

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta
Dissertação será disponibilizado
somente a partir de 24/11/2024.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

DESCRIÇÃO E AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE UM NOVO
SUBTIPO DE TCCP (*TIR-CYTOSKELETON COUPLING PROTEIN*)
NA FORMAÇÃO DA LESÃO *ATTACHING AND EFFACING*,
INDEPENDENTEMENTE DE NCK, EM UM ISOLADO DE
Escherichia albertii

IRANILDO DO AMARANTE FERNANDES

ORIENTADOR: RODRIGO TAVANELLI HERNANDES

COORIENTADORA: TÂNIA APARECIDA TARDELLI GOMES DO AMARAL

Dissertação apresentada ao Instituto de Biotecnologia,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título
de Mestre no Programa de Pós-Graduação em
Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração
Biologia de micro-organismos e imunidade.

Orientador: Rodrigo Tavanelli Hernandez

BOTUCATU – SP
2023

F363d

Fernandes, Iranildo do Amarante

Descrição e avaliação funcional de um novo subtipo de Tccp
(Tir-cytoskeleton coupling protein) na formação da lesão attaching and
effacing, independentemente de Nck, em um isolado de *Escherichia albertii* /
Iranildo do Amarante Fernandes. -- Botucatu, 2023
50 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto
de Biociências, Botucatu

Orientador: Rodrigo Tavanelli Hernandez

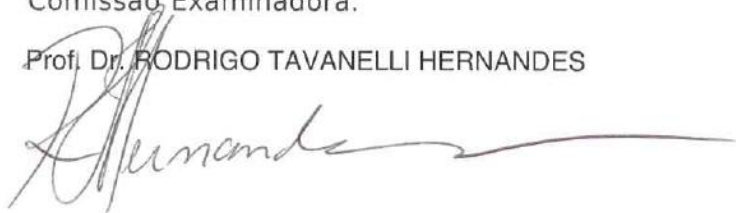
Coorientadora: Tânia Aparecida Tardelli Gomes do Amaral

1. *E. albertii*. 2. lesão AE. 3. virulência. 4. TccP4. I. Título.

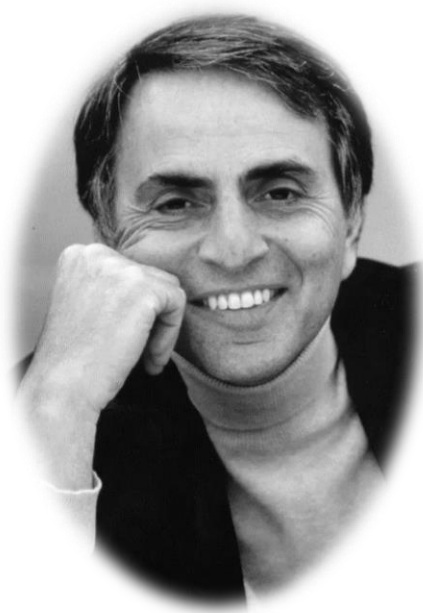
ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE IRANILDO DO AMARANTE FERNANDES, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA GERAL E APLICADA, DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 24 dias do mês de novembro do ano de 2023, às 08:00 horas, no(a) Espaço IB Eventos, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de IRANILDO DO AMARANTE FERNANDES, intitulada **Descrição e Avaliação funcional de um novo subtipo de TccP (Tir-cytoskeleton coupling protein) na formação da lesão attaching and effacing, independente de Nck, em um isolado de Escherichia albertii**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. RODRIGO TAVANELLI HERNANDES (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Departamento de Ciências Químicas e Biológicas / Instituto de Biociências de Botucatu Unesp, Prof. Dr. WALDIR PEREIRA ELIAS JUNIOR (Participação Presencial) do(a) Laboratório de Bacteriologia / Instituto Butantan, Pós-doutorando CLÁUDIA ANDRADE FREIRE (Participação Presencial) do(a) Laboratório de Bacteriologia / Instituto Butantan - Escola Superior do Instituto Butantan. Após a exposição pelo mestrando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: Aprovado. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. RODRIGO TAVANELLI HERNANDES



O presente estudo foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Processo FAPESP: 2021/10398-8 e 2022/06053-8 e desenvolvido no Programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada (área de concentração: Biologia de micro-organismos e imunidade), no Departamento de Ciências Químicas e Biológicas, do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP).



“Eu não quero acreditar, eu quero saber”

Carl Sagan

DEDICATÓRIA

Aos meus pais **Raimundo** (*In Memoriam*) e **Francisca**, e avó **Deusa** (*In Memoriam*), minhas sinceras desculpas, esse caminho que escolhi me faz ser um pouco ausente. Aos mesmos meus sinceros agradecimentos, onde mesmo distantes e com as dificuldades financeiras, não pouparam esforços para que eu chegasse até aqui. A vocês dedico esse trabalho, e todos os outros que surgirem daqui pra frente. Muito Obrigado!!!

Ao meu Orientador Rodrigo Tavanelli Hernandez, que sempre caminhou comigo nessa curta jornada que chamamos de Mestrado. Sem sua fé em mim, nos momentos mais difíceis, esse trabalho não estaria concluído. Meu exemplo de pesquisador, de pessoa e de profissional. Muito Obrigado!!!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, um agradecimento mais que especial a minha Coorientadora Tânia Aparecida Tardelli Gomes do Amaral.

Aos meus familiares, irmãos (Maria, Antônio, Ioneide, Ionete, Daniel e Verônica), Tios (Socorro e Zé Almir).

Aos meus amigos que foram essenciais até aqui, em especial à Aline Parisoto Missio, Ana Caroline Silva Gomes, Italo Rafael de Freitas, Stefani Thais Alves Dantas e Talita Gabriela de Souza.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Patogenicidade Bacteriana (Henrique Orsi, Bruna Luiz, Gustavo Boldrin, Guilherme Solveira, Luisa Pereira, Guilherme Frizzarin e Beatrice Di Virgilio), e em especial a Daiany Ribeiro Paz de Lira, fundamental nessa jornada.

A todos os docentes e funcionários do Setor de Microbiologia e Imunologia, Departamento de Ciências Químicas e Biológicas, Instituto de Biociências da UNESP, Campus de Botucatu.

A todos os parceiros nacionais e internacionais, Waldir Pereira Elias Junior (Instituto Butantan), Fernando Henrique Martins (*University of Texas Southwestern Medical Center*), Nina Jones (*University of Guelph*), Ooka Tadasuke (*Kagoshima University*) e Tetsuya Hayashi (*Kyushu University*).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro no desenvolvimento desse estudo.

