AFONSO GOMES ABREU JUNIOR

**Caracterização da proteína Pic (*protein involved in colonization*)
em *Escherichia coli* enteropatogênica atípica**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2015

AFONSO GOMES ABREU JUNIOR

**Caracterização da proteína Pic (*protein involved in colonization*)
em *Escherichia coli* enteropatogênica atípica**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Dr. Waldir Pereira Elias Junior

Versão Original

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Abreu Junior, Afonso Gomes.

Caracterização da proteína Pic (*protein involved in colonization*) em *Escherichia coli* enteropatogênica atípica / Afonso Gomes Abreu Junior. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Waldir Pereira Elias Junior.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Patogenicidade bacteriana.

Versão do título para o inglês: Characterization of Pic (protein involved in colonization) in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*.

1. *Escherichia coli* enteropatogênica atípica 2. Pic 3. Sistema complemento 4. Hemaglutinação 5. Atividade mucinolítica 6. Colonização I. Elias Junior, Prof. Dr. Waldir Pereira II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB012/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Afonso Gomes Abreu Junior.

Título da Tese: Caracterização da proteína Pic (*protein involved in colonization*) em *Escherichia coli* enteropatogênica atípica.

Orientador(a): Prof. Dr.Waldir Pereira Elias Junior.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **105** nas fls. **91** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Waldir Pereira Elias Junior, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Caracterização da proteína Pic (protein involved in colonization) em Escherichia coli enteropatogênica atípica** do qual participam o(s) alunos **Afonso Gomes Abreu Junior**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **10.10.2010, com validade de 3 anos**.

São Paulo, 18 de outubro de 2010.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEUA - ICB/USP

*Aos meus pais, Afonso Gomes Abreu e
Conceição de Maria Santos Jacinto
Abreu.*

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan (São Paulo, SP), com o auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processo N° 2010/11913-9.

AGRADECIMENTOS

Ao Criador, pela vida, família, amigos e por todas as graças alcançadas. Sem ele, tudo seria nada;

Aos meus queridos pais, por todo amor;

Aos meus irmãos, pela torcida;

Aos meus “tios-pais”, José Maria e Dora, por estarem sempre presentes em cada etapa da minha vida;

Aos meus tios Antônio, Francisco e José Carlos, pela ajuda e apoio;

Aos irmãos de longa jornada, Djalma e Marcus; e aos irmãos conquistados, Gustavo e João, pela amizade, conselhos, broncas e risos. Por todo o companheirismo nos dias de sol e pela força e apoio, indispensáveis, nos dias de chuva;

A eles: Aline, Ana Patrícia, Cibele, Joleen, Mariana, Samira e Wermerson, pelo carinho, amizade e torcida de sempre;

À minha eterna orientadora e amiga, Prof^a. Azize, pela amizade, apoio, conselhos e orações. Muito obrigado por tudo;

Ao meu orientador, Prof. Waldir, exemplo de competência e sucesso profissional, meu profundo respeito e admiração. Muito obrigado pela confiança depositada para conduzir este projeto, pela força, conhecimento científico, e acima de tudo, por ter me dado, ao longo desses últimos quatro anos, exemplos diários de seriedade e dedicação ao ofício de “ser pesquisador”;

Às Dr^{as} Angela, Cecília, Patrícia e Roxane, pelas discussões e contribuições ao trabalho;

Ao Dr. Fernando Navarro-Garcia e todo o seu grupo: Antônio, Farid, Javier, Jazmín, Lucía, Paul e Raúl, pela ajuda, aprendizado, colaboração e solicitude. Muchas gracias;

Aos pesquisadores, funcionários e alunos do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, principalmente aos amigos de bancada (Adriana, Cláudia, Fernanda, Fernando, Francielli, Kamila e Roberto), pelo apoio, companheirismo, momentos de alegria e por estarem sempre contribuindo com tantas coisas. Alguns, é claro, foram essenciais nessa jornada. Graças a eles, a vida longe de casa se tornou mais tranquila e feliz, com momentos de muita reflexão e aprendizado. Obrigado pela amizade, crescimento, paciência, ajuda, conversas, conselhos e muitas, muitas risadas;

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo;

E finalmente, à FAPESP, pela bolsa de estudo e apoio financeiro.

O meu muito obrigado!

*“Não siga pelo caminho que
te conduzem. Siga por onde
não há caminhos e deixe a sua
própria trilha.”*

Ralph Waldo Emerson

RESUMO

ABREU, A. G. **Caracterização da proteína Pic (*protein involved in colonization*) em *Escherichia coli* enteropatogênica atípica.** 2015. 162 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Proteínas denominadas autotransportadoras (AT) têm sido identificadas em *Escherichia coli* patogênicas, sendo frequentemente associadas a atributos de virulência, tais como adesão, agregação, invasão, formação de biofilme e toxicidade. A serinoprotease Pic (*protein involved in colonization*) é uma dessas AT, a qual foi originalmente identificada em *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *Shigella flexneri* 2a e *E. coli* uropatogênica. Em EAEC a proteína Pic apresenta papel importante na colonização da mucosa intestinal através de suas atividades de degradação de muco intestinal e indução de sua secreção. Um estudo prévio, que teve como objetivo analisar a prevalência de fatores de virulência de outros patótipos de *E. coli* diarreio gênicas em amostras de *E. coli* enteropatogênica atípicas (aEPEC), detectou uma cepa (BA589) portando o gene *pic*. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo caracterizar a proteína Pic produzida pela cepa de aEPEC BA589, através da determinação da sua estrutura genética e atividades biológicas *in vitro* e *in vivo*. A análise por *Southern blot* mostrou que *pic* em BA589 está presente em um plasmídeo de alto peso molecular (~98 kb) e o sequenciamento desse gene mostrou identidade de 99% com *pic* de EAEC 042. Pic da cepa BA589 (Pic₅₈₉), purificada por gel filtração a partir de sobrenadantes de cultura, foi capaz de clivar mucina isolada de glândula submaxilar bovina e hemaglutinar eritrócitos de coelho. Além disso, Pic₅₈₉ promoveu a clivagem direta de moléculas que participam das três vias sistema complemento (C1q, C2, C3 e C4). A cepa BA589 foi mutagenizada pelo sistema *lambda-red*, originando o mutante BA589Δ*pic*. Esse mutante perdeu as capacidades de degradação da mucina, hemaglutinação e clivagem de proteínas do sistema complemento. O papel de Pic₅₈₉ na colonização intestinal foi avaliado no modelo de camundongos tratados com estreptomicina. A cepa selvagem foi capaz de colonizar o intestino, o que não foi observado com o mutante BA589Δ*pic*. A análise da colonização intestinal por microscopia eletrônica de varredura mostrou uma elevada produção de muco nos camundongos infectados pela cepa selvagem e o ceco foi a região do intestino onde houve maior colonização. Em resumo, Pic₅₈₉ possui atividades hemaglutinante e mucinolítica, promove a inativação das três vias do sistema complemento e medeia a colonização intestinal de camundongos, preferencialmente na região do ceco. Desta forma, a serinoprotease Pic representa um fator de virulência adicional na cepa de aEPEC BA589, relacionada às etapas de adesão, colonização e evasão do sistema imune inato.

Palavras-chave: *Escherichia coli* enteropatogênica atípica. Pic. Sistema Complemento. Hemaglutinação. Atividade mucinolítica. Colonização.

ABSTRACT

ABREU, A. G. **Characterization of Pic (protein involved in colonization) in atypical enteropathogenic *Escherichia coli***. 2015. 162 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Autotransporter proteins (AT) have been identified in pathogenic *Escherichia coli*, where they are frequently associated with virulence attributes, such as adhesion, aggregation, invasion, biofilm formation and toxicity. Originally identified in enteroaggregative *E. coli* (EAEC), *Shigella flexneri* 2a and uropathogenic *E. coli*, the serine protease Pic (protein involved in colonization) is one of these AT. In EAEC Pic plays an important role in the colonization of the intestinal mucosa through its activities of degradation of intestinal mucus and induction of mucus secretion. A previous study, which aimed to analyze the prevalence of virulence factors of other pathotypes of diarrheagenic *E. coli* in atypical enteropathogenic *E. coli* (aEPEC) strains, detected a strain (BA589) carrying the *pic* gene. Thus, this study aimed to characterize the protein Pic produced by aEPEC BA589, by determining its genetic structure and biological activity in vitro and in vivo. Southern blot analysis showed that *pic* is located in a high molecular weight plasmid (~ 98 kb), and sequencing of this gene showed 99% identity with *pic* from EAEC 042. Pic from strain BA589 (Pic₅₈₉), purified by gel filtration from culture supernatants, was able to cleave mucin isolated from bovine submaxillary gland and to hemagglutinate rabbit erythrocytes. Furthermore, Pic₅₈₉ promoted the direct cleavage of molecules involved in the three complement system pathways (C1q, C2, C3 and C4). The BA589 strain was mutagenized by the lambda-red system, yielding the mutant BA589 Δ *pic*. This mutant lost the capacities to degrade mucin, hemagglutinate erythrocytes and cleave complement proteins. The role of Pic₅₈₉ in intestinal colonization was evaluated in the streptomycin treated mice model. The wild type strain was able to colonize the mice intestines, which was not observed with the mutant BA589 Δ *pic*. Analysis of intestinal colonization by scanning electron microscopy showed an elevated mucus production in mice infected with the wild type strain and the cecum was the region of higher colonization. In summary, Pic₅₈₉ presents mucinolytic and hemagglutinating activities, promotes the inactivation of the three complement system pathways and mediates intestinal colonization in mice, preferably in the cecum region. Thus, the serine protease Pic represents an additional virulence factor in aEPEC strain BA589, associated with adherence, colonization and evasion of innate immune system.

Key words: Atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. Pic. Complement System. Hemagglutination. Mucinolytic activity. Colonization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição global das causas de morte entre crianças com idade < 5 anos.....	19
Figura 2 - Sistemas de secreção em bactérias Gram negativas.....	29
Figura 3 - Esquema de secreção dos subgrupos do SSTV.....	36
Figura 4 - Estrutura geral das SPATEs.....	38
Figura 5 - Análise filogenética da sequência de aminoácidos das SPATEs.....	39
Figura 6 - Imunodeteção da proteína Pic.....	66
Figura 7 - Imunofluorescência para detecção da proteína Pic secretada durante a interação das cepas BA589 e 042 com células HEp-2.....	66
Figura 8 - Curva de crescimento das cepas BA589 e 042.....	68
Figura 9 - Imunodeteção da proteína Pic em cultura bacteriana.....	69
Figura 10 - Quantificação da proteína Pic por ELISA.....	70
Figura 11 - Testes de adesão em células HEp-2.....	71
Figura 12 - Teste de FAS em células HEp-2.....	72
Figura 13 - Esquema da estratégia de sequenciamento do gene <i>pic</i> da cepa BA589.....	73
Figura 14 - Alinhamento da sequência completa de <i>pic</i> de BA589 com EAEC 042.....	74
Figura 15 - Análise da sequência de <i>pic</i> da cepa BA589 pelo programa BLAST.....	78
Figura 16 - Análise do perfil plasmidial da cepa BA589.....	79
Figura 17 - Localização do gene <i>pic</i> através de <i>Southern blot</i>	80
Figura 18 - Verificação da presença do gene <i>pic</i> nas cepas BA589 curadas através de <i>Southern blot</i>	82
Figura 19 - Análise por SDS-PAGE (12%) e imunodeteção de Pic nos sobrenadantes de cultura das cepas curadas.....	83
Figura 20 - Eletroforese em gel de agarose (1,0%) dos fragmentos amplificados por reação de PCR a partir do plasmídeo pKD3, referentes ao cassete de resistência ao cloranfenicol.....	84
Figura 21 - Esquema de mutagênese pelo sistema lambda-red usado na deleção do gene <i>pic</i> da cepa BA589.....	85

Figura 22 - Eletroforese em gel de agarose (1,0%) dos fragmentos amplificados por reação de PCR das cepas transformantes, após mutagênese pelo sistema lambda-red.....	86
Figura 23 - Imunodeteção da proteína Pic nos mutantes.....	87
Figura 24 - Eletroforese em gel de agarose (1,0%) dos fragmentos amplificados a partir dos iniciadores <i>pic1a</i> (F) e <i>pic4c</i> (R) que amplificam o gene <i>pic</i> completo por reação de PCR.....	88
Figura 25 - Sequenciamento do mutante BA589 Δ <i>pic1</i>	89
Figura 26 - Análise da sequência do cassete de cloranfenicol no mutante BA589 Δ <i>pic1</i> pelo programa BLAST.....	90
Figura 27 - Curva de crescimento de BA589 e do mutante BA589 Δ <i>pic1</i>	90
Figura 28 - Análise por SDS-PAGE (10%) dos sobrenadantes após concentração utilizando Vivaspín 100 kDa e coloração com Comassie Blue.....	91
Figura 29 - Cromatograma obtido no sistema AKTA após gel filtração da proteína Pic.....	92
Figura 30 - Análise por SDS-PAGE (10%) das frações obtidas no primeiro pico do AKTA após coloração com Comassie Blue.....	93
Figura 31 - Imunodeteção de Pic após gel filtração.....	94
Figura 32 - Ensaio de sobrevivência da cepa BA589 e DH5 α	95
Figura 33 - Clivagem de moléculas do sistema complemento.....	96
Figura 34 - Esquema da clivagem de moléculas do complemento pela proteína Pic.....	97
Figura 35 - Atividade mucinolítica da proteína Pic.....	99
Figura 36 - Curva de crescimento de BA589.....	100
Figura 37 - Eletroforese em gel de agarose (1%) dos fragmentos amplificados por reação de PCR para o gene <i>pic</i> , a partir das fezes dos camundongos recém-chegados ao laboratório...	101
Figura 38 - Eletroforese em gel de agarose (1%) dos fragmentos amplificados por reação de PCR para o gene <i>pic</i> , após inoculação da cepa BA589.....	102
Figura 39 - Gráfico da colonização dos camundongos tratados com estreptomicina após infecção com BA589.....	103
Figura 40 - Microscopia eletrônica de varredura do intestino de camundongos infectados com BA589 e seu mutante BA589 Δ <i>pic</i>	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência de iniciadores, fragmentos amplificados e ciclos de amplificação das PCR para o sequenciamento do gene <i>pic</i> na cepa de aEPEC BA589.....	50
Tabela 2 - Sequência dos iniciadores, ciclos de amplificação e tamanho dos fragmentos amplificados nas reações de PCR para os marcadores de virulência de outros patótipos de DEC.....	51
Tabela 3 - Sequência de iniciadores, fragmentos amplificados e ciclos de amplificação das PCR usados para a mutagênese do gene <i>pic</i> pelo sistema lambda-red.....	55
Tabela 4 - Distribuição dos genes de virulência de autotransportadoras em amostras de EPEC atípica.....	65
Tabela 5 - Atividade de hemaglutinação da Proteína Pic.....	98

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	18
1.1 Diarreia infecciosa.....	18
1.2 <i>Escherichia coli</i> patogênicas.....	20
1.3 Proteases.....	26
1.4 Sistemas de Secreção.....	28
1.4.1 Sistema Sec.....	29
1.4.2 Sistema Tat.....	30
1.4.3 Sistema de Secreção Tipo I.....	30
1.4.4 Sistema de Secreção Tipo II.....	31
1.4.5 Sistema de Secreção Tipo III.....	31
1.4.6 Sistema de Secreção Tipo IV.....	32
1.4.7 Sistema de Secreção Tipo VI.....	33
1.4.8 Sistema de Secreção Tipo VII.....	33
1.4.9 Sistema de Secreção Tipo VIII.....	34
1.4.10 Sistema de Secreção Tipo V.....	35
1.4.10.1 SPATEs.....	38
2 OBJETIVO.....	42
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.1 Cepas bacterianas.....	43
3.2 Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos.....	43
3.3 Teste de adesão da cepa BA589 em células HEp-2	44
3.4 Teste de FAS (<i>Fluorescent Actin Staining</i>)	45
3.5 Imunofluorescência e microscopia confocal.....	45
3.6 Detecção da proteína Pic.....	46
3.6.1 Preparo das cepas para obtenção de Pic.....	46
3.6.2 Análise das proteínas através de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).....	46
3.6.3 Western blotting.....	47
3.6.4 Imunodetecção.....	47
3.6.5 Quantificação de Pic em sobrenadante de cultura.....	48
3.6.5.1 ELISA.....	48

3.7 Técnicas de biologia molecular.....	48
3.7.1 <i>Reação em cadeia da polimerase (PCR).....</i>	49
3.7.2 <i>Eletroforese em gel de agarose.....</i>	56
3.7.3 <i>Sequenciamento do gene pic.....</i>	56
3.7.4 <i>Análise do perfil plasmidial.....</i>	56
3.7.5 <i>Southern blotting do perfil plasmidial.....</i>	57
3.7.5.1 <u>Preparo e marcação da sonda genética.....</u>	57
3.7.5.2 <u>Hibridização e revelação.....</u>	57
3.7.6 <i>Cura plasmidial.....</i>	58
3.8 Deleção do gene <i>pic</i> pelo sistema lambda-red.....	59
3.8.1 <i>Construção do mutante.....</i>	59
3.8.2 <i>Preparo de células eletrocompetentes.....</i>	59
3.8.3 <i>Transformação com pKOBEG e seleção de colônias.....</i>	59
3.8.4 <i>Transformação com pKD3 e seleção de recombinantes.....</i>	60
3.9 Purificação da proteína Pic_{BA589}.....	60
3.10 Atividades biológicas de Pic₅₈₉ <i>in vitro</i>.....	61
3.10.1 <i>Hemaglutinação.....</i>	61
3.10.2 <i>Atividade mucinolítica.....</i>	61
3.10.3 <i>Resistência à atividade bactericida do soro.....</i>	61
3.10.4 <i>Clivagem de moléculas do sistema complemento.....</i>	62
3.11 Atividade biológica da cepa BA589 em modelo animal.....	62
3.11.1 <i>Curva de crescimento de BA589.....</i>	62
3.11.2 <i>Diluições logarítmicas e contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) de BA589.....</i>	63
3.11.3 <i>Modelo de camundongos tratados com estreptomicina.....</i>	63
3.11.4 <i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....</i>	64
4 RESULTADOS.....	65
4.1 Pesquisa de genes de autotransportadoras de outras DEC em amostras de aEPEC.....	65
4.2 Produção de Pic pela cepa BA589.....	66
4.3 Secreção de Pic durante a interação de BA589 com células HEp-2.....	67
4.4 Quantificação de Pic em sobrenadante de cultura bacteriana.....	68
4.5 Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos.....	70
4.6 Teste de adesão da cepa BA589 em células HEp-2.....	70

4.7 Pesquisa de genes de virulência de outros patótipos de DEC.....	72
4.8 Sequenciamento de <i>pic</i> da cepa BA589.....	73
4.9 Análise da localização de <i>pic</i> na cepa BA589.....	78
4.10 Deleção do gene <i>pic</i> pelo sistema lambda-red.....	83
4.11 Purificação de Pic.....	91
4.12 Análise das atividades de Pic <i>in vitro</i>.....	94
4.12.1 Clivagem de moléculas do complemento.....	94
4.12.2 Atividade de hemaglutinação.....	98
4.12.3 Atividade mucinolítica.....	99
4.13 Atividade biológica de BA589 em modelo animal.....	99
4.13.1 Curva de crescimento de BA589.....	99
4.13.2 Modelo de colonização com camundongos tratados com estreptomicina.....	100
5 DISCUSSÃO.....	105
6 CONCLUSÃO.....	120
REFERÊNCIAS.....	121
ANEXOS	
A – Autotransporter protein-encoding genes of diarrheagenic <i>Escherichia coli</i> are found both typical and atypical Enteropathogenic <i>E. coli</i> strains.....	149
B – The serine protease Pic from Enteroaggregative <i>Escherichia coli</i> mediates immune evasion by the direct cleavage of complement proteins.....	153

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Diarreia infecciosa

A diarreia infecciosa é considerada um dos grandes problemas de saúde pública mundial (BLACK et al., 2010). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a diarreia é definida como sendo a ocorrência de três ou mais evacuações com fezes líquidas ou semilíquidas num período de 24 horas (THAPAR; SANDERSON, 2004). É uma manifestação decorrente de uma disfunção gastrointestinal que resulta na perda de água, eletrólitos e nutrientes pelas fezes, podendo ter várias origens (O'RYAN; PRADO; PICKERING, 2005). Na década de 80 era a principal causa de mortalidade infantil e responsável por cerca de seis milhões de mortes ao ano em todo o mundo (THAPAR; SANDERSON, 2004). Nas últimas décadas houve uma diminuição no índice de mortalidade devido ao uso de sais para reidratação oral (SRO), melhoramento do saneamento básico, maior cobertura da vacinação contra rotavírus e sarampo, nutrição, aleitamento materno e higiene pessoal. Contudo, a diarreia continua sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade infantil. É a segunda causa de morte entre crianças < 5 anos em países em desenvolvimento, com cerca de 1,5 milhão de vítimas a cada ano. Esse número é maior do que as mortes causadas por AIDS, malária e sarampo juntos (Figura 1).

De acordo com o Fundo das Nações Unidas para a Infância ou UNICEF (*United Nations Children's Fund*), a pneumonia e a diarreia são responsáveis por 30% das mortes infantis. Cerca de 90% dessas mortes são atribuídas à má qualidade da água para consumo, saneamento inadequado e falta de higiene (UNICEF, 2012).

Com base nos parâmetros clínicos a diarreia pode ser classificada em três categorias: aguda, disenteria e persistente. A diarreia aguda é definida como a ocorrência de três ou mais episódios de fezes aquosas em um período de 24 horas, o que pode levar a uma perda de eletrólitos e rápida desidratação. A disenteria, também conhecida como diarreia sanguinolenta, é uma doença invasiva acompanhada de febre, dores abdominais, tenesmos e passagem de pequenas quantidades de fezes contendo sangue, muco e pus. Quando os episódios diarreicos possuem uma duração igual ou superior a 14 dias a diarreia é conhecida como persistente (EDGEWORTH, 2005; PODEWILS et al., 2004; UNICEF, 2012).

Figura 1 - Distribuição global das causas de morte entre crianças com idade < 5 anos.

Fonte: UNICEF, 2012.

Os critérios para decidir se o tratamento da diarreia deve ser medicamentoso ou não são controversos. Em casos onde o paciente apresenta uma doença invasiva com febre e presença de fezes contendo sangue e pus é indicado o uso de antibióticos (EDGEWORTH, 2005). Contudo, na maioria dos casos a antibioticoterapia não é indicada, tendo em vista que o uso de antibióticos possibilita o surgimento de patógenos resistentes às drogas. Em alguns casos, a exemplo de bactérias produtoras da toxina Shiga, o uso de antibióticos promove um maior agravamento do quadro clínico decorrente do estresse sofrido pelo patógeno e como consequência há um aumento na produção e liberação de toxina no meio. Desta forma, o tratamento da diarreia baseia-se principalmente na administração de SRO, suplementação com vitamina A e, em alguns casos, administração de zinco que reduz a gravidade e a duração dos episódios, além de diminuir o volume de fezes devido à maior captação do SRO. Estudos mostram que crianças ao receberem zinco no tratamento frequentemente têm maior apetite e são mais ativas durante os episódios de diarreia (PODEWILS et al., 2004; UNICEF, 2012).

Quando a diarreia é do tipo infecciosa ela pode ser causada por um amplo número de patógenos, incluindo bactérias, vírus e protozoários, que possuem um modo similar de transmissão: fecal-oral. Dentre os principais agentes virais, o Rotavírus é o responsável pela

maioria dos casos. Os protozoários *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum* e *Entamoeba histolytica* também contribuem para o aumento no número de casos, principalmente nos países em desenvolvimento. Entre as bactérias patogênicas, *Escherichia coli*, *Shigella* spp., *Campylobacter* spp., *Vibrio* spp. e *Salmonella* spp. são as principais causas de diarreia na infância (PODEWILS et al., 2004) e podem causar gastroenterites por um dos três mecanismos principais: produção de toxinas que geralmente promovem vômitos e cólicas abdominais; secreção de toxinas após adesão às células epiteliais que causam a síndrome da diarreia aquosa e invasão da mucosa intestinal causando disenteria e febre (EDGEWORTH, 2005).

1.2 *Escherichia coli* patogênicas

Membros da família Enterobacteriaceae são importantes patógenos humanos, especialmente em ambientes hospitalares, onde causam os mais variados tipos de infecção, tais como infecções do trato urinário, pneumonias, meningites, abscessos, feridas cirúrgicas, sepse e, principalmente, infecções intestinais causando diarreia (PATERSON, 2006; SADER et al., 2001).

As enterobactérias são de grande importância, não apenas por seus fatores de virulência, mas porque apresentam resistência a várias classes de antimicrobianos. Constituem 80% dos isolados de bacilos Gram negativos de importância médica e 50% das bactérias isoladas nos laboratórios de microbiologia. Estes micro-organismos causam uma série de doenças humanas, incluindo 30 a 35% de todos os casos de sepse e mais de 70% das infecções das vias urinárias e infecções intestinais (TRAUTNER; DAUROWCH, 2004).

Compreendidos na família Enterobacteriaceae, os gêneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* e *Yersinia* são considerados de maior importância médica. Estão dispersos na natureza, encontrados em plantas, solo, água e microbiota normal do trato intestinal dos animais e seres humanos, podendo estar associados com infecções comunitárias e hospitalares, oportunistas ou não (FARMER III; BOATWRIGHT; JANDA, 2007).

Importante espécie desta família, a *E. coli* é um dos micro-organismos mais versáteis encontrados na natureza. De ampla distribuição, normalmente coloniza o trato gastrointestinal de humanos e animais, onde faz parte da microbiota e estabelece uma relação mutuamente benéfica com seu hospedeiro. É um dos primeiros gêneros bacterianos a colonizar o trato gastrointestinal humano, já identificada nos primeiros meses de vida, sendo um dos

constituintes principais da microbiota intestinal até o fim da vida (GUARNER; MELAGELADA, 2003; NOVERR; HUFFNAGLE, 2004). A bactéria foi isolada e identificada em 1885 pelo alemão Theodor Escherich com o nome de *Bacterium coli commune* (ESCHERICH, 1988), entretanto, só passou a ser conhecida por *E. coli* em 1919 em homenagem ao pesquisador que a descreveu (CHEN; FRANKEL, 2005; COWAN, 1954). É um bacilo Gram negativo, oxidade-negativo, capaz de crescer tanto em ambientes aeróbicos quanto anaeróbicos, preferencialmente a 37 °C, podendo ainda ser móvel ou não. É facilmente isolada de amostras fecais através do cultivo em meios seletivos e a mudança de pH do meio, devido à fermentação da lactose, pode ser usada para diferenciar entre fermentadora ou não de lactose, uma vez que as *E. coli* lactose positivas aparecem vermelhas ou rosas em meio ágar MacConkey (CROXEN et al., 2013).

Em 1944, o dinamarquês Fritz Kauffman propôs um esquema para a classificação de *E. coli* com base nos seus perfis antigênicos: O (somático), H (flagelar) e K (capsular) (EDWARDS; EWING, 1972; LIOR, 1996). Desta forma, uma combinação específica dos antígenos O e H definem o sorotipo de um isolado. Essa tipagem foi muito útil e demonstrou que as linhagens de *E. coli* associadas às epidemias de diarreia entre as décadas de 20 e 40 pertenciam a um número pequeno de sorogrupos O, particularmente O55 e O111 (HINTON; MACGREGOR, 1958; NETER et al., 1951). Métodos moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de genes envolvidos na biogênese dos antígenos O e H podem também ser utilizados para a identificação de sorotipos (DEBROY; ROBERTS; FRATAMICO, 2011; WANG, 2003). A designação de NM ou H⁻ indica a ausência do antígeno H e que o isolado é não móvel. Atualmente existem 174 antígenos O e 53 antígenos H descritos, entretanto, apenas um pequeno número de sorotipos (combinação O:H) estão associados com doenças (CROXEN et al., 2013; DEBROY; ROBERTS; FRATAMICO, 2011; WANG et al., 2003).

As *E. coli* comensais raramente causam doenças, exceto em hospedeiros imunocomprometidos ou quando a barreira gastrointestinal é violada, a exemplo da peritonite. Entretanto, existem clones de *E. coli* altamente adaptados que têm adquirido atributos específicos de virulência e que, desta forma, conferem a estas bactérias uma maior habilidade para adaptarem-se a novos nichos, permitindo causar um amplo espectro de doenças. Esses atributos de virulência são frequentemente codificados por elementos genéticos que podem se mobilizados em diferentes cepas para criar novas combinações de fatores de virulência (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Uma vez adquiridos fatores de virulência, as *E. coli* podem causar doenças que vão desde as infecções intestinais até aquelas que afetam órgãos extra-intestinais causando infecções do trato urinário, sepses e meningites. São exemplos as *E. coli* uropatogênicas (UPEC) e as *E. coli* causadora de meningite em neonatos (NMEC) (CLEMENTS et al., 2012; NATARO; KAPER, 1998; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

E. coli é também o agente infeccioso mais frequente nas formas endêmicas da diarreia infantil (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002). Amostras de *E. coli* associadas a essas infecções intestinais são denominadas *E. coli* diarreiogênicas (DEC) e podem ser classificadas em seis categorias ou patótipos, de acordo com suas características de virulência e manifestações clínicas que causam. Esses patótipos são: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) e *E. coli* que adere difusamente em cultura de células epiteliais (DAEC) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; NATARO; KAPER, 1998).

EPEC tem sido identificada como um dos principais agentes de diarreia aguda na infância em países em desenvolvimento (HERNANDES et al., 2009; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; NATARO; KAPER, 1998) e foi o primeiro patótipos a ser identificado. O termo "EPEC" foi utilizado em 1955 (NETER et al., 1955) para descrever um número de cepas de *E. coli* epidemiologicamente relacionada a uma série de surtos de diarreia infantil nas décadas de 40 e 50 (BRAY, 1945; ROBINS-BROWNE, 1987).

Cepas de EPEC colonizam o intestino delgado e são caracterizadas pela capacidade de causar uma lesão histopatológica no epitélio intestinal denominada lesão *attaching-effacing* (lesão A/E), que é desencadeada por proteínas codificadas por genes presentes em uma ilha de patogenicidade denominada região LEE (*locus of enterocyte effacement*) (FRANKEL et al., 1998; MCDANIEL et al. 1995). Esta lesão é caracterizada pela desestruturação das microvilosidades intestinais, aderência íntima da bactéria à célula epitelial e reorganização do citoesqueleto, levando à formação de um pedestal onde a bactéria permanece intimamente aderida (MOON et al., 1983). A região LEE contém 41 genes e é complexamente regulada. Codifica um sistema de secreção tipo III (SSTIII) que transloca proteínas efetoras da bactéria para o citoplasma da célula hospedeira (DENG et al., 2004; HACKER; KAPER, 2000). Além desses efetores, algumas cepas de EPEC também codificam proteínas associadas à virulência, a exemplo de EspC, uma serinoprotease que atua como uma enterotoxina, causando efeitos citopáticos em células de cultura de tecidos (NAVARRO-GARCIA et al., 2004) e segmentos intestinais de ratos (MELLIES et al., 2001), além de promover a clivagem de importantes

substratos biológicos, como o fator V da cascata de coagulação, pepsina e espectrina (DUTTA et al., 2002).

Em 1995, as EPEC foram classificadas em típicas e atípicas. A diferença básica entre os dois grupos é a presença do plasmídeo EAF em tEPEC e sua ausência nas aEPEC (KAPER, 1996). Neste plasmídeo está localizado o operon *bfp*, que codifica a fímbria *bundle forming pilus* (BFP) (GIRÓN; HO; SCHOOLNIK, 1993).

Encontram-se também no pEAF o operon *per* (*plasmid encoded regulator*), o qual codifica um complexo regulador dos genes de virulência de EPEC (TOBE et al., 1999), além de uma sequência genética conhecida como sonda EAF, utilizada como diagnóstico molecular de tEPEC (BALDINI; NATARO; KAPER, 1986). A interação com as células epiteliais e a formação da lesão A/E por aEPEC é tardia em comparação com tEPEC, já que aEPEC não carrega o pEAF e, portanto, não expressa BFP e o regulador Per (BUERIS et al., 2015). A participação de outras adesinas, bem como do flagelo, são importantes nessa etapa da patogênese (GIRÓN et al., 2002; SAMPAIO et al., 2009).

