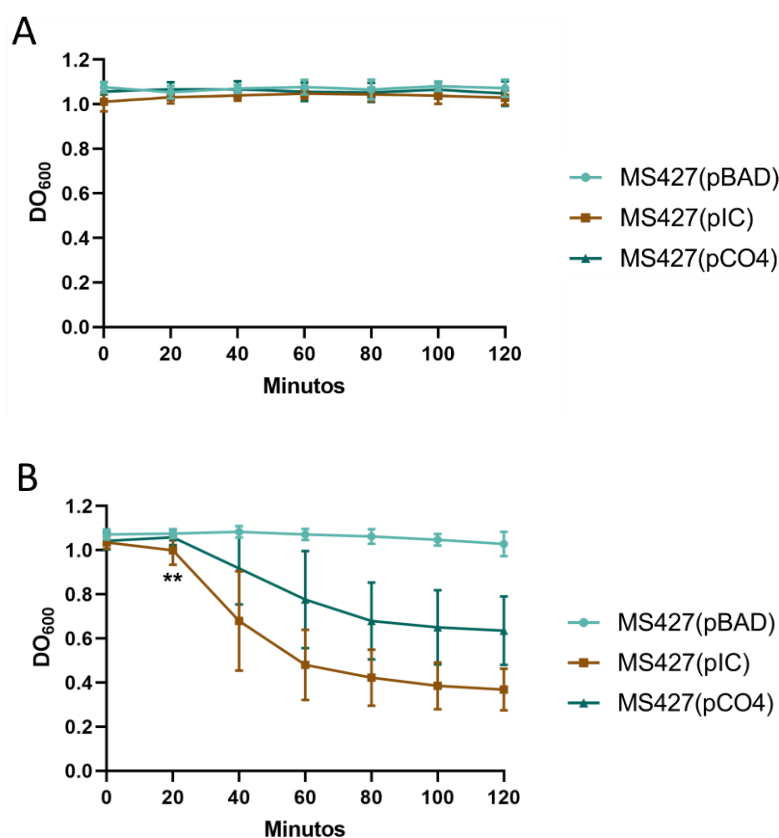


Figura 17. Ensaio de autoagregação em caldo BHI contendo 0,2% de L-arabinose com os isolados MS427 carregando o gene que codifica Ema, MS427(pIC), bem como os isolados controles, MS427(pBAD) e MS427(pCO4), que alberga o gene responsável por codificar o antígeno 43 clonado no vetor de expressão pBAD/*Myc*-His A. A = leitura da DO realizada após agitação dos tubos a cada 20 minutos; B = leitura da DO realizada sem a agitação dos tubos. Em B, foi observada diferença estatística entre MS427(pBAD) e MS427(pIC) a partir do tempo de 20 minutos ($P < 0,001$).

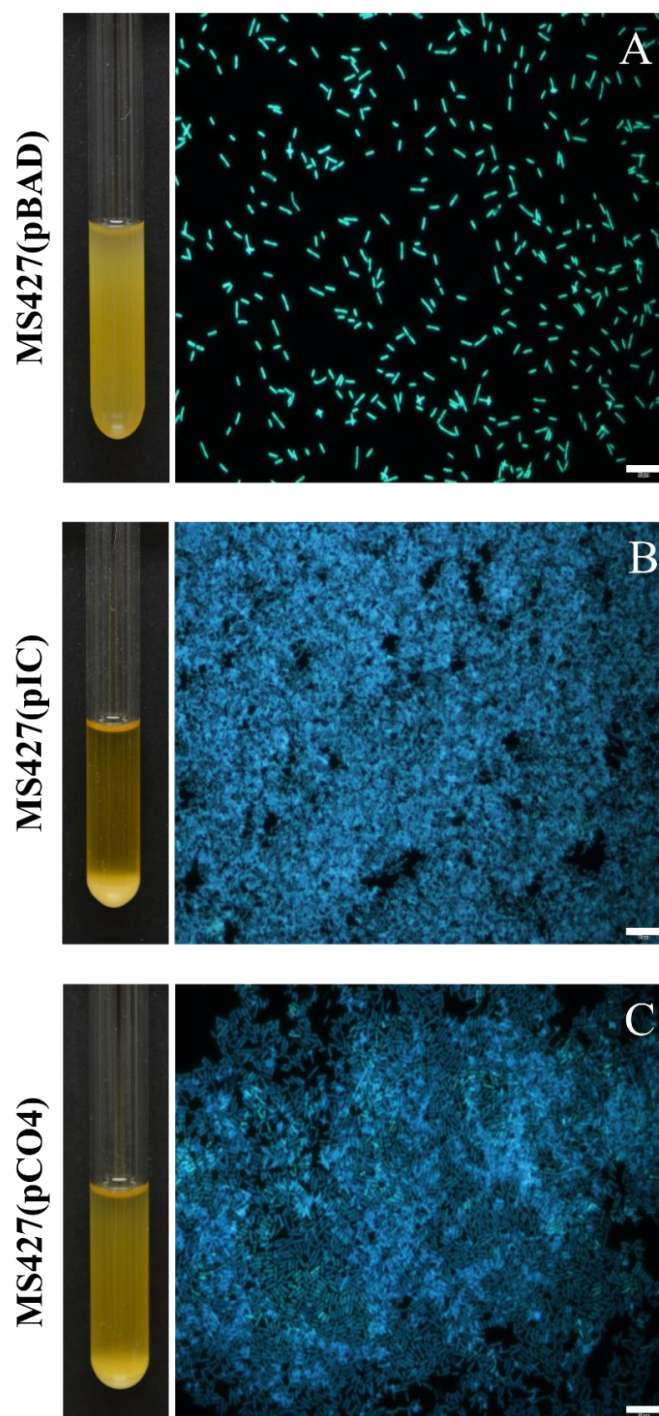


Figura 18. Ensaio de autoagregação visualizados por microscopia de imunofluorescência. Alíquotas dos sedimentos formados no fundo dos tubos de ensaio foram coradas com DAPI após o ensaio de autoagregação de duas horas. Nota-se que, na amostra portando o plasmídeo vazio (A) – MS427(pBAD) – as bactérias não se agregam, enquanto na amostra portando o plasmídeo com o gene responsável por codificar a proteína Ema (B) – MS427(pIC) – os agregados são claramente visíveis, assim como no controle expressando antígeno 43 (C) – MS427(pCO4). Barra = 10 μ m.

4.9 Produção de biofilme

A proteína Ema aumentou significativamente ($P < 0,0001$) a formação de biofilme em placas de poliestireno em 24, 48 e 72 horas quando a bactéria foi cultivada em caldo LB contendo 0,2% de L-arabinose em relação ao controle MS427(pBAD). Não foi observada diferença estatística significativa em relação ao controle MS427(pCO4) (Figura 19).

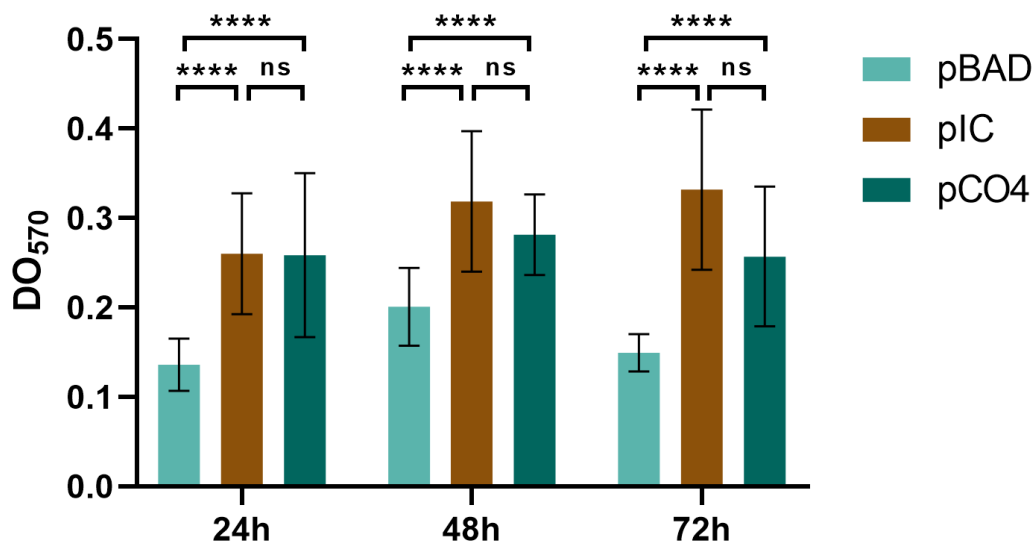


Figura 19. A proteína Ema promove aumento da produção de biofilme em superfície de poliestireno. Ensaio realizado em caldo LB com 0,2% de L arabinose e 2% de D-manopiranosídeo com 24, 48 e 72 horas de incubação. O gráfico compara os isolados com vetor vazio – MS427(pBAD), com o vetor contendo o gene *ema* – MS427(pIC) e com o vetor contendo o gene que codifica o antígeno 43 – MS427(pCO4), utilizado como controle positivo para formação de biofilme. As barras indicam média das leituras e barras de erros indicam o desvio padrão. Os asteriscos indicam diferença significativa ($P < 0,0001$) segundo teste de Tukey pós-ANOVA. ns = Diferença estatística não significativa.

No ensaio de formação de biofilme em lamínulas de vidro, não foi observada diferença significativa em nenhum dos tempos testados (Figura 20) quando os grupos foram comparados entre si. Desta maneira, é possível afirmar que Ema não promove formação de biofilme em vidro.