RESUMO

A espécie *Escherichia albertii* compreende o mais novo membro do gênero *Escherichia* e é responsável por casos esporádicos, bem como surtos de diarreia em diversos países do mundo, incluindo o Brasil. Uma das principais características de virulência observada em isolados classificados como pertencentes à espécie *E. albertii* é a formação da lesão *attaching and effacing* (AE), que é caracterizada pela aderência íntima da bactéria às células epiteliais, destruição das microvilosidades e formação de uma estrutura semelhante a um pedestal rico em F-actina e outros elementos do citoesqueleto eucariótico. Estudos anteriores, realizados com o protótipo brasileiro de *E. albertii* 1551-2, mostraram que esse patógeno possui a capacidade de recrutar F-actina para a formação da lesão AE utilizando tanto a via Nck-dependente, que requer a fosforilação do resíduo de Tirosina Y474 na proteína receptora Tir, quanto a via Nck-independente, que utiliza a proteína adaptadora TccP (*Tir-cytoskeleton coupling protein*). Estudos anteriores identificaram um novo subtipo de TccP no isolado de *E. albertii* 1551-2 (denominado TccP3), cujo papel na formação da lesão AE se mostrou minoritário. Análises posteriores do genoma do isolado de *E. albertii* 1551-2 revelaram que, além de TccP3, esse isolado alberga um gene com potencial para codificar um novo TccP. Frente ao exposto, nossos objetivos foram avaliar a relação desse novo TccP com os subtipos de TccP já descritos até o momento, bem como a participação dessa nova proteína na formação da lesão AE pela via independente de Nck. Uma árvore de máxima verossimilhança foi construída comparando as sequências de aminoácidos dos diferentes subtipos de TccP e a sequência do novo TccP encontrado no isolado 1551-2. Posteriormente, foram realizadas a mutagênese e complementação *in trans* do gene responsável por codificar essa nova proteína a partir do mutante 1551-2 Δ tccP3. Sequenciamento *Sanger* e *Immunoblotting* foram realizados para confirmação da mutagênese e complementação, respectivamente. Em desfecho, foram realizados testes quantitativos de FAS (*Fluorescent actin staining*) em células MEF (*Mouse Embryonic Fibroblast*) desprovidas de Nck e infectadas com as bactérias empregadas neste estudo. A nova proteína TccP identificada nesse estudo, está localizada em um clado diferente na árvore de máxima verossimilhança e apresentou identidade inferior a 80% se comparada com outros subtipos de TccP. Tais resultados indicam, portanto, se tratar de um novo subtipo de TccP, denominado neste estudo de TccP4. A deleção do gene tccP4 foi confirmada por sequenciamento bem como pela produção da proteína recombinante TccP4-Myc no isolado complementado por *Immunoblotting* com o soro anti-Myc. Os testes quantitativos mostraram que 64,7% das bactérias selvagens aderidas eram capazes de recrutar F-actina para a formação do pedestal característico da lesão AE, enquanto, apenas 5,0% dos isolados de *E. albertii* mutados em tccP4 (1551-2 Δ tccP3/ Δ tccP4) mostraram esse fenótipo, sendo essa diferença considerada significativa pelo teste de ANOVA ($P < 0.0001$). A complementação *in trans* restaurou a capacidade do isolado 1551-2 Δ tccP3/ Δ tccP4 (pTccP4) em recrutar F-actina em porcentagens semelhantes às observadas com o isolado selvagem (64,7% vs. 52,6%; $P = 0.3846$). Tais evidências vêm a corroborar o papel da proteína adaptadora TccP4 no recrutamento de F-actina, pela via Nck-independente, para a formação da lesão AE durante o estabelecimento do processo infeccioso por *E. albertii*.

Palavras chaves: *E. albertii*, lesão AE, virulência e TccP4.

ABSTRACT

The *Escherichia albertii* species comprises the newest member of the genus *Escherichia* and is responsible for sporadic cases, as well as outbreaks of diarrhea, in several countries worldwide. One of the main virulence features observed in this pathogen is the formation of the attaching and effacing (AE) lesion, characterized by intimate adherence of the bacteria to the epithelial cells, effacement of the microvilli, and formation of a pedestal-like structure that is rich in F-actin and other eukaryotic cytoskeleton elements. Previous studies carried out with the Brazilian prototype strain of *E. albertii* 1551-2 showed this pathogen has the capacity to recruit F-actin for the AE lesion formation using both the Nck-dependent pathway, which requires the phosphorylation of the Tyrosine residue 474 in the Tir receptor protein, as well as the Nck-independent pathway, which uses the TccP (Tir-cytoskeleton coupling protein) adaptor protein. In a recently published study a novel TccP, named TccP3, was identified in the 1551-2 genome. However, TccP3 was not considered essential for F-actin polymerization during AE lesion formation in infected cells. Despite TccP3, genomic analyses have identified a gene-encoding an additional TccP adaptor protein in the *E. albertii* 1551-2 isolate. Thus, our main objectives were to evaluate the association of this novel adaptor protein with the other TccP proteins described so far, as well as to evaluate the participation of this novel TccP in the AE lesion formation in a Nck-independent pathway. A maximum likelihood tree was constructed comparing the amino acid sequences of the different TccP and the sequence of the novel TccP uncovered in the 1551-2 isolate. Subsequently, mutagenesis and *in trans* complementation of the gene responsible for encoding this novel adaptor protein were performed in the 1551-2 Δ tccP3 mutant background. Sanger sequencing and Immunoblotting, with anti-Myc serum, were performed to confirm mutagenesis and complementation, respectively. Further, quantitative FAS (Fluorescent actin staining) assays were performed in MEF (Mouse Embryonic Fibroblast) cells lacking Nck (-/-), infected with the distinct bacteria to be evaluated. The novel TccP protein identified in this study occupied an exclusive clade in the maximum likelihood tree and showed less than 80% identity compared to other TccP proteins. These results indicate that it is a novel TccP, which was termed TccP4 in the present study. The *tccP4* gene deletion in the 1551-2 Δ tccP3 mutant background was confirmed by sequencing, and the production of the TccP4-Myc recombinant protein in the complemented isolate was demonstrated by Immunoblotting. Quantitative FAS assays showed that 1551-2 and 1551-2 Δ tccP3 were very efficient in the AE lesion formation, since 72.7% and 74.57% of adherent bacteria co-localized with polymerized F-actin in the MEF infected cells, respectively. On the other hand, only 2.4% of the *E. albertii* 1551-2 lacking *tccP4* (1551-2 Δ tccP3/ Δ tccP4) preserved this ability, with this difference being considered very significant ($P < 0.0001$). Complementation restored the ability of the 1551-2 Δ tccP3/ Δ tccP4 (pTccP4) to recruit F-actin as efficiently as the wild-type (72.7% vs. 71.74%; $P = 0.9944$). In conclusion, our data led to the identification of a novel TccP, named TccP4. Moreover, we showed that TccP4 is crucial for F-actin recruitment, in the Nck-independent pathway, during AE lesion formation in host cells infected by this pathogen.