Em tEPEC a fímbria BFP é responsável pelo estabelecimento do padrão de adesão localizada (AL), caracterizado por grupos compactos de bactérias na superfície celular de culturas de células epiteliais (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002). As aEPEC, por não possuírem o plasmídeo EAF, exibem o padrão conhecido como adesão localizada-like (AL-L) (RODRIGUES et al., 1996; SCALETISKY et al., 1999), ou exibem os padrões de aderência difusa (AD), agregativo (AA) ou localizado (AL₆) após seis horas de interação com células epiteliais (ABE et al., 2009; DULGUER et al., 2003; HERNANDES et al., 2009; ROBINS-BROWNE et al., 2004; VIEIRA et al., 2001).

No passado, as tEPEC foram mais comuns em países em desenvolvimento, onde eram encontradas fortemente associadas com diarreia aguda em crianças até 1 ano de idade, enquanto cepas de aEPEC foram mais frequentemente isoladas de crianças de países industrializados (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002). Vários estudos epidemiológicos recentes demonstraram que aEPEC é mais prevalente do que tEPEC, tanto em países em desenvolvimento como nos industrializados, onde essas cepas são encontradas em associação com diarreia endêmica e em surtos (OCHOA; CONTRERAS, 2011).

Outro patótipo de *E. coli*, STEC, foi primeiramente identificada em 1982 como agente de um surto de diarreia sanguinolenta e síndrome hemolítica urêmica (SHU) nos Estados Unidos (RILEY et al., 1983) e é caracterizada por sua habilidade para produzir a toxina Shiga (Stx) (O'BRIEN et al., 1982). Essa potente toxina é codificada por um fago e possui duas variantes, Stx1 e Stx2, sendo a Stx2 mais comum entre os isolados humanos (JOHANNES;

ROMER, 2010; ROMER et al., 2007). Como mecanismo de ação inibem a síntese proteica ao se ligarem a receptores Gb3 (globotriaosil ceramida) encontrados em elevadas concentrações no tecido renal e células do endotélio microvascular (PATON; MORONA; PATON, 2000), trato gastrointestinal e outros órgãos como cérebro, pâncreas e pulmões (BIELASZEWSKA et al., 1997).

Mais de 380 diferentes sorotipos de STEC têm sido isolados de humanos e animais, mas, somente um pequeno número desses sorotipos causam doenças em humanos. Destes, o sorotipo O157:H7 é o mais importante e faz parte de um subgrupo de STEC denominado *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (KARMALI; GANNON; SARGEANT, 2010; NGUYEN; SPERANDIO, 2012). EHEC causa um amplo espectro de doença em humanos, compreendendo desde casos assintomáticos até casos graves como a colite hemorrágica que pode evoluir para diversas patologias, dentre elas, SHU, púrpura trombocitopênica trombótica (PTT), cistite hemorrágica e até anormalidades neurológicas (KARMALI et al., 1983; KARMALI, 1989; GRIFFIN; TAUXE, 1991).

A capacidade de produzir uma ou mais toxinas Shiga é uma característica marcante das EHEC. No entanto, outros fatores são importantes para a virulência, como o plasmídeo pO157, que codifica para diversos fatores de virulência (MEAD; GRIFFIN, 1998; SCHMIDT; KERNBACH; KARCK, 1996) e, assim como as EPEC, possuem a ilha de patogenicidade LEE, que codifica o sistema de secreção tipo III e diversas proteínas efetoras (KRESSE et al., 1998; OGIERMAN; PATON; PATON, 2000). Além destes, algumas cepas ainda produzem serinoproteases, como EspP (BRUNDER, SCHMIDT; KARCH, 1997), EspI (SCHMIDT et al., 2001), Sab (HEROLD; PATON; PATON, 2009), EpeA (LEYTON et al., 2003), dentre outras.

EAEC é conhecida como um agente de doença diarreica aguda e persistente que afeta crianças e adultos (ESTRADA-GARCIA; NAVARRO-GARCIA, 2012; WANKE et al., 1991), pacientes imunocomprometidos (MATHEWSON et al., 1998), sendo também um agente causador da diarreia do viajante (OKHUYSEN; DUPONT, 2010). Além disso, EAEC foi descrita, recentemente, como sendo um agente causador de ITU (BOLL et al., 2013; OLESEN et al., 2012), podendo alcançar a circulação sanguínea por via ascendente e promover bacteremia e sepse (HERZOG et al., 2014).

O termo enteroaderente agregativo foi estabelecido por Nataro et al. (1987) ao analisar mais de 500 cepas de *E. coli* isoladas em um estudo epidemiológico sobre etiologia de diarreia aguda em crianças no Chile. Essas cepas apresentavam uma interação distinta com células HEp-2, denominada adesão agregativa (AA), onde as bactérias aderiam-se umas às

outras, à superfície da célula e à superfície da lamínula, em uma configuração que lembrava tijolos empilhados. Anos depois o patótipo passou a ser conhecido como EAEC (BAUDRY et al., 1990).

Dados obtidos a partir de vários estudos sugerem três principais características da patogênese EAEC: adesão inicial à mucosa intestinal (HICKS; CANDY; PHILLIPS, 1996; TZIPORI et al., 1992), elaboração de enterotoxinas e citotoxinas (BEHRENS; SHEIKH; NATARO, 2002; ESLAVA et al., 1998; FASANO et al., 1995; HENDERSON et al., 1999; MULLER et al., 2009), e indução do processo inflamatório da mucosa intestinal com liberação de citocinas (BOUCKENOOGHE et al., 2000; HARRINGTON et al., 2005; JIANG et al., 2002). Dentre as toxinas importantes para o estabelecimento dessa patogênese estão as serinoproteases Pic e Pet (ESLAVA et al., 1998; HENDERSON et al., 1999).

ETEC é frequentemente associada com a diarreia do viajante e é uma das principais causas de mortalidade infantil em países em desenvolvimento (CROXEN; FINLAY, 2010; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; NATARO; KAPER, 1998; QADRI et al., 2005). Este patótipo adere à mucosa intestinal através de seus fatores de colonização e em alguns casos com a participação das adesinas Tia (ELSINGHORST; KOPECKO, 1992) e da autotransportadora TibA (ELSINGHORST; WEITZ, 1994; LINDENTHAL; ELSINGHORST, 1999; TURNER, S. M. et al., 2006). O processo diarreico tem sido atribuído à secreção da enterotoxina termolábel (LT), termoestável (ST) ou pela combinação de ambas (CROXEN; FINLAY, 2010). Outro fator de virulência secretado por ETEC é a serinoprotease EatA (PATEL et al., 2004).

As EIEC possuem sua bioquímica, genética e mecanismos de patogênese muito relacionados com *Shigella* spp. (KAPER; O'BRIEN, 2014). Alguns estudos têm mostrado que *E. coli* e *Shigella* são taxonomicamente indistinguíveis a nível de espécie (PUPO; LAN; REEVES, 2000; WEI et al., 2003), sendo ambos os patógenos, intracelulares facultativos e causadores da disenteria bacilar (CROXEN et al., 2013). A patogênese se dá a partir da penetração na célula epitelial, seguido de lise do vacúolo endocítico, multiplicação intracelular, movimento através do citoplasma e extensão para as células adjacentes (SANSONETTI, 2002). Os genes requeridos para a patogênese de EIEC estão presentes em um plasmídeo de 213 kb (pWR100) (BUCHRIESER et al., 2000).

DAEC é assim denominada devido ao seu padrão de adesão difusa em células epiteliais (NATARO et al., 1987). Esse padrão é mediado por proteínas codificadas por uma família de operons, que incluem adesinas fimbriais (Dr e F1845), e adesinas não fimbriais (Afa), coletivamente designadas adesinas Afa-Dr (SERVIN, 2005). Diferente dos outros

patótipos, a patogênese de DAEC parece ser predominantemente mediada pela interação dessas adesinas com a célula hospedeira. Entretanto, algumas cepas secretam uma proteína autotransportadora, Sat, que causa lesões nas junções oclusivas (GUIGNOT et al., 2007), promove efeito citopático em células epiteliais, além de clivar espectrina e fator V da cascata de coagulação (GUYER et al., 2000).

Uma característica em comum a todos esses patótipos de *E. coli* é a secreção de proteases. Essas proteínas estão envolvidas em diversos processos celulares e extracelulares importantes para a sobrevivência da célula (PAGE; Di CERA, 2008a) e estão entre os polímeros biológicos mais estáveis. Possuem ligações peptídicas que podem resistir por várias horas em ácidos concentrados ou altas temperaturas, porém duram microssegundos na presença de proteases específicas. Estas enzimas realizam a clivagem proteolítica de ligações peptídicas, sendo uma das mais importantes e frequentes encontradas em todos os organismos (DRAG; SALVESEN, 2010). Algumas dessas proteases são fatores de virulência importantes atuando como toxinas com diferentes alvos celulares (HENDERSON; NAVARRO-GARCIA; NATARO, 1998).

1.3 Proteases

O estudo da proteólise iniciou-se no século XIX com a descrição da pepsina por Schwann em 1936 e da tripsina por Corvisart em 1956 (DRAG; SALVESEN, 2010). Desde então, as proteases têm sido identificadas em quase todos os organismos. Dados do genoma de organismos sequenciados até o momento estimam que pelo menos 2% das proteínas codificadas seriam proteases, sugerindo a participação destas em muitas vias biológicas e também implicadas em muitas doenças (LOPEZ-OTIN; OVERALL, 2002).

As proteases desempenham uma ampla variedade de processos fisiológicos e patológicos, como por exemplo, elas regulam a função, localização e atividade de muitas proteínas, modulam as interações proteína-proteína, transporte e secreção de proteínas através das membranas, criam novas moléculas bioativas, contribuem para o processamento de informação intracelular, geram, traduzem e amplificam sinais moleculares. As enzimas proteolíticas também influenciam a replicação e transcrição do DNA, proliferação e diferenciação celular, respostas de choque térmico e desnaturação proteica, angiogênese, neurogênese, ovulação, fertilização, cicatrização, mobilização de células-tronco, hemostasia, coagulação sanguínea, inflamação, imunidade, crescimento de tumores e metástases, necrose, apoptose, dentre outras (BARRET; RAWLINGS; WOESSNER, 1998; CRAIK, PAGE;

MADISON, 2011; DIAMMOND, 2007; GILL et al., 1996; RAO et al., 1998; STERNLICHT; WERB, 2001; WILSON; VOGEL; SOMERVILLE, 1997).

Todas essas funções desempenhadas pelas proteases fazem com que alterações nos sistemas proteolíticos causem um amplo espectro de doenças tais como distúrbios da coagulação, câncer, AIDS, doenças neurodegenerativas, inflamatórias e cardiovasculares, levando estas enzimas a serem um dos principais focos de atenção das indústrias farmacêuticas tanto como potenciais alvos de drogas como também na forma de biomarcadores para diagnóstico e prognóstico (ADAMS; KAUFFMAN, 2004; DRAG; SALVESEN, 2010; GREEN; EVAN, 2002; HU et al., 2007; KRISHNASWAMY, 2005; MOHAMED; SLOANE, 2006; OVERALL; DEAN, 2006; RAO et al., 1998; RIJKEN; LIJNEN, 2009). Estima-se que 5-10% de todos os alvos farmacêuticos que estão relacionados ao desenvolvimento de drogas sejam proteases (CRAIK; PAGE; MADISON, 2011; DRAG; SALVESEN, 2010). Além da indústria farmacêutica, as proteases são de grande utilização e interesse na pesquisa básica e em outras indústrias. São largamente utilizadas na indústria de alimentos, cosméticos, detergentes, couro e produção de ração animal, dentre outras (BAJPAI, 1999; GUTIÉRREZ; DEL RIO; MARTÍNEZ, 2009; IZADPANAH; GALLO, 2005; JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006; MADHAVI et al., 2014; PINHEIRO DA SILVA; MACHADO, 2012; RAO et al., 1998; SAEKI et al., 2007). Outra possível aplicação que vem sendo explorada é a utilização das proteases como agentes biorremediadores no tratamento de resíduos industriais (RAO et al., 1998).

As proteases são classificadas de acordo com seus sítios de ação, sendo divididas em dois grupos principais: as endopeptidases e as exopeptidases. Exopeptidases clivam ligações peptídicas próximas da extremidade amino ou carboxi-terminal do substrato, sendo assim subdivididas em amino e carboxi-peptidases. As endopeptidases clivam ligações peptídicas distantes das extremidades do substrato e são subdivididas em sete tipos catalíticos: serinoproteases, metaloproteases, cisteíno proteases, aspártico proteases, treonino proteases, glutâmico proteases e asparagino peptídeo liases (BARRET; RAWLINGS; WOESSNER, 2003; HARTLEY, 1960; KEIL, 1992; MADHAVI et al., 2014; RAWLINGS; BARRETT, BATEMAN, 2011).

Entretanto, um dos maiores desafios que as células eucariotas e procariotas possuem é o de transportar, de forma eficiente, proteínas do seu sítio de síntese no citosol para os sítios onde irão exercer suas funções (KUDVA et al., 2013). Como cerca de 40% de todas as proteínas de bactérias estão localizadas fora do citosol é evidente que a secreção dessas proteínas para o meio externo é vital para a sobrevivência das células (HOLLAND, 2010).

1.4 Sistemas de secreção

O termo “secreção de proteínas” descreve o transporte ativo de proteínas do citoplasma celular através das membranas interna e externa até o sobrenadante na bactéria ou superfície da célula (PUGSLEY, 1993).

A secreção de proteínas em bactérias é essencial para aquisição de nutrientes, biogênese de organelas, como fímbrias e flagelos, virulência, efluxo de drogas, comunicação intra e interespecífica, sobrevivência e adaptação em diversos meios (DAUTIN; BERNSTEIN, 2007). Entretanto, o citoplasma celular é separado do meio externo por uma bicamada de fosfolipídeos, que além promover o controle osmótico da célula é uma barreira para diversas substâncias. Para permitir a passagem de proteínas através da membrana citoplasmática, sem que haja comprometimento de sua estrutura e função, vários mecanismos de transporte estão envolvidos (NATALE; BRUSER; DRIESSEN, 2008).

Em bactérias Gram positivas as proteínas geralmente utilizam apenas o sistema Sec para atravessar a membrana celular e alcançar o meio extracelular ou para se ancorar na membrana (NAVARRE; SCHNEEWIND, 1999). Entretanto, em bactérias Gram negativas esse mecanismo é mais complexo devido à presença de uma membrana externa e um espaço periplamático que separa as duas membranas. Logo, exportar estas proteínas para a superfície da bactéria envolve o transporte através da membrana interna, periplasma e membrana externa. Para tanto, diversos sistemas de transportes estão envolvidos neste processo, os quais são identificados por algarismos romanos que vão de I a VIII, de acordo com ordem que foram descritos (figura 2).

Figura 2 - Sistemas de secreção em bactérias Gram negativas.

Fonte: Desvaux et al. (2009).

Alguns desses sistemas são conhecidos por serem dependentes do sistema geral de secreção (*Sec-pathway*) ou do sistema Tat (*twin-arginine translocation*) (DESVAUX et al., 2009; HENDERSON; NAVARRO-GARCIA; NATARO, 1998; KUDVA et al., 2013; NATALE; BRUSER; DRIESSEN, 2008).

1.4.1 Sistema Sec

As proteínas secretadas via sistema Sec utilizam uma maquinaria comum para o transporte através da membrana interna e são diferenciadas pelo seu mecanismo de secreção através da membrana externa. Possuem um peptídeo sinal e são, assim, reconhecidas pela chaperona citoplasmática SecB ou pela SRP (*signal recognition particle*) (ESER; EHRMANN, 2003). O complexo SecB-proteína tem como alvo a translocase formada pela proteína SecA,

que funciona como um motor molecular ao qual o complexo se liga, e pelas outras proteínas do sistema: SecD, SecE, SecF e SecY, que formam o canal condutor. No periplasma, as proteínas atravessam a membrana externa pelos sistemas tipo II ou V (HUECK, 1998; MURPHY; BECKWITH, 1996).

1.4.2 Sistema Tat

As proteínas transportadas por esta via possuem um motivo de argininas geminadas em seu peptídeo sinal (BERKS; SARGENT; PALMER, 2000; PALMER; BERKS, 2012). Em *E. coli*, esse sistema é composto por três proteínas de membrana, denominadas TatA, TatB, e TatC (CLINE; McCAFFERY, 2007). As proteínas TatB e TatC formam um complexo integrado à membrana que reconhece o peptídeo sinal da proteína alvo. A proteína, então, é translocada para o periplasma através do canal formado pelas proteínas TatA e o complexo TatBC se dissocia novamente (PALMER; BERKS, 2012).

A diferença fundamental entre os dois sistemas é que o aparato Sec transloca polipeptídeos um estado não dobrado, enquanto que a via Tat transporta proteínas já dobradas (PALMER; BERKS, 2012).

1.4.3 Sistema de secreção do tipo I (SSTI)

O SSTI é também chamado de transportador do tipo ABC (*ATP-binding cassette*), uma vez que um dos seus componentes translocador é uma ABC-ATPase, com propriedade de se ligar e hidrolisar ATP para fornecer energia a toda maquinaria de translocação (BLIGHT; HOLLAND, 1990; OSVALD; HOLLAND; SCHMITT, 2006; YOUNG; HOLLAND, 1999). Esse sistema forma um complexo intermembranar constituído por três componentes: uma proteína exportadora de membrana interna, do tipo ABC; uma proteína formadora de poro na membrana externa e uma proteína periplasmática ou proteína de fusão, que forma uma ponte entre as duas membranas (BINET et al., 1997; THANASSI; HULTGREN, 2000).

Esse sistema permite a secreção de diferentes toxinas, proteases e lipases por uma grande variedade de patógenos de animais e plantas, a partir do citoplasma para o espaço extracelular em uma única etapa, sem um passo intermediário periplasmático (GERLACH; HENSEL, 2007; HOLLAND; SCHMITT; YOUNG, 2005). O protótipo de estudo desse sistema é a secreção da α -hemolisina (HlyA) por *E. coli*. Essa proteína tem capacidade de se ligar ao cálcio ao interagir com a célula hospedeira. Essa interação estimula a inserção de

HlyA na membrana plasmática das células eucarióticas, promovendo a formação de poros com liberação do conteúdo citoplasmático (WELCH et al., 1981).

1.4.4 Sistema de secreção tipo II (SSTII)

O SSTII é uma complexa maquinaria contendo 12-15 proteínas que são geralmente codificadas em um mesmo operon e conhecido por ser o principal ramo da via geral de secreção ou GSP (*general secretory pathway*) (JHA; RAJESHWARI; SONTI, 2005; PUGSLEY, 1993; SANDKVIST, 2001; VOULHOX et al., 2001). Foi descoberto em *Klebsiella oxytoca*, onde é requerido para a secreção da lipoproteína pululanase (D'ENFERT; RYTER; PUGSLEY, 1987; PUGSLEY et al., 1993). Outras proteínas secretadas por este sistema incluem proteases, pectinases, fosfolipases, lipases, toxinas e são secretadas do citoplasma até o meio extracelular em duas etapas. Num primeiro momento essas proteínas são translocadas pela membrana citoplasmática usando a via sistema Sec (PUGSLEY et al., 1993) ou via Tat (VOULHOX et al., 2001), dependendo da natureza do peptídeo sinal. Na segunda etapa, são secretadas através da membrana externa pelo aparato do SSTII, cujas proteínas em *E. coli* são denominadas de Gsp e são descritas de GspA até GspO, sendo a proteína GspD o principal componente deste sistema. Esta proteína forma um complexo multimérico que funciona como um poro através do qual as proteínas são secretadas até o meio extracelular (FILLOUX, 2004; FRANCETIC; PUGSLEY, 1996).

1.4.5 Sistema de secreção tipo III (SSTIII)

É conhecido por funcionar como um “injetossoma”, que é uma estrutura que se assemelha a uma seringa e forma um canal que se estende da membrana interna da bactéria até a célula eucariótica, permitindo, assim, a injeção direta de fatores de virulência do citoplasma da bactéria para o interior da célula hospedeira (CORNELIS, 2006). Dentro destas células, as proteínas bacterianas, também chamadas de efetoras, modificam sinais celulares em benefício da bactéria, facilitando o processo de colonização e patogênese (GHOSH, 2004).

O SSTIII foi primeiramente descrito em *Yersinia* spp. para a secreção da proteína Yop (MICHIELS et al., 1990). Em *E. coli*, o sistema é constituído por cerca de 20 proteínas, incluindo as proteínas efetoras, regulatórias, estruturais e chaperoninas. Esses efetores possuem funções diversas, como: regular a secreção, facilitar a injeção de outras proteínas e alterar a estrutura e a função de proteínas do hospedeiro (GHOSH, 2004; HUECK, 1998).

Parte dessas proteínas é conservada na maioria dos SSTIII. Além disso, possuem sua sequência semelhante à de proteínas que compõem o corpo basal do flagelo bacteriano (AIZAWA, 2001; HUECK, 1998), sugerindo uma história evolutiva compartilhada entre os dois sistemas (NGUYEN, et al., 2000; SAIER, 2004).

Esse sistema consiste, basicamente, das proteínas Esps que formam um poro conectando as membranas da bactéria e da célula hospedeira. Dentre estas proteínas tem-se: EscN que está envolvida na conversão de energia para o sistema; EscD, R, S, T e U que formam um poro na membrana interna da bactéria; EscJ, uma lipoproteína que forma o canal periplasmático que funciona como uma ponte ligando os anéis das membranas interna e externa (DANNIEL et al., 2001; GAUTHIER; FINLAY, 1998); EscC que forma o poro na membrana externa (GAUTHIER; PUENTE; FINLAY, 2003) e EspA, que em conjunto com EspF, formam uma estrutura tipo “agulha”, projetando um canal por onde as proteínas efetoras são secretadas para a célula hospedeira (KNUTONN et al., 1998; WILSON et al., 2001). EspB e D são translocadas por estes canais para formar um poro na membrana da célula hospedeira (DANNIEL et al., 2001; GAUTHIER; FINLAY, 1998). As demais proteínas funcionam como proteínas efetoras, a exemplo de EspF e Map que promovem, de maneira geral, a destruição da barreira epiteliais e alterações na permeabilidade das junções oclusivas da célula epitelial (DEAN; KENNY, 2004; KNUTONN et al., 1998); EspG que causa uma desestabilização da rede de microtúbulos no citoplasma da célula epitelial (SHAW et al., 2005) e Tir que é o receptor para a intimina, uma proteína codificada pelo gene *eae* e responsável pela aderência íntima da bactéria com células epiteliais (JERSE; KAPER, 1991).

1.4.6 Sistema de secreção tipo IV (SSTIV)

Assim como o SSTIII, este sistema secreta as proteínas exportadas dentro da célula eucariótica. É um sistema excepcionalmente versátil, encontrado em bactérias Gram positivas e negativas e que secreta uma ampla variedade de substratos, que vão desde simples proteínas até complexos de proteína-proteína e proteína-DNA (CHRISTIE, 2001; FRONZES; CHRISTIE; WAKSMAN, 2009). São exemplos desse sistema, o transporte de DNA oncogênico e proteínas efetoras até o núcleo de células de plantas pelo *Agrobacterium tumefaciens* e o transporte da proteína CagA de *Helicobacter pylori*, que é um dos principais agentes de patologias como gastrite, úlcera péptica e adenocarcinoma gástrico (CHRISTIE, 2001). Além disso, pelo menos duas bactérias, *A. tumefaciens* e *E. coli*, podem transferir

substratos de DNA para fungos, plantas e células humanas (BUNDOCK et al., 1995; HEINEMANN; SPRAGUE, 1989; WATERS, 2001).

É um sistema composto por doze componentes denominados de VirB1 a VirB11 e VirD4, que funciona como uma proteína acopladora. A proteína VirB10 forma um canal entre as membranas, juntamente com outras proteínas Vir. VirB4 e VirB11 atuam como ATPases para o sistema e VirB2 e VirB5 atuam em conjunto para a formação do *pilus* extracelular (FRONZES et al., 2009; GERLACH; HENSEL, 2007).

1.4.7 Sistema de secreção tipo VI (SSTVI)

Recentemente, um novo sistema de secreção foi descoberto em bactérias Gram negativas e conhecido como sistema de secreção tipo VI (SSTVI) (FILLOUX; HACHANI; BLEVES, 2008; ZOUED et al., 2014). Os componentes deste sistema foram inicialmente identificados como IAHP (*IcmF-associated homologous proteins*) devido à homologia com o gene *icmF*, que codifica para uma proteína associada ao SSTIV. É uma via complexa com capacidade de translocar proteínas efetoras para dentro da célula hospedeira, assim como os sistemas III e IV (FILLOUX, 2013; SILVERMAN et al., 2012). O atual modelo de estrutura desse sistema indica que o mesmo é composto por dois complexos: uma estrutura semelhante ao sistema de injeção de DNA por um bacteriófago e outra associada à membrana do hospedeiro. Também de modo semelhante àquelas vias, o SSTVI é formado por uma complexa maquinaria composta por aproximadamente 13 proteínas estruturais, além das proteínas efetoras (BOYER et al., 2009; PUKATZKI; MCAULEY; MIYATA, 2009). Entretanto, o mecanismo pelo qual esse complexo interage para promover a secreção de proteínas efetoras ainda não é conhecido (SILVERMAN et al., 2012).

Algumas proteínas efetoras foram descritas para este sistema. Dentre elas, a proteína VgrG1 de *Vibrio cholerae*, que atua sobre o citoesqueleto de macrófagos, podendo causar a morte destes (MA et al., 2009) e VgrG1 de *Aeromonas hydrophila* que, uma vez injetada em células HeLa, provoca perturbações do citoesqueleto de actina com consequente apoptose celular (SUAREZ et al., 2010).

1.4.8 Sistema de secreção tipo VII (SSTVII)

Também conhecido como via chaperona/*usher*, o SSTVII é um ramo terminal do sistema geral de secreção responsável pela montagem e secreção de adesinas na superfície de

bactérias Gram negativas. A secreção por esta via requer dois componentes: uma chaperona periplasmática e uma proteína de membrana externa denominada *usher* (THANASSI; SAULINO; HULTGREN, 1998).

O protótipo de organelas que são montadas por esta via são os *pili* tipo I expressos por UPEC. Após o transporte Sec-dependente através da membrana interna, subunidades do pilus interagem com uma chaperona periplasmática por meio de um motivo C-terminal conservado, presente nas subunidades do pilus. A chaperona facilita a liberação de subunidades do pilus no periplasma e direciona o correto enovelamento na membrana externa (HENDERSON; NAVARRO-GARCIA; NATARO, 1998). Embora esta via apresente uma vaga similaridade com o Sistema de secreção do tipo V, estudos demonstraram a falta de uma estrutura e de uma sequência homóloga entre os dois sistemas (REMAUT et al., 2008; THANASSI et al., 2005). Em função desses achados, fica claro que a via chaperona/*usher* possui um sistema próprio e por isso passou a ser conhecido como SSTVII (DESVAUX et al., 2009).

1.4.9 Sistema de secreção tipo VIII (SSTVIII)

De maneira semelhante ao sistema anterior, a montagem e secreção da fímbria Curli foi considerada como uma via distinta dos outros sistemas de secreção, sendo proposto como o sistema SSTVIII (DESVAUX et al., 2009; KOSTAKIOTI et al., 2005; STATHOPOULOS et al., 2000). Curli é composta de fibras amiloides e sua biogênese está baseada no processo de nucleação-precipitação de proteínas na superfície bacteriana (EVANS; CHAPMAN, 2014).

Em *E. coli*, dois operons, *csgDEFG* e *csgBA*, são necessários para a biogênese de Curli. Os dois componentes Curli, CsgA e CsgB, e a lipoproteína CsgG atravessam a membrana interna através do sistema Sec. Embora o conhecimento do mecanismo de secreção seja limitado, estudos indicam que CsgG é necessário para a secreção de CsgA e CsgB através da membrana externa, sendo apresentado dois modelos para a secreção destes componentes na membrana externa. O primeiro suporta a idéia de que CsgG atue como uma chaperona estabilizando os dois componentes de Curli, o outro sustenta a idéia de que CsgG forma um poro através do qual CSGA e CSGB são secretados (LOFERER; HAMMAN; NORMARK, 1997; STATHOPOULOS et al., 2000).

1.4.10 Sistema de secreção tipo V (SSTV)

O SSTV, também conhecido como sistema “autotransportador”, é um ramo terminal do sistema geral de secreção e transporta uma grande variedade de proteínas com funções de protease, toxinas, adesinas e invasinas (HENDERSON et al., 2004). É um dos sistemas mais amplamente distribuídos entre as bactérias Gram negativas (YEN et al., 2002) e pode ser subdividido em cinco grupos (figura 3).

No sistema clássico ou 5a, as proteínas são produzidas como um único polipeptídeo que contém todas as informações para a sua secreção (HENDERSON; NAVARRO-GARCIA, 1998). No sistema de dois parceiros (TPS – *two partner secretion*) ou 5b, o domínio passageiro (TpsA) e o domínio translocador ou β -barril (TpsB) são localizados em cadeias polipeptídicas separadas. Ambas possuem o peptídeo sinal que é reconhecido pelo sistema Sec e após passagem pelo periplasma, TpsB é inserido na membrana externa para que TpsA possa atravessar, atingir o meio externo e exercer suas funções (JACOB-DUBUISSON; LOCHT; ANTOINE, 2001). O sistema das adesinas triméricas ou 5c segue a mesma rota do sistema clássico, entretanto, diferente de todos os outros grupos do SSTV, o poro translocador não é feito por um, mas por três cadeias polipeptídicas, onde cada uma das cadeias contribui com quatro fitas do tipo β para, assim, formarem o β -barril e consequente transporte dos três domínios passageiros (LINKE et al., 2006). O sistema de parceiros fusionados (FTP - *fused two-partner*) ou 5d foi descoberto recentemente em *Pseudomonas aeruginosa*, na secreção de PlpD. Este sistema difere dos demais por possuir o domínio passageiro fusionado ao domínio transportador por um domínio POTRA (*polypeptide transport-associated*). No sistema clássico, os domínios POTRA de BamA (sistema BAM), promovem a inserção do β -barril na membrana externa. No sistema 5d, esta função é exercida por um domínio POTRA intrínseco à proteína (SALACHA et al., 2010). No sistema clássico invertido ou 5e, em contraste com 5a, a ordem dos domínios passageiro e translocador é invertida para invasina de *Yersinia* spp. e intimina de *E. coli*. Desta forma, quem é inserido na membrana externa para formar o poro é o domínio N-terminal e não o domínio C-terminal, como observado nos outros sistemas. As demais etapas são realizadas conforme 5a (OBERHETTINGER et al., 2012).

membrana, BamB (YfgL), BamC (NlpB), BamD (YfiO) e BamE (SmpA) (KNOWLES et al., 2009). BamA é o componente central do sistema, formando um poro na membrana externa e juntamente com BamD são essenciais para a viabilidade e biogênese das OMPs. As demais proteínas são importantes para a estabilidade de BamAD, mas não são indispensáveis, uma vez que mutantes em *bamB*, *bamC* e *bamE* não comprometeram o sistema (MALINVERNI et al., 2006; RIGEL et al., 2012; ROBERT et al., 2006; ROSSITER et al., 2011). O papel exato de cada uma das proteínas do complexo BAM continua desconhecido, entretanto, BamAD são indispensáveis para a secreção das proteínas autotransportadoras (AT), a exemplo de Pet (ROSSITER et al., 2011).

De um modo geral, as ATs são sintetizadas contendo todas as informações necessárias para seu processo de secreção: um peptídeo sinal, importante para o reconhecimento do sistema Sec e translocação pela membrana interna; um domínio passageiro ou domínio α , que contém as características funcionais da proteína; e um β -barril que formará um poro na membrana externa para o transporte do domínio passageiro até o meio externo (DAUTIN; BERNSTEIN, 2007; HENDERSON; NAVARRO-GARCIA; NATARO, 1998; LEO; GRIN; LINKE, 2012). Desta forma, após sua síntese no citoplasma bacteriano, essas proteínas são reconhecidas pelo sistema Sec através do peptídeo sinal que é uma sequência formada de aproximadamente 20-30 aminoácidos, altamente conservada (DAUTIN, 2010). Após atravessar a membrana interna o peptídeo sinal é clivado e a proteína é liberada para o periplasma, onde interage com chaperonas periplasmáticas, a exemplo de DegP, FkpA, Skp, SurA e VirK, que são responsáveis por conduzir as “autotransportadoras” até a membrana externa (BEHRENS-KNEIP, 2010; HAGAN; SILHAVY; KAHNE, 2011; IEVA; BERNSTEIN, 2009; RUIZ-PEREZ et al., 2009; RUIZ-PEREZ; HENDERSON; NATARO, 2010; TAPIA-PESTRANA et al., 2012). O domínio β -barril é, então, inserido na membrana com o auxílio das proteínas do sistema BAM, formando um poro que permitirá a translocação do domínio passageiro para o meio externo (DAUTIN, 2010; HENDERSON; NAVARRO-GARCIA; NATARO, 1998).