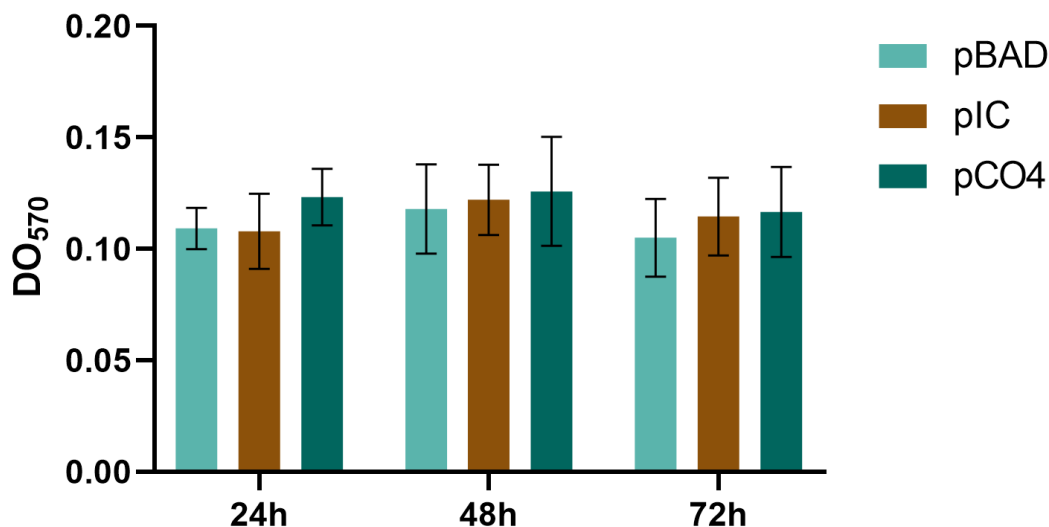


Figura 20. A proteína Ema não promove aumento da formação de biofilme em superfície de vidro. Ensaio realizado em caldo LB com 0,2% de L arabinose e 2% de D-manopiranosídeo com 24, 48 e 72 horas de incubação. O gráfico compara os isolados com vetor vazio – MS427(pBAD), com o vetor contendo o gene *ema* – MS427(pIC) e com o vetor contendo o gene que codifica o antígeno 43 – MS427(pCO4), utilizado como controle positivo para formação de biofilme em poliestireno. As barras indicam média das leituras e barras de erros indicam o desvio padrão. Não houve diferença estatística significativa nos ensaios ($P > 0,05$). Para os cálculos, foi utilizado ANOVA seguido de teste de Tukey.

4.10 Ensaio de ligação à componentes da matriz extracelular

Conforme apresentado na figura 21, a proteína Ema se ligou de maneira significativa ao fibrinogênio ($P = 0,0003$), fibronectina plasmática ($P < 0,0001$), fibronectina celular ($P < 0,0001$), colágeno tipo I ($P = 0,0097$), III ($P < 0,0001$) e V ($P < 0,0001$) e laminina ($P = 0,0003$). Uma vez que a ligação de Ema foi expressiva com as duas formas de fibronectina, uma curva dose-resposta foi conduzida buscando saturar a ligação com esses componentes utilizando diluições seriadas de 2 a 0,125 μM de Ema. Desta maneira, seria possível calcular a constante de dissociação dessa ligação. Contudo, com as diluições de Ema utilizadas, não foi possível saturar sua ligação com as duas formas de fibronectina (Figura 22).

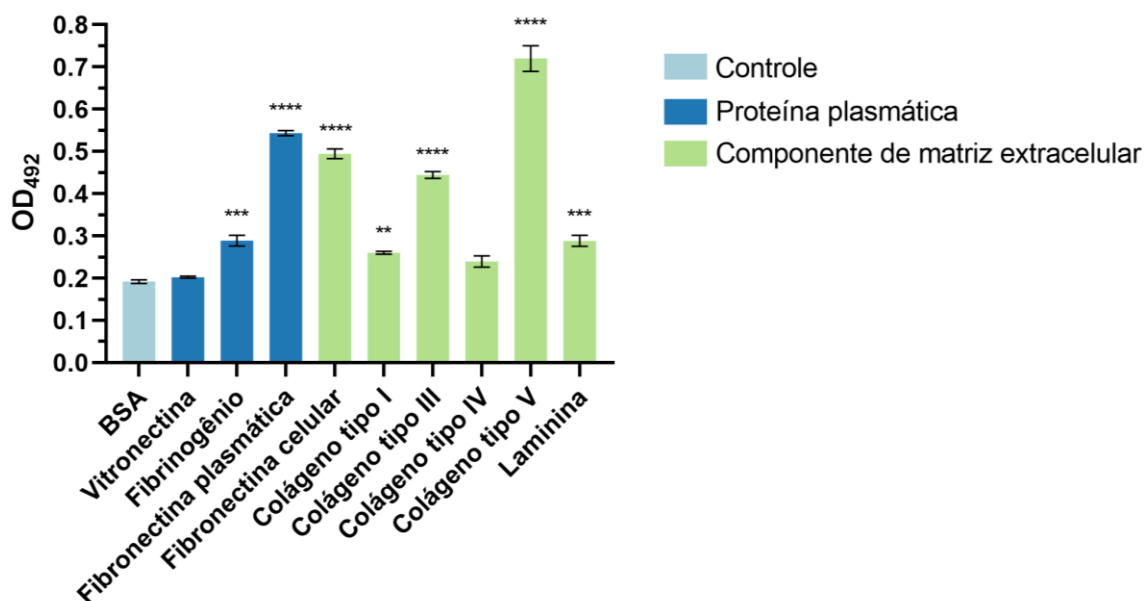


Figura 21. Ensaio de ligação à componentes da matriz extracelular utilizando 1 μ M da proteína Ema contra 1 μ g de cada componente testado. Soro albumina bovina (BSA) foi utilizado como controle negativo. As barras indicam média das leituras e barras de erros indicam o erro padrão. A proteína Ema se liga ao fibrinogênio ($P = 0,0003$), fibronectina plasmática ($P < 0,0001$), fibronectina celular ($P < 0,0001$), colágeno tipo I ($P = 0,0097$), III ($P < 0,0001$), V ($P < 0,0001$) e laminina ($P = 0,0003$). Para as análises estatísticas, foi utilizado ANOVA seguido de Dunnett.

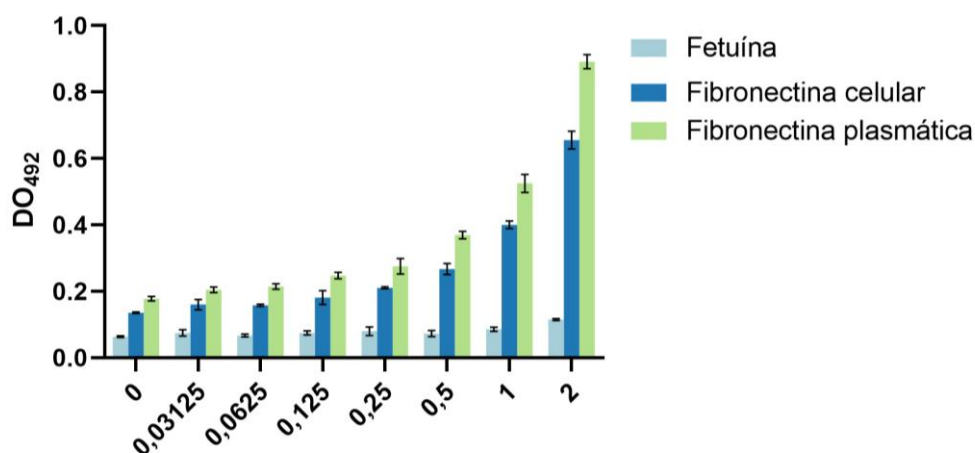


Figura 22. Curva dose-resposta utilizando diferentes concentrações de Ema contra 1 μ g de fibronectina celular ou plasmática. Os dados mostram que o aumento da ligação de Ema às duas formas de fibronectina é proporcional a sua concentração. Contudo, 2 μ g de Ema não foram suficientes para saturar a curva dose-resposta e calcular a constante de dissociação destas ligações. Fetuína (1 μ g) foi utilizada como controle negativo. As barras indicam média das leituras e barras de erros indicam o desvio padrão.

Em seguida, foi realizado um ensaio para verificar qual domínio da fibronectina possuía maior interação com a proteína Ema. Para tanto, foram testados os domínios F30 e F45, novamente utilizando diluições seriadas de Ema partindo de 2 μM . Tornou-se evidente que a ligação é muito mais intensa com o domínio F30, correspondente pela região aminoterminal da molécula, do que com o domínio F45, que vêm logo em seguida em direção à região carboxiterminal da molécula (Figura 23).