Keywords: *E. albertii*, AE lesion, virulence and TccP4

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
JUSTIFICATIVA	19
OBJETIVO	21
MATERIAIS E MÉTODOS	21
Isolado de <i>E. albertii</i> 1551-2	22
Sequenciamento do genoma completo	22
Relações filogenéticas entre os distintos subtipos de TccP	22
<i>Polymerase chain reaction</i> (PCR)	22
Construção de mutantes não polares nos genes <i>tccP4</i>	23
Complementação <i>in trans</i> no gene <i>tccP4</i>	25
Sequenciamento do gene <i>tccP4</i> do isolado selvagem e mutante no gene <i>tccP4</i>	25
<i>Immunoblotting</i>	25
Curva de crescimento	26
Imunofluorescência	26
Teste de <i>Fluorescence Actin Staining</i> e Quantificação dos pedestais de F-actina	27
RESULTADOS	28
TccP4: um novo efector do SST3 crucial na formação da lesão <i>attaching and effacing</i> em <i>Escherichia albertii</i>	28
Construção de mutantes no gene <i>tccP4</i> e complementação <i>in trans</i>	33
A proteína recombinante TccP4-Myc colocaliza com o acúmulo de F-actina promovido por <i>E. albertii</i> 1551-2	38
TccP4 é crucial para o recrutamento de F-actina por <i>E. albertii</i> 1551-2	39
Quantificação dos pedestais de F-actina em células MEF desprovidas de Nck	43
DISCUSSÃO	44
CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura genética da região LEE da <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica típica E2348/69	13
Figura 2. Representação esquemática do SST3	14
Figura 3. Vias de recrutamento de F-actina	15
Figura 4. Microscopia eletrônica de transmissão da alça de íleo de coelho infectada com <i>E. albertii</i> 1551-2	18
Figura 5. Representação esquemática das vias de indução do recrutamento de F-actina pelas vias dependente (1) e independente (2) da proteína eucariótica Nck	21
Figura 6. Identificação de uma nova proteína TccP, nomeada TccP4, em isolado de <i>E. albertii</i>	29
Figura 7. Comparação da sequência de aminoácidos de TccP4 de <i>E. albertii</i> 1551-2 com outras sequências de TccP conhecidas	32
Figura 8. Confirmação das principais características genotípicas do isolado selvagem de <i>E. albertii</i> 1551-2 e seus derivados	34
Figura 9. Confirmação da troca alélica entre o gene <i>tccP4</i> e <i>ble</i>	35
Figura 10. Comparação entre o sequenciamento do isolado 1551-2 selvagem (A) e duplo mutante 1551-2 Δ <i>tccP3</i> / Δ <i>tccP4</i> (B) na região do gene <i>tccP4</i>	36
Figura 11. <i>Immunoblotting</i> com anticorpos α -Myc	37
Figura 12. Curva de crescimento dos isolados utilizados neste estudo.	38
Figura 13. Ensaio de imunofluorescência demonstrando a produção da proteína recombinante TccP4-Myc pelo isolado 1551-2 Δ <i>tccP3</i> / Δ <i>tccP4</i> (pTccP4) e a colocalização das bactérias aderidas às células HeLa com a polimerização de F-actina	39
Figura 14. Controles bacterianos utilizados no teste de FAS	40
Figura 15. Detecção da polimerização de F-actina pelo isolado selvagem de <i>E. albertii</i> 1551-2 e seus derivados em células HeLa infectadas.	41
Figura 16. Detecção da polimerização de F-actina pelo isolado selvagem de <i>E. albertii</i> 1551-2 e seus derivados em células MEF Nck (-/-) infectadas.	42
Figura 17. A proteína TccP4 é crucial para a formação da lesão AE em células infectadas por <i>E. albertii</i> 1551-2	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Iniciadores de caracterização genotípica de <i>E. albertii</i> 1551-2	23
Tabela 2. Iniciadores utilizados para construção ou complementação dos mutantes no gene <i>tccP4</i>	24
Tabela 3. Plasmídeos e isolados utilizados nos experimentos de mutagênese e complementação	24
Tabela 4. Similaridade das sequências de aminoácidos entre as proteínas TccP, TccP2, TccP3 e TccP4 de cepas de EHEC, EPEC e <i>E. albertii</i> 1551-2	31
Tabela 5. Características genotípicas e perfil de resistência dos isolados de <i>E.</i> <i>albertii</i> utilizados neste estudo	33

INTRODUÇÃO

O primeiro isolado de *Escherichia albertii* (isolado 19982), do qual se tem conhecimento na literatura, foi obtido de uma criança de nove meses de idade com diarreia em Bangladesh. Tendo por base suas características bioquímicas, esse isolado foi, à época, classificado como *Hafnia alvei* (Albert et al., 1991). Posteriormente, no mesmo país, outros seis isolados com as mesmas características foram obtidos de crianças com diarreia, mostrando, assim, a circulação desse patógeno em Bangladesh (Albert et al., 1992). Albert e colaboradores mostraram que esses isolados de *Hafnia alvei* eram capazes, assim como os isolados de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), de induzir nas células epiteliais infectadas a formação da lesão *attaching and effacing* (AE) (Albert et al., 1992). Com base em características bioquímicas e genéticas, esses isolados de *Hafnia alvei* produtores da lesão AE foram reclassificados em uma nova espécie denominada *Escherichia albertii* (Huys et al., 2003).

Os principais sintomas associados às infecções do trato gastrointestinal por *E. albertii* compreendem: desidratação leve, diarreia aquosa, distensão abdominal, febre e vômito, sendo o período de incubação estimado entre 12 e 24 horas. Além de sua associação com casos esporádicos de diarreia (Ooka et al., 2012), surtos causados por *E. albertii* também já foram relatados, principalmente em estudos conduzidos no Japão (Asoshima et al., 2014; Konno et al., 2012; Ooka et al., 2012; Ooka et al., 2015). *E. albertii* já foi isolada de vários produtos alimentícios, incluindo carne processada e frango (Asoshima et al., 2014; Maeda et al., 2015; Wang et al., 2016), bem como sua ocorrência já foi relatada em sistemas de tratamento e distribuição de água potável (Maheux et al., 2014).