A maioria das AT precisa ser clivada entre o domínio passageiro e o β -domínio para que a proteína madura seja secretada para o meio externo (DAUTIN; BERNSTEIN, 2007). Essa clivagem pode ocorrer por vários mecanismos: de forma autoproteolítica, a partir de um domínio de protease localizado no domínio passageiro; por uma protease, a exemplo de IcsA de *S. flexneri*, que é clivada por uma protease da membrana externa homóloga a OmpT (IcsP) (SHERE et al., 1997); ou ainda podem ser clivadas por outras ATs, a exemplo da NalP de *N.*

Meningitidis, que cliva IgA, MspA e AusI (TURNER, D. P. et al., 2006; VAN ULSEN et al., 2003; VAN ULSEN et al., 2006).

Um importante grupo de proteínas que são secretadas por este sistema de transporte são as SPATEs (*serino protease autotransporters of Enterobacteriaceae*) (RUIZ-PEREZ; NATARO, 2014), cuja estrutura geral está esquematizada na figura 4.

Figura 4 - Estrutura geral das SPATEs.

Fonte: Ruiz-Perez e Nataro (2014).

1.4.10.1 SPATES

As serinoproteases são enzimas que possuem um sítio ativo contendo a tríade catalítica Ser/His/Asp, responsável por sua atividade proteolítica e são amplamente distribuídas entre vírus, bactérias e eucariotos, sendo, portanto, vital para os organismos (DODSON; WLODAWER, 1998; HEDSTROM, 2002; KREM; Di CERA, 2001; PAGE; Di CERA, 2008b).

A família das SPATEs inclui mais de 25 proteínas que são divididas filogeneticamente em duas classes, com base na sequência de aminoácidos do domínio passageiro (figura 5).

Figura 5 - Análise filogenética da sequência de aminoácidos das SPATEs.

Fonte: Ruiz-Perez e Nataro (2014).

As SPATEs da classe I possuem em comum a habilidade de causar efeitos citopáticos em cultura de células, além de exercerem atividade de enterotoxina (AL-HASANI et al., 2000; AL-HASANI et al., 2009; DJAFARI et al., 1997; ESLAVA et al., 1998; HENDERSON et al., 1999; MARONCLE et al., 2006; MELLIES et al., 2001; TADDEI et al., 2005). Dentre as autotransportadoras mais caracterizadas dessa família, tem-se: Sat (GUYER et al., 2000), Pet (ESLAVA et al., 1998), SigA (AL-HASANI et al., 2000), EspC (MELLIES et al., 2001) e EspP (DJAFARI et al., 1997). As SPATEs da classe II são conhecidas por degradar uma variedade de mucinas, glicoproteínas de superfície de leucócitos, apresentando vantagem no processo de colonização da mucosa, além de promoverem uma modulação do sistema imune, sendo conhecidas, portanto, como imunomoduladoras (DUTTA et al., 2002; GUTIÉRREZ-

JIMÉNEZ; ARCINIEGA; NAVARRO-GARCIA, 2008; HARRINGTON et al., 2009; LEYTON et al., 2003; PAHAN et al., 2004; RUIZ-PEREZ et al., 2011). As proteínas Tsh (PROVENCE; CURTISS, 1994), Vat (PARREIRA; GYLES, 2003), SepA (BENJELLOUN-TOUIMI et al., 1998), EpeA (LEYTON et al., 2003), EatA (PATEL et al., 2004) e Pic (HENDERSON et al., 1999) são as principais SPATEs desta classe.

Pic (*protein involved in colonization*) é uma serinoprotease produzida por EAEC (HENDERSON et al., 1999), *S. flexneri* 2a (RAJAKUMAR; SASKAWA; ADLER, 1997) e UPEC, neste último caso sob a denominação de PicU (PARHAM et al., 2004). Além destas, a cepa de EAEC produtora da toxina Shiga (sorotipo O104:H4), que foi responsável por um grande surto de diarreia sanguinolenta associada a síndrome hemolítica urêmica (SHU), ocorrido em 2011 na Europa, também produz Pic (MUNERA et al., 2014; RASKO et al., 2011).

Eslava et al. (1993) descreveram duas proteínas de 104 e 116 kDa isoladas de uma amostra de EAEC, que quando injetadas em íleo de ratos, induziram efeito citotóxico na mucosa. Estudos posteriores mostraram que a proteína de 116 kDa correspondia à Pic. Essa SPATE apresenta *in vitro* algumas funções que incluem a degradação de mucina (DUTTA et al., 2002; HENDERSON et al., 1999; GUTIÉRREZ-JIMÉNEZ; ARCINIEGA; NAVARRO-GARCIA, 2008), resistência à atividade bactericida do soro e hemaglutinação (HENDERSON et al., 1999). Além disso, é capaz de induzir resposta imune, uma vez que anticorpos séricos anti-Pic foram detectados em crianças convalescentes de quadros diarreicos por EAEC (BELLINE et al., 2005).

Outros papéis biológicos para Pic foram descritos, incluindo a degradação do fator V da cascata de coagulação (DUTTA et al., 2002) e clivagem de glicoproteínas de superfície de leucócitos, envolvidas no tráfico, migração e inflamação (RUIZ-PEREZ et al., 2011). Devido à sua atividade mucinolítica, Pic também promove a colonização intestinal de ratos e coelhos pela clivagem do muco presente na luz intestinal, favorecendo assim a adesão da bactéria aos enterócitos (HARRINGTON et al., 2009; MUNERA et al., 2014). Após estabelecimento da bactéria no sítio de infecção, Pic exerce um papel antagônico ao estimular células caliciformes a hiperproduzirem muco (NAVARRO-GARCIA et al., 2010).

Conforme mencionado, Pic foi detectada em EAEC, UPEC, *Shigella* e no híbrido EAEC/STEC. Nesses patógenos, a sequência genética *pic* apresenta 96% de identidade (HEIMER et al., 2004).

Em um estudo realizado por nosso grupo (ABREU et al., 2013) foi detectada uma cepa de aEPEC carreando o gene *pic*, dentre outros fatores de virulência. O fragmento *pic*

amplificado foi sequenciado, demonstrando a especificidade do mesmo, ou seja, homologia com o respectivo gene *pic* de EAEC descrito no GenBank. De forma distinta de tEPEC, aEPEC compreende um grupo heterogêneo de cepas em termos de sorotipo, padrões de adesão e presença de fatores de virulência de outros patótipos de DEC. Bando et al. (2009) mostraram que aEPEC apresenta *background* genético que a torna mais permissiva a aquisição de fatores de virulência não codificadas em LEE e carregados por elementos genéticos móveis. Desta forma, a presença de fatores de virulência adicionais pode representar vantagens adaptativas neste grupo. Neste contexto, torna-se relevante a caracterização fenotípica e genotípica de uma proteína característica de EAEC produzida por aEPEC, no sentido da compreensão da patogênese desse patógeno emergente.

2 OBJETIVO

Caracterizar a proteína Pic produzida por uma cepa de *E. coli* enteropatogênica atípica, através da determinação da sua estrutura genética e atividades biológicas *in vitro* e *in vivo*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cepas bacterianas

A presença de diversos marcadores de virulência de outros patótipos de DEC (EAEC, DAEC, EHEC e ETEC) foi pesquisada em 72 amostras de diferentes sorotipos de aEPEC. As amostras foram isoladas durante um estudo epidemiológico sobre a etiologia da diarreia aguda, na cidade de Salvador-Bahia, entre os anos de 2003 e 2004 (BUERIS et al., 2007). Em uma destas cepas (BA589), o gene *pic* foi detectado (ABREU et al., 2013) e utilizada neste estudo.

A cepa BA589, pertencente ao sorotipo O5:H2, foi isolada de uma criança com diarreia e foi previamente caracterizada como aEPEC através da determinação do genótipo *eae*⁺/*bfpA*⁻/EAF/*perABC*⁻/*stx1*⁻/*stx2*⁻ e pela falta da produção da fímbria BFP (ABE et al., 2009; BUERIS et al., 2007).

EAEC 042 (NATARO; KAPER, 1998) foi empregada como controle positivo para os procedimentos de PCR, e como controle negativo uma *E. coli* DH5α (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). *E. coli* C1845 (DAEC, padrão de adesão difuso), 17-2 (EAEC, padrão de adesão agregativa) e E2348/69 (tEPEC, padrão de adesão localizado) foram empregadas como controle nos ensaios de adesão em células HEp-2 (NATARO; KAPER, 1998). Nos ensaios de imunodeteção da proteína Pic, EAEC 042 e *E. coli* HB101 foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

Todas as cepas foram mantidas a -80 °C em caldo de soja tripticase (TSB) acrescido de glicerol a 20% e foram cultivadas em caldo Luria-Bertani (LB), ágar LB ou ágar MacConkey (MC), acrescidos de antibióticos apropriados quando indicado.

3.2 Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos

A avaliação da sensibilidade a antimicrobianos foi realizada pelo método de disco-difusão, conforme descrito pelo *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2009). Os antibióticos utilizados no teste foram os seguintes: ácido nalidixico (30 µg), amicacina (30 µg), amoxicilina/ácido clavulânico (30 µg), ampicilina (10 µg), aztreonam (30 µg), cefalotina (30 µg), cefotaxima (30 µg), ceftazidima (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), cloranfenicol (30 µg), estreptomicina (10 µg), gentamicina (10 µg), sulfametoxazol/trimetoprim (25 µg) e tetraciclina (30 µg).

3.3 Teste de adesão da cepa BA589 em células HEp-2

Os testes de interação com células epiteliais HEp-2 foram realizados de acordo com o protocolo descrito por Cravioto et al. (1979). As células HEp-2 foram cultivadas em garrafas para cultivo celular de 50 ml (Nunc, Inter Med, Roskilde, Dinamarca) contendo Meio Mínimo Essencial de Eagle, modificado por Dulbeco (DMEM) contendo antibióticos penicilina (1000 U/ml) e estreptomicina (1 mg/mL) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), acrescido de 10% de soro fetal bovino por 2 a 3 dias a 37 °C sob atmosfera de 10% de O₂ e 90% de CO₂. Após esse período de incubação, as células foram transferidas para placas de 24 orifícios (Nunc) contendo lamínulas de vidro e incubadas sob as mesmas condições até que atingiram 75% de confluência.

Para os ensaios de adesão, as cepas bacterianas foram cultivadas em 3 mL de TSB sem agitação a 37 °C por 18 h. Uma alíquota de 20 µL dessa cultura bacteriana foi adicionada a cada orifício da placa contendo a cultura de células HEp-2, previamente lavadas com tampão salina-fosfato (PBS) 1x (cloreto de sódio 137 mM; cloreto de potássio 2,7 mM; fosfato de sódio dibásico 4,3 mM; fosfato de potássio monobásico 1,5 mM) pH 7,4, e acrescidas de 980 µL de DMEM contendo 2% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab) e 1% de D-manose. Após incubação por 3 ou 6 h a 37 °C, as placas foram novamente lavadas com PBS 1x. Nos ensaios de 3 h, as células foram em seguida fixadas com metanol absoluto. Nos ensaios de 6 h, após as três primeiras horas de incubação, as placas foram lavadas com PBS, acrescidas de 1 mL de DMEM contendo 2% de SFB (Cultilab) e 1% de D-manose, e incubadas por mais 3 h a 37 °C. Em seguida, lavadas novamente com PBS e fixadas com metanol absoluto. Após a fixação, as células foram coradas por 5 min com corante eosina-azul de metileno em solução May-Grünwald (Merck, Darmstadt, HE, Alemanha), diluído na razão 1:2 em tampão Sorensen (fosfato de potássio monobásico 8,6 mM; fosfato de sódio dibásico 28,6 mM). Em seguida, esse corante foi desprezado sendo então acrescentada a solução corante azul-eosina-azul de metileno segundo Giemsa (Merck) diluída na razão 1:3 em tampão Sorensen, por 20 min. Após lavagem para retirada do excesso de corante, as lamínulas foram secas à temperatura ambiente e montadas em lâminas para microscopia com Entellan (Merck). As lâminas foram analisadas através de microscopia óptica, em aumento de 1.000 vezes.

3.4 Teste de FAS (*Fluorescent Actin Staining*)

O teste de detecção do acúmulo de actina após contato bactéria-célula em ensaio de 6 h foi realizado segundo a metodologia descrita por Knutton et al. (1989). O cultivo das células HEp-2, bem como os ensaios de adesão a células epiteliais *in vitro*, foram realizados como descrito no item anterior. Após o período de incubação e lavagens com PBS 1x, as células foram fixadas com *p*-formaldeído 4% em PBS 1x, por 18 h a 4°C. As células foram novamente lavadas com PBS 1x e em seguida permeabilizadas pela adição de Triton X-100 0,5% em PBS 1x, por precisamente 4 min. Após novas lavagens, foram adicionados 5 µg/ml de isotiocianato de faloidina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) diluído em PBS 1x. As placas foram incubadas por 20 min ao abrigo da luz e novamente lavadas com PBS 1x, por três vezes de 5 min. Em seguida, as lâminulas foram removidas da placa, secas com papel de filtro e fixadas sobre lâminas de vidro com a utilização de Mowiol (Calbiochem, San Diego CA, USA) adicionado do agente “*anti-fading*” Dabco (Sigma-Aldrich) onde foi acrescentado iodeto de propídio (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) em uma concentração final de 1:1000. As lâminas foram mantidas por cerca de 20 h a 4°C, e em seguida, observadas através de microscopia confocal em aumento de 1.000 vezes, utilizando o microscópio LSM 510 Meta (Zeiss, Oberkochen, BW, Alemanha) e os filtros BP500-530IR (488 nm) e LP560 (543 nm).

3.5 Imunofluorescência e microscopia confocal

O ensaio de imunofluorescência para detecção da proteína Pic, secretada por BA589 durante interação de 6 h com células HEp-2, foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Knutton et al. (1989), com algumas modificações. As células fixadas foram lavadas 5 vezes com PBS e permeabilizadas com Triton X-100 a 0,1% durante 5 min, imediatamente lavadas sete vezes com PBS e bloqueadas com albumina de soro bovino (BSA) a 1% (Research Organics, Cleveland, OH, EUA) em PBS durante 20 min. A preparação foi incubada com anticorpo primário anti-Pic diluído em PBS (1:60) durante 1 h à temperatura ambiente. As monocamadas foram lavadas sete vezes com PBS com posterior adição do anticorpo secundário anti-IgG de coelho produzido em cabra (1:200), marcado com fluoresceína. Em seguida foram incubadas à temperatura ambiente por 1h, protegidas da luz. Após sete lavagens o citoesqueleto de actina foi corado com faloidina rodamina e as bactérias com TO-PRO 3 durante 40 min à temperatura ambiente, protegidas da luz. Finalmente, as

células foram lavadas cinco vezes com PBS e duas vezes com água destilada para remover os sais. Em seguida foram secas à temperatura ambiente, protegidas da luz. As preparações foram montadas utilizando lamínula e Vectashield e analisadas com um microscópio confocal Leica TCS SP2 (Leica Microsystems, Wetzlar, HE, Alemanha) e os filtros BP500-530IR (488 nm) e LP560 (543 nm).

3.6 Detecção da proteína Pic

3.6.1 *Preparo das cepas para obtenção de Pic*

As cepas BA589, 042 e *E. coli* HB101 foram cultivadas sob agitação em LB a 37 °C por 18 h. Após o crescimento, 5 mL de cada uma dos cultivos foram centrifugados (4.000 rpm) por 15 min a 4 °C. Alíquotas de 1 mL dos sobrenadantes foram colocadas em tubos eppendorf de 1,5 mL em banho de gelo. Foram adicionados aos sobrenadantes 200 µL ácido tricloroacético (Sigma-Aldrich) para uma concentração final de 20% e incubados em banho de gelo por 1 h. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (14.000 rpm) por 25 min a 4 °C. Aos precipitados foram adicionados 500 µL de acetona fria (Merck) e centrifugados (14.000 rpm) por 10 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram desprezados e novamente foram adicionados 500 µL de acetona, seguido de centrifugação (14.000 rpm) por 10 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram desprezados e os precipitados foram secos em temperatura ambiente. Em seguida cada um dos precipitados foi ressuscitado em 15 µL de Tris-HCl 1M pH 8,0.

3.6.2 *Análise das proteínas através de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)*

As amostras preparadas como descrito no item 3.6.1 foram analisadas através de SDS-PAGE (12%) em condições desnaturantes, segundo o protocolo descrito por Laemmli (1970). Os extratos de proteínas foram misturados ao tampão de corrida (tris-hidroximetil) aminometano hidrocloreto 0,25 M; dodecil sulfato de sódio 8%; glicerol 80%; azul de bromofenol 0,04%; pH 6,8) acrescido de β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) na proporção de 1:20. Em seguida foi realizada a eletroforese a 20 mA (fonte modelo Power Pac 300, Bio-Rad) em aparatos específicos (Bio-Rad, Berkeley, CA, EUA) contendo tampão Tris-Glicina (tris (hidroximetil) aminometano 3%; glicina 14%; dodecil sulfato de sódio 1%). Foi utilizado

padrão de massa molecular com bandas de 170 a 10 kDa (PageRuler™ Prestained Protein Ladder) (Fermentas, Burlington, ON, Canadá).

Após a corrida, o gel foi corado com corante *Comassie Brilliant Blue* (Bio-Rad) por cerca de 1 h com leve agitação. Depois de corado, o gel foi incubado com solução descorante (metanol 45%; ácido acético glacial 10%) com leve agitação, até que as bandas correspondentes às proteínas fossem observadas.

3.6.3 *Western blotting*

Após a eletroforese em gel de poliacrilamida, as proteínas do gel foram transferidas por sistema úmido (Bio-Rad) para membrana de nitrocelulose específica para revelação por quimioluminescência (Amersham Pharmacia Biotech, Amersham, Bucks, Inglaterra). A membrana foi previamente incubada por 10 min no tampão de transferência Tris-Glicina (48 mM Tris-base, 39 mM Glicina, 20% etanol e 0,037% SDS pH 8,3). A transferência foi realizada a 350 mA por 1 h, utilizando aparato contendo tampão de transferência, no qual foi montado o “sanduíche” de transferência, composto por papel filtro, gel e membrana.

3.6.4 *Imunodeteção*

Após *Western-blotting* a membrana foi incubada a 4 °C por 18 h com solução de bloqueio (10% leite desnatado em PBS com 0,05% Tween-20) e leve agitação para bloqueio dos sítios inespecíficos. Em seguida a membrana foi lavada três vezes com PBS-T (PBS com 0,05% Tween-20) em agitação por 15 min.

Foi realizada uma incubação com a diluição 1:1000 do anticorpo policlonal anti-Pic (HENDERSON et al., 1999), seguida de incubação com o segundo anticorpo anti-IgG de coelho produzido em cabra conjugado com peroxidase na diluição 1:5000. Os anticorpos foram diluídos em PBS-T e as incubações foram realizadas por 1 h a temperatura ambiente com agitação. Depois de cada incubação, a membrana foi lavada três vezes com PBS-T, por 15 minutos, à temperatura ambiente com agitação. A detecção foi realizada através da utilização de solução substrato ECL (GE Healthcare, Chicago, IL, EUA) com revelação feita em câmara escura por exposição da membrana a filme raios-X (GE Healthcare).

3.6.5 Quantificação de Pic em sobrenadante de cultura

O ensaio foi realizado com o objetivo de comparar a produção de Pic entre as cepas BA589 e 042. As cepas (BA589 e 042) foram cultivadas nas mesmas condições a 37 °C por 18 h a 250 rpm. A DO₆₀₀ foi medida em intervalos de 1 h durante um período de 8 h e alíquotas de cada hora foram obtidas e armazenadas em freezer -80 °C para posterior quantificação da proteína Pic por *Western blotting* e ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), utilizando anticorpo anti-Pic para ambas as técnicas.

O *Western Blotting* foi realizado conforme descrito no item 3.6.3. Os sobrenadantes de cultura obtidos na curva de crescimento foram tratados com TCA, as proteínas separadas em SDS-PAGE (10%) e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. A imunodeteção foi realizada com o soro anti-Pic (1:1000) e anticorpo secundário (1:5000), seguida da revelação com o kit *ECLTM Western Blotting Analysis System* (GE Healthcare).

3.6.5.1 ELISA

Os sobrenadantes de cultura obtidos na curva de crescimento foram utilizados para quantificação de Pic por ELISA. Para a adsorção dos antígenos, placas de poliestireno com 96 poços foram expostas a uma solução de 10 µL do sobrenadante de cultura diluídos em tampão 0,1M carbonato/bicarbonato pH 9,6 e incubadas por 16 h a 4°C. Após incubação, os sítios inespecíficos foram bloqueados (BSA 1,0% em PBS com 0,05% Tween-20) por 1 h a 37°C. Posteriormente, a placa foi lavada uma vez com PBS-T (PBS com 0,05% Tween-20) para retirar o excesso da solução de bloqueio. A quantificação de Pic presente nos sobrenadantes de cultura foi realizada utilizando o anticorpo anti-Pic (1:1250) e anticorpo secundário anti-coelho (1:5000), seguido da revelação com o kit *TMB substrate Opt EIA Rgnt Set* (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA) e leitura em espectrofotômetro a 492 nm (Labsystems iEMS, Helsinque, Finlândia).

3.7 Técnicas de biologia molecular

As técnicas gerais de biologia molecular utilizadas neste estudo estão descritas em Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989) e Ausubel et al. (1995).

3.7.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi empregada tanto para a detecção, sequenciamento e mutação do gene *pic* na cepa em estudo, como para verificar a presença de diversos marcadores de virulência de outros patótipos de DEC (EAEC, DAEC, EHEC e ETEC). A sequência de todos os iniciadores, os respectivos ciclos de amplificação e seus respectivos controles encontram-se descritos nas tabelas 1, 2 e 3. Para cada reação foram utilizados 0,2 μ M de cada um dos iniciadores específicos (*forward* e *reverse*), 2,5 U de *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 1,5 mM de $MgCl_2$, 5 μ l tampão de PCR 1X (Invitrogen), 0,2 mM da mistura de dNTPs (Invitrogen) e água MilliQ estéril para um volume final de 50 μ l.

Os lisados bacterianos usados como DNA molde foram obtidos da seguinte forma: uma colônia isolada de uma placa de ágar LB foi transferida para um tubo de polipropileno contendo 500 μ l de água MilliQ estéril, submetida à fervura por 10 min e imediatamente resfriada em banho de gelo. Após a amplificação, o produto obtido foi analisado através de eletroforese em gel de agarose, conforme descrito no próximo item.

Tabela 1 - Sequência de iniciadores, fragmentos amplificados e ciclos de amplificação das PCR para o sequenciamento do gene *pic* na cepa de aEPEC BA589.

Gene	Sequência dos iniciadores	Anelamento (°C)	Amplicon (pb)	Referência
<i>pic1</i>	(F) GGGTATTGTCCGTTCCGAT (R) ACAACGATACCGTCTCCCG	60	1.176	HENDERSON et al., 1999.
<i>pic2</i>	(F) CCGGTGACAACTTGCATAA (R) CATAATTTCTGTTCCGTCA	56	978	Este estudo*
<i>pic3</i>	(F) GGAAGTGACAGGGCATTTG (R) CTTCGTATTGCCACCACTG'	56	1.011	Este estudo*
<i>pic4</i>	(F) ACAGGTTTCAGTCGGGTG (R) CACATCAGAACATATACCGG	56	1.000	Este estudo*
<i>pic1a</i>	(F) TTCTGGTGATAACGTCGGG (R) TATCATTGGCACCAGGTAC	55	333	Este estudo*
<i>pic2b</i>	(F) CGACAAAACATCAGGCACA (R) TGCAGTCGGGTGAAGGTAA	56	552	Este estudo*
<i>pic3b</i>	(F) GGGGGGAAGAAAGGTAATC' (R) CTGTCATAAGCGTCAATCC	56	450	Este estudo*
<i>pic3c</i>	(F) ACGGTGAATAAACTGGATGC (R) TCACTGTAACCAACCGTCTG	56	485	Este estudo*
<i>pic4c</i>	(F) GCTGGAAAGACGGTGATAT (R) ATACACTCCCCCTTACCGA	56	440	Este estudo*

(F) iniciador forward; (R) iniciador reverse.

*Iniciadores baseados na sequência de *pic* depositada no GenBank (Nº de acesso: FN554766.1)

Tabela 2 - Sequência dos iniciadores, ciclos de amplificação e tamanho dos fragmentos amplificados nas reações de PCR para os marcadores de virulência de outros patótipos de DEC.

Gene	Sequência dos Iniciadores	Anelamento (°C)	Amplicon (pb)	Referência
<i>shf</i>	(F) ATGAATTCCACTTTCTCCCGAGACATTC (R) ATGTCGACCCTTTAGCGGGAGCATTCAT	51	613	CZECZULIN et al., 1999.
<i>pilS</i>	(F) ATGAGCGTCATAACCTGTTC (R) CTGTTGGTTTCCAGTTTGAT	50	534	DUDLEY et al., 2006.
<i>pilV</i>	(F) GGATCCATGCAAAAAGACAACGATAA (R) AAGCTTTTAATTGAGCGTTACACACG	50	1194	DUDLEY et al., 2006.
<i>agg3A</i>	(F) GTATCATTGCGAGTCTGGTATTCAG (R) GGGCTGTTATAGAGTAACTTCCAG-	60	462	BERNIER; GOUNON; LE BOUGUÉNEC, 2002.
<i>agg3C</i>	(F) GTTTGGAACCGGGAATTAACATTG (R) AACTTTAGATACCCCTCACGCAG	65	485	BERNIER; GOUNON; LE BOUGUÉNEC, 2002.
<i>virK</i>	(F) ATGTTTTCTATAAGTAACTTATCATTTATCGG (R) TTAATTTGAATTCTGATGTTCTGAG	55	951	FUJIYAMA et al., 2008.
<i>rfbU</i>	(F) ATGAATATACTATTTACGGAATC (R) CTACAGGCACAGAAAATGCCGATG	55	822	FUJIYAMA et al., 2008.
<i>aap</i>	(F) ATGAAAAAATTAAGTTTGTTATCTTT (R) AACCCATTCGGTTAGAGCACT	60	343	BEVILACQUA, 2010.
<i>ap58</i>	(F) GGATGGCGCGGGTTTCAGAGG (R) CCGCCCGGGCATTTGTCAGA	63	591	MONTEIRO-NETO et al., 2003.
<i>irp2</i>	(F) AAGGATTCGCTGTTACCGGAC	55	264	CZECZULIN et al., 1999.

	(R) TCGTCGGGCAGCGTTTCTTCT			
<i>pet</i>	(F) GTGTTTCAACCAGGTTCAACA (R) CCTTCACCAATTTTATGCAGT	52	1.037	GIOPPO et al., 2000.
<i>astA</i>	(F) CCATCAACACAGTATATCCGA (R) GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT	58	111	YAMAMOTO et al., 1997.
<i>aafC</i>	(F) GTTATAGCTCGCACATATTC (R) TGCAGACTGATAATGCTC	68	1.144	ELIAS et al., 2002.
<i>aafA</i>	(F) TCAGAATGTTTGCGATTGCT (R) ATTTGTCACAAGCTCAGCAT	60	470	MONTEIRO, 2008.
<i>aggA</i>	(F) TTAGTCTTCTATCTAGGG (R) AAATTAATTCCGGCATGG	55	450	CZECZULIN et al., 1999.
<i>aggB</i>	(F) GCGGTGTACTTGTGATGGT (R) ATAGCCTGTTTTCTTCTCCT	58	437	VASCONCELLOS, 2014.
<i>aggC</i>	(F) TATTAAACCATGGTAAGC (R) ACCAAGATCCGAGATTGA	45	538	GIOPPO et al., 2000.
<i>aggD</i>	(F) CTCTACAATCAAGCCGCC (R) CATTTACAGGCATCGGATATT	58	758	VASCONCELLOS, 2014.
<i>agg4C</i>	(F) ATATGTTTAATCGGTTCTTTA (R) ACCATCTGATTCTAATACCGT	55	1000	VASCONCELLOS, 2014.
<i>aaiA</i>	(F) CCCACGACCAGATAACG (R) GTTTTTCAGGATTGCCATTAG	56	476	DUDLEY et al., 2006.

<i>aaiG</i>	(F) GGGAGTGTTCAGTCTGGAC (R) ATTTGTCACAAGCTCAGCAT	56	782	ANDRADE, GOMES; ELIAS, 2014.
<i>aggR</i>	(F) CGATACATTAAGACGCCTAAAG (R) TCTGATACATTAAATTCATCTGC	56	343	ANDRADE, GOMES; ELIAS, 2014.
<i>aatA</i>	(F) CTGGCGAAAGACTGTATCAT (R) CAATGTATAGAAATCCGCTGTT	56	630	SCHIMIDT et al., 1995.
<i>aaiC</i>	(F) AAAAATCTAGATGTCAAATAGAGATATAGGTG (R) TATATATCTAGAAACAACCTTAAATGATGAGT	53	278	DUDLEY et al., 2006.
<i>aida-I</i>	(F) GTTCTCTCTGATGGTTATGC (R) AACATTGACCATACCGCCG	60	342	ABREU et al., 2013.
<i>cah</i>	(F) CGTATCGCTGTGCCCCGATAAC (R) CCGTATACGAGTTGTCAGAATCA	58	707	RESTIERI et al., 2007.
<i>eatA</i>	(F) CAGGAGTGGGAACATTAAGTCA (R) CGTACGCCTTTGATTTACAGGAT	60	743	PATEL et al., 2004.
<i>ehaA</i>	(F) CACAGATGACAGAAGGGA (R) GTTTACCCCACTCGTCAG	59	326	ABREU et al., 2013.
<i>ehaB</i>	(F) CAGGGTTATGAGTGGGAAG (R) CCACTTGCTGCCGTTGTT	59	423	ABREU et al., 2013.
<i>ehaC</i>	(F) TAATGACGGCAAAGGTGGT (R) CATTTCATCAGGGAGTTGCT	59	599	ABREU et al., 2013.
<i>ehaD</i>	(F) GGCAGTTGACACGATTATTA (R) CTGTCGCTTTGCCATTATC	59	821	ABREU et al., 2013.

<i>ehaJ</i>	(F) ACGGGCTGCTGAGTATTT (R) GTAGTTTGCCACATCACCG	60	455	ABREU et al., 2013.
<i>epeA</i>	(F) GGGAGAGTTCAGGCATTTA (R) CAGCGTTACCTTACTTGAG	57	783	ABREU et al., 2013.
<i>espC</i>	(F) TAGTGCAGTGCAGAAAGCAGTT (R) AGTTTTCTGTTGCTGTATGCC	55	301	RESTIERI et al., 2007.
<i>espI</i>	(F) ATGGACAGAGTGGAGACAG (R) GCCACCTTTATTCTCACCA	52	560	SCHIMIDT et al., 2001.
<i>espP</i>	(F) GTCCATGCAGGGACATGCCA (R) TCACATCAGCACCGTTCTCTAT	55	547	RESTIERI et al., 2007.
<i>pet</i>	(F) GGCACAGAATAAAGGGGTGTTT (R) CCTCTTGTTTCCACGACATAC	58	302	RESTIERI et al., 2007.
<i>sab</i>	(F) GGTGGATACAGCAGGTAATG (R) TATCTCACCACCTGCTATCG	59	163	HEROLD; PATON; PATON, 2009.
<i>sat</i>	(F) TCAGAAGCTCAGCGAATCATTG (R) CCATTATCACCAGTAAAACGCACC	59	930	BOISEN et al., 2009.
<i>sepA</i>	(F) GCAGTGGAAATATGATGCGGC (R) TTGTTTCAGATCGGAGAAGAACG	58	794	RESTIERI et al., 2007.
<i>sigA</i>	(F) CCGACTTCTCACTTTCTCCCG (R) CCATCCAGCTGCATAGTGTTTG	58	430	BOISEN et al., 2009.
<i>tibA</i>	(F) ATGGTTGGCAGTGACGGTA (R) GGTGTTGACGGACGGAAA	58	480	ABREU et al., 2013.