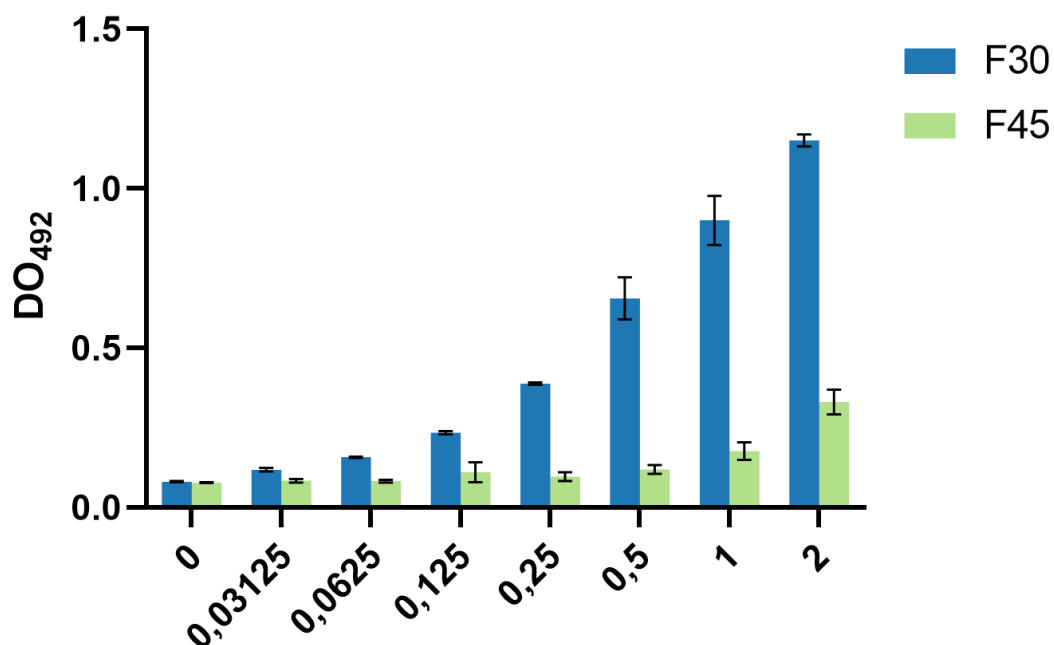


Figura 23. Curva dose-resposta utilizando diferentes concentrações de Ema contra 1 μg dos domínios F30 (domínio de ligação à heparina e fibrina – HBD) e F45 (domínio de ligação a gelatina e colágeno – GBD) da fibronectina. Nota-se que a interação da proteína Ema é muito mais expressiva com o domínio F30, apesar do domínio F45 também promover ligação quando Ema está em maiores concentrações. As barras indicam média das leituras e barras de erros indicam o desvio padrão.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo caracterizou uma nova proteína autotransportadora da família AIDA-I codificada pelo gene/ORF 282_14_25_77, identificado no genoma de um isolado de EPEC atípica do sorotipo O2:H16 (HERNANDES et al. 2020), a qual foi denominada *Extracellular Matrix-binding Autotransporter*, ou Ema. Análises de bioinformática mostraram que a região aminoterminal correspondente ao peptídeo sinal de Ema tem 21 aminoácidos. Isso indica que possivelmente esta proteína não precisa estar ligada ao sistema Sec enquanto se desloca no periplasma em direção ao complexo Bam, ao contrário de SPATEs como por exemplo EspP (SZABADY et al. 2004) e Tsh (SIJBRANDI et al. 2003).

Este tipo de evidência reforça a hipótese de que Ema não faz parte da família das SPATEs. De acordo com o evidenciado pela microscopia eletrônica de transmissão, Ema está ancorada à membrana externa da bactéria. Por não haver evidências moleculares de que a proteína seja trimérica, também não poderia pertencer à família das TAAs. Além disso, o achado das repetições “AIDA” e domínio “pertactina” na sequência de aminoácidos da proteína reforçam a hipótese de Ema pertença à família AIDA-I (WELLS et al. 2007). Analisando a árvore de máxima verossimilhança, têm-se outro indício de que a proteína pertence à família AIDA-I, uma vez que se situou entre adesinas desta família.

O envolvimento da proteína Ema nos fenótipos de autoagregação bacteriana, aumento da formação de biofilme e de ligação à componentes da matriz extracelular aqui representados reforçam a sua classificação na família das proteínas da família AIDA-I, uma vez que são características encontradas em membros dessa família (VO et al. 2017).

O fenótipo de autoagregação é muito bem descrito em outras proteínas da família AIDA-I, como a própria AIDA-I, TibA, antígeno 43 e Cah (SHERLOCK et al. 2004; SHERLOCK, VEJBORG e KLEMM, 2005; KJÆRGAARD et al. 2000a; TORRES et al. 2002). É importante ressaltar que no caso de Cah, o fenótipo de autoagregação bloqueia a adesão a células HeLa (TORRES et al. 2002), mas não há registros na literatura a respeito de um fenômeno semelhante nas outras proteínas citadas. Durante estudos futuros envolvendo ensaios de adesão e invasão, este possível efeito de bloqueio deve ser levado em consideração na hora de interpretar os resultados.

No antígeno 43, a autoagregação fornece proteção contra peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (SCHEMBRI et al. 2003). Sabe-se que a produção de antígeno 43 aumenta a captação da bactéria produtora desta proteína por neutrófilos. Estes neutrófilos atacam as

células internalizadas através da ação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Logo, as bactérias produtoras de antígeno 43 podem ser internalizadas pelos neutrófilos e dispersadas em outro local, permitindo a colonização de sítios distintos evadindo os mecanismos de defesa do hospedeiro (FEXBY et al. 2007). Como Ema também promove o fenótipo de autoagregação, ensaios de internalização por neutrófilos e ensaios de susceptibilidade ao H_2O_2 poderão ser realizados no futuro, buscando elucidar este potencial de dispersão para sítios extraintestinais em bactérias produtoras de Ema.

Outro ponto importante sobre autoagregação é que há na literatura registros de proteínas da família AIDA-I reconhecendo outras da mesma família, como o que ocorre com antígeno 43 e AIDA-I (SHERLOCK et al. 2004). Da mesma maneira, o antígeno 43 também promove formação de biofilme interespecífica (KJÆRGAARD et al. 2000b). Não se pode descartar que estes tipos de interações ocorram com Ema.

Assim como a autoagregação, o fenótipo de formação de biofilme também é recorrente na literatura em outras proteínas da família AIDA-I, como a própria AIDA-I, antígeno 43, TibA, Cah, EhaD, UpaC e UpaE (SHERLOCK et al. 2004; KJÆRGAARD et al. 2000b; SHERLOCK, VEJBORG e KLEMM, 2005; TORRES et al. 2002; WELLS et al. 2008; ALLSOPP et al. 2012 e BATTAGLIOLI et al. 2018). Da mesma maneira, UpaB, uma adesina autotransportadora identificada em UPEC – CFT073, também é responsável por aumentar a produção de biofilme em poliestireno (ALLSOPP et al. 2012).

Os biofilmes, além de atuarem como mecanismo de adesão do microrganismo ao hospedeiro ou a superfícies abióticas, compreendem também um mecanismo de resistência ao estresse ambiental, incluindo desde fatores físicos, como temperatura e pH, até fatores químicos, como a resistência aos antimicrobianos e bacteriocinas, sendo um importante agente de permanência da bactéria no hospedeiro ou no meio ambiente. Por conta dessas propriedades, os biofilmes podem ser associados a infecções persistentes (FLEMMING et al. 2016).

Em casos de cateterismo no trato urinário, ocorre liberação de fibrinogênio, que recobre toda a superfície do catéter (TAMADONFAR et al. 2019). Com isso, bactérias do gênero *Enterococcus* se aderem ao fibrinogênio e formam biofilme, levando à sua persistência no sítio de infecção. Isto ocorre devido a produção da fímbria Ebp (*endocarditis and biofilm-associated pilus*), que é capaz de se ligar ao fibrinogênio (FLORES-MIRELES et al. 2014). É importante ressaltar que Ebp também é capaz de promover aumento da produção de biofilme (NALLAPAREDDY et al. 2006). Da mesma maneira, UpaB, uma adesina autotransportadora identificada em UPEC – CFT073,

também é responsável por aumentar a produção de biofilme e também é capaz de se ligar ao fibrinogênio (ALLSOPP et al. 2012).

Em conjunto, o fenótipo de ligação ao fibrinogênio observado nos ensaios de ligação a componentes da matriz extracelular, juntamente com o fenótipo do aumento da produção de biofilme, indicam que Ema possua não apenas um papel na colonização e permanência em superfícies abióticas, como também seja um possível fator de virulência para patógenos que causam infecções extraintestinais.

No caso de AIDA-I, *aah* que está imediatamente *downstream* ao gene *aidA* codifica a proteína heptosiltransferase (AAH – *autotransporter adhesion heptosyltransferase*). Esta proteína modifica a adesina AIDA-I madura adicionando aproximadamente 19 resíduos de heptose. Sem esta modificação, a proteína é produzida e transportada para o meio extracelular normalmente, porém, perde a capacidade de se aderir a células (BENZ e SCHMIDT 2001). TibA também é modificada por uma proteína próxima, TibC, que é produzida como um dodecâmero capaz de glicosilar até seis TibA simultaneamente. Este tipo de alteração na conformação de TibA permite que esta proteína promova adesão a células epiteliais (YAO et al. 2014; CÔTÉ, CHARBONNEAU e MOUREZ, 2013).

É importante notar que a comparação do genoma do isolado selvagem BA92 com os *short reads* do genoma do isolado IAL 5132 (O2:H16 sem o gene *ema*) mostrou, além do ponto de inserção do gene *ema* no cromossomo da BA92, que o gene está contido em um profago composto por outros 19 genes além de *ema*. Considerando que no presente estudo as possíveis funções de Ema foram caracterizadas de maneira isolada, é necessário realizar estudos com estes outros 19 genes para investigar a presença de algum tipo de regulador ou mecanismo semelhante aos encontrados em AIDA-I e TibA flanqueando o gene da nova proteína, levando a modificações estruturais pós-traducionais que alterem sua funcionalidade final.