Além das doenças do trato gastrointestinal, um estudo descreveu a capacidade de *E. albertii* de causar bacteremia, indicando a possibilidade desse patógeno em acessar o hospedeiro humano através de portas de entradas alternativas, visto que a paciente em questão não havia tido contato prévio com humanos e aves infectadas, e também não apresentou histórico de diarreia (Inglis et al., 2015). Embora a prevalência de *E. albertii* no Brasil ainda seja um assunto que requer mais pesquisas, um estudo conduzido pelo Instituto Adolfo Lutz investigou um total de 5.047 pacientes com diarreia, entre os anos de 2011 e 2016, mostrando que *E. albertii* foi identificada em apenas 0,2% dos pacientes incluídos nesse estudo (Ori et al., 2019), a importância desses dados é evidenciada pela dificuldade de diferenciação de *E. coli* e *E. albertii*.

A lesão AE, que compreende uma das principais ferramentas de virulência identificada em isolados de *E. albertii* até o momento, é caracterizada pela aderência íntima da bactéria às

células epiteliais, destruição das microvilosidades e formação de uma estrutura semelhante a um pedestal rico em F-actina e outros elementos do citoesqueleto eucariótico (Moon et al., 1983). A grande maioria dos genes responsáveis por codificar proteínas que participam da formação da lesão AE estão localizados em uma ilha de patogenicidade (PAI), denominada *locus of enterocyte effacement*, região LEE, formada por um conjunto de 41 genes organizados em cinco operons policistrônicos (LEE1, LEE2, LEE3, LEE4 e LEE5), dois operons bicistrônicos (*espG-rorG1* e *grlA-grlR*) e quatro genes individuais (*etgA*, *cesF*, *map*, *escD*) (Gaytán et al., 2016; McDaniel et al., 1995) (Figura 1). A clonagem da região LEE em um *background* de *E. coli* K12, demonstrou a capacidade de causar a lesão AE semelhante ao isolado selvagem de EPEC (McDaniel et al., 1997). Surpreendentemente, o mesmo experimento foi realizado, porém clonando a região LEE de EHEC no mesmo *background* de K-12 e não houve restauração na capacidade de recrutar F-actina (ELLIOT; YU; KAPER, 1999), sugerindo assim, que EPEC e EHEC promoviam a lesão AE por mecanismos diferentes.

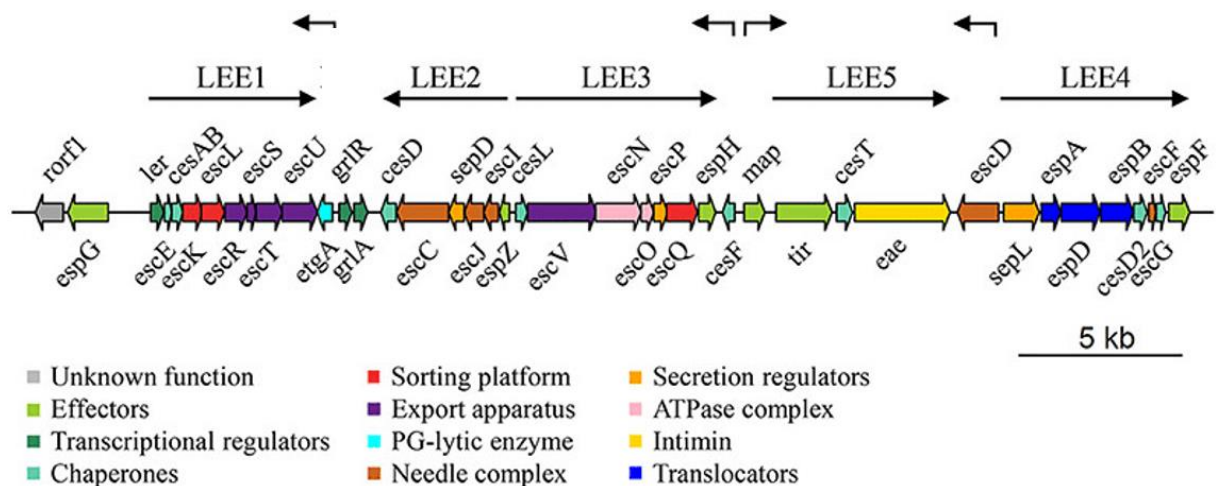


Figura 1. Estrutura Genética da Região LEE da *Escherichia coli* enteropatogênica típica E2348/69. Fonte: Gaytán et al., 2016 PMID: 27818950.

Os genes localizados nos operons LEE1, LEE2 e LEE3 codificam o aparato do sistema de secreção do tipo 3 (SST3) (Figura 2) responsável pela translocação de proteínas efetoras do citoplasma da célula bacteriana para o citoplasma da célula hospedeira eucariótica. O translocon do SST3 é formado por proteínas codificadas por genes localizados no operon LEE4, destacando-se as proteínas EscF (que forma a agulha do SST3), EspA (proteína que recobre a proteína EscF) e as proteínas EspB e EspD que são sinergicamente responsáveis pela formação do poro de translocação nas células epiteliais hospedeiras. A região LEE5 alberga o gene *eae*

(*E. coli attaching and effacing*) que codifica a adesina autotransportadora inversa intimina (Jerse et al., 1990), bem como o gene *tir* (*translocated intimin receptor*), que codifica o receptor da intimina, translocado para as células hospedeiras através do SST3 (Kenny et al., 1997).

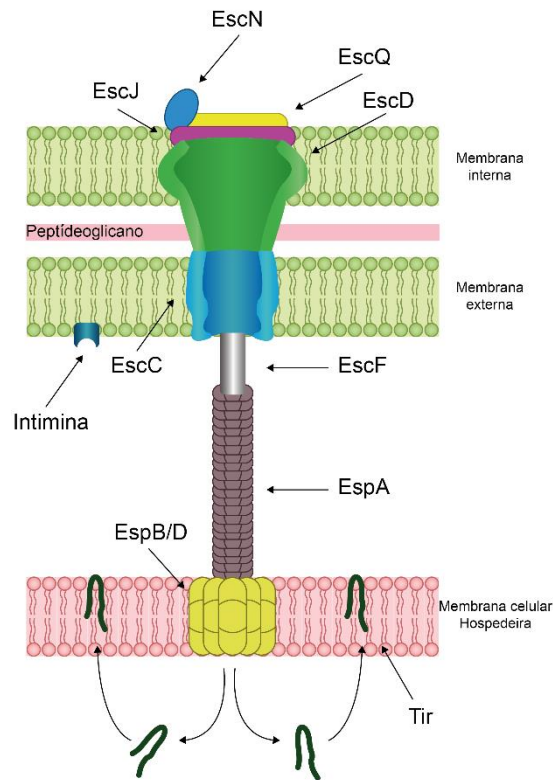


Figura 2. Representação esquemática do SST3. Fonte: Própria (Não publicado).