Tabela 3 - Sequência de iniciadores, fragmentos amplificados e ciclos de amplificação das PCR usados para a mutagênese do gene *pic* pelo sistema lambda-red.

Gene	Sequência dos iniciadores	Anelamento (°C)	Amplicon (pb)	Referência
<i>pic</i>	(F) GGGTATTGTCCGTTCCGAT (R) ACAACGATACCGTCTCCCG	60	1176	HENDERSON et al., 1999.
<i>pic</i>	pic1a(F) TTCTGGTGATAACGTCGGG pic4c(R) ATACACTCCCCCTTACCGA	55	~4.200	Este estudo
BA589Δ <i>pic</i>	(F)TCATTAGCTTCTTCAGCTATTTTACTTTTATATCCCTTGTA ACATCATGGAGAATCCATATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG (R)TTTATATTTTAAGAGTCTCTGAGAAAGGCTGCCTTCCGGCA GCCCTTTACCCCCACATCACATATGAATATCCTCCTTAG	50	-	Este estudo

(F) iniciador forward; (R) iniciador reverse.

3.7.2 Eletroforese em gel de agarose

Os géis foram preparados por aquecimento, fundindo-se agarose (Invitrogen) em tampão TAE 1x (Tris-base 40 mM; ácido acético 40 mM, EDTA 1 mM), na concentração final de 0,8% a 1,0%. Os fragmentos de DNA resultantes das PCRs foram acrescidos de tampão de amostra 1x (azul de bromofenol 0,25%; xilenocianol 0,25%; glicerol 30%). Como marcador de peso molecular foi utilizado o *1kb DNA Ladder* ou *Low Mass Ladder* (Invitrogen). Após a corrida eletroforética, realizada sob corrente constante de 80 V em tampão TAE 1x, os géis foram corados em solução de gelRed (Uniscience, Woburn, MA, EUA) na concentração de 1:10000 por aproximadamente 30 min e observados em transiluminador de luz ultravioleta.

3.7.3 Sequenciamento do gene *pic*

As reações de sequenciamento foram realizadas no Centro de Estudos do Genoma Humano (Universidade de São Paulo). As duas fitas de DNA foram sequenciadas e para as reações foi utilizado o sequenciador automático MegaBACE 1000 (Amersham Pharmacia Biotech). As reações foram realizadas de acordo com o protocolo do fabricante, utilizando o *kit APBiotec DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing* (empregando a Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase) e os iniciadores descritos na tabela 1. Para edição das sequências de nucleotídeos foi utilizado o programa SeqMan™ 4.5 (Expert Analysis Software DNA Star, Inc para PC, Madison, WI, USA). Em seguida, as sequências foram comparadas utilizando o programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* 7.0.5.3 (Carlsbad). Todas as sequências de aminoácidos deduzidas foram alinhadas com a sequência de aminoácidos deduzida da proteína Pic de EAEC 042 (número de acesso no GenBank: FN554766.1).

3.7.4 Análise do perfil plasmidial

Para a análise do perfil plasmidial de BA589 foram utilizados como marcadores o conteúdo plasmidial das cepas de *E. coli* 39R861 e V517 que albergam plasmídeos com massas moleculares conhecidas (THRELFALL et al., 1986). A extração plasmidial foi realizada através do *kit Quiagen® Plasmid Midi Kit* (Quiagen, Valencia, CA, EUA), segundo recomendações do fabricante. Após a extração, o DNA plasmidial foi analisado através de

eletroforese em gel de agarose e corado em solução de gel-Red para análise, conforme descrito no item 3.7.2.

3.7.5 *Southern blotting do perfil plasmidial*

Foi realizada uma reação de hibridização dos plasmídeos com uma sonda genética correspondente ao gene *pic*, com a finalidade de determinar se a sua localização na cepa em estudo era plasmidial ou cromossômica. Os conteúdos plasmidiais de BA589 e 39R861 foram extraídos e submetidos à eletroforese em gel de agarose (item 3.7.2). Após a eletroforese, o DNA plasmidial contido no gel de agarose foi tratado com solução de HCl 0,25 M durante 30 min sob leve agitação. Em seguida o gel foi lavado com água destilada e tratado com solução de NaOH 0,5 M/NaCl 1,5 M (solução desnaturante) por 30 min sob agitação lenta. O gel foi novamente lavado com água destilada e tratado com solução de Tris-HCl 1 M / NaCl 2 M (solução neutralizante) por 30 min sob leve agitação. Após esse tratamento, os plasmídeos foram transferidos para uma membrana de *nylon* carregada positivamente (GE Healthcare) utilizando o sistema a vácuo (Amersham Pharmacia Biotech), segundo recomendações do fabricante.

3.7.5.1 Preparo e marcação da sonda genética

A sonda foi preparada a partir do amplicon *pic* de EAEC 042, obtido por PCR, conforme descrito no item 4.4.1. Os iniciadores *pic*1(F) e (R) e as condições de amplificação empregadas constam na tabela 1. A marcação da sonda e hibridização da membrana foram realizadas utilizando o kit *ECL Nucleic Acid Labelling and Detection System* (GE Healthcare), conforme instruções do fabricante.

3.7.5.2 Hibridização e revelação

Após a transferência, a membrana de *nylon* foi hibridizada com a sonda *pic* marcada. A membrana contendo o DNA plasmidial fixado e desnaturado foi umedecida em solução SSC 2X (NaCl 0,3M/Citrato Trissódico.2H₂O 0,03M). Em seguida foi bloqueada com tampão de pré-hibridização (GE Healthcare) a 42 °C por cerca de 20 min. Posteriormente foi adicionada a sonda marcada e a membrana hibridizada por cerca de 20 h, a 42 °C com agitação lenta e constante.

Decorrido o tempo de hibridização a membrana foi transferida para um recipiente limpo e submetida a duas lavagens sucessivas de 10 min cada, a 42 °C, com tampão primário (SDS 0,4%; SSC 20X; NaCl 3M/Citrato Trissódico.2H₂O 0,3M). Logo após realizaram-se duas lavagens de 5 min cada, com tampão secundário (SSC 2X), a 42 °C, e procedeu-se com a revelação.

A revelação foi realizada empregando-se os reagentes de detecção contidos no *kit* de marcação e detecção, e o sinal gerado foi detectado após exposição da membrana a filmes de raios-X (GE Healthcare). Os filmes foram revelados com auxílio de revelador e fixador específicos para filmes de raios-X (Kodak, Rochester, NY, EUA).

3.7.6 Cura plasmidial

A cura plasmidial foi realizada pela técnica de alaranjado de acridina descrita por Hirota (1960), após localização do gene *pic* em um dos plasmídeos de BA589 (item 3.7.5). Foram empregadas diferentes concentrações do alaranjado de acridina (25, 50, 75, 100 e 125 µg/ml) para a seleção da maior concentração que permitisse o crescimento bacteriano. A cepa BA589 foi cultivada em caldo LB com agitação de 250 rpm a 37°C até atingir a fase logarítmica de crescimento (~10⁸ UFC/ml). Em seguida, essa cultura foi diluída para uma concentração final de 10⁻⁴ UFC/ml e 3 ml foram distribuídos em tubos contendo as diferentes concentrações de alaranjado de acridina. Esses tubos foram recobertos com papel alumínio e incubados em condições estáticas a 37°C durante 18 h. Em seguida, o tubo correspondente à maior concentração de alaranjado de acridina onde houve crescimento bacteriano foi utilizado para a seleção de cepas curadas. Para isso, esse crescimento bacteriano foi semeado em ágar MacConkey e após incubação a 37°C durante 18 h foram selecionadas 50 colônias para realização de ensaios que pudessem indicar a perda do plasmídeo contendo *pic*. Dentre estes: PCR (item 3.7.1), extração plasmidial (item 3.7.4) com análise através de eletroforese em gel de agarose (item 3.7.2), *Southern blot* (item 3.7.5), análise proteica em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (item 3.6.2) e imunodetecção (item 3.6.4).

3.8 Deleção do gene *pic* pelo sistema lambda-red

3.8.1 Construção do mutante

A construção do mutante BA589 Δ *pic* foi baseada na técnica de mutagênese específica, com uso de fragmento linear de DNA, com emprego do sistema de recombinases codificadas pelo fago λ Red (DATSENKO; WANNER, 2000). As sequências dos iniciadores foram originadas a partir das sequências adjacentes ao gene *pic* da cepa BA589, previamente sequenciada.

3.8.2 Preparo de células eletrocompetentes

Alíquotas de *E. coli* BA589 eletrocompetentes foram obtidas segundo protocolo descrito em Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989). Uma colônia isolada foi cultivada em 11 mL de caldo SOB (Tryptona 2 g; Extrato de Levedura 0,5 g; NaCl 0,05 g; 1 mL KCl 250 mM; 0,5 mL MgCl₂ 2M / qsp 100 mL) a 37 °C por 18 h, sob agitação constante de 250 rpm. Em seguida, 10 mL da cultura foram cultivados em 90 mL de caldo SOB, mantendo as mesmas condições do crescimento anterior até atingir a densidade óptica a 600 nm de 0,6 a 1,0. Ao atingir a densidade esperada, a cultura foi centrifugada a 4.500 rpm por 15 min a 4 °C. O sedimento bacteriano foi ressuspensionado em 100 mL água milliQ e centrifugado a 4.500 rpm por 10 minutos a 4 °C. Foram realizadas mais quatro lavagens nas mesmas condições. Após lavagens o sedimento bacteriano foi ressuspensionado com 1 mL de água milliQ contendo glicerol 15%. A suspensão foi armazenada a -80 °C, em alíquotas de 50 μ L até o momento do uso.

3.8.3 Transformação com pKOBEG e seleção de colônias

O vetor pKOBEG (Apra^R), que contém os genes que codificam para as recombinases, foi introduzido por eletroporação na cepa BA589. As colônias transformadas com pKOBEG foram selecionadas por crescimento em ágar LB contendo apramicina (100 μ g/mL).

3.8.4 Transformação com *pKD3* e seleção de recombinantes

O fragmento contendo o cassete de resistência ao cloranfenicol foi amplificado por PCR a partir do vetor *pKD3* utilizando os iniciadores *BA589 Δ pic(F)* e *BA589 Δ pic(R)* (tabela 3). Esses iniciadores, além de anelarem na sequência do vetor, possuem homologia com regiões adjacentes ao gene *pic*. Após a obtenção em larga escala desse fragmento, o mesmo foi purificado utilizando o *DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare). As cepas de *BA589* contendo *pKOBEG* foram cultivadas com 100 mM de arabinose e após o preparo da eletrocompetência, de acordo com a metodologia descrita por Sambrook et al. (1989), foram transformadas com diluições seriadas do fragmento linear, com posterior seleção de transformantes em placas contendo cloranfenicol.

Após seleção dos recombinantes, os mesmos foram cultivados a 42 °C em ágar LB contendo cloranfenicol com o objetivo de expulsar o plasmídeo *pKOBEG* da cepa mutante (*BA589 Δ pic*). Em seguida, técnicas de PCR (item 3.7.1) e imunodeteção para Pic (item a seguir) foram empregadas para confirmação da mutação.

3.9 Purificação da proteína Pic_{BA589}

A purificação da proteína foi realizada utilizando uma coluna de gel filtração acoplada ao sistema AKTA (GE Healthcare). Para tanto, a cepa *BA589* foi cultivada em caldo LB com agitação de 250 rpm a 37 °C por 18 h. Em seguida o cultivo bacteriano foi centrifugado a 4.000 rpm por 15 min a 4 °C. O sobrenadante obtido foi filtrado em membrana de 0,22 μ m e em seguida concentrado utilizando um concentrador filtrante (Millipore, Bedford, MA, USA) de membrana com *cut off* de 100 kDa. Alíquotas desse concentrado foram aplicadas em gel de SDS-PAGE (item 3.6.2) para análise e quantificação da amostra.

Após essa etapa de exclusão das proteínas com baixo peso molecular, o concentrado foi aplicado em uma coluna de gel filtração para obtenção da proteína de interesse, a partir da exclusão das demais proteínas por tamanho de massa molecular. Para isto, uma coluna Superdex 16/60 (GE Healthcare) foi equilibrada com 121 mL de NaCl 0,05M pH 7,0 e em seguida lavada com 242 ml de NaCl 0,15M pH 7,0. Após o preparo da coluna, alíquotas do sobrenadante concentrado foram diluídos em tampão NaCl 0,15M / Fosfato de sódio 0,05M pH 7,0 (proporção de 1:1) e aplicados na coluna. O mesmo tampão utilizado na diluição do sobrenadante concentrado foi utilizado para a eluição da amostra. As alíquotas eluídas da coluna (acoplada ao sistema AKTA de purificação) foram coletadas em tubos estéreis já

adaptados ao AKTA. Neste sistema, para cada alíquota coletada é feita uma leitura de absorbância e geração de um gráfico referente às leituras. Em seguida, as frações referentes ao(s) pico(s) gerados no gráfico foram analisadas por SDS-PAGE (item 3.6.2), seguido de *Western Blotting* (item 3.6.3) com imunodeteção da proteína Pic (item 3.6.4).

3.10 Atividades biológicas de Pic₅₈₉ *in vitro*

3.10.1 Hemaglutinação

Hemácias de coelho obtidas comercialmente (BBV, Valinhos, São Paulo, Brasil) foram lavadas duas vezes com tampão fosfato (PBS) e ressuspensas para uma concentração final de 3%, com 1% de manose. Preparações de Pic₅₈₉ foram adicionadas a 100 µl da suspensão de hemácias e incubadas por 20 min em temperatura ambiente. Apenas aglutinação visível das hemácias foi considerada como resultado positivo. A inibição da hemaglutinação foi realizada com adição de anticorpos anti-Pic (1:50 diluído em PBS) à proteína Pic e incubados em temperatura ambiente por 30 min antes da adição às hemácias.

3.10.2 Atividade mucinolítica

Para analisar a atividade mucinolítica, Pic purificada das cepas BA589 e 042, bem como o sobrenadante de cultura de BA589 Δ *pic*, foram incubados por 24 h a 37 °C em um meio composto de 1,5% de agarose e 0,5% de mucina de glândula submaxilar bovina (Sigma-Aldrich) e distribuídos sobre lâminas de vidro para microscopia, de forma a compor uma superfície de 0,5 cm de altura. Após a solidificação do meio foram realizados orifícios de 0,5 cm de diâmetro na superfície do mesmo, onde 10 µL da proteína purificada ou sobrenadante de cultura concentrado foram aplicados. Após incubação as placas foram coradas com amido-black (Sigma-Aldrich) por 30 min e em seguida descoradas com uma solução contendo metanol 70% e ácido acético 7%. O teste foi considerado positivo quando halos de lise foram observados ao redor do local onde as amostras foram aplicadas.

3.10.3 Resistência à atividade bactericida do soro

A lise mediada pelo sistema complemento foi avaliada mediante a incubação das cepas BA589 e *E. coli* DH5 α com soro humano normal (SHN). As bactérias foram incubadas a 37

°C por 5, 10, 15, 30 e 60 min com 10% de SHN e com 10% de soro humano previamente inativado a 56 °C por 30 min (SHI). Um vigésimo do volume de cada incubação foi semeado em placa contendo ágar LB e em seguida incubado a 37 °C durante 18 h para determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC). A sensibilidade ao soro foi avaliada comparando-se o número de bactérias presentes nas placas.

3.10.4 Clivagem de moléculas do sistema complemento

Essa avaliação foi realizada mediante a detecção dos produtos de clivagem de moléculas do sistema complemento (C1q, C2, C3 e C4) após incubação com o sobrenadante de cultura das cepas BA589 e BA589 Δ *pic*. Os componentes do sistema complemento purificados a partir de plasma humano, os anticorpos específicos e conjugados foram adquiridos comercialmente (Complement Technology, Tyler, TX, USA).

Sobrenadantes de cultura das cepas BA589 (0,5 µg do secretado total de proteína) e BA589 Δ *pic* (0,5 µg) foram incubados com cada uma das moléculas do complemento (500 ng de C1q, C2, C3 e C4) por 5 h a 37°C. Em seguida foram submetidos à análise por SDS-PAGE-10% (item 3.6.2). A detecção dos produtos de clivagem foi realizada por *immunoblotting* (item 3.6.4) com anticorpos específicos para cada uma das moléculas (anti-C2, anti-C3, anti-C4 e anti-C1q) (ORTH et al., 2010).

3.11 Atividade biológica da cepa BA589 em modelo animal

3.11.1 Curva de crescimento de BA589

A curva de crescimento de BA589 foi obtida correlacionando as leituras de absorbância do meio de cultura em determinados intervalos de tempo, segundo as condições de cultivo descritas a seguir. Inicialmente a cepa foi cultivada em 3 mL de caldo LB a 37 °C por 18 h. A partir deste cultivo foi realizada uma diluição para análise da curva de crescimento. Uma alíquota de 1 mL da cultura foi transferida para 500 mL de LB (1:500) e incubado a 37 °C com agitação de 250 rpm. O crescimento bacteriano foi monitorado a cada 30 min durante 8 h, através de leituras de absorbância em comprimento de onda de 600 nm, utilizando o espectrofotômetro Ultrospec 2000 (Amersham Pharmacia Biotech).

3.11.2 Diluições logarítmicas e contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) de BA589

Para determinar qual diluição da cultura de BA589 correspondia à concentração de 1×10^3 UFC/mL a ser utilizada no ensaio de colonização (item 3.11.3), a cepa foi cultivada em 3 mL de caldo LB a 37°C por 18 h. Uma alíquota de 1 mL da cultura foi transferida para 500 mL de LB e incubada a 37°C com agitação de 250 rpm até atingir o pico da fase log de crescimento bacteriano, de acordo com o item 3.11.1. Em seguida, uma alíquota de 50 mL dessa cultura foi centrifugada a 6.000 rpm por 5 min e o sedimento obtido foi lavado com PBS 1x (pH 7,4). O procedimento foi realizado por mais uma vez e o sedimento foi solubilizado em 50 mL de PBS 1x (pH 7,4). Foram realizadas diluições logarítmicas e 100 µL de cada diluição foram cultivados em ágar MacConkey suplementado com estreptomicina (100 µg/µL) e ampicilina (100 µg/µL) para contagem de UFC. Estes antibióticos foram utilizados para uma melhor seleção das colônias de BA589, tendo em vista que a mesma possui resistência para tais antimicrobianos.

3.11.3 Modelo de camundongos tratados com estreptomicina

O modelo de camundongos tratados com a estreptomicina foi adaptado de Harrington et al. (2009) para avaliar a capacidade de colonização das cepas BA589 e BA589 Δ pic. Para tanto, camundongos BALB/c fêmeas com 12 semanas de idade foram tratadas (48 h antes da inoculação e durante o experimento) com água *ad libitum* contendo 5 g/litro de estreptomicina. Suspensões da cepa BA589 curada foram preparadas para uma concentração final de 5×10^3 UFC/mL. Antes da infecção com as cepas bacterianas, os camundongos receberam oralmente 200 µL de solução de bicarbonato de sódio 0,4 M para neutralizar o pH gástrico. Aproximadamente 15 min depois, 200 µL do inóculo foram administrados por via oral e as fezes frescas foram coletadas diariamente até 15 dias após infecção. As fezes foram pesadas, homogeneizadas em PBS 1x estéril (pH 7,4) e diluições seriadas foram semeadas em ágar MacConkey suplementado com estreptomicina (100 µg/mL) e ampicilina (100 µg/mL) para contagem de UFC.

3.11.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para analisar o tipo de interação da cepa BA589 e BA589 Δ pic com a mucosa intestinal dos camundongos, o mesmo experimento descrito acima foi realizado. Ao final do período determinado como o de maior colonização bacteriana, os animais foram sacrificados e secções de 0,5 cm de cada compartimento (duodeno, jejuno, íleo e ceco) foram retiradas para análise por MEV.

Os cortes foram fixados em uma solução de glutaraldeído a 3% em tampão cacodilato de sódio a 0,1M; pós-fixadas com tetróxido de ósmio a 1% e desidratadas com gradiente seriado de etanol (60, 70, 80, 90, 95 e 100%). Após secagem completa do material, realizada pelo método de ponto crítico do gás carbônico, as preparações foram montadas em suportes apropriados para microscopia de varredura, receberam uma fina camada de ouro e foram observadas ao microscópio eletrônico de varredura (FEI Quanta 250) (FEI corporate, Hillsboro, OR, USA) em 10 kV e distância de trabalho de 8,3 mm (KNUTTON, 1995).

Estes experimentos foram realizados pela Dra. Cecilia Mari Abe, pesquisadora do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan.

4 RESULTADOS

4.1 Pesquisa de genes de autotransportadoras de outras DEC em amostras de aEPEC

A prevalência de genes que codificam proteínas autotransportadoras de outros patótipos de DEC foi determinada em amostras de aEPEC por PCR. Essas proteínas estão relacionadas às funções de adesão, agregação, formação de biofilme, degradação de componentes celulares, entero e citotoxicidade (ABREU et al., 2013). Conforme apresentado na Tabela 4, os genes *aida-I*, *epeA*, *sab*, *sat* e *tibA* não foram detectados. Os demais genes (*cah*, *eatA*, *ehaABCDJ*, *espC*, *espP*, *espI* e *pet*) foram detectados em porcentagens variáveis e em uma cepa (BA589) foi detectado o gene *pic*. Esses resultados fazem parte do artigo apresentado no Anexo A, resultante do presente estudo.

Tabela 4 - Distribuição dos genes de virulência de autotransportadoras em amostras de EPEC atípica.

Genes	EPEC atípica (n=72)	
	No.	%
<i>aida-I</i>	0	0.0
<i>cah</i>	3	4.2
<i>eatA</i>	3	4.2
<i>ehaA</i>	33	45.8
<i>ehaB</i>	24	33.3
<i>ehaC</i>	32	44.4
<i>ehaD</i>	31	43.1
<i>ehaJ</i>	3	4.2
<i>epeA</i>	0	0.0
<i>espC</i>	21	29.2
<i>espI</i>	5	6.9
<i>espP</i>	3	4.2
<i>pet</i>	4	5.6
<i>pic</i>	1	1.4
<i>sab</i>	0	0.0
<i>sat</i>	0	0.0
<i>tibA</i>	0	0.0

4.2 Produção de Pic pela cepa BA589

A aEPEC BA589 albergando o gene *pic* foi então selecionada como protótipo para prosseguimento deste projeto, no sentido de caracterizar a produção/função de Pic em uma aEPEC.

Desta forma, foi realizado um experimento para pesquisar a produção da proteína Pic em sobrenadante de cultura. A Figura 6 mostra o resultado da análise realizada por imunodeteccção, indicando que a proteína Pic estava sendo produzida pela cepa BA589.

Figura 6 - Imunodeteccção da proteína Pic.

Após separação em SDS-PAGE (10%) os sobrenadantes de cultura concentrados foram transferidos para uma membrana de nitrocelulose e a imunodeteccção foi realizada com o soro anti-Pic (1:1000) e anticorpo secundário (1:5000), seguido da revelação com o *kit ECLTM Western Blotting Analysis System* (GE Healthcare). A imagem corresponde ao filme de raios-X após exposição ao *immunoblotting*, seguida de revelação e fixação. PM: marcador de massa molecular *Kaleidoscope Prestained Standards* (BioRad), com as respectivas massas indicadas ao lado.

A confirmação da produção de Pic em BA589 deu subsídios para a continuidade deste estudo.

4.3 Secreção de Pic durante a interação de BA589 com células HEp-2

Inicialmente foi realizada uma imunofluorescência utilizando o anticorpo anti-Pic para observar se Pic era secretada no momento de interação das cepas EAEC 042 e BA589 com células HEp-2 (Figura 7). Os resultados mostram que Pic, mesmo após o estabelecimento da adesão bactéria/célula, continua sendo produzida durante todo o processo de infecção.

Figura 7 - Imunofluorescência para detecção da proteína Pic, secretada durante a interação das cepas BA589 e 042 com células HEp-2.

Após cultivo, células HEp-2 foram infectadas com as cepas BA589 e 042. Depois de 6 h de interação bactéria/célula, foi realizada a imunodeteção utilizando soro anti-Pic (1:80) e anticorpo secundário (1:200). As imagens obtidas em microscópio confocal referem-se às células HEp-2 não infectadas (1) e células Hep-2 infectadas com a cepa 042 (2) e BA589 (3). Todas as células foram igualmente tratadas com: a) Isotiocianato de faloidina (1:60), b) To-Pro3 (1:250), c) Anticorpos anti-Pic e secundário. As imagens 1d, 2d e 3d representam a sobreposição das três primeiras imagens.

O ensaio de imunofluorescência também mostrou que Pic de BA589, possivelmente, era produzida em maior quantidade comparada com Pic de EAEC 042. Assim, foi necessário fazer uma quantificação da proteína produzida por ambas as cepas.

4.4 Quantificação de Pic em sobrenadante de cultura bacteriana

As cepas BA589 e 042 foram cultivadas em caldo LB a 37 °C sob agitação constante de 250 rpm. A DO₆₀₀ foi medida em intervalos de 1 h durante um período de 8 h, conforme a curva de crescimento obtida (Figura 8). Aliquotas de 1 mL a cada hora, de ambas as cepas, também foram coletadas e analisadas por *Western blotting* e ELISA.

Figura 8 - Curva de crescimento das cepas BA589 e 042.

As cepas foram cultivadas em caldo LB com agitação de 250 rpm a 37°C. As absorbâncias dos cultivos (leitura a 600 nm) foram obtidas em intervalos de 60 min durante 8 h.

Uma parte das alíquotas coletadas na curva de crescimento foi utilizada na imunodeteção de Pic nos sobrenadantes de cultura. Após tratamento e precipitação dos sobrenadantes com TCA, as amostras foram aplicadas em um SDS-PAGE 10% seguido de *Western blotting* e imunodeteção.

Conforme mostrado na figura 9, a proteína Pic produzida por ambas as cepas começa a ser detectada a partir da terceira hora de cultivo. Foi verificado também que Pic de BA589 é produzida de maneira crescente, diferente daquela produzida por EAEC 042 que após 18 h de cultivo diminui a produção e mantém uma quantidade similar àquela observada em 3 h.

Figura 9 - Imunodeteccção da proteína Pic em cultura bacteriana.

Alíquotas dos sobrenadantes de cultura das cepas BA589 e 042, coletadas em intervalos de 1 h, foram concentradas com ácido tricloroacético (TCA) e após separação em SDS-PAGE (10%) foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e a imunodeteccção foi realizada com o soro anti-Pic (1:1000) e anticorpo secundário (1:5000), seguido da revelação com o kit *ECLTM Western Blotting Analysis System* (GE Healthcare). A imagem corresponde ao filme de raios-X após exposição ao *immunoblotting*, seguida de revelação e fixação.

Tendo em vista que o *Western blotting* não é uma técnica quantitativa, foi realizado um ELISA para que essa diferença na produção de Pic entre as cepas fosse mensurada. Para tanto, outra parte das alíquotas obtidas no cultivo bacteriano foi utilizada para este propósito. A quantificação de Pic foi realizada utilizando o anticorpo anti-Pic (1:1250) e anticorpo secundário anti-rabbit (1:5000), seguido da revelação com o kit *TMB substrate Opt EIA Rgnt Set* (BD Biosciences). Conforme ilustrado no gráfico (Figura 10), a proteína Pic de ambas as cepas apresentam um pico de produção com 3 h de cultivo, corroborando a detecção inicial por immunoblotting. A proteína Pic de EAEC 042 mantém uma produção quase constante após 4 h de cultivo, ao passo que Pic de BA589 continua a ser produzida de forma aumentada e gradativa até as 18 h de cultivo, corroborando todos os resultados observados ao longo da execução deste projeto.

Figura 10 - Quantificação da proteína Pic por ELISA.

Alíquotas dos sobrenadantes de cultura das cepas BA589 e 042, coletadas em intervalos de 1 h, foram diluídas em tampão carbonato (1:10) e aplicadas em placas de 96 poços com posterior incubação a 37 °C por 2 h, seguido de incubação *over night* a 4 °C. Após bloqueio com BSA (1%) a quantificação de Pic foi realizada utilizando o anticorpo anti-Pic (1:1250) e anticorpo secundário (1:5000), seguido da revelação com o kit *TMB substrate Opt EIA Rgnt Set* (BD Biosciences). A leitura das absorbâncias foi realizada a 450 nm.

4.5 Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos

De todos os antibióticos testados pelo método de disco-difusão, a cepa BA589 apresentou resistência a ampicilina, estreptomicina e tetraciclina, sendo susceptível ao ácido nalidixico, amicacina, amoxicilina, aztreonam, cefalotina, cefotaxima, ceftazidima, ciprofloxacina, cloranfenicol, gentamicina e sulfametoxazol/trimetoprim.

4.6 Teste de adesão da cepa BA589 em células HEp-2

Conforme representado na Figura 11, BA589 apresentou o padrão de adesão localizado-*like* (AL-L), após o período de 6 h de interação bactérias-células HEp-2. O padrão AL-L é caracterizado pela presença de bactérias aderidas em grupos esparsos, localizados sobre a superfície da célula epitelial. Esse padrão de adesão é o mais frequentemente

observado em cepas de aEPEC (ABE et al., 2009; DULGUER et al, 2003; ROBINS-BROWNE et al., 2004; VIEIRA et al., 2001).

Figura 11 - Teste de adesão em células HEp-2.

Padrão de interação da cepa BA589 e de cepas controle com células HEp-2 após 6 h de interação. As células foram coradas com solução de May-Grünwald/Giemsa e visualizadas através de microscopia de luz com aumento de 1.000 vezes. (A) padrão de adesão difusa da cepa DAEC C1845, (B) padrão de adesão agregativa da cepa EAEC 17-2, (C) padrão de adesão localizada da cepa tEPEC E2348/69, (D) padrão de adesão localizada-like da cepa BA589.

Para verificar se BA589 tinha a capacidade de causar a lesão *attaching-effacing* (A/E) *in vitro*, característico das cepas de EPEC típicas e atípicas, foi realizado o teste de FAS, também em ensaios de 6 h de interação com células HEp-2. O teste mostrou um acúmulo de actina polimerizada sob a adesão bacteriana nas células HEp-2, mostrando que a cepa em estudo é capaz de causar esse tipo de lesão (Figura 12).

Figura 12 - Teste de FAS em células HEp-2.

Após 6 h de interação das amostra bacterianas com células HEp-2, as mesmas foram coradas com isotiocianato de faloidina e To-Pro3 e visualizadas através de microscopia de fluorescência com aumento de 1.000 vezes. As imagens obtidas em microscópio confocal referem-se às células HEp-2 infectadas com as cepas BA589 (1) e E2348/69 (2). Todas as células foram igualmente tratadas com: a) Isotiocianato de faloidina (1:60) e b) To-Pro3 (1:250). As imagens 1c e 2c representam a sobreposição das duas primeiras imagens.

Desta forma, as principais características de EPEC atípica foram confirmadas na cepa BA589, ou seja, a expressão do padrão AL-L e o potencial de induzir a lesão A/E.

4.7 Pesquisa de genes de virulência de outros patótipos de DEC

A presença de diversos marcadores de virulência de outros patótipos de DEC (EAEC, DAEC, STEC e ETEC) também foi pesquisada por PCR. Dentre estes, os genes *aafA*, *aafC*, *aap*, *aaiA*, *aaiG*, *aggABCD*, *agg3A*, *aggC*, *agg4A*, *agg4C*, *aggR*, *ap58*, *rfbU*, *pilV*, *sigA*, *shf* e *virK* não foram detectados por PCR. Por outro lado, os genes *astA*, *irp2*, *pilS* e *sepA* foram detectados na cepa BA589.

4.8 Sequenciamento de *pic* da cepa BA589

Com o intuito de conhecer a sequência de nucleotídeos do gene *pic* de BA589 foi estabelecida uma estratégia para o seu sequenciamento completo, ou seja, do codon de iniciação ao codon de terminação. A Figura 13 mostra a estratégia utilizada para esse sequenciamento. Para tanto, foram utilizados 9 pares de iniciadores (Tabela 1) que cobriram a sequência completa do gene.

Figura 13 - Esquema da estratégia de sequenciamento do gene *pic* da cepa BA589.

Esses diversos fragmentos amplificados foram sequenciados em ambos os sentidos e as diversas sequências obtidas foram alinhadas em um único “*contig*”, correspondendo a 4.119 nucleotídeos. Esse fragmento compreende o gene *pic* completo da BA589. Essa sequência foi então comparada com a sequência de *pic* de EAEC 042, utilizando o programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (version 7.0.5.3), conforme apresentado na Figura 14.