Na árvore de máxima verossimilhança, dentre as proteínas autotransportadoras selecionadas para este estudo, TibA aparece como sendo a proteína mais filogeneticamente relacionada a Ema. TibA é capaz de promover tanto adesão quanto invasão de células do epitélio intestinal humano (LINDENTHAL e ELSINGHORST, 2001). Estudos envolvendo ensaios de aderência e invasão a células deverão fornecer mais informações a respeito dessa proximidade com TibA.

Outra característica importante de Ema evidenciada neste estudo foi a sua capacidade de se ligar a diversas moléculas de matriz extracelular, o que permitiu nomeá-la: *Extracellular Matrix-binding Autotransporter*.

O colágeno do tipo I é a proteína mais abundante no corpo humano, correspondendo a aproximadamente 30% de todas as proteínas do corpo. É encontrado em tecidos ósseos, tendões, pele, ligamentos e músculos (SMITH e RENNIE, 2007). A capacidade observada de Ema se ligar a uma proteína que é vastamente distribuída pelo corpo humano sugere que este fenótipo seja um facilitador da colonização do hospedeiro. O fenótipo de ligação do colágeno do tipo I já foi observado em uma outra autotransportadora da família AIDA-I, UpaE (BATAGLIOLI et al. 2018).

Foi observada também ligação de Ema com a molécula de colágeno do tipo III, um componente importante da parede de vasos sanguíneos e do epitélio do trato gastrointestinal (BYERS et al. 2017). Já foi demonstrado na literatura que a *E. coli* O157:H7 produz mais biofilme em superfície abiótica contendo colágeno do tipo III imobilizado do que na superfície sem esse componente (CHAGNOT et al. 2013). Esses dois fenótipos sugerem uma possível contribuição de Ema na colonização e persistência no sítio intestinal, onde a patologia das DEC's se desenvolve.

O colágeno do tipo V foi um dos componentes da matriz extracelular ao qual Ema apresentou ligação. Esse tipo de colágeno aparece na literatura sendo isolado pela primeira vez a partir de placenta humana (BURGESON et al 1976). Posteriormente, é descoberta sua presença como componente de tendões de embrião de galinha (JIMENEZ YANKOWSKI e BASHEY, 1978), osso e cartilagem (RHODES e MILLER, 1978), pulmão (MADRI e FURTHMAYR, 1979), músculo esquelético (BAILEY, SHELLSWELL e DUANCE, 1979), pele de rato (DEYL, MACEK e ADAM, 1979), córnea (PÖSCHL e VON DER MARK, 1980), membrana basal da musculatura lisa renal de rato e matriz extracelular associada (MARTINEZ-HERNANDEZ, GAY e MILLER 1982).

Dada esta diversidade de sítios que possuem colágeno do tipo V e os resultados obtidos nos ensaios de ligação à componentes da matriz extracelular, em conjunto com os dados que sugerem que Ema possa atuar como invasora e sua possível capacidade de disseminação no hospedeiro através da internalização por neutrófilos, é sugestível que Ema possa ter papel na aderência a esses sítios fora do intestino. Dessa forma, é reforçado o argumento de que ensaios futuros buscando elucidar seu papel na colonização de sítios extraintestinais.

Ema também apresentou ligação à fibronectina, o que já foi observado em outros estudos com outras proteínas da família AIDA-I, como UpaB (ALLSOPP et al. 2012) e UpaE (BATTAGLIOLI et al. 2018). Contudo, nestes estudos não foi elucidado o papel desse fenótipo na patogenicidade, além de não ser especificado se os ensaios foram realizados com a forma celular ou plasmática da fibronectina.

Sabe-se que, ao contrário das bactérias gram-positivas, a fibronectina dificulta a aderência de *E. coli* quando recobre a superfície de células epiteliais (ABRAHAM, BEACHEY e SIMPSON, 1983; SIMPSON, HASTY e BEACHEY, 1985). Já foi demonstrado que *E. coli* capaz de se ligar à fibronectina tem sua capacidade de colonizar fibroblastos significativamente reduzida ao ser pré-incubada com fibronectina (FRÖMAN et al. 1984). Portanto, a capacidade de se ligar à fibronectina pode facilitar a colonização de sítios que possuam fibronectina exposta.

Já foi demonstrado na literatura que *Streptococcus pyogenes* produtor da proteína de membrana M1 é capaz de invadir células pulmonares (A549 – ATCC CCL-185) quando estas são incubadas com laminina ou fibronectina (CUE et al. 1998). Dessa maneira, a interação por estas moléculas gera a hipótese de que Ema possa atuar como uma invasina e desempenhar um importante papel na colonização de tecidos extraintestinais, além de ser uma possível ferramenta de persistência. Se estes resultados se concretizarem em estudos futuros, Ema se tornaria ainda mais próxima de TibA, uma vez que esta também é uma AIDA-I que atua como invasina.

A laminina não é um componente que fica diretamente exposto na superfície do epitélio celular. Logo, bactérias capazes de se ligarem a ela precisam antes vencer a integridade celular para conseguirem utilizá-la de alguma forma. Dessa maneira, a laminina não deve atuar como um fator importante na colonização inicial do tecido por bactérias capazes de se ligarem a ela. Contudo, existem bactérias, como *Helicobacter pylori*, que são capazes de produzir urease, que degrada ureia em amônia e uma citotoxina vacuolante (WADSTRÖM, HIRMO e BORÉN, 1996). Esses compostos lesionam as células, eventualmente destruindo-as e expondo a membrana basal. Com isso, a laminina fica exposta. Assim, as bactérias capazes de se ligarem a laminina ocupam os sítios de ligação dela que seriam utilizados pelas células epiteliais na reconstrução do tecido lesionado (LJUNGH, MORAN e WADSTRÖM, 1996).

Levando em consideração que as EPEC são capazes de reorganizar o citoesqueleto da célula hospedeira, causando lesões que comprometem a integridade do epitélio, é possível estimar que após a adesão e formação de lesão A/E, Ema possa ser um importante

fator para a persistência da bactéria no tecido hospedeiro. Da mesma maneira, se as especulações a respeito de Ema ser forem confirmadas experimentalmente, a sua capacidade de ligação à laminina poderia proporcionar um sítio seguro para a bactéria evadir ao sistema imunológico do hospedeiro antes mesmo de realizar a lesão A/E. Além disso, UpaE que também é uma AIDA-I, promove ligação à laminina (BATTAGLIOLI et al. 2018), dado que fortalece o argumento de que Ema faz parte desta família de autotransportadoras.

Apesar de vários dados sugerirem que Ema possa ser uma invasina por ter diversas semelhanças com outras já descritas, é importante considerar esse achado com cautela. Se nada na biologia faz sentido senão sob a luz da evolução, o fator “acaso” não deve ser esquecido. Estruturas biológicas e até mesmo seres vivos diferentes podem ocasionalmente convergirem evolutivamente por conta de mutações aleatórias, principalmente se houverem pressões seletivas semelhantes.

É incabível, nos dias atuais, conceber a ideia de que um organismo simples ou complexo, conscientemente e propositalmente desenvolveu ao longo de dezenas de milhares de anos uma estrutura biológica para uma finalidade específica. Se os futuros ensaios de invasão evidenciarem que Ema é de fato uma invasina, estudos evolutivos poderão ser realizados para entender quando essa estrutura surgiu e quais eram as possíveis pressões seletivas. Do contrário, é possível especular que Ema possa ser um estágio inicial de uma estrutura que, dentro de alguns milhares de anos, poderá ao acaso, se tornar uma invasina.

Por fim, existem ensaios em fase inicial de execução buscando encontrar Ema em outros grupos de *E. coli* patogênica na coleção do Laboratório de Patogenicidade Bacteriana do Instituto de Biociências da Unesp de Botucatu. Até o momento, o gene *ema* já foi encontrado em um isolado de *E. coli* causador de mastite clínica bovina e em uma UPEC, o que fortalece sua relação com as proteínas Upa, descritas em UPEC.

6. CONCLUSÃO

A nova proteína autotransportadora Ema é uma adesina não fimbrial da família AIDA-I que participa dos fenótipos de autoagregação, formação de biofilme em poliestireno e ligação ao fibrinogênio, fibronectina celular e plasmática, colágenos do tipo I, III e V e laminina. Contudo, seu potencial patogênico intestinal e extraintestinal ainda não foi completamente elucidado e estudos futuros devem resolver essas questões.

7. REFERÊNCIAS

- ABE, C. M. et al. Virulence features of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* identified by the *eae+* EAF-negative *stx-* genetic profile. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 64, n. 4, p. 357-365, 2009.
- ABRAHAM, S. N.; BEACHEY, E. H.; SIMPSON, W. A. Adherence of *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* to fibronectin-coated and uncoated epithelial cells. *Infection and immunity*, v. 41, n. 3, p. 1261-1268, 1983.
- ADAMS, T. M.; WENTZEL, A.; KOLMAR, H. Intimin-mediated export of passenger proteins requires maintenance of a translocation-competent conformation. **Journal of bacteriology**, v. 187, n. 2, p. 522-533, 2005.
- AKAIKE, H. Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. In: **Selected papers of hirotugu akaike**. New York, NY: Springer New York, 1998. p. 199-213.
- ALLSOPP, L. P. et al. Molecular characterization of UpaB and UpaC, two new autotransporter proteins of uropathogenic *Escherichia coli* CFT073. **Infection and immunity**, v. 80, n. 1, p. 321-332, 2012.
- ALVES, T. D. S. et al. Genome-Based Characterization of Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Isolated from Clinical Bovine Mastitis. **Current Microbiology**, v. 80, n. 3, p. 89, 2023.
- ARNDT, D. et al. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. **Nucleic acids research**, v. 44, n. W1, p. W16-W21, 2016.
- BATTAGLIOLI, E. J. et al. Identification and characterization of a phase-variable element that regulates the autotransporter UpaE in uropathogenic *Escherichia coli*. **MBio**, v. 9, n. 4, p. 10.1128/mbio.01360-18, 2018.
- BAILEY, A. J.; SHELLSWELL, G. B.; DUANCE, V. C. Identification and change of collagen types in differentiating myoblasts and developing chick muscle. **Nature**, v. 278, n. 5699, p. 67-69, 1979.
- BENZ, I.; SCHMIDT, M. A. Cloning and expression of an adhesin (AIDA-I) involved in diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infection and immunity**, v. 57, n. 5, p. 1506-1511, 1989.
- BENZ, I.; SCHMIDT, M. A. Glycosylation with heptose residues mediated by the *aah* gene product is essential for adherence of the AIDA-I adhesin. **Molecular microbiology**, v. 40, n. 6, p. 1403-1413, 2001.