A compreensão das etapas envolvidas no recrutamento de F-actina e formação do pedestal característico da lesão AE durante as infecções causadas por EPEC e *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) despertou o interesse de pesquisadores por vários anos, sendo que até o presente momento, duas vias de indução da lesão AE foram caracterizadas. Na primeira via, descrita tendo por base o isolado protótipo de EPEC E2348/69, a interação Tir-Intimina provoca a fosforilação do resíduo de tirosina 474 (Y₄₇₄) do domínio C-terminal de Tir; esse resíduo apresenta sítio de ligação para as proteínas adaptadoras Nck (*non-catalytic region of tyrosine kinase*) presentes nas células do hospedeiro. Subsequentemente a essa interação, ocorre o recrutamento e ativação da proteína N-WASP (*Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein*), iniciando a polimerização da actina através da ativação do complexo proteico Arp2/3 (*Actin related protein 2/3*), o que promove a formação do pedestal (Devinney et al., 2001; Kenny, 1999).

Em contrapartida, a proteína Tir produzida por EHEC do sorotipo O157:H7, não apresenta o resíduo de Y₄₇₄, sendo assim incapaz de recrutar F-actina, para a formação do pedestal utilizando uma via dependente de Nck. Estudos mostraram, que isolados de EHEC do sorotipo O157:H7 utilizam o SST3 para secretar para a célula hospedeira, juntamente com a proteína Tir, uma proteína adaptadora que ficou conhecida como *Tir-cytoskeleton coupling protein* (TccP) (Garmendia et al., 2004), ou EspF_U, devido a sua homologia com a proteína efetora EspF (Campellone; Robbins; Leong, 2004). Ao ser translocada para o citoplasma da célula hospedeira, TccP se liga ao Tir via proteínas eucarióticas da família IRTKS, o que resulta na ativação de N-WASP e Arp2/3, recrutando F-actina, em uma via independente de Nck (Garmendia et al., 2004) (Figura 3).

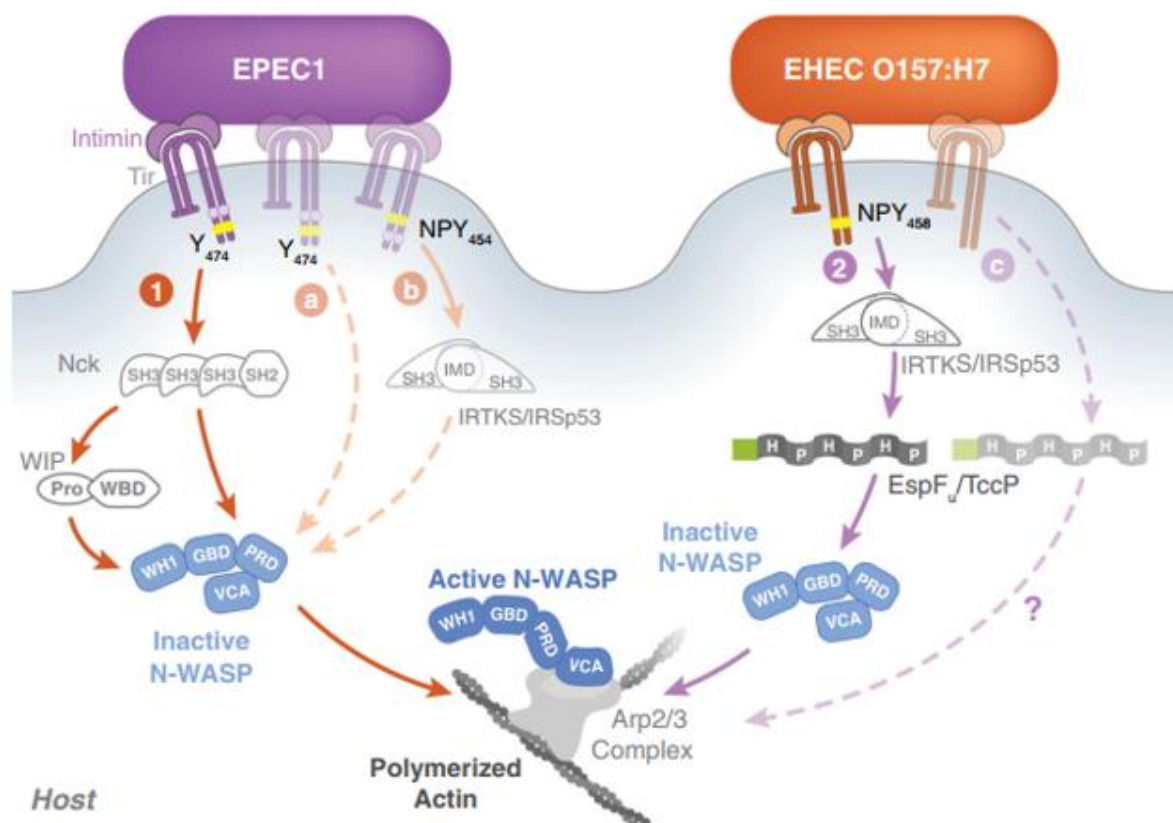


Figura 3. Vias de Recrutamento de F-actina. A via 1 necessita do recrutamento e ativação da proteína eucariótica Nck. A via 2 independe de Nck, utilizando uma proteína adaptadora da família TccP/EspF_U. **Fonte:** Lai et al., 2013 PMID: 23927593.

Desde os primeiros estudos sobre o potencial patogênico de *E. albertii*, a capacidade desse patógeno de aderir às células epiteliais tem sido notada (Albert et al., 1992). Assim como as EPEC atípicas (aEPEC), que são desprovidas da fimbria *bundle-forming pilus* (BFP) e, portanto incapazes de formar o padrão de aderência localizada (AL) característico das EPEC típicas (tEPEC), os isolados de *E. albertii* formam na superfície das células epiteliais infectadas

microcolônias bacterianas frouxas, que podem ser observadas apenas em ensaios de aderência realizados com períodos de incubação bactéria-célula mais prolongados (6 horas) (Albert et al., 1992; Hernandez et al., 2006; Lima et al., 2019).