Figura 14 - Alinhamento da sequência completa de *pic* de BA589 com EAEC 042.

```

      3310      3320      3330      3340      3350      3360      3370      3380      3390      3400
picBA589  ATGGGTGACCTGCGTAAACACAAACGGTGATGCCGGTGCTGGGCGCGCATCATGAGTGGTGCCGGTTCTGCAGACGGTGGTTACAGTGATAATTACACCC
pic042    M G D L R N T N G D A G A W A R I M S G A G S A D G G Y S D N Y T
           .....G.....

      3410      3420      3430      3440      3450      3460      3470      3480      3490      3500
picBA589  ATGTTTCAGGTTCGGCTTTGACAAAAACATGAACTGGACGGTGTGGACCTGTTTACCGGTGTCCAGATGACCTATACCGACAGCAGTGCAGACAGCCATGTC
pic042    H V Q V G F D K K H E L D G V D L F T G V T M T Y T D S S A D S H A
           .....
           H V Q V G F D K K H E L D G V D L F T G V T M T Y T D S S A D S H A

      3510      3520      3530      3540      3550      3560      3570      3580      3590      3600
picBA589  ATTTCAGCGGAAGACGAAATCGGTGGGGGGCGGTCTGTATGCTTCAGCATTTGTTGAGTCCGGTGCCTATATCGATTTGATTGGTAAATATATTACCACAT
pic042    F S G K T K S V G G G L Y A S A L F E S G A Y I D L I G K Y I H H
           .....
           F S G K T K S V G G G L Y A S A L F E S G A Y I D L I G K Y I H H

      3610      3620      3630      3640      3650      3660      3670      3680      3690      3700
picBA589  GACCAATGATTACACAGGTAACTTTGCTAGCCTGGGAACGAAACACTACAAACCCCATTCCTGGTATGCCGGTGTGAAACGGGTTCACCGCTATCACCTGA
pic042    D N D Y T G N F A S L G T K H Y N T H S W Y A G A E T G Y R Y H L
           .....
           D N D Y T G N F A S L G T K H Y N T H S W Y A G A E T G Y R Y H L

      3710      3720      3730      3740      3750      3760      3770      3780      3790      3800
picBA589  CAGAGGACACGTTTCATTGAGCCGCGAGGCTGAACTGGTTACGGCGCCGTGTCCGGGAAACATTCCGCTGGAAAGACGGTGATATGGACCTGAGCATGAA
pic042    T E D T F I E P Q A E L V Y G A V S G K T F R W K D G D M D L S M K
           .....
           T E D T F I E P Q A E L V Y G A V S G K T F R W K D G D M D L S M K

      3810      3820      3830      3840      3850      3860      3870      3880      3890      3900
picBA589  GAACAGGGACTTCAGTCCGCTGGTGGGAAGAACAGGGGTGAACTGGGCAAGACCTTCAGTGGTAAGGACTGGAGTGTGACGGCCCGTGCCGGAACAGC
pic042    N R D F S P L V G R T G V E L G K T F S G K D W S V T A R A G T S
           .....
           N R D F S P L V G R T G V E L G K T F S G K D W S V T A R A G T S

      3910      3920      3930      3940      3950      3960      3970      3980      3990      4000
picBA589  TGGCAGTTTGACCTGCTGAATAATGGAGAGACCGTACTGCGTGATGCGTCCGGGGAGAAACGGATAAAAGGAGAGAGGACAGCCGGATGCTGTTTAATG
pic042    W Q F D L L N N G E T V L R D A S G E K R I K G E K D S R M L F N
           .....
           W Q F D L L N N G E T V L R D A S G E K R I K G E K D S R M L F N

      4010      4020      4030      4040      4050      4060      4070      4080      4090      4100
picBA589  TTGGTATGAATGCCAGATAAAGGACAAATATCCGCTTTGGTCTGGAATTTGAGAACTCAGCCTTTGGTAAATATAACGTGGATAATGCGGTAAACCGGAA
pic042    V G M N A Q I K D N M R F G L E F E K S A F G K Y N V D N A V N A N
           .....
           V G M N A Q I K D N M R F G L E F E K S A F G K Y N V D N A V N A N

      4110
picBA589  TTTCCGGTATATGTTCTGA
           F R Y M F *
pic042    .....
           F R Y M F *

```

A análise pelo programa BLAST do “National Center for Biotechnology Information” mostrou uma identidade de 99% de *pic* de BA589 com o mesmo gene presente em duas cepas de EAEC (042 e 55989) e em *Shigella flexneri* 2a (Figura 15). Esse achado confirmou que o gene amplificado detectado na cepa BA589 é o mesmo previamente sequenciado em EAEC e *S. flexneri* 2a (HENDERSON et al., 1999; RAJKUMAR; DEVARAJ; NIRANJALI, 1997). Além disso, o conhecimento dessa sequência permitiu o prosseguimento deste estudo no sentido de obtenção de um clone de expressão e de um mutante isogênico.

Figura 15 - Análise da sequência de *pic* da cepa BA589 pelo programa BLAST.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
CU928145.2	Escherichia coli 55989 chromosome, complete genome	7651	1.530e+04	100%	0.0	99%
FN554766.1	Escherichia coli 042 complete genome	7646	7646	100%	0.0	99%
AF005674.2	Shigella flexneri 2a str. 301, complete genome	7640	7640	100%	0.0	99%
CP001383.1	Shigella flexneri 2002017, complete genome	7640	7640	100%	0.0	99%
AF014073.1	Shigella flexneri 2a str. 2457T, complete genome	7640	7640	100%	0.0	99%
AF200692.2	Shigella flexneri 2a she pathogenicity island, complete sequence	7618	7618	100%	0.0	99%
U35656.1	Shigella flexneri 2a mucinase (she) gene and enterotoxin 1 (set1A an	7618	7618	100%	0.0	99%
AF097644.1	Escherichia coli Pic serine protease precursor (pic), toxin subunit Set	7601	7601	100%	0.0	99%
CP001671.1	Escherichia coli ABU 83972, complete genome	6913	6913	99%	0.0	96%
AF014075.1	Escherichia coli CFT073, complete genome	6913	6913	99%	0.0	96%
FN543503.1	Citrobacter rodentium ICC168 plasmid pCROD1, complete sequence	2374	3682	98%	0.0	84%
Z47381.1	S. flexneri 2a set1A and set1B genes for enterotoxin 1	1995	1995	26%	0.0	99%
CP002797.1	Escherichia coli NA114, complete genome	1435	1435	32%	0.0	85%
AP009378.1	Escherichia coli SE15 DNA, complete genome	1435	1435	32%	0.0	85%
CP000038.1	Shigella sonnei Ss046, complete genome	1188	1188	15%	0.0	99%

4.9 Análise da localização de *pic* na cepa BA589

A extração plasmidial foi realizada com a finalidade de determinar o perfil plasmidial da cepa BA589 e verificar se a localização de *pic* era cromossômica ou plasmidial. A eletroforese em gel de agarose realizada após a extração plasmidial mostrou que a cepa apresenta oito bandas correspondentes a possíveis plasmídeos com tamanhos que variam de 1,2 a 98,0 Kb, conforme apresentado na figura 16.

Figura 16 - Análise do perfil plasmidial da cepa BA589.

Após a eletroforese em gel de agarose (0,7%) da extração plasmidial o gel foi corado com brometo de etídio e observado em transiluminador de luz ultravioleta. Canaletas: (1) plasmídeos de *E. coli* 39R861 (marcador plasmidial com plasmídeos de alto peso), (2) plasmídeos de *E. coli* V517 (marcador plasmidial com plasmídeos de baixo peso), (3) plasmídeos de BA589. Ao lado de cada banda estão os tamanhos em kb de cada plasmídeo.

Novas extrações plasmidiais da cepa BA589 foram realizadas com o objetivo determinar a localização do gene *pic*, através de *Southern blot* com uma sonda específica. Para tanto, o conteúdo plasmidial do gel de agarose, após extração, foi transferido para uma membrana de *nylon* e hibridizado com uma sonda genética correspondente ao gene *pic* da EAEC 042, marcada por quimioluminescência.

O resultado obtido por *Southern blot* (Figura 17) mostrou que o gene *pic* na cepa em estudo está localizado em um plasmídeo de aproximadamente 98,0 Kb.

Figura 17 - Localização do gene *pic* através de *Southern blot*.

Após a eletroforese em gel de agarose (0,7%) da extração plasmidial de BA589, o gel foi corado com brometo de etídio, observado em transiluminador de luz ultravioleta (Painel A) e transferido para uma membrana de *nylon*, a qual foi hibridizada com uma sonda específica correspondente ao gene *pic*. Após a detecção com auxílio do *kit ECL Nucleic Acid Labelling and Detection System* (GE Healthcare), a membrana de *nylon* foi exposta a um filme de raios-X, seguido de revelação e fixação (Painel B). Canaletas: (1) *E. coli* 39R861, (2) BA589, (3) produto amplificado por PCR correspondente ao gene *pic* de EAEC 042. As setas indicam o plasmídeo de interesse de ~98 Kb e o fragmento *pic* amplificado.

Em seguida, foi realizado um experimento de cura na tentativa de eliminar esse plasmídeo e consequente a produção de Pic.

A cura plasmidial teve como objetivo obter pelo menos uma colônia da cepa BA589 sem o plasmídeo que alberga *pic*. Inicialmente, as colônias obtidas a partir do crescimento em 125 µg/ml de alaranjado de acridina (maior concentração de acridina onde houve crescimento bacteriano) foram analisadas por PCR para a verificação da perda do gene *pic*. Dentre as 52 colônias analisadas, quatro foram negativas para a amplificação de *pic*, indicando uma possível perda do plasmídeo que alberga o gene e foram denominadas curadas 1, 2, 3 e 4.

Diante dos resultados obtidos com a cura plasmidial, novos ensaios foram necessários para a confirmação da perda do plasmídeo que alberga *pic* nas colônias selecionadas. Esses ensaios incluíram a análise do perfil plasmidial e hibridização do com a sonda *pic*, seguida da imunodeteção da respectiva proteína.

A extração plasmidial das colônias curadas e a análise por eletroforese em gel de agarose mostraram que as quatro colônias curadas perderam todos os plasmídeos de massa molecular baixa (Figura 18A). Contudo, foi possível observar que houve uma alteração no padrão de migração do plasmídeo de maior massa molecular em três dessas cepas. Ou ainda, a perda do plasmídeo de 98 kb, o que possibilitou a visualização de um segundo plasmídeo com coeficiente de migração eletroforética muito próximo daquele. Esses resultados indicam que a região ou o plasmídeo que alberga o gene *pic* foram perdidos, uma vez que os resultados da PCR foram negativos para o mesmo.

Desta forma, a partir do conteúdo plasmidial contido no gel de agarose, foi realizado um *Southern blot* com o objetivo de confirmar essa perda do gene no plasmídeo anteriormente identificado. A Figura 18B mostra o resultado após hibridização da membrana com uma sonda genética correspondente ao gene *pic* da EAEC 042, marcada por quimioluminescência. Apenas a amostra BA589 foi positiva, indicando a perda do gene em todas as curadas.

Figura 18 - Verificação da presença do gene *pic* nas cepas BA589 curadas através de *Southern blot*.

Após a eletroforese em gel de agarose (0,7%) da extração plasmidial de BA589 e das curadas, o gel foi corado com brometo de etídio, observado em transiluminador de luz ultravioleta (Painel A) e transferido para uma membrana de *nylon*, a qual foi hibridizada com uma sonda específica correspondente ao gene *pic*. Após a detecção com auxílio do *kit ECL Nucleic Acid Labelling and Detection System* (GE Healthcare), a membrana de *nylon* foi exposta a um filme de raios-X, seguido de revelação e fixação (Painel B). Canaletas: (1) *E. coli* 39R861, (2) EAEC 042, (3) BA589, (4) Curada 1, (5) Curada 2, (6) Curada 3, (7) Curada 4, (8) produto amplificado por PCR correspondente ao gene *pic* de EAEC 042. As setas indicam o plasmídeo de interesse de ~98 Kb e o fragmento *pic* amplificado.

Em seguida foi verificado se essas curadas haviam deixado de produzir Pic. Para isso, as proteínas dos sobrenadantes de três delas foram obtidas e submetidas à imunodetecção, de modo semelhante ao descrito no item 3.6.4. A Figura 19A mostra o resultado da análise do sobrenadante de cultura das cepas curadas por SDS-PAGE. Nessa análise observa-se um perfil eletroforético diferente entre a cepa BA589 e as curadas. Com esse mesmo conteúdo proteico foi realizada a imunodetecção com o soro anti-Pic com o objetivo de verificar se a proteína Pic estava sendo produzida e secretada no sobrenadante das culturas. A Figura 19B mostra o resultado desta análise. Em três das amostras curadas pôde-se observar que Pic (~109 kDa) não foi detectada no sobrenadante de cultura, indicando, assim, que a proteína não

estava sendo produzida por estas cepas. Esse ensaio confirmou o sucesso na cura do plasmídeo que alberga o gene *pic* na cepa BA589.

Figura 19 - Análise por SDS-PAGE (12%) e imunodeteccção de Pic nos sobrenadantes de cultura das cepas curadas.

(A) Análise por SDS-PAGE (12%) dos sobrenadantes de cultura concentrados das cepas curadas, após coloração com Comassie Blue. Canaletas: (1) Marcador de massa molecular *LMW Calibration kit for SDS Electrophoresis* (GE Healthcare), com as respectivas massas indicadas pelas setas, (2) *E. coli* DH5 α , (3) *E. coli* HB101, (4) aEPEC Ba589, (5) Curada 1, (6) Curada 2, (7) Curada 3. (B) Após separação em SDS-PAGE (10%) os sobrenadantes de cultura concentrados foram transferidos para uma membrana de nitrocelulose e a imunodeteccção foi realizada com o soro anti-Pic (1:1000) e anticorpo secundário (1:5000), seguido da revelação com o kit *ECLTM Western Blotting Analysis System* (GE Healthcare). A imagem corresponde ao filme de raios-X após exposição ao immunoblotting, seguida de revelação e fixação. A seta ao lado indica a proteína Pic com 109 kDa. Canaletas: (1) Marcador de massa molecular *PageRulerTM Prestained Protein Ladder* (Bio-Rad), com as respectivas massas indicadas pelas setas, (2) *E. coli* DH5 α , (3) *E. coli* HB101, (4) aEPEC Ba589, (5) Curada 1, (6) Curada 2, (7) Curada 3.

4.10 Deleção do gene *pic* pelo sistema lambda-red

Alguns requisitos são necessários para realizar a mutação de um gene pelo sistema lambda-red utilizando o plasmídeo pKD46 (Amp^R). Dentre eles, a cepa deve ser capaz de crescer a 30, 37 e 42 °C e ser sensível à ampicilina e cloranfenicol. Além disso, o gene a ser mutado não pode ser essencial à bactéria e a sua sequência de nucleotídeos deve ser conhecida, ou em outro caso, a sequência de um homólogo em outra cepa.

Tendo em vista que a cepa BA589 é resistente ao antibiótico ampicilina, o plasmídeo pKOBEG (*Apra^R*) foi utilizado (SAMPAIO et al, 2009). Este vetor também é utilizado no sistema lambda-red e difere do pKD46 por possuir resistência ao antibiótico apramicina. Inicialmente foi realizado um teste de sensibilidade aos antimicrobianos com a cepa BA589 e a mesma apresentou sensibilidade a apramicina, o que indicou a possibilidade de se usar o pKOBEG na deleção do gene *pic*. Em seguida, a cepa BA589 competente foi transformada com o pKOBEG e as transformantes cultivadas em ágar LB contendo apramicina (100 µg/mL). Colônias transformantes foram selecionadas e armazenadas a -80 °C em caldo LB contendo 0,5% de glicerol. Em paralelo, os iniciadores BA589Δ*pic*(F) e BA589Δ*pic*(R) foram desenhados para serem utilizados na deleção de *pic*. Estes, além de possuírem 60 pb (cada um) com homologia a regiões adjacentes ao gene, anelam com o vetor pKD3 que possui o cassete de resistência para cloranfenicol. Os iniciadores foram utilizados para amplificar um fragmento de 1.1 Kb contendo o cassete completo de resistência ao cloranfenicol a partir do vetor pKD3 (figura 20).

Figura 20 - Eletroforese em gel de agarose (1,0%) dos fragmentos amplificados por reação de PCR a partir do plasmídeo pKD3, referentes ao cassete de resistência ao cloranfenicol.

O gel foi corado em solução de corante gelRed (1:10000) e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta. Canaletas: (1) marcador 1 kb DNA ladder (Invitrogen); (2 a 10) fragmentos amplificados do cassete de resistência a cloranfenicol. A seta indica o tamanho do fragmento amplificado do cassete de resistência.

Em seguida os fragmentos foram purificados utilizando o kit *DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) e em seguida tratado com a enzima *DpnI* para digestão do DNA parental, seguido de nova purificação. O produto purificado foi introduzido por eletroporação em uma cepa de BA589 transformada previamente com o pKOBEG. O objetivo foi promover a recombinação do produto de PCR com o gene *pic* na cepa BA589, a partir das regiões homólogas, conforme esquema da figura 21.

Figura 21 - Esquema de mutagênese pelo sistema lambda-red usado na deleção do gene *pic* da cepa BA589.

Após eletroporação, as transformantes foram incubadas por 1 h com agitação de 150 rpm a 30 °C. Essa temperatura é ideal para que o plasmídeo pKOBEG produza as recombinases de interesse e promova a troca do gene *pic* pelo cassete de resistência a cloranfenicol. Após incubação, o produto da transformação foi transferido para placas de ágar LB contendo cloranfenicol e incubados a 37 °C por 18 h.

Dez colônias foram selecionadas para confirmação da recombinação. Um novo cultivo, desta vez a 42 °C em meio contendo cloranfenicol, foi necessário para que o

plasmídeo pKOBEG fosse expulso do mutante. Como controle da perda do plasmídeo, o mesmo cultivo foi feito em meio contendo apramicina. Duas colônias foram recuperadas a partir do crescimento apenas em cloranfenicol. A inibição do crescimento destas colônias em meio contendo apramicina confirmou que as mesmas haviam perdido o plasmídeo pKOBEG.

Uma PCR para detecção de *pic* foi realizada com o objetivo de verificar se as transformantes realmente havia perdido o gene. Conforme mostra a figura 22, as duas transformantes foram negativas e receberam o nome de BA589 Δ *pic*1 e BA589 Δ *pic*2.

Figura 22 - Eletroforese em gel de agarose (1,0%) dos fragmentos amplificados por reação de PCR das cepas transformantes, após mutagênese pelo sistema lambda-red.

O gel foi corado em solução de corante gelRed (1:10000) e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta. Canaletas: (1) marcador *1 kb plus DNA ladder* (Invitrogen); (2) HB101 (controle negativo); (3) BA589 (controle positivo); (4) BA589 Δ *pic*1; (5) BA589 Δ *pic*2.

Diante disto, uma análise por SDS-PAGE seguida de imunodetecção da proteína Pic foi realizada. Os resultados mostraram a ausência da produção da proteína nos mutantes (figura 23).

Figura 23 - Imunodetecção da proteína Pic nos mutantes.

(A) Análise por SDS-PAGE (12%) dos sobrenadantes de cultura concentrados das cepas curadas, após coloração com Comassie Blue. A Canaleta 1 corresponde ao marcador de massa molecular *LMW Calibration kit for SDS Electrophoresis* (GE Healthcare), com as respectivas massas indicadas ao lado. As demais canaletas estão identificadas na figura. (B) Após separação em SDS-PAGE (10%) os sobrenadantes de cultura concentrados foram transferidos para uma membrana de nitrocelulose e a imunodetecção foi realizada com o soro anti-Pic (1:1000) e anticorpo secundário (1:5000), seguido da revelação com o kit *ECLTM Western Blotting Analysis System* (GE Healthcare). A imagem corresponde ao filme de raios-X após exposição ao imunoblotting, seguida de revelação e fixação. A seta ao lado indica a proteína Pic com 109 kDa.

Confirmada a deleção nas duas cepas, uma delas (BA589Δpic1) foi escolhida para realização das próximas etapas. A primeira destas etapas foi mostrar por meio de uma PCR a amplificação completa da região contendo o gene na cepa BA589 (4.2 Kb), bem como a troca desta região pelo cassete de resistência ao cloranfenicol (1.1 Kb), utilizando os iniciadores *pic1a*(F) e *pic4c*(R), descritos na tabela 1. Estes iniciadores anelam em regiões upstream e downstream ao gene *pic*, que não foram deletadas na recombinação. A figura 24 mostra a diferença no tamanho das bandas dos produtos amplificados, conforme esperado.

Figura 24 - Eletroforese em gel de agarose (1,0%) dos fragmentos amplificados a partir dos iniciadores *pic1a*(F) e *pic4c*(R) que amplificam o gene *pic* completo por reação de PCR.

O gel foi corado em solução de corante gelRed (1:10000) e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta. Canaletas: (1) marcador *1 kb plus DNA ladder* (Invitrogen); (2) HB101 (controle negativo); (3) BA589 (controle positivo); (4) BA589 Δ *pic1*.

Em seguida foi realizado o sequenciamento completo da região onde foi feita a troca do gene *pic* pelo cassete de resistência ao cloranfenicol. Como apresentado na figura 25, a análise do sequenciamento mostrou que a mutação do gene *pic* pelo sistema lambda-red foi realizada com êxito na cepa BA589.

Figura 25 - Sequenciamento do mutante BA589 Δ *pic*1.

Em destaque (cinza e verde), as regiões utilizadas na confecção dos iniciadores desenhados para deletar o gene *pic*. Em cinza, as regiões dos iniciadores que possuem homologia com as regiões adjacentes a *pic* e responsáveis pela recombinação homóloga. Em verde, as sequências de nucleotídeos presentes no cassete de resistência ao cloranfenicol utilizados para amplificar o cassete, a partir do plasmídeo pKD3. A figura como um todo mostra o sequenciamento completo do cassete de resistência no mutante BA589 Δ *pic*1. As regiões em cinza também indicam que o cassete foi inserido entre as regiões adjacentes ao gene *pic*.

A análise pelo programa BLAST do “National Center for Biotechnology Information” mostrou que a região sequenciada de BA589 Δ *pic*1, referente à recombinação, possui uma identidade de 99% com o cassete de resistência ao cloranfenicol presente no plasmídeo pKD3 (Figura 26).

Figura 26 - Análise da sequência do cassete de cloranfenicol no mutante BA589 Δ pic1 pelo programa BLAST.

Template plasmid pKD3, complete sequence

Sequence ID: [gb|AY048742.1](#) Length: 2804 Number of Matches: 3

Range 1: 34 to 1044				GenBank	Graphics	Next Match	Previous Match
Score	Expect	Identities		Gaps		Strand	
1832 bits(992)	0.0	1006/1014	(99%)	4/1014(0%)		Plus/Plus	
Query	1	TAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGA				60	
Sbjct	34	TAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGA				93	
Query	61	ACTTCATTTAAATGGCGCGCCTTACGCCCCGCCCTGCCACTCATCGCAGTACTGTTGTAA				120	
Sbjct	94	ACTTCATTTAAATGGCGCGCCTTACGCCCCGCCCTGCCACTCATCGCAGTACTGTTGTAA-				152	

Após mutação, as cepas BA589 e BA589 Δ pic1 foram cultivadas em caldo LB a 37 °C com agitação constante de 250 rpm. A DO₆₀₀ foi medida em intervalos de 30 min durante um período de 8 h. Como mostra o gráfico da curva de crescimento, a mutação do gene não interferiu no crescimento da cepa BA589 (figura 27).

Figura 27 - Curva de crescimento de BA589 e do mutante BA589 Δ pic1.

As cepas foram cultivadas em caldo LB com agitação de 250 rpm a 37°C. As absorbâncias dos cultivos (leitura a 600 nm) foram obtidas em intervalos de 30 min durante 8 h.

4.11 Purificação de Pic

Tendo em vista que a proteína recombinante não foi obtida, foi realizada uma purificação de Pic a partir do sobrenadante concentrado de BA589 utilizando uma coluna de gel filtração acoplada ao sistema AKTA de cromatografia (GE Healthcare). Para tanto, a cepa em estudo foi cultivada em 1 L de caldo LB a 37 °C por 18 h com agitação. O sobrenadante de cultura foi filtrado e concentrado utilizando Vivaspín 100 kDa (GE Healthcare), conforme figura 28.

Figura 28 - Análise por SDS-PAGE (10%) dos sobrenadantes após concentração utilizando Vivaspín 100 kDa e coloração com Comassie Blue.

Canaletas: (1) Marcador de massa molecular LMW *Calibration kit for SDS Electrophoresis* (GE Healthcare), com as respectivas massas indicadas ao lado; (2) Sobrenadante do cultivo de BA589 concentrado 2x; (3) Sobrenadante do cultivo de BA589 concentrado 3x.

Em seguida, alíquotas do sobrenadante concentrado foram aplicadas na coluna de gel filtração acoplada ao sistema AKTA de purificação. A figura 29 ilustra um dos cromatogramas obtidos a partir do sistema de imagem do AKTA. Nele é possível observar a presença de dois picos referentes a possíveis proteínas.

Figura 29 - Cromatograma obtido no sistema AKTA após gel filtração da proteína Pic.

Para verificar se os picos correspondiam a proteínas, foi realizada uma análise por SDS-PAGE (12%) de todas as frações obtidas no primeiro e segundo picos. A figura 30 mostra que as frações obtidas no primeiro pico eram proteínas com o peso similar a proteína Pic. Entretanto, o SDS-PAGE das frações referentes ao segundo pico não apresentou nenhuma banda referente a possíveis proteínas.

Figura 30 - Análise por SDS-PAGE (10%) das frações obtidas no primeiro pico do AKTA após coloração com *Comassie Blue*.

A canaleta 1 corresponde ao marcador de massa molecular LMW *Calibration kit for SDS Electrophoresis* (GE Healthcare), com as respectivas massas indicadas ao lado. As demais canaletas correspondem às frações obtidas no primeiro pico observado no cromatograma do AKTA.

Para confirmar se a proteína obtida na purificação era a proteína de interesse, foi realizado um *Western blotting* seguido de imunodeteção utilizando o anticorpo anti-Pic, para alíquotas de ambos os picos. Desta forma, a purificação da proteína Pic foi realizada com êxito, uma vez que a fração obtida no pico 1 foi reconhecida pelo anticorpo anti-Pic (Figura 31).

Figura 31 - Imunodeteccção de Pic após gel filtração.

Após separação em SDS-PAGE (10%) as alíquotas referentes aos picos 1 e 2 obtidos na gel filtração foram transferidos para uma membrana de nitrocelulose e a imunodeteccção foi realizada com o soro anti-Pic (1:1000) e anticorpo secundário (1:5000), seguido da revelação com o kit *ECLTM Western Blotting Analysis System* (GE Healthcare). A imagem corresponde ao filme de raios-X após exposição ao immunoblotting, seguida de revelação e fixação. A seta ao lado indica a proteína Pic com 109 kDa.

Desta forma, com a obtenção do mutante em *pic* e da proteína purificada, os próximos passos foram: (a) avaliar a capacidade de Pic em clivar moléculas do sistema complemento; (b) analisar se as atividades mucinolítica e de hemaglutinação, previamente descritas para a patogênese de EAEC e (c) investigar o papel de Pic no processo de colonização em modelo animal, utilizando camundongos tratados com estreptomicina.

4.12 Análise das atividades de Pic *in vitro*

4.12.1 Clivagem de moléculas do complemento

Um ensaio de sobrevivência também foi realizado com a cepa BA589 para verificar se a mesma possuía atividade bactericida. Conforme mostrado na figura 32, a cepa em estudo foi

capaz de sobreviver à atividade bactericida do soro humano, diferente da cepa DH5 α .

Figura 32 - Ensaio de sobrevivência da cepa BA589 e DH5 α .

Após cultivo bacteriano a 37 °C, as cepas BA589 e DH5 α foram incubadas a 37 °C por 5, 10, 15, 30 e 60 min com soro humano ativado ou previamente inativado. Em seguida foram semeadas em placas contendo ágar LB e incubadas a 37 °C por 18 h para determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC).

Tendo em vista que o mecanismo de ação da serinoprotease secretada por EAEC sobre o sistema complemento não foi elucidado e que a cepa BA589 também se mostrou resistente à atividade bactericida do soro humano, o objetivo desta etapa foi analisar o possível papel de Pic nesse processo. Para tanto, algumas moléculas-chave das três vias do sistema complemento (C1q, C2, C3 e C4) foram utilizadas nos ensaios de incubação com a serino protease Pic. A avaliação foi realizada mediante a detecção dos produtos de clivagem de moléculas do sistema complemento após incubação com o sobrenadante de cultura das cepas BA589 e BA589 Δ pic. A figura 33 mostra esses produtos de clivagem apenas nas incubações com o sobrenadante de cultura da cepa BA589. As incubações realizadas com a cepa mutante BA589 Δ pic, assim como as do controle negativo com PBS, não mostraram clivagem das moléculas C2, C3 e C4. Com relação à molécula C1q, não houve clivagem em nenhuma das incubações, indicando que a proteína Pic não possui atividade sobre esta molécula.

Figura 33 - Clivagem de moléculas do sistema complemento.

Os sobrenadantes de cultura das cepas BA589 e BA589 Δ pic1 foram incubados por 5 h a 37 °C com moléculas do complemento e em seguida as amostras foram aplicadas em SDS-PAGE (10%) e após separação foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. A imunodeteção foi realizada utilizando anticorpos específicos, seguido da revelação com o kit *ECLTM Western Blotting Analysis System* (GE Healthcare). As imagens correspondem aos filmes de raios-X após exposição ao immunoblotting, seguida de revelação e fixação. As setas ao lado de cada figura correspondem às bandas de clivagens das moléculas do sistema complemento.

Assim, pela clivagem direta de proteínas importantes para a ativação das três vias do sistema complemento, a proteína Pic promove resistência à atividade bactericida do soro e contribui para que patógenos produtores desta serinoprotease consigam evadir ao sistema imune do hospedeiro.

Para compreender de maneira mais abrangente este processo de interação de Pic com proteínas do sistema complemento, o presente estudo foi ampliado empregando a proteína Pic da cepa protótipo de EAEC 042, a qual possui identidade de 99% em nível de aminoácidos com a Pic da cepa BA589.

Pic₀₄₂ foi capaz de clivar as moléculas C3b e C4b, e assim como Pic₅₈₉, promoveu a clivagem direta de outras proteínas da via clássica e das lectinas, como C2, C3 e C4. Fragmentos de clivagem dessas moléculas também foram observados após a incubação destas moléculas com sobrenadantes de cultura de HB101(pPic1). Os fragmentos de clivagem de C3 foram mapeados utilizando peptídeos FRET (fluorescence resonance energy transfer peptides). Um ensaio utilizando o soro humano como fonte de proteínas do complemento

4.12.2 Atividade de hemaglutinação

Ensaios prévios realizados por Henderson et al., (1999) mostraram que Pic produzida por EAEC 042 promove a hemaglutinação de hemácias de rato, carneiro, porco e coelho, sendo mais intensa nesta última espécie. Desta forma, para confirmar se a serinoprotease Pic da cepa BA589 estava ativa, hemácias de coelhos foram obtidas comercialmente e incubadas com preparações de Pic₅₈₉, Pic₀₄₂ e com os sobrenadantes de cultura das cepas BA589 e BA589 Δ pic. A inibição da hemaglutinação também foi realizada com adição prévia de anticorpos anti-Pic às incubações.

Conforme mostrado na tabela 5, todas as preparações contendo Pic promoveram a hemaglutinação das hemácias de coelho. Contudo, a perda dessa atividade foi observada quando anticorpos anti-Pic foram adicionados à reação. Esse mesmo efeito foi observado com o sobrenadante de cultura da cepa BA589 Δ pic. Desta forma, estes dados confirmam os dados da atividade de hemaglutinação obtidos previamente para uma cepa de EAEC. Além disso, mostram que a proteína purificada por gel filtração estava ativa e que na cepa em estudo outras proteínas secretadas não promovem a hemaglutinação das hemácias de coelho, uma vez que o sobrenadante de cultura do mutante não possui atividade de hemaglutinação.

Tabela 5 - Atividade de hemaglutinação da Proteína Pic.