- BHATT, S. et al. The evasive enemy: Insights into the virulence and epidemiology of the emerging attaching and effacing pathogen *Escherichia albertii*. **Infection and immunity**, v. 87, n. 1, 2019.
- BODELÓN, G.; MARÍN, E.; FERNÁNDEZ, L. A. Role of periplasmic chaperones and BamA (YaeT/Omp85) in folding and secretion of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* strains. **Journal of bacteriology**, v. 191, n. 16, p. 5169-5179, 2009.
- BOERLIN, P. et al. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. **Journal of clinical microbiology**, v. 37, n. 3, p. 497-503, 1999.
- BOKETE, T. N. et al. Genetic and phenotypic analysis of *Escherichia coli* with enteropathogenic characteristics isolated from Seattle children. **The Journal of infectious diseases**, v. 175, n. 6, p. 1382-1389, 1997.
- BRAUN, V.; ONDRACZEK, R.; HOBBIE, S. Activation and secretion of Serratia hemolysin. **Zentralblatt für Bakteriologie**, v. 278, n. 2-3, p. 306-315, 1993.
- BRAY, J. Isolation of Antigenically Homogeneous Strains of *Bact. coli neapolitanum* from Summer Diarrhoea of Infants. **Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 57, n. 2, p. 239-47, 1945.
- BROOKS, J. W. et al. Fatal pneumonia caused by Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) in a juvenile cat recovered from an animal hoarding incident. **Veterinary microbiology**, v. 167, n. 3-4, p. 704-707, 2013.
- BRUNDER, W.; SCHMIDT, H.; KARCH, H. EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 cleaves human coagulation factor V. **Molecular microbiology**, v. 24, n. 4, p. 767-778, 1997.
- BRYCE, J. et al. WHO estimates of the causes of death in children. **The Lancet**, v. 365, n. 9465, p. 1147-1152, 2005.
- BUERIS, V. et al. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 839-844, 2007.
- BURGESS, M. N. et al. Biological evaluation of a methanol-soluble, heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin in infant mice, pigs, rabbits, and calves. **Infection and Immunity**, v. 21, n. 2, p. 526-531, 1978.

- BYERS, P. H. et al. Diagnosis, natural history, and management in vascular Ehlers–Danlos syndrome. In: **American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics**. 2017. p. 40-47.
- CAFFREY, P.; OWEN, P. Purification and N-terminal sequence of the alpha subunit of antigen 43, a unique protein complex associated with the outer membrane of *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, v. 171, n. 7, p. 3634-3640, 1989.
- CARVALHO, H. M. et al. Antibody against the carboxyl terminus of intimin α reduces enteropathogenic *Escherichia coli* adherence to tissue culture cells and subsequent induction of actin polymerization. **Infection and immunity**, v. 73, n. 4, p. 2541-2546, 2005.
- CASASANTA, M. A. et al. A chemical and biological toolbox for Type Vd secretion: Characterization of the phospholipase A1 autotransporter FplA from *Fusobacterium nucleatum*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 49, p. 20240-20254, 2017.
- CELIK, N. et al. A bioinformatic strategy for the detection, classification and analysis of bacterial autotransporters. **PLoS one**, v. 7, n. 8, p. e43245, 2012.
- Centers for Disease Control and Prevention. **Update: Multistate Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infections from Hamburgers -- Western United States, 1992-1993**. 1993. Disponível em: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00020219.htm>. Acesso em 08 de agosto de 2023.
- CHAGNOT, C. et al. In vitro colonization of the muscle extracellular matrix components by *Escherichia coli* O157: H7: the influence of growth medium, temperature and pH on initial adhesion and induction of biofilm formation by collagens I and III. **PLoS one**, v. 8, n. 3, p. e59386, 2013.
- CHARBONNEAU, M.; BERTHIAUME, F.; MOUREZ, M. Proteolytic processing is not essential for multiple functions of the *Escherichia coli* autotransporter adhesin involved in diffuse adherence (AIDA-I). **Journal of bacteriology**, v. 188, n. 24, p. 8504-8512, 2006.
- CHAUHAN, A. et al. Did I pick the right colony? Pitfalls in the study of regulation of the phase variable antigen 43 adhesin. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e73568, 2013.
- CLEMENTS, J. D.; FINKELSTEIN, R. A. Isolation and characterization of homogeneous heat-labile enterotoxins with high specific activity from *Escherichia coli* cultures. **Infection and Immunity**, v. 24, n. 3, p. 760-769, 1979.

- CÔTÉ, J.; CHARBONNEAU, M.; MOUREZ, M. Glycosylation of the *Escherichia coli* TibA self-associating autotransporter influences the conformation and the functionality of the protein. **PloS one**, v. 8, n. 11, p. e80739, 2013.
- CROXEN, M. A. et al. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 822-880, 2013.
- CUE, D. et al. *Streptococcus pyogenes* serotype M1 encodes multiple pathways for entry into human epithelial cells. **Infection and immunity**, v. 66, n. 10, p. 4593-4601, 1998.
- CUNHA, M. P. V. et al. Pandemic extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) clonal group O6-B2-ST73 as a cause of avian colibacillosis in Brazil. **PLoS One**, v. 12, n. 6, p. e0178970, 2017.
- DA MATA MADEIRA, P. V. et al. Structural basis of lipid targeting and destruction by the type V secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of molecular biology**, v. 428, n. 9, p. 1790-1803, 2016.
- DAUTIN, N.; BERNSTEIN, H. D. Protein secretion in gram-negative bacteria via the autotransporter pathway. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 61, p. 89-112, 2007.
- DE, S. N. et al. A study of the pathogenicity of strains of *Bacterium coli* from acute and chronic enteritis. **Journal of pathology and bacteriology**, v. 71, n. 1, p. 201-9, 1956.
- DE LIRA, D. R. P et al. Identification of a hybrid atypical enteropathogenic and enteroaggregative *Escherichia coli* (aEPEC/EAEC) clone of serotype O3:H2 associated with a diarrheal outbreak in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 2075-2079, 2021.
- DE OLIVEIRA-GARCIA, D. et al. Fimbriae and adherence of *Stenotrophomonas maltophilia* to epithelial cells and to abiotic surfaces. **Cellular microbiology**, v. 5, n. 9, p. 625-636, 2003.
- DEAN, P.; KENNY, B. The effector repertoire of enteropathogenic *E. coli*: ganging up on the host cell. **Current opinion in microbiology**, v. 12, n. 1, p. 101-109, 2009.
- DEYL, Z.; MACEK, K.; ADAM, M. Collagen α A and α B chains constitute two separate molecular species. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 89, n. 2, p. 627-634, 1979.
- DIAS, R. C. B et al. Diarrhegenic *Escherichia coli* pathotypes investigation revealed atypical enteropathogenic *E. coli* as putative emerging diarrheal agents in children living in Botucatu, São Paulo State, Brazil. **Apmis**, v. 124, n. 4, p. 299-308, 2016.

- DIDERICHSEN, B. *flu*, a metastable gene controlling surface properties of *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, v. 141, n. 2, p. 858-867, 1980.
- DONNENBERG, M. S. et al. A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localized adherence. **Molecular microbiology**, v. 6, n. 22, p. 3427-3437, 1992.
- DROBNAK, I. et al. Of linkers and autochaperones: an unambiguous nomenclature to identify common and uncommon themes for autotransporter secretion. **Molecular microbiology**, v. 95, n. 1, p. 1-16, 2015.
- DUDLEY, E. G. et al. Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a *pheU* pathogenicity island in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Molecular microbiology**, v. 61, n. 5, p. 1267-1282, 2006.
- DUTTA, P. R. et al. Functional comparison of serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae. **Infection and immunity**, v. 70, n. 12, p. 7105-7113, 2002.
- EGILE, C. et al. Activation of the CDC42 effector N-WASP by the *Shigella flexneri* IcsA protein promotes actin nucleation by Arp2/3 complex and bacterial actin-based motility. **The Journal of cell biology**, v. 146, n. 6, p. 1319-1332, 1999.
- ELANKUMARAN, P. et al. Genomic and temporal trends in canine ExPEC reflect those of human ExPEC. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 3, p. e01291-22, 2022.
- ELSINGHORST, E. A.; WEITZ, J. A. Epithelial cell invasion and adherence directed by the enterotoxigenic *Escherichia coli* *tib* locus is associated with a 104-kilodalton outer membrane protein. **Infection and immunity**, v. 62, n. 8, p. 3463-3471, 1994.
- ESCHERICH, T. Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings. **Fortschr. d. Med.**, v. 3, p. 515-522, 1885
- ESLAVA, C. et al. Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infection and immunity**, v. 66, n. 7, p. 3155-3163, 1998.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). **Tracing seeds, in particular fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds, in relation to the Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O104: H4 2011 Outbreaks in Germany and France**. 2011.
- FEXBY, S. et al. Biological Trojan horse: antigen 43 provides specific bacterial uptake and survival in human neutrophils. **Infection and immunity**, v. 75, n. 1, p. 30-34, 2007.
- FLEMMING, H. et al. Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 563-575, 2016.