No entanto, um estudo realizado no Brasil com o isolado de *E. albertii* denominado 1551-2, que foi obtido de uma criança de 23 meses de idade com um quadro clínico de diarreia aguda (Vieira et al., 2001), mostrou que esse isolado produzia microcolônias bacterianas bastante compactas na superfície das células epiteliais infectadas, em ensaios realizados com períodos estendidos de incubação (6 horas), sendo esse padrão denominado de AL₆ (Hernandes et al., 2006) para diferenciar do padrão AL produzido por isolados de tEPEC em ensaios realizados com 3 horas de incubação. Um estudo posterior que caracterizou um total de cinco isolados de *E. albertii*, provenientes de crianças brasileiras com diarreia, mostrou que três isolados produziam o padrão AL, enquanto os outros dois isolados produziam o padrão AL₆ (Lima et al., 2019).

O isolado brasileiro de *E. albertii* 1551-2 foi extensivamente estudado no intuito de promover a compreensão de quais adesinas estariam envolvidas na formação do padrão AL₆ em células HeLa (Hernandes et al., 2006; Hernandez et al., 2008; Hernandez et al., 2013; Romão et al., 2014; Yamamoto et al., 2017). Tendo por base que o isolado de *E. albertii* 1551-2 alberga a região LEE e, portanto, o gene *eae* que codifica a adesina intimina (Hernandes et al., 2006; Vieira et al., 2001), esse gene se tornou o primeiro candidato a ser mutagenizado. A mutagênese no gene *eae* do isolado 1551-2 fez com que essa bactéria deixasse de produzir o padrão AL₆, passando assim a aderir às células HeLa no padrão de aderência difusa, reforçando assim o papel da adesina intimina na formação do padrão de aderência AL₆ (Hernandes et al., 2008). Ensaios quantitativos de aderência revelaram uma diminuição de aproximadamente 33% no número de bactérias associadas às células HeLa quando comparados o isolado 1551-2 mutado no gene *eae* com o isolado selvagem (Hernandes et al., 2013).

Posteriormente, foi demonstrado que o padrão de aderência difusa, produzido pelo isolado 1551-2 mutado no gene *eae*, era dependente do translocon do SST3, uma vez que o mutante do isolado 1551-2 no gene *escN* (que codifica a ATPase do SST3) ou o duplo mutante nos genes *eae/espA*, não eram mais aderentes às células HeLa (Hernandes et al., 2013). Embora muitos estudos ainda sejam necessários para compreender a regulação dos fatores de virulência envolvidos na aderência de *E. albertii* às células epiteliais, foi demonstrado que a aderência do isolado 1551-2 às células HeLa é significativamente maior quando os experimentos são realizados na presença de 5% de CO₂, comparando-se a experimentos realizados em uma atmosfera normal (0,03%). No mesmo estudo, observou-se também que a presença de altas

concentrações de glicose altera o padrão AL₆ para um padrão híbrido, onde concomitantemente às microcolônias compactas características do padrão AL₆, foram observadas bactérias aderidas à superfície abiótica (vidro) em um padrão que se assemelha ao padrão de aderência agregativa (AA), sendo esse padrão híbrido referido como AL₆/AA-like (Romão et al., 2014).

Além dos estudos realizados com células HeLa (Hernandes et al., 2008; Hernandez et al., 2013), foi também evidenciado que o isolado de *E. albertii* 1551-2 foi capaz de aderir às células intestinais polarizadas e diferenciadas Caco-2 (Pacheco et al., 2014; Yamamoto et al., 2017) e T84 (Yamamoto et al., 2009). Interessantemente, estudos realizados com fragmentos de íleo obtidos de ratos, *in vitro organ culture* (IVOC), mostraram que a aderência às células desse tecido era completamente dependente de um SST3, uma vez que a mutação no gene *escN* foi capaz de reduzir significativamente a capacidade do isolado 1551-2 em aderir a esse fragmento de tecido (Yamamoto et al., 2017), diferentemente do observado com os mutantes nos genes *eae*, *tir* e *fimA* (que codifica a pilina da fimbria do tipo I de *E. coli*).

Embora todos os estudos focados em entender o processo de aderência de isolados de *E. albertii*, especialmente os realizados com o isolado brasileiro 1551-2, tenham funcionalmente demonstrado o papel da adesina intimina e do translocon do SST3 (Hernandes et al., 2013; Yamamoto et al., 2017), é importante destacar que dos 243 isolados de *E. albertii* sequenciados até o momento, aproximadamente 91% albergam o gene *paa* (*porcine attaching and effacing associated*) (Gomes et al., 2020), que codifica uma adesina originalmente identificada e caracterizada em um isolado de EPEC de suíno (Batisson et al., 2003). Também já foi observada a presença do gene *efa1/lifA* (*EHEC factor for adherence/lymphocyte inhibitory factor*) (Lima et al., 2019), que codificava uma adesina identificada em um isolado de EHEC do sorotipo O111:HNM (Nicholls et al., 2000).

Além de aderir às células epiteliais, isolados de *E. albertii* são também capazes de aderir a superfícies abióticas, em especial, ao poliestireno (Lima et al., 2019). Estudos com o isolado 1551-2 mostraram que esse fenótipo é mediado pela produção da fimbria do tipo I (FT1), uma vez que a mutagênese no gene *fimA*, que codifica a pilina da FT1, impactou drasticamente a formação de biofilme (Hernandes et al., 2013).

Como mencionado anteriormente, a capacidade de *E. albertii* em produzir a lesão AE foi evidenciada desde os primeiros estudos de patogenicidade bacteriana realizados com esse patógeno (Albert et al., 1991; Albert et al., 1992). Nos estudos publicados até o momento, esse fenótipo tem sido observado nos seguintes modelos experimentais: células cultivadas *in vitro* (Hernandes et al., 2013; Lima et al., 2019; Pacheco et al., 2014; Yamamoto et al., 2009), alça ligada de coelho (Albert et al., 1991; Albert et al., 1992; Gomes et al., 2020) ou IVOC de

fragmentos do íleo de ratos (Yamamoto et al., 2017). A formação da lesão AE, nos modelos experimentais citados, tem sido evidenciada diretamente através de microscopia eletrônica de transmissão ou varredura, buscando-se pelas características histopatológicas da lesão AE; ou indiretamente através do teste de FAS (*fluorescent actin-staining*) que permite evidenciar o acúmulo de F-actina junto ao sítio de aderência bactéria-célula (Knutton et al., 1989). A capacidade do isolado brasileiro de *E. albertii* 1551-2 em produzir a lesão AE nas células epiteliais infectadas já foi evidenciada *in vitro* utilizando várias linhagens celulares, HeLa, Caco-2 e T84 (Hernandes et al., 2006; Hernandez et al., 2013; Pacheco et al., 2014; Yamamoto et al., 2009) e IVOC de fragmentos do íleo de ratos (Yamamoto et al., 2017); bem como *in vivo*, em modelo de alça ligada de coelho (Gomes et al., 2020) (Figura 4).