Preparações	Hemaglutinação
Pic₀₄₂	+
Pic_{BA589}	+
Pic_{BA589} pretratada com anticorpo anti-Pic	-
BA589 (sobrenadante de cultura)	+
BA589Δpic (sobrenadante de cultura)	-

Preparações de Pic foram incubadas com hemácias de coelho para analisar a atividade de hemaglutinação. Apenas aglutinação visível das hemácias foi considerada como resultado positivo.

4.12.3 Atividade mucinolítica

Para analisar a atividade mucinolítica, Pic purificada das cepas BA589 e 042, bem como o sobrenadante de cultura de BA589 Δ pic foram incubados com mucina de glândula submaxilar bovina. Após coloração com amido-black, halos de lise foram observados ao redor do local onde as amostras foram aplicadas. Apenas as amostras que continham Pic promoveram degradação da mucina, o que não pôde ser observado com o sobrenadante de cultura do mutante BA589 Δ pic (Figura 35).

Figura 35 - Atividade mucinolítica da proteína Pic.

Zonas de lise em mucina de glândula submaxilar bovino foram visíveis após tratamento com Pic (Pic_{BA589} e Pic₀₄₂) e coloração com amido-black. Nenhuma lise foi observada quando a mucina foi incubada com preparações do mutante BA589 Δ pic.

4.13 Atividade biológica de BA589 em modelo animal

4.13.1 Curva de crescimento de BA589

A cepa BA589 foi cultivada em caldo LB a 37 °C com agitação constante de 250 rpm. A DO₆₀₀ foi medida em intervalos de meia hora por um período de 8 h (Figura 36). O objetivo desse ensaio foi determinar o pico de crescimento da cepa na fase log, a ser utilizado nos experimentos *in vivo*, no modelo de camundongos tratados com estreptomicina (item 3.11.3).

Figura 36 - Curva de crescimento de BA589.

A cepa foi cultivada em caldo LB com agitação constante de 250 rpm a 37 °C. As absorbâncias do cultivo em comprimento de onda de 600 nm foram obtidas em intervalos de 30 min durante 8 h.

4.13.2 Modelo de colonização com camundongos tratados com estreptomicina

Inicialmente foi realizado um experimento piloto para verificar se nesse modelo seria possível determinar a colonização bacteriana da cepa BA589. Para tanto, quatro camundongos BALB/c fêmeas com 12 semanas foram utilizados no ensaio *in vivo*. Fezes dos mesmos foram coletadas no momento da chegada ao biotério e semeadas em ágar MacConkey para realização do gene *pic* por PCR para as colônias fermentadoras de lactose. Esse foi o controle para determinar a ausência de cepas de *E. coli* albergando o gene *pic* no intestino dos animais (figura 37).

Figura 37 - Eletroforese em gel de agarose (1%) dos fragmentos amplificados por reação de PCR para o gene *pic*, a partir das fezes dos camundongos recém-chegados no laboratório.

O gel foi corado em solução de gelRed (1:10000) e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta. (PM): marcador de peso molecular 100 bp (Invitrogen); (1): HB101 (controle negativo); (2): BA589 (controle positivo); (3): amostra de fezes do camundongo 1; (4): camundongo 2; (5): camundongo 3; (6): camundongo 4. A seta indica o tamanho do fragmento amplificados do gene *pic*.

Após uma semana de observação, os camundongos foram tratados (48 h antes da inoculação e durante o experimento) com água *ad libitum* contendo 5 g/L de estreptomicina. Antes da infecção com as cepas bacterianas, os camundongos receberam oralmente 200 µL de solução de bicarbonato de sódio 0,4 M para neutralização do pH gástrico e 15 min depois, 200 µL do inóculo de BA589 (1×10^3 UFC/ml) foram administrados por via oral. Fezes frescas foram coletadas diariamente até 15 dias após infecção. As fezes foram pesadas, homogeneizadas em PBS estéril e diluições seriadas foram semeadas em ágar MacConkey contendo ampicilina e estreptomicina (marcas de resistência de BA589) para determinação do número de UFC. Em paralelo foram realizadas PCRs, a partir das colônias obtidas na colonização, para detecção do gene *pic*.

Como mostra a figura 38, o modelo de colonização com camundongos tratados com estreptomicina mostrou-se adequado, uma vez que todos os camundongos foram colonizados

pela cepa BA589 e mostraram positividade para o gene *pic* através da PCR ao longo dos 15 dias de análise.

Figura 38 - Eletroforese em gel de agarose (1%) dos fragmentos amplificados por reação de PCR para o gene *pic*, após inoculação da cepa BA589.

O gel foi corado em solução de gelRed (1:10000) e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta. (PM): marcador *1 kb DNA ladder* (Invitrogen); (1): HB101 (controle negativo); (2): BA589 (controle positivo); (3): amostra de fezes do camundongo 1; (4): camundongo 2; (5): camundongo 3; (6): camundongo 4. A seta indica o tamanho do fragmento amplificados do gene *pic*

Confirmada a colonização dos camundongos pela cepa BA589, um novo ensaio composto por 12 animais foi realizado com as cepas BA589 e BA589 Δ *pic*. O modelo de colonização foi desenvolvido exatamente como descrito anteriormente, ou seja, após inoculação de BA589, as fezes foram pesadas, homogeneizadas em PBS estéril e diluições seriadas foram semeadas em ágar MacConkey contendo ampicilina e estreptomicina para determinação do número de UFC/g de fezes. Em paralelo foram realizadas PCRs a partir das colônias obtidas na colonização da cepa BA589, para detecção do gene *pic*. Todas as PCRs se mostraram positivas ao longo de todo o experimento e ao longo dos 15 dias de estudo houve uma elevada colonização dos camundongos infectados com a cepa BA589. O mesmo não pôde ser observado nos camundongos infectados com o mutante BA589 Δ *pic*, uma vez que nenhum destes foi colonizado (figura 39).

Figura 39 - Gráfico do segundo ensaio de colonização dos camundongos tratados com estreptomicina após infecção com amostra BA589.

Os dados referem-se à contagem de UFC/g de fezes obtida a partir da coleta das fezes frescas de camundongos BALB/c fêmeas com 12 semanas de idade, infectados com 5×10^3 UFC da cepa BA589 ao longo de 15 dias.

A análise dos compartimentos intestinais por MEV mostrou que a cepa selvagem (BA589) foi capaz de induzir uma elevada produção de muco pelas células caliciformes. O mesmo não foi observado com o controle (camundongos não infectados) e nem com mutante (BA589 Δ *pic*). Além disso, o íleo e o ceco foram as partes do intestino onde foi possível observar a presença de bactérias aderidas à mucosa, sendo esta última, a região intestinal com maior número de bactérias promovendo a colonização dos camundongos infectados com a cepa selvagem (figura 40).

Figura 40 - Microscopia eletrônica de varredura do intestino de camundongos infectados com BA589 e seu mutante BA589 Δ pic.

5 DISCUSSÃO

A classificação inicial de EPEC nos subgrupos tEPEC e aPEC foi baseada na presença ou ausência do plasmídeo pEAF, respectivamente (KAPER, 1996). Embora exista essa distinção entre os dois subgrupos, ambos têm em comum o mecanismo central de patogênese de EPEC: a formação da lesão A/E. Esta lesão pode ser observada em cultura de células epiteliais, em fragmentos de intestino mantidos em cultura (*in vitro organ culture*) e *in vivo*, utilizando patógenos que produzem esta lesão em modelos animais como o *Citrobacter rodentium* e EPEC de coelhos (*rabbit diarrheagenic E. coli*) (NATARO; KAPER, 1998). Acredita-se que a diarreia causada por EPEC é consequência direta da lesão A/E, devido à diminuição da superfície de absorção intestinal. Além disso, alguns de efetores translocados pelo SSTIII, tais como Map, EspF, EspG e EspH, podem ter impacto sobre os canais de água e íons no epitélio intestinal (CROXEN; FINLAY, 2010).

Análises da cinética da formação da lesão A/E demonstram claramente um retardo na formação dessa lesão causada por aEPEC, em comparação com tEPEC. A falta de Per, codificado no pEAF, na rede de regulação de genes de virulência é um dos principais fatores que retardam o estabelecimento da lesão A/E induzidas por amostras de aEPEC (BUERIS et al., 2015).

Posteriormente à classificação dos subgrupos tEPEC e aEPEC, foram relatadas características diferenciais adicionais, tais como sorotipos, características de virulência, padrões de adesão e reservatórios (HERNANDES et al., 2009). Em geral, as cepas de tEPEC são mais homogêneas do que aEPEC em suas características de virulência, apresentando principalmente os fatores de virulência codificados por LEE e pEAF. Por outro lado, amostras de aEPEC frequentemente albergam genes de fatores de virulência de outros patótipos de DEC (AFSET et al., 2006; AFSET et al., 2008; DULGUER et al., 2003; GOMES et al., 2004; HERNANDES et al., 2011; SCALETSKY et al., 2010; VIEIRA et al., 2001). De fato, estudos filogenéticos indicam que amostras de aEPEC têm *background* com características que permitem a aquisição, manutenção e expressão de genes que codificam virulência fatores de outros patótipos de DEC (AFSET et al., 2008; BANDO et al., 2009). A presença em aEPEC de fatores de virulência de outros patótipos pode significar vantagens adaptativas e conferir mecanismos de patogenicidade adicionais à lesão A/E.

Neste sentido, o presente estudo teve início com a investigação da presença de genes que codificam proteínas autotransportadoras de DEC em cepas de aEPEC. Os genes pesquisados codificam proteínas relacionadas à virulência, tais como aderência, agregação,

formação de biofilme, invasão e toxicidade (BENZ; SCHMIDT, 2011; HENDERSON et al., 2004).

Poucos estudos investigaram a presença de genes de autotransportadoras em EPEC, onde *ehaD*, *ehaJ*, *espC*, *espP*, *espI*, *pet*, e *pic* foram previamente detectados em frequências semelhantes aos observados em nossa coleção (AFSET et al., 2006; BOISEN et al., 2009; GOMES et al., 2004; SCHMIDT et al., 2001). Por outro lado, Easton et al. (2011) encontraram maiores frequências de *eha* (100% de *ehaAB* e 86% para *ehaC*), ao analisarem a prevalência desses genes em uma coleção de 21 EPEC isoladas na Austrália.

Os cinco genes mais frequentes foram *ehaABCD* e *espC*. Os outros genes investigados foram detectados em baixas frequências (*espI*, *pet*, *cah*, *eatA* e *ehaJ*, *espP* e *pic*) ou não foram detectados (*aida-I*, *epeA*, *sab*, *sat* e *tibA*).

O papel destas proteínas autotransportadoras na patogênese de aEPEC não está estabelecido. Outros fatores envolvidos em adesão e formação do biofilme, como *pic*, *cah* e *eha*, podem compensar a falta de BFP nos estágios iniciais da colonização intestinal em aEPEC, tendo importância na persistência de aEPEC no intestino (CULLER et al., 2014; HERNANDES et al., 2009; NGUYEN et al., 2006).

Em uma dessas cepas de aEPEC (BA589) foi detectado o gene *pic*. Esse dado despertou interesse, uma vez que não há relatos na literatura de estudos sobre Pic em EPEC. Além disso, em EAEC a proteína Pic é responsável por diversas funções, incluindo a colonização intestinal, estimulação da produção de muco intestinal e a evasão ao sistema imune inato (RUIZ-PEREZ; NATARO, 2014). Dos poucos estudos que analisaram a frequência do gene em outras DEC e outras enterobactérias, apenas Boisen et al. (2009) detectaram uma cepa de EPEC O55 albergando *pic*, entretanto esses autores não a classificaram em típica ou atípica.

Antes de iniciar o projeto de caracterização de Pic na cepa BA589, foi necessário analisar se a mesma era produzida nesta cepa, uma vez que o amplicon detectado correspondia a 1.176 pb de um total de 4.119 pb do gene *pic* completo. A produção de Pic em sobrenadante de cultura da cepa BA589 foi detectada por *immunoblotting*, permitindo o prosseguimento da caracterização fenotípica e molecular de Pic na aEPEC BA589.

Algumas características de aEPEC foram então analisadas na amostra selecionada, incluindo a determinação do padrão de adesão e da capacidade de formação de pedestais em células epiteliais cultivadas. A cepa BA589 apresentou o padrão de adesão localizado-*like* (AL-L) após o período de 6 h de interação bactérias-células HEp-2. O padrão AL-L é caracterizado pela presença de bactérias aderidas em grupos esparsos, localizados sobre a

superfície da célula epitelial. Esse padrão de adesão é o mais frequentemente observado em amostras de aEPEC (ABE et al., 2009; DULGUER et al., 2003; HERNANDES et al., 2009; ROBINS-BROWNE et al., 2004; VIEIRA et al., 2001).

A lesão A/E pode ser indiretamente visualizada através do teste de FAS, onde a actina polimerizada acumulada no pedestal é evidenciada pela ligação à faloidina marcada a um fluorocromo e visualizada em microscopia de fluorescência (KNUTON et al., 1989). Também no período de incubação de 6 h com células HEp-2, a cepa BA589 foi capaz de induzir o acúmulo de actina polimerizada sob a adesão bacteriana, indicando que a amostra em estudo é capaz de induzir a formação dos pedestais da lesão A/E.

O processo que leva à formação da lesão A/E pode ser dividido em quatro estágios. Primeiro ocorre a interação da bactéria com a célula hospedeira mediada pela fímbria BFP, em tEPEC, e filamentos EspA e flagelo, em tEPEC e aEPEC. Em um segundo momento, ocorre uma desestruturação das microvilosidades e secreção de moléculas efetoras para o interior da célula hospedeira através do SSTIII. No terceiro estágio ocorre a adesão íntima da bactéria ao enterócito, mediada pela interação da adesina intimina com o seu receptor translocado Tir, o que induz um desarranjo do citoesqueleto celular culminando no acúmulo de actina polimerizada e de outros componentes do citoesqueleto no local da adesão. Por fim, essas alterações no citoesqueleto levam à formação de uma estrutura semelhante a um pedestal, sobre o qual a bactéria permanece aderida (CROXEN; FINLAY, 2010; FRANKEL; PHILLIPS, 2008).

Diversos genes de virulência, comumente encontrados nos patótipos de DEC, foram pesquisados na cepa do presente estudo. O objetivo dessa pesquisa foi investigar a existência de algum fator de virulência com atividades biológicas semelhantes às aquelas descritas para a proteína Pic, de tal forma a interferir na interpretação dos resultados com o mutante em *pic*, bem como nas análises de atividade funcional da proteína. Além disso, essas análises também foram importantes para conhecer o perfil genético e de virulência da cepa BA589. Dentre os genes de EAEC, EPEC, EHEC ETEC e DAEC pesquisados foram detectados: *astA*, *ehaA*, *espI*, *irp2*, *pilS* e *sepA*.

Savarino et al. (1991) identificaram em cepas de EAEC uma enterotoxina termoestável denominada *E. coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1) codificada pelo gene *astA*. Essa enterotoxina apresenta homologia com o domínio enterotóxico da toxina ST de ETEC, sendo capaz de induzir um aumento da concentração de cGMP intracelular (SAVARINO et al., 1993). A sequência *astA* é frequentemente detectada em cepas de aEPEC (AFSET et al., 2006; GOMES et al., 2004; VIEIRA et al., 2001), tendo sido significativamente associada

com diarreia no Brasil (DULGUER et al., 2003) e associada a surtos em países desenvolvidos (HEDBERG et al., 1997; VILJANEN et al., 1990; YATSUYANAGI et al., 2003). Entretanto, o papel de EAST1 na patogênese é questionável uma vez que a sua presença também foi detectada em cepas de *E. coli* não patogênicas (SAVARINO et al., 1996). Além disso, não foi determinado se há produção da toxina por essas cepas de aEPEC.

Os genes *ehaA* (*EHEC autotransporter A*) e *espI* (*E. coli secreted protease, island-encoded*) de EHEC codificam proteínas autotransportadoras, assim como o gene *pic*. Contudo, o primeiro codifica a proteína EhaA que está envolvida com o processo de formação de biofilme (WELLS et al., 2008), ao passo que o segundo codifica para EspI que diferente daquela, está relacionada com o processo de degradação de proteínas do plasma (SCHIMIDT et al., 2001). Portanto, atividades distintas daquelas descritas para Pic.

O gene *irp-2*, também encontrado na cepa em estudo, está presente em uma ilha de patogenicidade do cromossomo de *Yersinia enterocolitica*, onde codifica a proteína Irp2 (*iron-repressible high-molecular weight protein 2*) envolvida na biossíntese de um sideróforo (yersiniabactina) (SCHUBERT et al., 1998). Esse gene já foi detectado em outros patótipos de DEC, incluindo EPEC, entretanto a sua função na patogênese não é conhecida (AFSET et al., 2006; GOMES et al., 2004; SCHUBERT et al., 1998).

Os genes do operon *pil* estão envolvidos na biogênese de uma fímbria tipo IV que pode ser produzida por diferentes patógenos (YOSHIDA et al., 1998). Os genes *pilS* e *pilV*, que codificam as proteínas PilS (proteína estrutural da fímbria) e PilV (adesina fimbrial), respectivamente, foram pesquisados por PCR. Entretanto, apenas *pilS* foi detectado, sugerindo que não há produção da fímbria Pil em BA589.

O gene *sepA* de *S. flexneri* e EAEC codifica a proteína autotransportadora SepA (*Shigella extracellular protein A*) (BENJELLOUN-TOUIMI et al., 1998; BOISEN et al., 2009). Apesar de não apresentar efeito citopático em células HEp-2, há indícios de sua participação nos danos da mucosa intestinal no processo de shigelose (BENJELLOUN-TOUIMI et al., 1998; DUTTA et al., 2002;). A proteína SepA, embora faça parte da mesma classe de SPATEs e apresente uma homologia de 67% com Pic, possui substratos distintos desta. Ao contrário de Pic, SepA não cliva mucina e nem o fator V da cascata de coagulação, assim como não promove a degradação de glicoproteínas de superfície de leucócitos (DUTTA et al., 2002; RUIZ-PEREZ et al., 2011; RUIZ-PEREZ & NATARO, 2014). SepA está presente em grande parte das cepas de EAEC isoladas de pacientes com diarreia (BOISEN et al., 2009). Entretanto, o papel desta proteína ainda permanece indefinido na patogênese de EAEC.

Em seguida a produção de Pic pela cepa BA589 foi estudada com maiores detalhes. Inicialmente foram realizados ensaios de interação com a linhagem celular HEp-2 mostrando que Pic era produzida nos momentos iniciais de interação com células epiteliais. Mesmo após o estabelecimento da adesão bactéria/célula, a proteína continuava sendo produzida durante todo o processo de infecção. Foi observado também que a produção de Pic de aEPEC em contato com células HEp-2 ocorre em pontos localizados sobre as células. Isto provavelmente se deve ao padrão LAL de adesão apresentado pela BA589. Diferente desta, a secreção de Pic por EAEC ocorre de forma mais distribuída sobre as células, devido ao padrão AA de adesão promovido por esta bactéria. Vale ressaltar que o número de bactérias na infecção por EAEC é bem maior que na adesão por aEPEC. Entretanto, foi observado que mesmo com uma menor quantidade de bactérias aderidas, a cepa BA589 produz uma maior quantidade de Pic, corroborando dados prévios da imunodeteção. Esses resultados observados na interação das cepas BA589 e 042 com células HEp-2, mostrando que Pic₅₈₉ era produzida e secretada em maior quantidade com relação à protótipo, foram confirmados posteriormente por *western blotting* e ELISA. A expressão de *pic* em EAEC 042 é dependente de um promotor que é maximamente activado a 37 °C em fase exponencial de crescimento (BEHRENS; SHEIKH; NATARO, 2002). Cabe salientar que os mecanismos de regulação da expressão de *pic* em aEPEC não são conhecidos.

Um dado interessante com relação à localização do gene *pic* na cepa BA589 foi obtido nos ensaios de *southern blotting* e de cura plasmidial. Esses resultados mostraram que, diferente do que é observado em EAEC 042, *Shigella flexneri* (RAJAKUMAR; SASKAWA; ADLER, 1997) e UPEC (HEIMER et al., 2004), o gene *pic* em BA589 está presente em um plasmídeo de alto peso molecular (~98 kb).

O sequenciamento completo de *pic* mostrou uma identidade de 99% com o mesmo gene encontrado em EAEC e *S. flexneri* 2a (números de acesso no GenBank: FN554766.1 e AF200692.2). A análise de nucleotídeos nestas cepas revelou a presença de sequências de inserção (IS) flanqueando o gene. As mesmas IS são também encontradas flanqueando outros genes de autotransportadoras (HENDERSON; NAVARRO-GARCIA; NATARO, 1998), indicando que na cepa BA589 esse gene pode ter sido adquirido por uma transferência horizontal e, desta forma, inserido no plasmídeo de 98 kb.

A transferência horizontal de genes é um processo em que um organismo doador transfere seu material genético ou MGE (*mobile genetic elements*) para um organismo receptor, que não seja seu descendente, tornando-se, portanto, um importante mecanismo pelo qual micro-organismos adquirem novas características fenotípicas (CROXEN; FINLAY,

2010; FROST et al., 2005; OCHMAN; LAWRENCE; GROISMAN, 2000; SHAMES; AUWETER; FINLAY, 2010).

Um dado adicional corroborando a ideia da presença de IS flanqueando *pic* na BA589 refere-se ao experimento de cura plasmidial realizado neste estudo. Esse ensaio teve por objetivo eliminar o plasmídeo que alberga *pic* utilizando a acridina. Essa molécula se intercala no DNA impedindo a sua replicação, tendo ação mais direta em plasmídeos de baixo peso molecular. Contudo, mesmo sabendo dessa limitação para curar plasmídeos de alto peso, o alaranjado de acridina foi utilizado na tentativa de eliminar o plasmídeo que albergava *pic*.

Cepas negativas para a detecção do gene *pic* foram obtidas, sugerindo a perda desse plasmídeo. Entretanto, aparentemente houve uma diminuição do seu tamanho. A diferença de tamanho entre os plasmídeos das cepas curadas com relação a não curada foi de aproximadamente 4-5 kb. O alaranjado de acridina poderia ter eliminado a sequência *pic* junto às ISs flanqueadoras. Alternativamente pode ter ocorrido a perda do plasmídeo que alberga *pic*, evidenciando um plasmídeo de tamanho muito próximo que comigra nas análises de eletroforese em gel de agarose. Dados mais precisos a respeito da sequência desse plasmídeo poderão ser obtidas após o sequenciamento do genoma da cepa BA589, atualmente em análise no Instituto Sanger (Reino Unido) sob a coordenação do Dr. Gad Frankel.

Após esta etapa, foi realizada a deleção do gene *pic* de BA589 pelo sistema lambda-red. A cepa BA589 alberga oito plasmídeos o que possivelmente determinou a incompatibilidade o plasmídeo pKD46. Como alternativa foi empregado o plasmídeo pKOBEG, que também é utilizado no sistema lambda-red e difere do pKD46 por possuir o cassete de resistência ao antibiótico apramicina (SAMPAIO et al., 2009). Assim, foi obtida a deleção do gene *pic*, originando o mutante BA589 Δ *pic*, confirmado por sequenciamento de nucleotídeos e perda da produção de Pic em sobrenadante de cultura.

Nas etapas seguintes foram avaliadas as atividades do mutante BA589 Δ *pic* em comparação com a selvagem e com a proteína Pic purificada. Para tanto, foi necessário obter a proteína Pic₅₈₉ purificada. A clonagem do gene *pic* em vetor de expressão para obtenção da proteína recombinante tornou-se um grande desafio devido ao tamanho do gene (4.119 pb).

Após a clonagem e sequenciamento de *pic* em vetor pGEM-T *easy*, foi realizada a subclonagem do gene em vetor pSPORT incluindo a sequência do promotor nativo e a sequência Shine-Dalgarno. Entretanto, em nenhum dos clones obtidos a proteína Pic não foi produzida (dados não apresentados).

Novas tentativas de subclonagem de *pic* foram realizadas com os vetores pACY184, pBR322, pET22b, pET26b e pET28, todas sem sucesso (dados não apresentados). Com isso, a

clonagem de *pic* em vetor de expressão foi substituída pela purificação da proteína nativa após a purificação do sobrenadante de cultura de BA589 por gel filtração, utilizando uma coluna cromatográfica acoplada ao sistema AKTA de cromatografia.

Conforme descrito anteriormente, a proteína Pic é uma serinoprotease da classe 2 das SPATEs com atividades de hemaglutinação, clivagem de mucina, degradação do fator V da cascata de coagulação e clivagem de glicoproteínas de superfície envolvidas no tráfico de leucócitos, migração e inflamação (AYALA-LUJAN et al., 2014; DUTTA et al., 2002; GUTIÉRREZ-JIMÉNEZ; ARCINIEGA; NAVARRO-GARCIA, 2008; HENDERSON et al., 1999; PARHAM et al., 2004; RUIZ-PEREZ et al., 2011). Foi inicialmente descrita como ShMu e codificada pelo gene *she* presente em uma Ilha de patogenicidade de *S. flexneri* 2a (NORIEGA, 1995).

Diversos estudos têm mostrado uma elevada frequência de SPATES, incluindo Pic, em isolados clínicos. Boisen et al. (2009) ao analisarem a presença de SPATEs entre amostras de EAEC, observaram que 94,5% destas possuíam genes que codificavam pelo menos uma SPATE, incluindo membros da classe I e II. Dentre estas, 63,6% albergavam o gene *pic*, assim como um estudo prévio, também com isolados de EAEC, onde a prevalência do gene foi de 57% (CZECZULIN et al., 1999). Pahram et al. (2004) ao investigarem a distribuição de Pic em 715 isolados de *E. coli* de origem fecal e ITU mostraram que a ocorrência do gene *pic* foi de 22,5% nas ITU e de 12% nos isolados de origem fecal. Dados similares aos obtidos por Heimer et al. (2004) que detectaram o gene em 31% dos casos de pielonefrite e 7% nas amostras de origem fecal. Recentemente, Tapader et al. (2014) avaliaram a frequência de SPATEs em cepas de *E. coli* causando sepse em neonatos e também encontraram um elevado índice (89%) de isolados albergando genes que codificavam para SPATEs. Pic estava presente em 9% desses casos, o que se torna um agravante para o quadro clínico desses pacientes, tendo em vista que uma das funções atribuídas a esta serinoprotease diz respeito à sua capacidade de conferir resistência ao soro humano.

Ensaio realizados por Henderson et al. (1999) mostraram que *E. coli* DH5 α , normalmente suscetível à atividade bactericida do soro, é capaz de sobreviver quando pré-tratada com preparações de Pic purificada. Os autores sugeriram que Pic deve agir na via clássica do sistema complemento ou em algum componente essencial das etapas iniciais da cascata.

O sistema complemento é composto por aproximadamente 35 proteínas presentes no plasma ou associadas a membranas celulares e representa a primeira linha de defesa do sistema imune inato de mamíferos (WALPORT et al., 2001; ZIPFEL; HALLSTROM;

RIESBECK, 2013). A ativação deste sistema desempenha um papel essencial não apenas na proteção contra infecções, mas também na preservação da homeostase através da modulação dos processos inflamatórios, regulação gênica, bem como remoção de imunocomplexos e células apoptóticas (KOHL, 2006; SKATTUM et al., 2011).

Esse sistema pode ser ativado por três vias diferentes: clássica, alternativa e lectinas. O início da ativação da via clássica depende, principalmente, da presença de imunocomplexos formados por anticorpos ligados a epítomos antigênicos; a via alternativa é estimulada espontaneamente pela hidrólise de C3 ou pela presença de estruturas de superfície externa, a exemplo do LPS; e a via das lectinas é induzida pela ligação de açúcares presentes na superfície de micro-organismos à lectinas MBL (*mannose binding lectin*) ou MBP (*mannan binding protein*) (GOLDFARB; PARRILLO, 2005; ISSAC, 2009; WALPORT, 2001; ZIPFEL; SKERKA, 2009; ZIPFEL; HALLSTROM; RIESBECK, 2013).

O componente C3 tem papel central na ativação do sistema complemento, pelas três vias. Todas as vias levam à formação de C3 convertases que são responsáveis pela clivagem de C3, gerando a anafilotoxina C3a e o fragmento C3b, que se associa às C3 convertases para formar as C5 convertases: C4bC2bC3b (via alternativa) e C3bBbC3b (via clássica e das lectinas). Com a proteólise da molécula de C5 é produzida a anafilotoxina C5a e o fragmento C5b, ao qual se associam sequencialmente os componentes C6, C7, C8 e C9, culminando na formação do complexo de ataque à membrana ou MAC (*membrane attack complex*). Este complexo (C5b-C9) se insere na bicamada lipídica promovendo um desequilíbrio iônico que resulta na lise celular (GOLDFARB; PARRILLO, 2005; LAMBRIS; RICKLIN; GEISBRECHT, 2008; WALPORT, 2001; ZIPFEL; SKERKA, 2009).

Como resultado dessa ativação do sistema complemento, além da lise celular, são geradas diversas moléculas com importantes funções biológicas. Dentre as funções, tem-se: produção de fragmentos proteicos (C3b, iC3b, C3d e C4d) que atuam como opsoninas, facilitando o processo de fagocitose de micro-organismos; solubilização de imunocomplexos; estímulo da síntese de imunoglobulinas, além da produção de anafilotoxinas (C3a e C5a), capazes de recrutar células inflamatórias e promover a desgranulação de mastócitos e basófilos, com consequente liberação de mediadores inflamatórios (ISAAC, 2009).

Considerando que o sistema complemento é um importante componente da imunidade inata e adquirida, diversos patógenos desenvolveram estratégias de evasão a este sistema, possibilitando o estabelecimento da infecção (BEHNSEN et al., 2010; DEL TORDELLO et al., 2014; FRAGA et al. 2004; ORTH et al., 2010).

Um ensaio de sobrevivência realizado com a cepa BA589 mostrou que a mesma é capaz de

resistir à atividade bactericida do soro humano normal. Isto despertou o interesse para entender de que forma se dava essa resistência. Além disso, ao analisar o soro de crianças com diarreia aguda, atendidas em um hospital público de São Paulo, Belline et al. (2005) mostraram que anticorpos anti-Pic são produzidos durante o curso natural de infecção por EAEC, sugerindo que de alguma forma Pic induzia uma resposta imune no hospedeiro.

Para avaliar a possível interação de Pic com moléculas do sistema complemento, a proteína foi incubada com moléculas importantes deste sistema. Pic promove a evasão de BA589 ao sistema complemento, causando resistência à atividade bactericida do soro. No presente estudo foi mostrado que esta evasão se dá pela clivagem direta de C2, C3 e C4 que são moléculas-chave para a ativação das três vias do sistema. Essas moléculas, uma vez inativadas, comprometem toda a cascata de ativação do sistema, impedindo a formação do MAC. Além disso, há um comprometimento na formação de anafilotoxinas que são geradas no processo normal de ativação da cascata, o que, por sua vez, resulta na falta do recrutamento de células inflamatórias para o foco da infecção, facilitando assim a ação do patógeno sobre o hospedeiro. Uma análise completa de todo esse processo de interação de Pic com proteínas do complemento, assim como a inativação das vias do sistema pela ação desta serinoprotease, está descrita e discutida de forma mais completa no Anexo B deste trabalho, utilizando a proteína purificada da cepa de EAEC 042.

Tendo em vista que Pic é bem conservada entre todos os patógenos onde foi identificada, apresentando uma identidade de aminoácidos superior a 96% (HEIMER et al., 2004), os dados obtidos com Pic de EAEC 042 também podem ser estendidos para a cepa aEPEC BA589, bem como para UPEC, *S. flexneri* 2a e para o híbrido EAEC / STEC (sorotipo O104: H4) que também produz Pic (RASKO et al., 2011).

Em algumas situações cepas de UPEC e EAEC podem atingir a corrente sanguínea causando bacteremia e sepse. Essas cepas têm em comum a presença de Pic (HERZOG et al., 2014; JUSTICE et al., 2006; KEDDY et al., 2012; ULETT et al., 2013). Neste contexto, a produção de Pic por estes patógenos pode conferir uma vantagem importante, protegendo estas bactérias do sistema imune inato.