- FLORES-MIRELES, A. L. et al. EbpA vaccine antibodies block binding of *Enterococcus faecalis* to fibrinogen to prevent catheter-associated bladder infection in mice. **Science translational medicine**, v. 6, n. 254, p. 254ra127-254ra127, 2014.
- FRANK, C. et al. Epidemic profile of Shiga-toxin–producing *Escherichia coli* O104: H4 outbreak in Germany. *New England Journal of Medicine*, v. 365, n. 19, p. 1771-1780, 2011.
- FRASER, M. E. et al. Structure of Shiga toxin type 2 (Stx2) from *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 26, p. 27511-27517, 2004.
- FRÖMAN, G. et al. Binding of *Escherichia coli* to fibronectin. **J. Biol. Chem.**, v. 259, p. 14899-14905, 1984.
- FUJIYAMA, Rika et al. The *shf* gene of a *Shigella flexneri* homologue on the virulent plasmid pAA2 of enteroaggregative *Escherichia coli* 042 is required for firm biofilm formation. **Current microbiology**, v. 56, p. 474-480, 2008.
- GASTEIGER, E. et al. ExpASY: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. **Nucleic acids research**, v. 31, n. 13, p. 3784-3788, 2003.
- GAYTÁN, M. O. et al. Type three secretion system in attaching and effacing pathogens. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 6, p. 129, 2016.
- GIRÓN, J. A.; HO, A. S.; SCHOOLNIK, G. K. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Science**, v. 254, n. 5032, p. 710-713, 1991.
- GOH, K. G. K et al. Bioinformatic and Molecular Analysis of Inverse Autotransporters from *Escherichia coli*. **Mosphere**, v. 4, n. 4, p. e00572-19, 2019.
- GOMES, T. A. T. et al. Emerging enteropathogenic *Escherichia coli* strains?. **Emerging infectious diseases**, v. 10, n. 10, p. 1851, 2004.
- GOMES, T. A. T. et al. Adhesin-encoding genes from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* are more prevalent in atypical than in typical enteropathogenic *E. coli*. **Journal of clinical microbiology**, v. 49, n. 9, p. 3334-3337, 2011.
- GOMES, T. A. T et al. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Escherichia coli in the Americas**, p. 77-96, 2016.
- ANDERSON, G. G. et al. Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. **Science**, v. 301, n. 5629, p. 105-107, 2003.
- GUAN, Y. et al. An equation to estimate the difference between theoretically predicted and SDS PAGE-displayed molecular weights for an acidic peptide. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 13370, 2015.

- GUYER, D. M. et al. Identification of Sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. **Molecular microbiology**, v. 38, n. 1, p. 53-66, 2000.
- HAO, R. et al. Quinolone-resistant *Escherichia coli* O127a:K63 serotype with an extended-spectrum-beta-lactamase phenotype from a food poisoning outbreak in China. **Journal of clinical microbiology**, v. 50, n. 7, p. 2450-2451, 2012.
- HARRINGTON, S. M.; DUDLEY, E. G.; NATARO, J. P. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **FEMS microbiology letters**, v. 254, n. 1, p. 12-18, 2006.
- HEBBELSTRUP JENSEN, B. et al. Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Clinical microbiology reviews**, v. 27, n. 3, p. 614-630, 2014.
- HEDBERG, C. W. et al. An outbreak of foodborne illness caused by *Escherichia coli* O39:NM, an agent not fitting into the existing scheme for classifying diarrheogenic *E. coli*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 176, n. 6, p. 1625-1628, 1997.
- HENDERSON, I. R. et al. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 68, n. 4, p. 692-744, 2004.
- HENDERSON, I. R.; NAVARRO-GARCIA, F.; NATARO, J. P.; The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. **Trends in microbiology**, v. 6, n. 9, p. 370-378, 1998.
- HENDERSON, I. R.; OWEN, P. The major phase-variable outer membrane protein of *Escherichia coli* structurally resembles the immunoglobulin A1 protease class of exported protein and is regulated by a novel mechanism involving Dam and OxyR. **Journal of bacteriology**, v. 181, n. 7, p. 2132-2141, 1999.
- HERNANDES, R. T. et al. Characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains that express typical localized adherence in HeLa cells in the absence of the bundle-forming pilus. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 11, p. 4214-4217, 2006.
- HERNANDES, R. T. et al. The localized adherence pattern of an atypical enteropathogenic *Escherichia coli* is mediated by intimin omicron and unexpectedly promotes HeLa cell invasion. **Cellular microbiology**, v. 10, n. 2, p. 415-425, 2008.
- HERNANDES, R. T. et al. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS microbiology letters**, v. 297, n. 2, p. 137-149, 2009.

- HERNANDES, R. T. et al. Fimbrial adhesins produced by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 23, p. 8391-8399, 2011.
- HERNANDES, R. T. et al. Comparative genomic analysis provides insight into the phylogeny and virulence of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains from Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 6, p. e0008373, 2020.
- HOANG, D. T. et al. UFBoot2: improving the ultrafast bootstrap approximation. **Molecular biology and evolution**, v. 35, n. 2, p. 518-522, 2018.
- HOICZYK, E. et al. Structure and sequence analysis of Yersinia YadA and Moraxella UspAs reveal a novel class of adhesins. **The EMBO journal**, v. 19, n. 22, p. 5989-5999, 2000.
- HUBER, H. et al. ESBL-producing uropathogenic *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Switzerland. **Veterinary microbiology**, v. 162, n. 2-4, p. 992-996, 2013.
- IDE, T. et al. Characterization of translocation pores inserted into plasma membranes by type III-secreted Esp proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Cellular microbiology**, v. 3, n. 10, p. 669-679, 2001.
- JENSEN, E. B.; CARLSEN, S. Production of recombinant human growth hormone in *Escherichia coli*: expression of different precursors and physiological effects of glucose, acetate, and salts. **Biotechnology and bioengineering**, v. 36, n. 1, p. 1-11, 1990.
- JERSE, A. E. et al. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 20, p. 7839-7843, 1990a.
- JIMENEZ, S. A.; YANKOWSKI, R.; BASHEY, R. I. Identification of two new collagen α -chains in extracts of lathyrus chick embryo tendons. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 81, n. 4, p. 1298-1306, 1978.
- KALYAANAMOORTHY, S. et al. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. **Nature methods**, v. 14, n. 6, p. 587-589, 2017.
- KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature reviews microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123-140, 2004.
- KAUFFMANN, F. The serology of the coli group. **The Journal of Immunology**, v. 57, n. 1, p. 71-100, 1947.

- KENNY, B. et al. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. **Cell**, v. 91, n. 4, p. 511-520, 1997b.
- KIM, S. et al. Genomic and transcriptomic landscape of *Escherichia coli* BL21(DE3). **Nucleic acids research**, v. 45, n. 9, p. 5285-5293, 2017.
- KING, L. A. et al. Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104: H4 associated with organic fenugreek sprouts, France, June 2011. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 11, p. 1588-1594, 2012.
- KJÆRGAARD, K. et al. Antigen 43 from *Escherichia coli* induces inter- and intraspecies cell aggregation and changes in colony morphology of *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of bacteriology**, v. 182, n. 17, p. 4789-4796, 2000a.
- KJÆRGAARD, K. et al. Antigen 43 facilitates formation of multispecies biofilms. **Environmental microbiology**, v. 2, n. 6, p. 695-702, 2000b.
- KLAUSER, T.; POHLNER, J.; MEYER, T. F. The secretion pathway of IgA protease-type proteins in gram-negative bacteria. **Bioessays**, v. 15, n. 12, p. 799-805, 1993.
- KLEMM, P.; VEJBORG, R. M.; SHERLOCK, O. Self-associating autotransporters, SAATs: functional and structural similarities. **International journal of medical microbiology**, v. 296, n. 4-5, p. 187-195, 2006.
- KNUTTON, S. et al. A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. **The EMBO journal**, v. 17, n. 8, p. 2166-2176, 1998.
- KOBAYASHI, R. K. T.; GAZIRI, L. C. J.; VIDOTTO, M. C. Functional activities of the Tsh protein from avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strains. **Journal of veterinary science**, v. 11, n. 4, p. 315-319, 2010.
- KOTLOFF, K. L. et al. The incidence, aetiology, and adverse clinical consequences of less severe diarrhoeal episodes among infants and children residing in low-income and middle-income countries: a 12-month case-control study as a follow-on to the Global Enteric Multicenter Study (GEMS). **The Lancet Global Health**, v. 7, n. 5, p. e568-e584, 2019.
- KOSTAKIOTI, M.; STATHOPOULOS, C. Functional analysis of the Tsh autotransporter from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. **Infection and immunity**, v. 72, n. 10, p. 5548-5554, 2004.
- LAARMANN, S.; SCHMIDT, M. A. The *Escherichia coli* AIDA autotransporter adhesin recognizes an integral membrane glycoprotein as receptor. **Microbiology**, v. 149, n. 7, p. 1871-1882, 2003.

- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.
- LAN, R.; REEVES, P. R. *Escherichia coli* in disguise: molecular origins of Shigella. **Microbes and infection**, v. 4, n. 11, p. 1125-1132, 2002.
- LANATA, C. F. et al. Child Health Epidemiology Reference Group of the World Health Organization and UNICEF. Global causes of diarrheal disease mortality in children < 5 years of age: a systematic review. **PloS one**, v. 8, n. 9, p. e72788, 2013.
- LARKIN, M. A. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. **bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947-2948, 2007.
- LEE, M.; CHERLA, R. P.; TESH, V. L. Shiga toxins: intracellular trafficking to the ER leading to activation of host cell stress responses. **Toxins**, v. 2, n. 6, p. 1515-1535, 2010.
- LEO, J. C.; GOLDMAN, A. The immunoglobulin-binding Eib proteins from *Escherichia coli* are receptors for IgG Fc. **Molecular immunology**, v. 46, n. 8-9, p. 1860-1866, 2009.
- LEO, J. C.; GRIN, I.; LINKE, D. Type V secretion: mechanism (s) of autotransport through the bacterial outer membrane. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 367, n. 1592, p. 1088-1101, 2012.
- LEO, J. C. et al. The inverse autotransporter family: intimin, invasin and related proteins. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 305, n. 2, p. 276-282, 2015.
- LETUNIC, I.; BORK, P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. **Nucleic acids research**, v. 49, n. W1, p. W293-W296, 2021.
- LEVINE, M. M. et al. New knowledge on pathogenesis of bacterial enteric infections as applied to vaccine development. **Microbiological reviews**, v. 47, n. 4, p. 510-550, 1983.
- LEVINE, M. M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. **Journal of infectious Diseases**, v. 155, n. 3, p. 377-389, 1987.
- LEYTON, D. L.; ROSSITER, A. E.; HENDERSON, I. R. From self sufficiency to dependence: mechanisms and factors important for autotransporter biogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 213-225, 2012.

- LINDENTHAL, C.; ELSINGHORST, E. A. Enterotoxigenic *Escherichia coli* TibA glycoprotein adheres to human intestine epithelial cells. **Infection and immunity**, v. 69, n. 1, p. 52-57, 2001.
- LINKE, D. et al. Trimeric autotransporter adhesins: variable structure, common function. **Trends in microbiology**, v. 14, n. 6, p. 264-270, 2006.
- LJUNGH, A.; MORAN, A. P.; WADSTRÖM, T. Interactions of bacterial adhesins with extracellular matrix and plasma proteins: pathogenic implications and therapeutic possibilities. **FEMS immunology and medical microbiology**, v. 16, n. 2, p. 117-126, 1996.
- MADRI, J. A.; FURTHMAYR, H. Isolation and tissue localization of type AB2 collagen from normal lung parenchyma. **The American journal of pathology**, v. 94, n. 2, p. 323, 1979.
- MALUTA, R. P. et al. Overlapped sequence types (STs) and serogroups of avian pathogenic (APEC) and human extra-intestinal pathogenic (ExPEC) *Escherichia coli* isolated in Brazil. **PloS one**, v. 9, n. 8, p. e105016, 2014.
- MARTINEZ-GIL, M. et al. YeeJ is an inverse autotransporter from *Escherichia coli* that binds to peptidoglycan and promotes biofilm formation. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-16, 2017.
- MCDANIEL, T. K. et al. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 5, p. 1664-1668, 1995.
- MEUSKENS, I. et al. Type V secretion systems: an overview of passenger domain functions. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1163, 2019.
- MIRDITA, M. et al. ColabFold: making protein folding accessible to all. **Nature methods**, v. 19, n. 6, p. 679-682, 2022.
- MISTRY, J. et al. Pfam: The protein families database in 2021. **Nucleic acids research**, v. 49, n. D1, p. D412-D419, 2021.
- MOON, H. W. et al. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. **Infection and immunity**, v. 41, n. 3, p. 1340-1351, 1983.
- MOREIRA, C. G. et al. Bundle-forming pili and EspA are involved in biofilm formation by enteropathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 11, p. 3952-3961, 2006.

- MUNHOZ, D. D. et al. Distribution of major pilin subunit genes among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* and influence of growth media on expression of the ecp operon. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 942, 2018.
- NALLAPAREDDY, S. R. et al. Endocarditis and biofilm-associated pili of *Enterococcus faecalis*. **The Journal of clinical investigation**, v. 116, n. 10, p. 2799-2807, 2006.
- NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.
- NATARO, J. P. et al. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 6, n. 9, p. 829-831, 1987.
- NESTA, B. et al. FdeC, a novel broadly conserved *Escherichia coli* adhesin eliciting protection against urinary tract infections. **MBio**, v. 3, n. 2, 2012.
- NETER, E. et al. Demonstration of Antibodies against Enteropathogenic *Escherichia coli* in Sera of Children of Various Ages. **Pediatrics**, v. 16, n. 6, p. 801-8, 1955.
- NGUYEN, L. et al. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. **Molecular biology and evolution**, v. 32, n. 1, p. 268-274, 2015.
- ORI, E. L. et al. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* and *Escherichia albertii* in Brazil: pathotypes and serotypes over a 6-year period of surveillance. **Epidemiology & Infection**, v. 147, 2019.
- ORSI, H. et al. Characterization of mammary pathogenic *Escherichia coli* reveals the diversity of *Escherichia coli* isolates associated with bovine clinical mastitis in Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 106, n. 2, p. 1403-1413, 2023.
- OWEN, P.; CAFFREY, P.; JOSEFSSON, L. G. Identification and partial characterization of a novel bipartite protein antigen associated with the outer membrane of *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, v. 169, n. 8, p. 3770-3777, 1987.
- PARK, J. H. et al. Diarrheal outbreak caused by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* O157: H45 in South Korea. **Foodborne pathogens and disease**, v. 11, n. 10, p. 775-781, 2014.
- PAYSAN-LAFOSSE, T. et al. InterPro in 2022. **Nucleic acids research**, v. 51, n. D1, p. D418-D427, 2023.
- PEARSON, J. S. et al. The genetics of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence. **Annual review of genetics**, v. 50, p. 493-513, 2016.
- PELAYO, J. S. et al. Virulence properties of atypical EPEC strains. **Journal of medical microbiology**, v. 48, n. 1, p. 41-49, 1999.

- PILZ, D. et al. Mechanism of YadA-mediated serum resistance of *Yersinia enterocolitica* serotype O3. **Infection and immunity**, v. 60, n. 1, p. 189-195, 1992.
- PLATTS-MILLS, J. A. et al. Pathogen-specific burdens of community diarrhoea in developing countries: a multisite birth cohort study (MAL-ED). **The Lancet Global health**, v. 3, n. 9, p. e564-e575, 2015.
- PROVENCE, D. L.; CURTISS 3RD, R. Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. **Infection and immunity**, v. 62, n. 4, p. 1369-1380, 1994.
- RAVI, M. et al. Contribution of AIDA-I to the pathogenicity of a porcine diarrheagenic *Escherichia coli* and to intestinal colonization through biofilm formation in pigs. **Veterinary microbiology**, v. 120, n. 3-4, p. 308-319, 2007.
- RHODES, R. K.; MILLER, E. J. Physicochemical characterization and molecular organization of the collagen A and B chains. **Biochemistry**, v. 17, n. 17, p. 3442-3448, 1978.
- RILEY, L. W. et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **New England journal of medicine**, v. 308, n. 12, p. 681-685, 1983.
- RODRIGUES, J. et al. Clonal structure and virulence factors in strains of *Escherichia coli* of the classic serogroup O55. **Infection and immunity**, v. 64, n. 7, p. 2680-2686, 1996.
- ROY, K. et al. Vaccination with EtpA glycoprotein or flagellin protects against colonization with enterotoxigenic *Escherichia coli* in a murine model. **Vaccine**, v. 27, n. 34, p. 4601-4608, 2009.
- RUIZ-PEREZ, F.; NATARO, J. P. Bacterial serine proteases secreted by the autotransporter pathway: classification, specificity, and role in virulence. **Cellular and molecular life sciences**, v. 71, p. 745-770, 2014.
- RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **The Journal of infectious diseases**, v. 181, n. 5, p. 1753-1754, 2000.
- SALACHA, R. et al. The *Pseudomonas aeruginosa* patatin-like protein PlpD is the archetype of a novel Type V secretion system. **Environmental microbiology**, v. 12, n. 6, p. 1498-1512, 2010.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold spring harbor laboratory press, 1989.

- SANDVIG, Kirsten et al. Pathways followed by ricin and Shiga toxin into cells. **Histochemistry and cell biology**, v. 117, p. 131-141, 2002.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.
- SANTOS, A. C. D. M. et al. Diversity of hybrid-and hetero-pathogenic *Escherichia coli* and their potential implication in more severe diseases. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 10, p. 339, 2020.
- SCALETSKY, I. C. A.; SILVA, M. L.; TRABULSI, L. R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infection and immunity**, v. 45, n. 2, p. 534-536, 1984.
- SCALETSKY, I. C. A. et al. Identification and characterization of the locus for diffuse adherence, which encodes a novel afimbrial adhesin found in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infection and immunity**, v. 73, n. 8, p. 4753-4765, 2005.
- SCALETSKY, I. C. A. et al. Evidence of pathogenic subgroups among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. **Journal of clinical microbiology**, v. 47, n. 11, p. 3756-3759, 2009.
- SCALETSKY, I. C. A. et al. Adherence factors in atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains expressing the localized adherence-like pattern in HEp-2 cells. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 1, p. 302-306, 2010.
- SCHEMBRI, M. A. et al. Differential expression of the *Escherichia coli* autoaggregation factor antigen 43. **Journal of bacteriology**, v. 185, n. 7, p. 2236-2242, 2003.
- SCHEMBRI, M. A.; DALSGAARD, D.; KLEMM, P. Capsule shields the function of short bacterial adhesins. **Journal of bacteriology**, v. 186, n. 5, p. 1249-1257, 2004.
- SCHEUTZ, F. et al. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. **Journal of clinical microbiology**, v. 50, n. 9, p. 2951-2963, 2012.
- SCHÜROFF, P. A. et al. The aggregate-forming pili (AFP) mediates the aggregative adherence of a hybrid-pathogenic *Escherichia coli* (UPEC/EAEC) isolated from a urinary tract infection. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 3073-3093, 2021.
- SCHWARZ, Gideon. Estimating the dimension of a model. **The annals of statistics**, p. 461-464, 1978.