Figura 4. Microscopia eletrônica de transmissão da alça de íleo de coelho infectada com *E. albertii* 1551-2. A destruição das microvilosidades e a formação da estrutura semelhante a um pedestal são evidenciadas pelo asterisco, indicando a capacidade do isolado 1551-2 em induzir a lesão AE *in vivo*. **Fonte:** Gomes et al., 2020 PMID: 32588811.

Inesperadamente, ensaios de interação do isolado de *E. albertii* 1551-2 com células HeLa mostraram que esse isolado era capaz de invadir essa linhagem celular (Hernandes et al., 2008), com uma eficiência três vezes maior que o isolado de EPEC JPN15, isolado protótipo de tEPEC E2348/69 espontaneamente curada do pEAF (*EPEC adherence factor plasmid*) e, portanto, incapaz de produzir a fímbria BFP. O isolado de *E. albertii* 1551-2 alberga o subtipo

syndrome protein) que são partes essenciais da cascata de polimerização de F-actina durante a formação da lesão AE. Em um trabalho publicado por Cheng e colaboradores (2008), foi demonstrado que uma sequência de 27 aminoácidos da região N-terminal dos PRRs apresenta alta afinidade pelo domínio central GBD (*GTPase binding domain*) de N-WASP. Essa interação leva à ativação de proteínas pertencentes à família WASP e, posteriormente, a ativação do complexo Arp 2/3, culminado na formação dos pedestais de F-actina. É importante ressaltar que, na proteína TccP4 do protótipo brasileiro de *E. albertii* 1551-2, o primeiro PRR contém essa sequência de 27 aminoácidos que, teoricamente, apresenta alta afinidade pelo domínio central GBD de N-WASP, enquanto os outros dois PRRs não apresentam os dois primeiros aminoácidos dessa sequência N-terminal. Apesar dessa diferença, a proteína TccP4 mostrou-se colocalizando com o acúmulo de F-actina e ser essencial para a formação do pedestal.

Sendo assim, observamos que a proteína identificada neste estudo apresenta resíduos de aminoácido parcialmente conservados, quando comparada com outros TccPs, gerando evidências das possíveis interações de TccP4 com proteínas eucarióticas no recrutamento de F-actina na formação de pedestal.

CONCLUSÃO

Nossos dados levaram a identificação de uma nova proteína, aqui nomeada como TccP4. Além disso, foi demonstrado que TccP4 é crucial para o recrutamento de F-actina, pela via Nck-independente, durante a formação da lesão AE em células hospedeiras infectadas por *E. albertii*, podendo contribuir na patogênese desse microrganismo.

REFERÊNCIAS

- AITIO, O. et al. Recognition of tandem PxxP motifs as a unique Src homology 3-binding mode triggers pathogen-driven actin assembly. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 50, p. 21743–21748, 14 dez. 2010.
- ALBERT, M. J. et al. *Hafnia alvei*, a probable cause of diarrhea in humans. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 4, p. 1507–1513, 1991.
- ALBERT, M. J. et al. Sharing of virulence-associated properties at the phenotypic and genetic levels between enteropathogenic *Escherichia coli* and *Hafnia alvei*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 310–314, 1992.
- ASOSHIMA, N. et al. Identification of *Escherichia albertii* as a causative agent of a food-borne outbreak occurred in 2003. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 67, n. 2, p. 139–140, 2014.
- BATISSON, I. et al. Characterization of the novel factor Paa involved in the early steps of the adhesion mechanism of attaching and effacing *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 8, p. 4516–4525, 2003.
- BRANDAL, L. T. et al. Shiga Toxin 2a in *Escherichia albertii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 1454–1455, 2015.
- CAMPELLONE, K. G.; ROBBINS, D.; LEONG, J. M. EspFU is a translocated EHEC effector that interacts with Tir and N-WASP and promotes Nck-independent actin assembly. **Developmental Cell**, v. 7, n. 2, p. 217–228, 2004.
- CHENG, H. C. et al. Structural mechanism of WASP activation by the enterohaemorrhagic *E. coli* effector EspFU. **Nature**, v. 454, n. 7207, p. 1009–1013, 21 ago. 2008.
- CROXEN, M. A. et al. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 822–880
- DATSENKO, K. A.; WANNER, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 12, p. 6640–6645, 2000.
- DEVINNEY, R. et al. Enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* use a different Tir-based mechanism for pedestal formation. **Molecular Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 1445–1458, 2001.
- DONNENBERG, M. S. et al. Role of the *eaeA* Gene in Experimental Enteropathogenic *Escherichia coli* Infection. **J Clin. Invest**, 1993.
- ELLIOTT, S. J.; YU, J.; KAPER, J. B. The Cloned Locus of Enterocyte Effacement from Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Is Unable To Confer the Attaching and Effacing Phenotype upon *E. coli* K-12. **Infection and Immunity**, p. 4260–4263, 1999.
- FEDOR, Y. et al. From single-strand breaks to double-strand breaks during S-phase: A new mode of action of the *Escherichia coli* Cytotoxic Distending Toxin. **Cellular Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 1–15, 2013.
- GARMENDIA, J. et al. TccP is an enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 type III effector protein that couples Tir to the actin-cytoskeleton. **Cellular Microbiology**, v. 6, n. 12, p. 1167–1183, 2004.
- GARMENDIA, J. et al. Characterization of TccP-mediated N-WASP activation during enterohaemorrhagic *Escherichia coli* infection. **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 1444–1455, set. 2006.
- GAYTÁN, M. O. et al. Type three secretion system in attaching and effacing pathogens. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, n. 129, p. 1–25, 2016.
- GOMES, T. A. T. et al. *Escherichia albertii* Pathogenesis. **EcoSal Plus**, v. 9, n. 1, 2020.
- GRASSO, F.; FRISAN, T. Bacterial genotoxins: Merging the DNA damage response into infection biology. **Biomolecules**, v. 5, n. 3, p. 1762–1782, 2015.