Patógenos humanos desenvolveram diferentes mecanismos para evadir à ação do sistema complemento a fim de promover seu processo de infecção. Dentre esses mecanismos, a secreção de proteases é uma importante estratégia desenvolvida por uma variedade de micro-organismos, tais como *Aspergillus fumigatus* (BEHNSEN et al., 2010), *N. meningitidis* (DEL TORDELLO et al., 2014) e *Leptospira interrogans* (FRAGA et al., 2014). Estes micro-organismos secretam serinoproteases como Alp1 (BEHNSEN et al., 2010), NalP (DEL

TORDELLO et al., 2014), e termolisina (FRAGA et al., 2014), respectivamente. Alp1 cliva diversas proteínas do complemento, incluindo C3, C3b, C4, C5 e C4b (BEHNSEN et al., 2010). NalP e a termolisina possuem uma atividade mais específica, degradando a molécula central de complemento C3 (DEL TORDELLO et al., 2014; FRAGA et al., 2014).

No presente trabalho, foi demonstrado que Pic reduz significativamente a ativação do complemento por todas as três vias. Pic foi capaz de clivar C3, uma molécula central da cascata do complemento, bem como C3b e proteínas da via clássica e das lectinas, como C4 e C2. Essa degradação de componentes do complemento foi observada tanto com a proteína purificada como com o sobrenadante de *E. coli* HB101 produzindo Pic. Ensaio proteolítico adicionais utilizando o soro humano normal (SHN) como uma fonte de proteínas do complemento mostraram que Pic também é ativa em um meio mais fisiológico, sendo capaz de clivar C2, C3 e C4. Neste contexto, as clivagens de C3 e C2 por Pic são mais pronunciadas do que a clivagem de C4. Curiosamente, a clivagem de C2 presente no SHN mostrou um perfil diferente e foi mais eficiente quando comparado com a degradação observada com a molécula de C2 purificada. Uma explicação para isto seria a atuação de componentes do soro, tais como cofatores, que poderiam estar favorecendo a degradação de C2 por Pic. Portanto, entre as proteínas do complemento testadas, os principais alvos de Pic são C2, C3 e seus fragmentos.

Outro achado interessante foi o de que Pic atua em sinergismo com os reguladores do sistema complemento, fator I (FI) e fator (FH), promovendo uma eficiente inativação da molécula de C3. Na presença de Pic, moléculas de C3b são geradas e em seguida, degradadas quando FI e FH são adicionados à reação. O sinergismo entre proteases bacterianas e reguladores do hospedeiro não é incomum e já foi relatado por outros micro-organismos, incluindo *Enterococcus faecalis* (PARK et al., 2007; 2008), *Staphylococcus aureus* (LAARMAN et al. 2011), *N. meningitidis* (DEL TORDELLO et al., 2014) e *L. interrogans* (FRAGA et al., 2014). Del Todello et al. (2014) mostraram que a autotransportadora NalP de *N. meningitidis* cliva a molécula de C3, produzindo um fragmento semelhante à C3b, que logo em seguida é degradado na presença de FI e FH. Como consequência, uma menor deposição de C3b na superfície bacteriana foi observada.

Para melhor analisar a clivagem C3 por Pic, peptídeos FRET correspondentes a regiões expostas da superfície dessa molécula foram sintetizados. Pic foi capaz de degradar o peptídeo FRET Abz-GLARSNLDEIIAQ-EDDnp, que contém o sítio de clivagem onde as C3 convertases degradam a cadeia α de C3 (sublinhada na sequência). Pic tem como alvo principal (91%) os mesmos aminoácidos que as C3 convertases (arginina e serina,

respectivamente). Portanto, como resultado desta clivagem, as moléculas C3a-like e C3b-like são possivelmente geradas. Também foi demonstrado que Pic foi capaz de degradar os peptídeos FRET 2, 3 e 4, que estão localizados no fragmento C3b da molécula de C3.

Além disso, vale ressaltar que como consequência da clivagem C3 por Pic, uma molécula C3a-like é potencialmente produzida. Fragmentos de C3a são importantes moléculas inflamatórias, recrutando basófilos e mastócitos para os locais de infecção e, portanto, promovem desgranulação e liberação de mediadores vasoativos (ISAAC, 2009). Desta forma, as possíveis funções deste anafilotoxina na infecção por patógenos produtores de Pic não podem ser excluídas. No entanto, ensaios adicionais de clivagem demonstraram que o resíduo N-terminal de arginina (R), que é essencial para a atividade inflamatória, pode ainda ser removido por Pic.

Assim como Pic, a serinoprotease EspP de EHEC também foi capaz de clivar a molécula C3 do sistema complemento (ORTH et al., 2010). EspP é conhecida por sua capacidade de degradar pepsina e, assim como Pic também é capaz de clivar o fator V da cascata de coagulação (DUTTA et al, 2002). Alguns autores sugerem que essa inativação do fator V resulta em uma diminuição da coagulação, levando a um sangramento mais prolongado e aumento da hemorragia no trato gastrointestinal nos casos de infecções por EHEC (BRUNDER et al., 1999). Proteases presentes no sobrenadante de cultura de leptospiros patogênicos, a exemplo da metaloprotease Termolisina (FRAGA et al., 2014), também promovem a clivagem direta de C3, assim como a autotransportadora NalP de *Neisseria meningitidis* (Del TORDELLO et al., 2013) e Alp1 de *Aspergillus fumigatus* (BEHNSEN et al., 2010).

Além da inativação do sistema complemento, algumas atividades já atribuídas à Pic₀₄₂ (DUTTA et al., 2002; HENDERSON et al., 1999) foram analisadas para Pic₅₈₉. Dentre elas, a atividade de hemaglutinação e mucinolítica. Estas análises foram importantes para verificar se a proteína Pic obtida no processo de gel filtração estava ativa.

Henderson et al. (1999) mostraram que Pic₀₄₂ possuía atividade de hemaglutinação quando incubada com hemácias de rato, carneiro, porco e coelho, tendo uma ação mais eficiente nesta última espécie. Assim, as hemácias de coelho também foram usadas nos ensaios com Pic₅₈₉ para mostrar que a proteína em estudo estava funcional, uma vez que resultado obtido neste estudo foi semelhante ao descrito por aqueles autores.

Dutta et al. (2002) ao analisarem a ação de algumas SPATEs sobre diversos substratos biológico mostraram que além de Pic a proteína Tsh de *E. coli* aviária também possuía atividade mucinolítica, diferente de outras serinoproteases como EspC, EspP, Pet, Sat e SepA

que não apresentaram esta atividade quando incubadas com mucina. Conforme apresentado nos resultados, Pic₅₈₉ foi capaz de degradar mucina em um ensaio semelhante àquele com Pic₀₄₂ (DUTTA et al., 2002; HENDERSON et al., 1999). Gutiérrez-Jiménez, Arciniega e Navarro-Garcia (2008) demonstraram essa atividade mucinolítica através de um ELISA, utilizando mucinas de glândula submaxilar bovino e de estômago de porco marcadas com biotina. Os autores mostraram que essa ação de Pic sobre ambas as mucinas acontece de forma dose-dependente e que o motivo serina é a região da proteína responsável por essa atividade. Ao utilizarem o inibidor de serino protease PMSF (*phenylmethylsulphonyl fluoride*), bem como o mutante sítio dirigido de Pic (mutação na região serino da proteína), a atividade mucinolítica foi abolida. Além disso, Pic também foi capaz de promover, de forma eficiente, a clivagem de diversas glicoproteínas presentes na superfície de leucócitos. Dentre elas: CD43, que previne a aderência dos leucócitos com as células vizinhas, permitindo, assim, a sua migração em resposta à atração por quimiocinas; PSGL-1, envolvida no tráfego de leucócitos; CD44, responsável pelo controle da migração celular; CD45, envolvida com adesão celular, migração e modulação da sinalização e produção de citocinas; além de outras glicoproteínas, como CD93 e fractalina (RUIZ-PEREZ et al., 2011).

Diferente das SPATEs de classe I, Pic não cliva pepsina, α -espectrina e não possui efeito citotóxico em cultura de células, sendo proposto que o principal papel de Pic na patogênese está relacionado com sua atividade mucinolítica, uma vez que na infecção por *E. coli* e *S. flexneri* 2a ocorre o contato com a mucosa intestinal que possui o muco agindo como uma barreira contra infecções entéricas (DUTTA et al., 2002; HENDERSON et al., 1999).

O muco intestinal oferece numerosas vantagens para bactérias presentes no lúmen e epitélio intestinal, promovendo um recurso energético com produção de açúcares usados no crescimento da microbiota entérica (HAO; LEE, 2004). Além disso, a produção de muco funciona como uma barreira físico-química que protege o hospedeiro contra micro-organismos patogênicos (LIÉVIN-LE MOAL; SERVIN, 2006; RAJKUMAR et al., 1998). Alguns patógenos entéricos desenvolvem várias estratégias para penetrarem na camada de muco intestinal, em muitos casos empregando um movimento flagelar intensificado e outros elaborando enzimas que degradam o muco (COHEN; LAUX, 1995; FRETER et al., 1981).

Conforme descrito por Navarro-Garcia et al. (2010) e também observado nos ensaios de interação bactéria-células HEp-2 neste estudo, a proteína Pic é secretada no momento inicial da adesão de EAEC com células epiteliais. Desta forma, por funcionar como uma protease com atividade mucinolítica, Pic promove um importante papel na patogenicidade destes micro-organismos através da degradação desse muco, facilitando, assim, o processo de

colonização pelas bactérias produtoras desta serinoprotease. No caso da cepa de aEPEC do presente estudo, este seria um atributo bastante vantajoso na colonização, compensado a falta de BFP.

Munera et al. (2014) ao realizarem ensaios de colonização com coelhos, demonstraram que as autotransportadoras Pic e SigA, secretadas pela cepa de EAEC produtora da toxina Shiga (sorotipo O104:H4), são essenciais para a colonização destes. Além disso, essas proteínas estão diretamente envolvidas com o processo diarreico e com a persistência do patógeno no trato gastrointestinal desses animais. Harrington et al. (2009) também demonstraram por meio de ensaios com camundongos tratados com estreptomicina, que a proteína Pic secretada por uma cepa de *E. coli* enteroagregativa também estava envolvida com o processo de colonização intestinal. Assim, com o intuito de verificar se Pic poderia estar envolvida com o processo de colonização animal por EPEC atípica, foi realizado um ensaio similar, utilizando a cepa BA589 e seu mutante BA589 Δ pic. Contudo, os resultados obtidos no presente estudo diferiram daqueles observados por Harrington et al. (2009), no sentido de que com o mutante *pic* houve diminuição na colonização dos animais e não a ausência da colonização, como observado com a cepa BA589 Δ pic. Isto provavelmente se deve à presença de outros fatores de virulência encontrados na cepa de EAEC 042 não encontrados em cepas de EPEC, a exemplo da fímbria AAF/II, que é principal fator de colonização, associado ao processo de adesão agregativa de EAEC (CZECZULIN et al., 1997).

É interessante ressaltar que em outros os trabalhos de colonização realizados com cepas de EPEC, o inóculo bacteriano necessário para promover a colonização é na ordem de 1×10^7 a 1×10^9 UFC/mL (NGUYEN; RIZVI; HECHT, 2015; RHEE et al., 2011). Em nossos ensaios, mesmo utilizando um inóculo bem menor (5×10^3 UFC/mL), BA589 foi capaz de promover a colonização intestinal em animais tratados com estreptomicina, de forma semelhante aos observados nos ensaios com EAEC 042 (HARRINGTON et al., 2009). Deste modo, os resultados de colonização descritos neste trabalho indicam que a proteína Pic é também um fator essencial para a colonização de aEPEC em modelo animal, uma vez que nenhum dos animais inoculados com a cepa mutante foi colonizado.

Seria necessário confirmar esses resultados através da obtenção de um mutante complementado. Foram realizadas várias tentativas de transformação com plasmídeo pPic, o qual contém o gene *pic* inserido no vetor pACY184 (HENDERSON et al., 1999). A presença desse plasmídeo em *E. coli* HB101 permite a produção de Pic. Entretanto, a cepa BA589 alberga pelo menos oito plasmídeos de massas diferentes, o que certamente dificultou a compatibilidade com pPic (dados não apresentados). Além disso, pPic confere resistência ao

cloranfenicol e o mutante BA589 Δ pic também apresenta essa resistência. Esses dois fatores dificultaram a complementação do mutante.

As análises dos compartimentos intestinais dos camundongos colonizados com BA589 e BA589 Δ pic mostraram que houve uma acentuada colonização do ceco pela cepa selvagem BA589. O mesmo não foi observado nos outros compartimentos intestinais (duodeno, jejuno e íleo) e nem em todos esses compartimentos obtidos a partir dos camundongos infectados pelo mutante BA589 Δ pic. Vale ressaltar ainda a grande quantidade de muco presente nas secções obtidas dos camundongos infectados com a cepa selvagem, diferente do observado com as secções obtidas a partir do mutante. A presença de grande quantidade de muco também foi observada visualmente quando os compartimentos do intestino foram retirados para a realização dos cortes para microscopia, principalmente na região cecal.

Conforme previamente descrito por Navarro-Garcia et al. (2010), Pic possui duas funções antagônicas. A primeira, já discutida, é a sua ação mucinolítica, diretamente relacionada com o processo de colonização. A segunda é estimular células caliciformes a produzir muco em grandes quantidades, após o estabelecimento da bactéria na mucosa intestinal. Acredita-se que esta função seja um mecanismo de proteção da bactéria, impedindo ou dificultando a ação de outros patógenos no local da infecção. Esses mesmos autores mostraram que Pic secretada por EAEC, UPEC e *S. flexneri* 2a estimulou o aumento do número de células caliciformes, bem como a quantidade de muco produzido por estas. O mesmo não foi observado com os mutantes das respectivas cepas, que apresentaram um resultado similar ao observado com o controle negativo (*E. coli* HB101). Também foi mostrado que este efeito não depende do motivo serino protease, uma vez que o mutante neste sítio manteve a atividade de hipersecreção do muco. Assim, estes resultados nos dão suporte para inferir que essa grande quantidade de muco observada nos cortes histológicos, deste estudo, é consequência direta da ação de Pic sobre o epitélio intestinal.

Embora a infecção por aEPEC seja a priori restrita à mucosa intestinal, alguns estudos já evidenciaram a capacidade de algumas cepas em invadir células epiteliais em cultura (HERNANDES et al., 2008; YAMAMOTO et al., 2009), além de translocar do intestino delgado para linfonodos mesentéricos, baço e fígado, em modelo animal de translocação bacteriana (LIBERATORE et al., 2011; SAMPAIO et al., 2014). Foi demonstrado que essa translocação é dependente do SSTIII (SAMPALIO et al., 2014); entretanto, a sobrevivência do patógeno na corrente circulatória requer fatores associados à evasão do sistema complemento, tal como Pic. Dessa forma a presença dessa serino protease em uma aEPEC com essa capacidade de translocação teria um papel essencial na evasão da resposta imune.

Em resumo, a serinoprotease Pic representa um fator de virulência adicional em aEPEC, relacionado às etapas de adesão, colonização e evasão do sistema imune inato.

6 CONCLUSÃO

- A cepa de aEPEC BA589 expressa a proteína Pic codificada por um gene localizado em um plasmídeo de alto peso molecular;
- Pic₅₈₉, de forma semelhante à Pic₀₄₂, possui atividade hemaglutinante e mucinolítica.
- Pic₅₈₉ promove a inativação do sistema complemento pela clivagem direta de moléculas que participam das três vias;
- Pic₅₈₉ medeia a colonização intestinal de camundongos pela cepa de aEPEC BA589 e que essa colonização se dá principalmente no ceco.

REFERÊNCIAS

- ABE, C. M.; TRABULSI, L. R.; BLANCO, J.; BLANCO, M.; DHABI, G.; BLANCO, J. E.; MORA, A.; FRANZOLIN, M. R.; TADDEI, C. R.; MARTINEZ, M. B.; PIAZZA, R. M. F.; ELIAS, W. P. Virulence features of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* identified by the *eae*⁺ EAF-negative *stx*⁻ genetic profile. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 64, p. 357-365, 2009.
- ABREU, A. G.; BUERIS, V.; PORANGABA, T. M.; SIRCILI, M. P.; NAVARRO-GARCIA, F.; ELIAS, W. P. Autotransporter protein-encoding genes of diarrheagenic *Escherichia coli* are found in both typical and atypical enteropathogenic *E. coli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 79, p. 411-414, 2013.
- ABREU, A. G.; FRAGA, T. R.; MARTINEZ, A. P. G.; KONDO, M. Y.; JULIANO, M.A.; JULIANO, L.; NAVARRO-GARCIA, F.; ISAAC, L.; BARBOSA, A. S.; ELIAS, W. P. The serine protease Pic from pathogenic *Escherichia coli* and *Shigella flexneri* mediates immune evasion by the direct cleavage of complement proteins. **J. Infect. Dis.**, 2015. In press.
- ADAMS, J.; KAUFFMAN, M. Development of the proteasome inhibitor Velcade (Bortezomib). **Cancer Invest.**, v. 22, p. 304-311, 2004.
- AFSET, J. E.; BRUANT, G.; BROUSSEAU, R.; HAREL, J.; ANDERSEN, E.; BEVANGER, L.; BERGH, K. Identification of virulence genes linked with diarrhea due to atypical enteropathogenic *Escherichia coli* by DNA microarray analysis and PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, p. 3703-3711, 2006.
- AFSET, J. E.; ANDERSEN, E.; BRUANT, G.; HAREL, J.; WIELER, L.; BERGH, K. Phylogenetic background and virulence profile of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* from a case control study using multilocus sequence typing and DNA microarray. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, p. 2280-2290, 2008.
- AIZAWA, S. I. Bacterial flagella and type III secretion systems. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 202, p. 157-164, 2001.
- AL-HASANI, K.; HENDERSON, I. R.; SAKELLARIS, H.; RAJAKUMAR, K.; GRANT, T.; NATARO, J. P.; ROBINS-BROWNE, R.; ADLER, B. The sigA gene which is borne on the she pathogenicity island of *Shigella flexneri* 2a encodes an exported cytopathic protease involved in intestinal fluid accumulation. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 2457-2463, 2000.
- AL-HASANI, K.; NAVARRO-GARCIA, F.; HUERTA, J.; SAKELLARIS, H.; ADLER, B. The immunogenic SigA enterotoxin of *Shigella flexneri* 2a binds to HEp-2 cells and induces fodrin redistribution in intoxicated epithelial cells. **Plos One**, v. 4, p. 1-5, 2009.
- ANDRADE, F. B.; GOMES, T. A.; ELIAS, W. P. A sensitive and specific molecular tool for detection of both typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Microbiol. Methods.**, v. 106, p.16-18, 2014.

***De acordo com:**

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

AUSUBEL, F.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Short protocols in molecular biology**. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 1995.

AYALA-LUJAN, J. L.; VIJAYAKUMAR, V.; GONG, M.; SMITH, R.; SANTIAGO, A. E.; RUIZ-PEREZ, F. Broad spectrum activity of a lectin-like bacterial serine protease family on human leukocytes. **Plos One**, v. 9, p. 1-14, 2014.

BAJPAI, P. Application of enzymes in the pulp and paper industry. **Biotechnol. Prog.**, v. 15, p. 147-157, 1999.

BALDINI, M. M.; NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Localization of a determinant for HEp-2 adherence by enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 52, p. 334-336, 1986.

BANDO, S. Y.; ANDRADE, F. B.; GUTH, B. E.; ELIAS, W. P.; MOREIRA-FILHO, C. A.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* genomic background allows the acquisition of non-EPEC virulence factors. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 299, p. 22-30, 2009.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N.; WOESSNER, J. **Handbook of Proteolytic Enzymes**. London: Academic Press, 1998.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N.; WOESSNER, J. **Handbook of Proteolytic Enzymes**. London: Academic Press, 2003.

BAUDRY, B.; SAVARINO, S. J.; VIAL, P.; KAPER, J. B.; LEVINE, M. M. A sensitive and specific DNA probe to identify enteroaggregative *Escherichia coli*, a recently discovered diarrheal pathogen. **J. Infect. Dis.**, v. 161, p. 1249-1251, 1990.

BEHNSEN, J.; LESSING, F.; SCHINDLER, S.; WARTENBERG, D.; JACOBSEN, I. D., THOEN, M.; ZIPFEL, P. F.; BRAKHAGE, A. A. Secreted *Aspergillus fumigatus* protease Alp1 degrades human complement proteins C3, C4, and C5. **Infect. Immun.**, v. 78, p. 3585-3594, 2010.

BEHRENS, M.; SHEIKH, J.; NATARO, J. P. Regulation of the overlapping *pic/set* locus in *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 2915-2925, 2002.

BEHRENS-KNEIP, S. The role of SurA factor in outer membrane protein transport and virulence. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 300, p. 421-428, 2010.

BELLINI, E. M.; ELIAS, W. P.; GOMES, T. A. T.; TANAKA, T. L.; TADDEI, C. R.; HUERTA, R.; NAVARRO-GARCIA, F.; MARTINEZ, M. B. Antibody response against plasmid-encode toxin (Pet) and the protein involved in intestinal colonization (Pic) in children with diarrhea produced by enteroaggregative *Escherichia coli*. **Immun. Med. Microbiol.**, v. 43, p. 259-263, 2005.

BENJELLOUN-TOUIMI, Z.; SI TAHAR, M.; MONTECUCCO, C.; SANSONETTI, P. J.; PARSOT, C. SepA, the 110 kDa protein secreted by *Shigella flexneri*: two-domain structure and proteolytic activity. **Microbiology**, v. 144, p. 1815-1822, 1998.

BENZ, I.; SCHMIDT, M. A. Structures and functions of autotransporter proteins in microbial pathogens. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 301, p. 461-468, 2011.

BERKS, B. C.; SARGENT, F.; PALMER, T. The Tat protein export pathway. **Mol. Microbiol.**, v. 35, p. 260-274, 2000.

BERNIER, C.; GOUNON, P.; LE BOUGUÉNEC, C. Identification of an aggregative adhesion fimbria (AAF) type III-encoding operon in enteroaggregative *Escherichia coli* as a sensitive probe for detecting the AAF-encoding operon family. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 4302-4311, 2002.

BEVILACQUA, L. F. **Construção de mutantes do gene que codifica a proteína dispersina (aap) em *Escherichia coli***. Trabalho de conclusão do Programa de Aprimoramento Profissional da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Instituto Butantan, São Paulo, 2010.

BIELASZEWSKA, M.; CLARKE, I.; KARMALI, M. A.; PETRIC, M. Localization of intravenously administered verocytotoxins (Shiga-like toxins) 1 and 2 in rabbits immunized with homologous and heterologous toxoids and toxin subunits. **Infect Immun.**, v. 65, p. 2509-2516, 1997.

BINET, R.; LETOFFE, S.; GHIGO, J. M.; DELEPELAIRE, P.; WANDERSMAN, C. Protein secretion by Gram-negative bacterial ABC exporters - a review. **Gene**, v. 192, p. 7-11, 1997.

BLACK, R. E.; COUSENS, S.; JOHNSON, H. L.; LAWN, J. E.; RUDAN, I.; BASSANI, D. G.; JHA, P.; CAMPBELL, C.; WALKER, C. F.; CIBULSKIS, R.; EISELE, T.; LIU, L.; MATHERS, C. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. **Lancet**, v. 375, p. 1969-1987, 2010.

BLIGHT, M. A.; HOLLAND, I. B. Structure and function of haemolysin B, P-glycoprotein and other members of a novel. **Mol. Microbiol.**, v. 4, p. 873-880, 1990.

BOISEN, N.; RUIZ-PEREZ, F.; SCHEUTZ, F.; KROGFELT, K. A.; NATARO, J. P. Short report: high prevalence of serine protease autotransporter cytotoxins among strains of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 80, p. 294-301, 2009.

BOLL, E. J.; STRUVE, C.; BOISEN, N.; OLESEN, B.; STAHLHUT, S. G.; KROGFELT, K. A. Role of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in uropathogenesis. **Infect. Immun.**, v. 81, p. 1164-1171, 2013.

BOUCKENOOGHE, A. R.; DUPONT, H. L.; JIANG, Z. D.; ADACHI, J.; MATHEWSON, J. J.; VERENKAR, M. P.; RODRIGUES, S.; STEFFEN, R. Markers of enteric inflammation in enteroaggregative *Escherichia coli* diarrhea in travelers. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 62, p. 711-713, 2000.

BOYER, F.; FICHANT, G.; BERTHOD, J.; VANDENBROUCK, Y.; ATTREE, I. Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide *in silico* analysis: What can be learned from available microbial genomic resources? **BMC Genomics**, v. 10, p. 1-14, 2009.

BRAY, J. Isolation of antigenically homogenous strains of *Bact. coli* from summer diarrhoea of infants. **J. Pathol. Bacteriol.**, v. 57, p. 239-247, 1945.

BRUNDER, W.; SCHMIDT, H.; KARCH, H. EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. **Mol. Microbiol.**, v. 24, p. 767-778, 1997.

BRUNDER, W.; SCHMIDT, H.; FROSCH, M.; KARCH, H. The large plasmids of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are highly variable genetic elements. **Microbiology**, v. 145, p. 1005-1014, 1999.

BUCHRIESER, C.; GLASER, P.; RUSNIOK, C.; NEDJARI, H.; D'HAUTEVILLE, H.; KUNST, F.; SANSONETTI, P.; PARSOT, C. The virulence plasmid pWR100 and the repertoire of proteins secreted by the type III secretion apparatus of *Shigella flexneri*. **Mol. Microbiol.**, v. 38, p. 760-771, 2000.

BUERIS, V.; SIRCILI, M. P.; TADEI, C. R.; SANTOS, M. F.; FRANZOLIN, M. R.; MARTINEZ, M. B.; FERRER, S. E.; BARRETO, M. L.; TRABULSI, L. R. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 839-844, 2007.

BUERIS, V.; HUERTA-CANTILLO, J.; NAVARRO-GARCIA, F.; RUIZ, R. M.; CIANCIARULLO, A. M.; ELIAS, W. P. Late establishment of the attaching and effacing lesion caused by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* depends on protein expression regulated by Per. **Infect. Immun.**, v. 83, p. 379-388, 2015.

BUNDOCK, P.; DEN DULK-RAS, A.; BEIJERSBERGEN, A.; HOOYKAAS, P. J. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. **Eur. Mol. Biol. Organ. J.**, v. 14, p. 3206-3214, 1995.

CHEN, H. D.; FRANKEL, G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 29, p. 83-98, 2005.

CHRISTIE, P. J. Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. **Mol. Microbiol.**, v. 40, p. 294-305, 2001.

CLEMENTS, A.; YOUNG, J. C.; CONSTANTINOU, N.; FRANKEL, G. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Microbes**, v. 3, p. 71-87, 2012.

CLINE, K.; MCCAFFERY, M. Evidence for a dynamic and transient pathway through the TAT protein transport machinery. **Eur. Mol. Biol. Organ. J.**, v. 26, p. 3039-49, 2007.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria**: Eighth edition. CLSI document M07-A8. Wayne (PA), USA: CLSI; 2009.

COHEN, P. S.; LAUX, D. C. Bacterial adhesion to and penetration of intestinal mucus *in vitro*. **Methods Enzymol.**, v. 253, p. 309-314, 1995.

CORNELIS, G. R. The type III secretion injectisome, **Nature**, v. 2, p. 811-825, 2006.

- COWAN, S. T. Abbreviation of bacterial generic names. **Science**, v. 120, p. 1103-1104, 1954.
- CRAIK, C. S.; PAGE, M. J.; MADISON, E. L. Proteases as therapeutics. **Biochem. J.**, v. 435, p:1-16, 2011.
- CRAVIOTO, A.; GROSS, R. J.; SCOTLAND, S. M.; ROWE, B. An adhesive factor in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. **Curr. Microbiol.**, v. 3, p. 95-99, 1979.
- CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 8, p. 26-38, 2010.
- CROXEN, M. A.; LAW, R. J.; SCHOLZ, R.; KEENEY, K. M.; WLODARSKA, M.; FINLAY, B. B. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 26, p. 822-880, 2013.
- CULLER, H. F.; MOTA, C. M.; ABE, C. M.; ELIAS, W. P.; SIRCILI, M. P.; FRANZOLIN, M. R. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains form biofilm on abiotic surfaces regardless of their adherence pattern on cultured epithelial cells. **Biomed. Res. Int.**, v. 2014, p. 1-10, 2014.
- CZECZULIN, J. R.; BALEPUR, S.; HICKS, S.; PHILLIPS, A.; HALL, R.; KOTHARY, M. H.; NAVARRO-GARCIA, F.; NATARO, J. P. Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 4135-4145, 1997.
- CZECZULIN, J. R.; WHITTAM, T. S.; HANDERSON, I. R.; NAVARRO-GARCIA, F.; NATARO, J. P. Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 2692-2699, 1999.
- D'ENFERT, C.; RYTER, A.; PUGSLEY, A. P. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Klebsiella pneumoniae* genes for production, surface localization and secretion of the lipoprotein pullulanase. **Eur. Mol. Biol. Organ. J.**, v. 6, p. 3531-3538, 1987.
- DANIELL, S. J.; TAKAHASHI, N.; WILSON, R.; FRIEDBERG, D.; ROSENSHINE, I.; BOOY, F. P.; SHAW, R. K.; KNUTTON, S.; FRANKEL, G.; AIZAWA, S. The filamentous type III secretion translocon of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Cell Microbiol.**, v. 3, p. 865-871, 2001.
- DATSENKO, K. A.; WANNER, B. L. One step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 97, p. 6640-6645, 2000.
- DAUTIN, N.; BERNSTEIN, H. D. Protein secretion in gram-negative bacteria via the autotransporter pathway. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 61, p. 89-112, 2007.
- DAUTIN, N. Serine protease autotransporters of enterobacteriaceae (SPATEs): biogenesis and function. **Toxins**, v. 2, p. 1179-1206, 2010.

DEAN, P.; KENNY, B. Intestinal barrier dysfunction by enteropathogenic *Escherichia coli* is mediated by two effector molecules and a bacterial surface protein. **Mol. Microbiol.**, v. 54, p. 665-675, 2004.

DEL TORDELLO, E.; VACCA, I.; RAM, S.; RAPPUOLI, R.; SERRUTO, D. *Neisseria meningitidis* NaIP cleaves human complement C3, facilitating degradation of C3b and survival in human serum. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 111, p. 427-432, 2014.

DEBROY, C.; ROBERTS, E.; FRATAMICO, P. M. Detection of O antigens in *Escherichia coli*. **Anim. Health Res. Rev.**, v. 12, p. 169-185, 2011.

DESVAUX, M.; HÉBRAUD, M.; TALON, R.; HENDERSON, I. R. Secretion and subcellular localizations of bacterial proteins: a semantic awareness issue. **Trends Microbiol.**, v. 17, p. 139-45, 2009.

DENG, W.; PUENTE, J. L.; GRUENHEID, S.; LI, Y.; VALLANCE, B. A.; VÁZQUEZ, A.; BARBA, J.; IBARRA, J. A.; O'DONNELL, P.; METALNIKOV, P.; ASHMAN, K.; LEE, S.; GOODE, D.; PAWSON, T.; FINLAY, B. B. Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 101, p. 3597-3602, 2004.

DIAMOND, S. L. Methods for mapping protease specificity. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 11, p. 46-51, 2007.

DJAFARI, S.; EBEL, F.; DEIBEL, C.; KRÄMER, S.; HUDEL, M.; CHAKRABORTY, T. Characterization of an exported protease from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, V. 25, p. 771-784, 1997.

DODSON, G.; WLODAWER, A. Catalytic triads and their relatives. **Trends Biochem.**, v. 23, p. 347-352, 1998.

DRAG, M.; SALVESEN, G. S. Emerging principles in protease-based drug discovery. **Nat. Rev. Drug. Discov.**, v. 9, p. 690-701, 2010.

DUDLEY, E. G.; ABE, C.; GHIGO, J. M.; LATOUR-LAMBERT, P.; HORMAZABAL, J. C.; NATARO, J. P. An IncII plasmid contributes to the adherence of the atypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain C1096 to cultured cells and abiotic surfaces. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 2102-2114, 2006.

DULGUER, M. V.; FABBRICOTTI, S. H.; BANDO, S. Y.; MOREIRA-FILHO, C. A.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETISKY, I. C. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains: phenotypic and genetic profiling reveals a strong association between enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin and diarrhea. **J. Infect. Dis.**, v. 188, p. 1685-1694, 2003.

DUTTA, P. R.; CAPPELLO, R.; NAVARRO-GARCIA, F.; NATARO, J. P. Functional comparison of serine protease autotransporters of enterobacteriaceae. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 7105-7113, 2002.