- SEEMANN, Torsten. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics**, v. 30, n. 14, p. 2068-2069, 2014.
- SERVIN, A. L. Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. **Clinical microbiology reviews**, v. 18, n. 2, p. 264-292, 2005.
- SHEIKH, J. et al. A novel dispersin protein in enteroaggregative *Escherichia coli*. **The Journal of clinical investigation**, v. 110, n. 9, p. 1329-1337, 2002.
- SHERLOCK, O. et al. Novel roles for the AIDA adhesin from diarrheagenic *Escherichia coli*: cell aggregation and biofilm formation. **Journal of bacteriology**, v. 186, n. 23, p. 8058-8065, 2004.
- SHERLOCK, O.; VEJBORG, R. M.; KLEMM, P. The TibA adhesin/invasin from enterotoxigenic *Escherichia coli* is self recognizing and induces bacterial aggregation and biofilm formation. **Infection and immunity**, v. 73, n. 4, p. 1954-1963, 2005.
- SIJBRANDI, R. et al. Signal recognition particle (SRP)-mediated targeting and Sec-dependent translocation of an extracellular *Escherichia coli* protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 7, p. 4654-4659, 2003.
- SIMPSON, W. A.; HASTY, D. L.; BEACHEY, E. H. Binding of fibronectin to human buccal epithelial cells inhibits the binding of type 1 fimbriated *Escherichia coli*. **Infection and immunity**, v. 48, n. 2, p. 318-323, 1985.
- SJÖLING, Å. et al. In vivo expression of the heat stable (*estA*) and heat labile (*eltB*) toxin genes of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). **Microbes and infection**, v. 8, n. 12-13, p. 2797-2802, 2006.
- SMITH, K.; RENNIE, M. J. New approaches and recent results concerning human-tissue collagen synthesis. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 10, n. 5, p. 582-590, 2007.
- STEIN, M. et al. Characterization of EspC, a 110-kilodalton protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli* which is homologous to members of the immunoglobulin A protease-like family of secreted proteins. **Journal of bacteriology**, v. 178, n. 22, p. 6546-6554, 1996.
- SUGIURA, N. Further analysis of the data by Akaike's information criterion and the finite corrections: further analysis of the data by Akaike's. **Communications in Statistics-theory and Methods**, v. 7, n. 1, p. 13-26, 1978.
- SULLIVAN, M. J.; PETTY, N. K.; BEATSON, S. A. Easyfig: a genome comparison visualizer. **Bioinformatics**, v. 27, n. 7, p. 1009-1010, 2011.

- SUHR, M.; BENZ, I.; SCHMIDT, M. A. Processing of the AIDA-I precursor: removal of AIDA^C and evidence for the outer membrane anchoring as a β -barrel structure. **Molecular microbiology**, v. 22, n. 1, p. 31-42, 1996.
- SURANA, N. K. et al. The Haemophilus influenzae Hia autotransporter contains an unusually short trimeric translocator domain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 15, p. 14679-14685, 2004.
- SZABADY, R. L. et al. An unusual signal peptide facilitates late steps in the biogenesis of a bacterial autotransporter. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 1, p. 221-226, 2005.
- TAMADONFAR, K. O. et al. Reaching the end of the line: urinary tract infections. **Microbiology spectrum**, v. 7, n. 3, p. 10.1128/microbiolspec. bai-0014-2019, 2019.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. **Molecular biology and evolution**, v. 38, n. 7, p. 3022-3027, 2021.
- TERTTI, R. et al. Adhesion protein YadA of *Yersinia* species mediates binding of bacteria to fibronectin. **Infection and immunity**, v. 60, n. 7, p. 3021-3024, 1992.
- TEUFEL, F. et al. SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models. **Nature biotechnology**, v. 40, n. 7, p. 1023-1025, 2022.
- TOTSIKA, M. et al. Molecular characterization of the EhaG and UpaG trimeric autotransporter proteins from pathogenic *Escherichia coli*. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 7, p. 2179-2189, 2012.
- TRABULSI, L. R. et al. Typical and Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 5, p. 508, 2002.
- ULETT, G. C. et al. Functional analysis of antigen 43 in uropathogenic *Escherichia coli* reveals a role in long-term persistence in the urinary tract. **Infection and immunity**, v. 75, n. 7, p. 3233-3244, 2007.
- VALLE, J. et al. UpaG, a new member of the trimeric autotransporter family of adhesins in uropathogenic *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, v. 190, n. 12, p. 4147-4161, 2008.
- VAN DER WOUDE, M.; BRAATEN, B.; LOW, D. Epigenetic phase variation of the *pap* operon in *Escherichia coli*. **Trends in microbiology**, v. 4, n. 1, p. 5-9, 1996.

- VAZQUEZ-JUAREZ, R. C. et al. CadA negatively regulates *Escherichia coli* O157: H7 adherence and intestinal colonization. **Infection and immunity**, v. 76, n. 11, p. 5072-5081, 2008.
- VEERASSAMY, S.; SMITH, A.; TILLIER, E. R. M. A transition probability model for amino acid substitutions from blocks. *Journal of Computational Biology*, v. 10, n. 6, p. 997-1010, 2003.
- VELARDE, J. J. et al. Solution structure of the novel dispersin protein of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Molecular microbiology**, v. 66, n. 5, p. 1123-1135, 2007.
- VIEIRA, M. A. et al. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* as aetiologic agents of sporadic and outbreak-associated diarrhoea in Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 65, n. 9, p. 998-1006, 2016.
- VIEIRA, M. A. et al. Diversity of strategies used by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* to induce attaching and effacing lesion in epithelial cells. **Journal of medical microbiology**, v. 68, n. 6, p. 940-951, 2019.
- VIEIRA, M. A. M. et al. 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. **The Journal of infectious diseases**, v. 183, n. 5, p. 762-772, 2001.
- VIEIRA, M. A. M. et al. Prevalence and characteristics of the O122 pathogenicity island in typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 4, p. 1452-1455, 2010.
- VO, J. L. et al. Autotransporter adhesins in *Escherichia coli* pathogenesis. **Proteomics**, v. 17, n. 23-24, p. 1600431, 2017.
- WADSTRÖM, T.; HIRMO, S.; BORÉN, T. Biochemical aspects of *Helicobacter pylori* colonization of the human gastric mucosa. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 10, n. Sup1, p. 17-27, 1996.
- WEDLEY, A. L.; ELAJNEF, H. M.; FLETCHER, J. N. Characterization of a novel EAST-negative enteropathogenic *E. coli* strain implicated in a food-borne outbreak of diarrhoea in adults. **Apmis**, v. 121, n. 6, p. 494-502, 2013.
- WELLS, J. G. et al. Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **Journal of clinical microbiology**, v. 18, n. 3, p. 512-520, 1983.

- WELLS, T. J. et al. Autotransporter proteins: novel targets at the bacterial cell surface. **FEMS microbiology letters**, v. 274, n. 2, p. 163-172, 2007.
- WELLS, T. J. et al. EhaA is a novel autotransporter protein of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 that contributes to adhesion and biofilm formation. **Environmental microbiology**, v. 10, n. 3, p. 589-604, 2008.
- WELLS, T. J.; TOTSIKA, M.; SCHEMBRI, M. A. Autotransporters of *Escherichia coli*: a sequence-based characterization. **Microbiology**, v. 156, n. 8, p. 2459-2469, 2010.
- WHITTAM, T. S. et al. Clonal relationships among *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis and infantile diarrhea. **Infection and immunity**, v. 61, n. 5, p. 1619-1629, 1993.
- WICK, R. R. et al. Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. **PLoS computational biology**, v. 13, n. 6, p. e1005595, 2017.
- World Health Organization. **Diarrhoeal disease**. 2017. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>. Acesso em 08 ago. 2023.
- WONG, A. R. C. et al. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: even more subversive elements. **Molecular microbiology**, v. 80, n. 6, p. 1420-1438, 2011.
- XAVIER, R. G. C. et al. Characterization of *Escherichia coli* in Dogs with Pyometra and the Influence of Diet on the Intestinal Colonization of Extraintestinal Pathogenic *E. coli* (ExPEC). **Veterinary Sciences**, v. 9, n. 5, p. 245, 2022.
- YAO, Q. et al. A structural mechanism for bacterial autotransporter glycosylation by a dodecameric heptosyltransferase family. **Elife**, v. 3, p. e03714, 2014.
- YATSUYANAGI, J. et al. Characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains harboring the *astA* gene that were associated with a waterborne outbreak of diarrhea in Japan. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 5, p. 2033-2039, 2003.