- GRASSO, F.; FRISAN, T. Bacterial genotoxins: Merging the DNA damage response into infection biology. **Biomolecules**, v. 5, n. 3, p. 1762–1782, 2015.
- HERNANDES, R. T. et al. Dissection of the role of pili and type 2 and 3 secretion systems in adherence and biofilm formation of an atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strain. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 10, p. 3793–3802, 2013.
- 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.
- HINENOYA, A. et al. Isolation and characterization of an *Escherichia albertii* strain producing three different toxins from a child with diarrhea. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 70, n. 3, p. 252–257, 2017.
- HUYS, G. et al. *Escherichia albertii* sp. nov., a diarrhoeagenic species isolated from stool specimens of Bangladeshi children. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, n. 3, p. 807–810, 2003.
- INGLIS, T. J. J. et al. First bacteraemic human infection with *Escherichia albertii*. **New Microbes and New Infections**, v. 8, p. 171–173, 2015.
- 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, 1990.
- JINADASA, R. N. et al. Cytolethal distending toxin: A conserved bacterial genotoxin that blocks cell cycle progression, leading to apoptosis of a broad range of mammalian cell lineages. **Microbiology**, v. 157, n. 7, p. 1521–1875, 2011.
- JONES, D.T.; TAYLOR, W.R.; THORNTON, J.M. (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. **Computer Applications in the Biosciences** 8: 275-282.
- JONES, N. et al. Nck adaptor proteins link nephrin to the actin cytoskeleton of kidney podocytes. **Nature**, v. 440, n. 7085, p. 818–823, 2006.
- 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, 1997.
- KENNY, B. Phosphorylation of tyrosine 474 of the enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule is essential for actin nucleating activity and is preceded by additional host modifications. **Molecular Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 1229–1241, 1999.
- KNUTTON, S. et al. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: Basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 4, p. 1290–1298, 1989.
- KOTLOFF, K. L. et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. **The Lancet**, v. 382, n. 9888, p. 209–222, jul. 2013.
- KONNO, T. et al. Isolation and identification of *Escherichia albertii* from a patient in an outbreak of gastroenteritis. **Japanese journal of infectious diseases**, v. 65, n. 3, p. 203–207, 2012.
- 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.
- LANATA, C. F. et al. Global Causes of Diarrheal Disease Mortality in Children <5 Years of Age: A Systematic Review. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. e72788, 4 set. 2013.
- LAI, Y. et al. Intimate host attachment: Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. **Cellular Microbiology**, v. 15, n. 11, p. 1796–1808, 2013.

- LIMA, M. P. et al. Phenotypic characterization and virulence-related properties of *Escherichia albertii* strains isolated from children with diarrhea in Brazil. **Pathogens and Disease**, v. 77, n. 2, 2019.
- MAEDA, E. et al. Detection of *Escherichia albertii* from chicken meat and Giblets. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 77, n. 7, p. 871–873, 2015.
- MAHEUX, A. F. et al. Characterization of *Escherichia fergusonii* and *Escherichia albertii* isolated from water. **Journal of Applied Microbiology**, v. 117, n. 2, p. 597–609, 2014.
- MCDANIEL, T. K. et al. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 92, n. 5, p. 1664–1668, 1995.
- MCDANIEL, T. K.; KAPER, J. B. A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12. **Molecular Microbiology**, v. 23, n. 2, p. 399–407, 1997.
- MARTINS, F. H. et al. Interactions between Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) and Gut Commensals at the Interface of Human Colonoids. **mBio**, v. 13, n. 3, 1 jun. 2022.
- MARTINS, F. H. et al. Phylogenetic distribution of tir-cytoskeleton coupling protein (tccP and tccP2) genes in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 364, n. 11, p. 1–7, 2017.
- 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.
- MURAKAMI, K. et al. Shiga toxin 2f-producing *Escherichia albertii* from a symptomatic human. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 67, n. 3, p. 204–208, 2014.
- NICHOLLS, L.; GRANT, T. H.; ROBINS-BROWNE, R. M. Identification of a novel genetic locus that is required for in vitro adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. **Molecular Microbiology**, v. 35, n. 2, p. 275–288, 2000.
- O'BRIEN, A. D.; LAVECK, G. D. Purification and characterization of a *Shigella dysenteriae* 1-like toxin produced by *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 40, n. 2, p. 675–683, 1983.
- OOKA, T. et al. Clinical significance of *Escherichia albertii*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 488–492, 2012.
- OOKA, T. et al. Defining the genome features of *Escherichia albertii*, an emerging enteropathogen closely related to *Escherichia coli*. **Genome Biology and Evolution**, v. 7, n. 12, p. 3170–3179, 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 and Infection**, v. 147, 2019.
- PACHECO, V. C. R. et al. Invasion of differentiated intestinal Caco-2 cells is a sporadic property among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains carrying common intimin subtypes. **Pathogens and Disease**, v. 70, n. 2, p. 167–175, 2014.
- PICHON, C. et al. Uropathogenic *Escherichia coli* AL511 requires flagellum to enter renal collecting duct cells. **Cellular Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 616–628, 2009.
- ROMÃO, F. T. et al. Genomic Properties and Temporal Analysis of the Interaction of an Invasive *Escherichia albertii* With Epithelial Cells. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. December, p. 1–14, 2020.
- ROMÃO, F. T. et al. Influence of environmental factors in the adherence of an atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strain to epithelial cells. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 1–7, 2014.
- ROMÃO, F. T. et al. Complete genome sequence of *Escherichia albertii* strain 1551-2, a potential extracellular and intracellular pathogen. **Genome Announcements**, v. 6, n. 9, p. 1–2, 2018.

- STEPHEN, F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, **Nucleic Acids Res.** 25:3389-3402, 1997
- SAMPAIO, S. C. F. et al. The flagella of an atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strain are required for efficient interaction with and stimulation of interleukin-8 production by enterocytes in vitro. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 10, p. 4406–4413, out. 2009.
- SHIGA, K. 1898. Ueber den Dysenterie-bacillus (*Bacillus dysenteriae*). **Zentralbl Bakteriol Orig** 24:913–918
- TAIEB, F. et al. The Enterobacterial Genotoxins: Cytolethal Distending Toxin and Colibactin. **EcoSal Plus**, v. 7, n. 1, 2016.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. (2021). MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Molecular Biology and Evolution** <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.
- 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. **Journal of Infectious Diseases**, v. 183, n. 5, p. 762–772, 2001.
- WANG, H. et al. Prevalence of eae-positive, lactose non-fermenting *Escherichia albertii* from retail raw meat in China. **Epidemiology and Infection**, v. 144, n. 1, p. 45–52, 2016.
- WHO, World Health Organization. Diarrhoeal disease. 2019. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>. Acessado em 8 fev. 2022.
- YAMAMOTO, D. et al. *Escherichia albertii*, a novel human enteropathogen, colonizes rat enterocytes and translocates to extra-intestinal sites. **PLOS ONE**, v. 12, n. 2, p. 1–16, 2017.
- YAMAMOTO, D. et al. Invasiveness as a putative additional virulence mechanism of some atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* strains with different uncommon intimin types. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 1–10, 2009.