EASTON, D. M.; TOTSIKA, M.; ALLSOPP, L. P.; PHAN, M. D.; IDRIS, A.; WURPEL, D. J.; SHERLOCK, O.; ZHANG, B.; VENTURINI, C.; BEATSON, S. A.; MAHONY, T. J.; COBBOLD, R. N.; SCHEMBRI, M. A. Characterization of EhaJ, a new autotransporter protein from enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. **Front. Microbiol.**, v. 2, p. 1-9, 2011.

EDGEWORTH, J. D. Bacterial gastroenteritis. **Medicine**, v. 33, p. 73-77, 2005.

EDWARDS, P. R.; EWING, W. H. **Identification of Enterobacteriaceae**. 3th ed. Burgess Minneapolis: Publishing Co., 1972.

ELIAS, W. P.; UBER, A. P.; TOMITA, S. K.; TRABULSI, L. R.; GOMES, T. A. T. Combinations of putative virulence markers in typical and variant enteroaggregative *Escherichia coli* strains from children with and without diarrhoea. **Epidemiol. Infect.**, v. 129, p. 49-55, 2002.

ELSINGHORST, E. A.; KOPECKO, D. J. Molecular cloning of epithelial cell invasion determinants from enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 2409-2417, 1992.

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. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 3463-3471, 1994.

ESCHERICH, T. The intestinal bacteria of the neonate and breast-fed infant. 1884. **Rev. Infect. Dis.**, v. 10, p. 1220-1125, 1988.

ESER, M.; EHRMANN, M. SecA-dependent quality control of intracellular protein localization. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 100, p13231-13234, 2003.

ESLAVA, C.; VILLASECA, J.; MORALES, R.; NAVARRO, A.; CRAVIOTO, A. Identification of a protein with toxigenic activity produced by enteroaggregative *Escherichia coli*. In: 93th GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. **Abstracts**. Washington: American Society for Microbiology, 1993. p. 44, res. B-105.

ESLAVA, C.; NAVARRO-GARCIA, F.; CZECZULIN, J. R.; HENDERSON, I. R.; CRAVIOTO, A.; NATARO, J. P. Pet, an autotransporters enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 3155-3163, 1998.

ESTRADA-GARCIA, T.; NAVARRO-GARCIA, F. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathotype: a genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 66, p. 281-298, 2012.

EVANS; CHAPMAN. Curli biogeneses: order out of disorder. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1843, p. 1551-1558, 2014.

FARMER III, J. J.; BOATWRIGHT, K. D.; JANDA, M. Enterobacteriaceae: Introduction and identification. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; LANDRY, M. L.;

PFALLER, M. A. **Manual of Clinical microbiology**. 9 ed. Washington: American Society for Microbiology, 2007. v. 1, cap. 42, p. 649-669.

FASANO, A.; NORIEGA, F. R.; MANEVAL, D. R. JR.; CHANASONGCRAM, S.; RUSSELL, R.; GUANDALINI, S.; LEVINE, M. M.. *Shigella* enterotoxin 1: an enterotoxin of *Shigella flexneri* 2a active in rabbit small intestine *in vivo* and *in vitro*. **J. Clin. Invest.**, v. 95, p. 2853-2861, 1995.

FILLOUX, A. The underlying mechanisms of type II protein secretion. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1694, p. 163-179, 2004.

FILLOUX, A.; HACHANI, A.; BLEVES, S. The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. **Microbiology**, v. 154, p. 1570-1583, 2008.

FILLOUX, A. The rise of the Type VI secretion system. **F1000Prime Rep.**, v. 5; p. 1-8, 2013.

FRAGA, T. R.; COURROL, D. S.; CASTIBLANCO-VALENCIA, M. M.; HIRATA, I. Y.; VASCONCELLOS, S. A.; JULIANO, L.; BARBOSA, A. S.; ISAAC, L. Immune evasion by pathogenic leptospira strains: the secretion of proteases that directly cleave complement proteins. **J. Infect. Dis.**, v. 209, p. 876-886, 2014.

FRANCETIC, O.; PUGSLEY, A. P. The cryptic general secretory pathway (*gsp*) operon of *Escherichia coli* K-12 encodes functional proteins. **J. Bacteriol.**, v. 178, p. 3544-3549, 1996.

FRANKEL, G.; PHILLIPS, A. D.; ROSENSHINE, I.; DOUGAN, G.; KAPER, J. B.; KNUUTTON, S. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. **Mol. Microbiol.**, v. 30, p. 911-921, 1998.

FRANKEL, G.; PHILLIPS, A. D. Attaching effacing *Escherichia coli* and paradigms of Tir-triggered actin polymerization: getting off the pedestal. **Cell Microbiol.**, v.10, p. 549-556, 2008.

FRETER, R.; ALLWEISS, B.; O'BRIEN, P. C.; HALSTEAD, S. A.; MACSAI, M. S. Role of chemotaxis in the association of motile bacteria with intestinal mucosa: in vitro studies. **Infect. Immun.**, v. 34, p. 241-249, 1981.

FROST, L. S.; LEPLAE, R.; SUMMERS, A. O.; TOUSSAINT, A. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 3, p. 722-732, 2005.

FRONZES, R.; CHRISTIE, P. J.; WAKSMAN, G. The structural biology of type IV secretion systems. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 7, p. 703-14, 2009.

FUJIYAMA, R.; NISHI, J.; IMUTA, N.; TOKUDA, K.; MANAGO, K.; KAWANO, Y. The *shf* gene of *Shigella flexneri* homologue on the virulent plasmid pAA2 of enteroaggregative *Escherichia coli* 042 is required for firm biofilm formation. **Curr. Microbiol.**, v. 56, p. 474-480, 2008.

GAUTHIER, A.; FINLAY, B. B. Protein translocation: delivering virulence into the host cell. **Curr. Biol.**, v. 8, p. 768-770, 1998.

GAUTHIER, A.; PUENTE, J. L.; FINLAY, B. B. Secretin of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system requires components of the type III apparatus for assembly and localization. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 3310-3319, 2003.

GERLACH, R. G.; HENSEL, M. Protein secretion systems and adhesins: The molecular armory of Gram-negative pathogens. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 297, p. 401-415, 2007.

GHOSH, P. Process of protein transport by the type III secretion system. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 68, p. 771-795, 2004.

GILL, I.; LÓPEZ-FANDIÑO, R.; JORBA, X.; VULFSON, E. N. Biologically active peptides and enzymatic approaches to their production. **Enzyme Microbial. Technol.**, v. 18, p. 162-183, 1996.

GIOPPO, N. M. R.; ELIAS, W. P.; VIDOTTO, M. C.; LINHARES, R. E.; SARIDAKIS, H. O.; GOMES, T. A. T.; TRABULSI, L. R.; PELAYO, J. S. Prevalence of Hep-2 cells adherent *Escherichia coli* and characterization of enteroaggregative *E. coli* and chain-like adherent *E. coli* isolated from children with and without diarrhoea in Londrina, Brazil. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 190, p. 293-298, 2000.

GIRÓN, J. A.; HO, A. S. Y.; SCHOOLNIK, G. K. Characterization of fimbriae produced by enteropathogenic *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 175, p. 7391-7403, 1993.

GIRÓN, J. A.; TORRES, A. G.; FREER, E.; KAPER, J. B. The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. **Mol. Microbiol.**, v. 44, p. 361-379, 2002.

GOLDFARB, R. D.; PARRILLO, J. E. Complement. **Crit. Care Med.**, v. 33, p. 482-484, 2005.

GOMES, T. A.; IRINO, K.; GIRÃO, D. M.; GIRÃO, V. B.; GUTH, B. E.; VAZ, T. M.; MOREIRA, F. C.; CHINARELLI, S. H.; VIEIRA, M. A. Emerging enteropathogenic *Escherichia coli* strains? **Emerg. Infect. Dis.**, v. 10, p. 1851-1855, 2004.

GREEN, D. R.; EVAN, G. I. A matter of life and death. **Cancer Cell**, v. 1, p. 19-30, 2002.

GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. **Epidemiol. Rev.**, v. 13, p. 60-98, 1991.

GRIJPSTRA, J.; ARENAS, J.; RUTTEN, L.; TOMMASSEN, J. Autotransporter secretion: varying on a theme. **Res. Microbiol.**, v. 164, p. 562-582, 2013.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J. R. Gut flora in health and disease. **Lancet**, v. 361, p. 512-519, 2003.

GUIGNOT, J.; CHAPLAIS, C.; COCONNIER-POLTER, M. H.; SERVIN, A. L. The secreted autotransporter toxin, Sat, functions as a virulence factor in Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* by promoting lesions in tight junction of polarized epithelial cells. **Cell Microbiol.**, v. 9, p. 204-221, 2007.

GUTIÉRREZ, A.; DEL RÍO, J. C.; MARTÍNEZ, A. T. Microbial and enzymatic control of pitch in the pulp and paper industry. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 82, p. 1005-1018, 2009.

GUTIÉRREZ-JIMÉNEZ, J.; ARCINIEGA, I.; NAVARRO-GARCÍA, F. The serine protease motif of Pic mediates a dose-dependent mucolytic activity after binding to sugar constituents of the mucin substrate. **Microb. Pathog.**, v. 45, p. 115-123, 2008.

GUYER, D. M.; HENDERSON, I. R.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Identification of Sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 38, p. 53-66, 2000.

HACKER, J.; KAPER, J. B. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 54, p. 641-679, 2000.

HAGAN, C. L.; SILHAVY, T. J.; KAHNE, D. β -Barrel membrane protein assembly by the Bam complex. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 80, p. 189-210, 2011.

HAO, W. L.; LEE, Y. K. Microflora of the gastrointestinal tract: a review. **Methods Mol. Biol.**, v. 268, p. 491-502, 2004.

HARRINGTON, S. M.; STRAUMAN, M. C.; ABE, C. M.; NATARO, J. P. Aggregative adherence fimbriae contribute to the inflammatory response of epithelial cells infected with enteroaggregative *Escherichia coli*. **Cell Microbiol.**, v. 7, p. 1565-1578, 2005.

HARRINGTON, S. M.; SHEIKH, J.; HENDERSON, I. R.; RUIZ-PEREZ, F.; COHEN, P. S.; NATARO, J. P. The Pic protease of enteroaggregative *Escherichia coli* promotes intestinal colonization and growth in the presence of mucin. **Infect. Immun.**, v. 77, p. 2465-2473, 2009.

HARTLEY, B. S. Proteolytic enzymes. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 29, p. 45-72, 1960.

HEDBERG, C. W.; SAVARINO, S. J.; BESSER, J. M.; PAULUS, C. J.; THELEN, V. M.; MYERS, L. J.; CAMERON, D. N.; BARRETT, T. J.; KAPER, J. B.; OSTERHOLM, M. T. An outbreak of foodborne illness caused by *Escherichia coli* O39:NM, an agent not fitting into the existing scheme for classifying diarrheogenic *E. coli*. **J. Infect. Dis.**, v. 176, p. 1625-1628, 1997.

HEDSTROM, L. Serine protease mechanism and specificity. **Chem. Rev.**, v. 102, p. 4501-4524, 2002.

HEIMER, S. R.; RASKO, D. A.; LOCKATELL, C. V.; JOHNSON, D. E.; MOBLEY, H. L. Autotransporter genes *pic* and *tsh* are associated with *Escherichia coli* strains that cause acute pyelonephritis and are expressed during urinary tract infection. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 593-597, 2004.

HEINEMANN, J. A.; SPRAGUE, G. F. JR. Bacterial conjugative plasmids mobilize DNA transfer between bacteria and yeast. **Nature**, v. 340, p. 205-209, 1989.

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

HENDERSON, I. R.; CZECHULIN, J.; ESLAVA, C.; NORIEGA, F.; NATARO, J. P. Characterization of Pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 5587-5596, 1999.

HENDERSON, I. R.; NAVARRO-GARCIA, F.; DESVAUX, M.; FERNANDEZ, R. C.; ALA'ALDEEN, D. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 68, p. 692-744, 2004.

HERNANDES, R. T.; SILVA, R. M.; CARNEIRO, S. M.; SALVADOR, F. A.; FERNANDES, M. C.; PADOVAN, A. C.; YAMAMOTO, D.; MORTARA, R. A.; ELIAS, W. P.; DA SILVA BRIONES, M. R.; GOMES, T. A. The localized adherence pattern of an atypical enteropathogenic *Escherichia coli* is mediated by intimin omicron and unexpectedly promotes HeLa cell invasion. *Cell Microbiol.*, v. 10, p. 415-25, 2008.

HERNANDES, R. T.; ELIAS, W. P.; VIEIRA, M. A. M.; GOMES, T. A. T. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 297, p. 137-149, 2009.

HERNANDES, R. T.; VELSKO, I.; SAMPAIO, S. C. F.; ELIAS, W. P.; ROBINS-BROWNE, R. M.; GOMES, T. A. T.; GIRON, J. A. Fimbrial adhesins produced by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 77, n. 23, p. 8391-8399, 2011.

HEROLD, S.; PATON, J. C.; PATON, A. W. Sab, a novel autotransporter of locus of enterocyte effacement-negative shiga-toxigenic *Escherichia coli* O113:H21, contributes to adherence and biofilm formation. **Infect. Immun.**, v. 77, p. 3234-3243, 2009.

HERZOG, K.; ENGELER DUSEL, J.; HUGENTOBLE, M.; BEUTIN, L.; SÄGESSER, G.; STEPHAN, R.; HÄCHLER, H.; NÜESCH-INDERBINEN, M. Diarrheagenic enteroaggregative *Escherichia coli* causing urinary tract infection and bacteremia leading to sepsis. **Infection**, v. 42, p. 441-444, 2014.

HICKS, S.; CANDY, D. C.; PHILLIPS, A. D. Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa *in vitro*. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 4751-4760, 1996.

HINTON, N. A.; MACGREGOR, R. R. A study of infections due to pathogenic serogroups of *Escherichia coli*. **Can. Med. Assoc. J.**, v. 79, p. 359-364, 1958.

HIROTA, Y. The effect of acridine dyes on mating type factors in *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 46, p. 57-64, 1960.

HOLLAND, B.; SCHMITT, L.; YOUNG, J. Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway. **Mol. Membr. Biol.**, v. 22, p. 29-39, 2005.

HOLLAND, I. B. The extraordinary diversity of bacterial protein secretion mechanisms. **Methods Mol. Biol.**, v. 619, p. 1-20, 2010.

HU, J.; VAN DEN STEEN, P. E.; SANG, Q. X.; OPDENAKKER, G. Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. **Nature Rev. Drug Discov.**, v. 6, p. 480-498, 2007.

HUECK, C. J. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 62, p. 379-433, 1998.

IEVA, R.; BERNSTEIN, H. D. Interaction of an autotransporter passenger domain with BamA during its translocation across the bacterial outer membrane. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 106, p. 19120-19125, 2009.

ISAAC, L. **Sistema complemento**. In: CALICH, V.; VAZ, C. *Imunologia*. São Paulo: Revinter. 1a ed. p. 117, 2009.

IZADPANAH, A.; GALLO, R. L. Antimicrobial peptides. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 52, p. 381-390, 2005.

JACOB-DUBUISSON, F.; LOCHT, C.; ANTOINE, R. Two-partner secretion in Gram-negative bacteria: thrifty, specific pathway for large virulence proteins. **Mol. Microbiol.**, v. 40, p. 306-313, 2001.

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. W. Peptide Antimicrobial Agents. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 19, p. 491-511, 2006.

JERSE, A. E.; KAPER, J. B. The *eae* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes a 94-kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid. **Infect. Immun.**, v. 59, p. 4302-439, 1991.

JHA, G.; RAJESHWARI, R.; SONTI, R. V. Bacterial type two secretion system secreted proteins: double-edged swords for plant pathogens. **Mol. Plant Microbe Interact.**, v. 18, p. 891-898, 2005.

JIANG, Z. D.; GREENBERG, D.; NATARO, J. P.; STEFFEN, R.; DUPONT, H. L. Rate of occurrence and pathogenic effect of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in international travelers. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 4185-4190, 2002.

JOHANNES, L.; RÖMER, W. Shiga toxins--from cell biology to biomedical applications. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 8, p. 105-116, 2010.

JUSTICE, S. S.; HUNSTAD, D. A.; SEED, P. C.; HULTGREN, S. J. Filamentation by *Escherichia coli* subverts innate defenses during urinary tract infection. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 103, p. 19884-19889, 2006.

KAPER, J. B. Defining EPEC. **Rev. Microbiol.**, v. 27, p. 130-133, 1996.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 123-138, 2004.

KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. Overview and historical perspectives. **Microbiol. Spectr.**, v. 2, p. 1-15, 2014.

KARMALI, M. A.; STEELE, B. T.; PETRIC, M.; LIM, C. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. **Lancet.**, v. 1, p. 619-20, 1983.

KARMALI, M. A. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 2, p. 15-38, 1989.

KARMALI, M. A.; GANNON, V.; SARGEANT, J. M. Vero-cytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). **Vet. Microbiol.**, v. 140, p. 360-370, 2010.

KEDDY, K. H.; SOOKA, A.; CROWTHER-GIBSON, P.; QUAN, V.; MEIRING, S.; COHEN, C.; NANA, T.; SRIRUTTAN, C.; SEETHARAM, S.; HOOSEN, A.; NAICKER, P.; ELLIOTT, E.; HAFJEJEE, S.; WHITELOW, A.; KLUGMAN, K. P. Systemic shigellosis in South Africa. **Clin. Infect. Dis.**, v. 54, p. 1448-1454, 2012.

KEIL, B. **Specificity of proteolysis**. Berlin, Germany: Springer-Verlag KG, 1992.

KLAUSER, T.; POHLNER, J.; MEYER, T. F. The secretion pathway of IgA protease-type proteins in Gram-negative bacteria. **Bioessays**, v. 15, p. 799-805, 1993.

KNOWLES, T. J.; BROWNING, D. F.; JEEVES, M.; MADERBOCUS, R.; RAJESH S.; SRIDHAR, P.; MANOLI, E.; EMERY, D.; SOMMER, U.; SPENCER, A.; LEYTON, D. L.; SQUIRE, D.; CHAUDHURI, R. R.; VIANI, M. R.; CUNNINGHAM, A. F.; HENDERSON, I. R.; OVERDUIN, M. Structure and function of BamE within the outer membrane and the beta-barrel assembly machine. **Eur. Mol. Biol. Organ. Rep.**, v. 12, p. 123-128, 2011.

KNOWLES, T. J.; SCOTT-TUCKER, A.; OVERDUIN, M.; HENDERSON, I. R. Membrane protein architects: the role of the BAM complex in outer membrane protein assembly. **Nat. Rev. Microbiol.** v. 7, p. 206-214, 2009.

KNUTTON, S., BALDWIN, T., WILLIAMS, P. H., MCNEISH, A. S. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 57, p. 1290-1298, 1989.

KNUTTON, S. Electron microscopy methods in adhesion. **Methods enzymol.**, v. 253, p. 145-158, 1995.

KNUTTON, S.; ROSENSHINE, I.; PALLAN, M. J.; NISAN, I.; NEVES, B. C.; BAIN, C.; WOLFF, C.; DOUGAN, G.; FRANKEL, G. A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. **Eur. Mol. Biol. Organ. J.**, v. 17, p. 2166-2176, 1998.

KÖHL, J. Self, non-self, and danger: a complementary view. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 586, p. 71-94, 2006.

KOSTAKIOTI, M.; NEWMAN, C. L.; THANASSI, D. G.; STATHOPOULOS, C. Mechanisms of protein export across the bacterial outer membrane. **J. Bacteriol.**, v. 187, 4306-4314, 2005.

KREM, M. M.; DI CERA, E. Molecular markers of serine protease evolution. **Eur. Mol. Biol. Organ. J.**, v. 20, p. 3036-3045, 2001.

KRESSE, A. U.; SCHULZE, K.; DEIBEL, C.; EBEL, F.; ROHDE, M.; CHAKRABORTY, T.; GUZMÁN, C. A. Pas, a novel protein required for protein secretion and attaching and effacing activities of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 180, p. 4370-4379, 1998.

KRISHNASWAMY, S. Exosite-driven substrate specificity and function in coagulation. **J. Thromb. Haemost.**, v. 3, p. 54-67, 2005.

KUDVA, R.; DENKS, K.; KUHN, P.; VOGT, A.; MÜLLER, M.; KOCH, H. G. Protein translocation across the inner membrane of Gram-negative bacteria: the Sec and Tat dependent protein transport pathways. **Res. Microbiol.**, v. 164, p. 505-534, 2013.

LAARMAN AJ, RUYKEN M, MALONE CL, VAN STRIJP JA, HORSWILL AR, ROOIJAKKERS SH. *Staphylococcus aureus* metalloprotease aureolysin cleaves complement C3 to mediate immune evasion. **J. Immunol.**, v. 186, p. 6445-6453, 2011.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAMBRIS, J. D.; RICKLIN, D.; GEISBRECHT, B. V. Complement evasion by human pathogens. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 6, p. 132-142, 2008.

LEO, J. C.; GRIN, I.; LINKE, D. Type V secretion: mechanism(s) of autotransport through the bacterial outer membrane. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 367, p. 1088-1101, 2012.

LEYTON, D. L.; SLOAN, J.; HILL, R. E.; DOUGHTY, S.; HARTLAND, E. L. Transfer region of pO113 from enterohemorrhagic *Escherichia coli*: similarity with R64 and identification of a novel plasmid-encoded autotransporter, EpeA. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 6307-6319, 2003.

LIÉVIN-LE MOAL, V.; SERVIN, A. L. The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 19, p. 315-337, 2006.

LIBERATORE, A. M.; MOREIRA, F. C.; GOMES, T. A.; MENCHACA-DIAZ, J. L.; KOH, I. H. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* bacterial translocation associated with tissue hypoperfusion in rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 44, p. 1018-1024, 2011.

LINDENTHAL, C.; ELSINGHORST, E. A. Identification of a glycoprotein produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 4084–4091, 1999.

LINKE, D.; RIESS, T.; AUTENRIETH, I. B.; LUPAS, A.; KEMPF, V. A. Trimeric autotransporter adhesins: variable structure, common function. **Trends Microbiol.**, v. 14, p. 264-270, 2006.

LIOR, H. Classification of *Escherichia coli*. In: GYLES, C. L. (Ed.). ***Escherichia coli in domestic animals and humans.***, Wallingford: CAB International, p. 31-72, 1996.

LOFERER, H.; HAMMAR, M.; NORMARK, S. Availability of the fibre subunit CsgA and the nucleator protein CsgB during assembly of fibronectin-binding curliis limited by the intracellular concentration of the novel lipoprotein CsgG. **Mol Microbiol.**, v. 26, p. 11-23, 1997.

LOPEZ-OTIN, C.; OVERALL, C. M. Protease degradomics: a new challenge of proteomics. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 3, p. 509-519, 2002.

MA, A. T.; MCAULEY, S.; PUKATZKI, S.; MEKALANOS, J. J. Translocation of a *Vibrio cholerae* type VI secretion effector requires bacterial endocytosis by host cells. **Cell Host Microbe**, v. 5, p. 234-243, 2009.

MADHAVI, J.; SRILAKSHMI, J.; RAGHAVENDRA-RAO M. V.; KRISHNA-SATYA K.; SAMBASIVA-RAO, K. R. S. Proteases - a single group of enzyme bridging industrial and therapeutic demands. **Intern. J. Inst. Pharm. Life Science**, v. 4, p.1-27, 2014.

MALINVERNI, J. C.; WERNER, J.; KIM, S.; SKLAR, J. G.; KAHNE, D.; MISRA R.; SILHAVY, T. J. YfiO stabilizes the YaeT complex and is essential for outer membrane protein assembly in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 61, p. 151-164, 2006.

MARONCLE, N. M, SIVICK, K. E.; BRADY, R.; STOKES, F. E.; MOBLEY, H. L. Protease activity, secretion, cell entry, cytotoxicity, and cellular targets of secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*. **Infect Immun.**, v. 74, 6124-6134, 2006.

MATHEWSON, J. J.; SALAMEH, B. M.; DUPONT, H. L.; JIANG, Z. D.; NELSON, A. C.; ARDUINO, R.; SMITH, M. A.; MASOZERA, N. HEp-2 cell-adherent *Escherichia coli* and intestinal secretory immune response to human immunodeficiency virus (HIV) in outpatients with HIV-associated diarrhea. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 5, p. 87-90, 1998.

MCDANIEL, T. K.; JARVIS, K. G.; DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** v. 92, p. 1664-1668, 1995.

MEAD, P. S.; GRIFFIN, P. M. *Escherichia coli* O157:H7. **Lancet**, v. 352, p. 1207-1212, 1998.

MELLIES, J. L.; NAVARRO-GARCIA, F.; OKEKE, I.; FREDERICKSON, J.; NATARO J. P.; KAPER, J. B. EspC pathogenicity island of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes an enterotoxin. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 315-324, 2001.

MICHELIS, T., WATTIAU, P.; BRASSEUR, R.; RUYSSCHAERT, J. M.; CORNELIS, G. Secretion of Yop proteins by *Yersiniae*. **Infect. Immun.**, v. 58, p. 2840-2849, 1990.

MOHAMED, M. M.; SLOANE, B. F. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. **Nature Rev. Cancer**, v. 6, p. 764–775, 2006.

MONTEIRO, B. T. **Caracterização da proteína dispersina em amostras de *Escherichia coli* não pertencentes ao patótipo de *E. coli* enteroagregativa.** 2008. 97 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

MONTEIRO-NETO, V.; BANDO, S. Y.; MOREIRA-FILHO, C. A. GIRÓN, J. A. Characterization of an outer membrane protein associated with hemagglutination and adhesive properties of enteroaggregative *Escherichia coli* O111:H12. **Cell. Microbiol.**, v. 5, p. 533-547, 2003.

MOON, H. W.; WHIPP, S. C.; ARGENZIO, R. A.; LEVINE, M. M.; GIANNELLA, R. A. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. **Infect. Immun.**, v. 41, p. 1340-1351, 1983.

MUELLER, M.; GRAUSCHOPF, U.; MAIER, T.; GLOCKSHUBER, R.; BAN, N. The structure of a cytolytic alpha-helical toxin pore reveals its assembly mechanism. **Nature**, v. 459, p. 726-730, 2009.

MUNERA, D.; RITCHIE, J. M.; HATZIOS, S. K.; BRONSON, R.; FANG, G.; SCHADT, E. E.; DAVIS, B. M.; WALDOR, M. K. Autotransporters but not pAA are critical for rabbit colonization by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4. **Nat. Commun.**, v. 5, n. 3080, 2014.

MURPHY, K. C; BECKWITH, J. Export of proteins to the cell envelope in *Escherichia coli*, In NEIDHARDT, F. C.; CURTISS III, R.; INGRAHAM, J. L.; LIN, E. C. C.; LOW, K. B.; MAGASANIK, B.; RILEY, M.; REZNIKOFF, W. S.; SCHAECHTER, M.; UMBARGER, H. E. (Ed.), ***Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology***, 2th ed. ASM Press, Washington, D. C., 1996, p. 967-978.

NATALE, P.; BRÜSER, T.; DRIESSEN, A. J. Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane-distinct translocases and mechanisms. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1778, p. 1735-1756, 2008.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B.; ROBINS-BROWNE, R.; PRADO, V.; VIAL, P. A.; LEVINE, M. M. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEP-2 cells. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 16, p. 829-831, 1987.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, p. 142-201, 1998.

NAVARRE, W. W.; SCHNEEWIND, O. Surface proteins of Gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 63, p. 174-229, 1999.

NAVARRO-GARCIA, F.; CANIZALEZ-ROMAN, A.; SUI, B. Q.; NATARO, J. P.; AZAMAR, Y. The serine protease motif of EspC from enteropathogenic *Escherichia coli* produces epithelial damage by a mechanism different from that of Pet toxin from enteroaggregative *E. coli*. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 3609–3621, 2004.

NAVARRO-GARCIA, F.; GUTIÉRREZ-JIMÉNEZ, J.; GARCIA-TOVAR, C.; CASTRO, L. A.; SALAZAR-GONZALEZ, H.; CORDOVA, V. Pic, an autotransporter protein secreted by different pathogens in the Enterobacteriaceae family, is a potent mucus secretagogue. **Infect Immun.**, vol. 78, p. 4101-4109, 2010.

NETER, E.; WESTPHAL, O.; LUDERITZ, O.; GINO, R. M.; GORZYNSKI, E. A. Demonstration of antibodies against enteropathogenic *Escherichia coli* in sera of children of various ages. **Pediatrics**, v. 16, p. 801-808, 1955.

NETER, E.; WEBB, C. R.; SHUMWAY, C. N.; MURDOCK, M. R. Study on etiology, epidemiology and antibiotic therapy of infantile diarrhea, with particular reference to certain serotypes of *Escherichia coli*. **Am. J. Public Health.**, v. 41, p. 1490-1496, 1951.

NGUYEN, L.; PAULSEN, I. T.; TCHIEU, J.; HUECK, C. J.; SAIER, M. H. JR. Phylogenetic analyses of the constituents of type III protein secretion systems. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.**, v. 2, p. 125-144, 2000.

NGUYEN, M.; RIZVI, J.; HECHT, G. Expression of Enteropathogenic *Escherichia coli* Map is significantly different than that of other type III secreted effectors *in vivo*. **Infect. Immun.**, v. 83, p. 130-137, 2015.

NGUYEN, R. N.; TAYLOR, L. S.; TAUSCHEK, M.; ROBINS-BROWNE, R. M. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* infection and prolonged diarrhea in children. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 12, p. 597-603, 2006.

NGUYEN, Y.; SPERANDIO, V. Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathogenesis. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, v. 2, p. 1-7, 2012.

NORIEGA, F. R. ShMu, a protein of *S. flexneri* 2a with hemagglutinin and mucinase activities is encoded by an open reading frame (*she*) that forms an antisense gene pair with the operon encoding *Shigella* enterotoxin 1 (ShET1). GenBank accession no. U35656. 1995.

NOVERR, M. C.; HUFFNAGLE, G. B. Does the microbiota regulate immune responses outside the gut? **Trends Microbiol.**, v. 12, p. 562-568, 2004.

OBERHETTINGER, P.; SCHÜTZ, M.; LEO, J. C.; HEINZ, N.; BERGER, J.; AUTENRIETH, I. B.; LINKE, D. Intimin and Invasin Export Their C-Terminus to the Bacterial Cell Surface Using an Inverse Mechanism Compared to Classical Autotransport. **PLoS One**, v. 7, p. 1-15, 2012.

O'BRIEN, A. D.; LAVECK, G. D.; THOMPSON, M. R.; FORMAL, S. B. Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.**, v. 146, p. 763-769, 1982.

OCHMAN, H., LAWRENCE, J. G.; GROISMAN, E. A. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. **Nature**, v. 405, p. 299-304, 2000.

OCHOA, T. J.; CONTRERAS, C. A. Enteropathogenic *Escherichia coli* infection in children. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 24, p. 478-483, 2011.

OGIERMAN, M. A.; PATON, A. W.; PATON, J. C. Up-regulation of both intimin and *eae*-independent adherence of shiga toxigenic *Escherichia coli* O157 by *ler* and phenotypic impact of a naturally occurring *ler* mutation. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 5344-5353, 2000.

OKHUYSEN, P. C.; DUPONT, H. L. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC): a cause of acute and persistent diarrhea of worldwide importance. **J. Infect. Dis.**, v. 202, p. 503-505, 2010.

OLESEN, B.; SCHEUTZ, F.; ANDERSEN, R. L.; MENARD, M.; BOISEN, N.; JOHNSTON, B.; HANSEN, D. S.; KROGFELT, K. A.; NATARO, J. P.; JOHNSON, J. R. Enteroaggregative *Escherichia coli* O78:H10, the cause of an outbreak of urinary tract infection. **J. Clin. Microbiol.**, v. 50, p. 3703-3711, 2012.

ORTH, D.; EHRLLENBACH, S.; BROCKMEYER, J.; KHAN, A. B.; HUBER, G.; KARCH, H.; SARG, B.; LINDNER, H.; WÜRZNER, R. EspP, a serine protease of enterohemorrhagic *Escherichia coli*, impairs complement activation by cleaving complement factors C3/C3b and C5. **Infect. Immun.**, v. 78, p. 4294-4301, 2010.

O'RYAN, M.; PRADO, V.; PICKERING, L. K. A millennium update on pediatric diarrheal illness in the developing world. **Semin. Pediatr. Infect. Dis.**, v. 16, p. 125-36, 2005.

OSWALD, C.; HOLLAND, I. B.; SCHMITT, L. The motor domains of ABC-transporters. What can structures tell us? **Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v. 372, p. 385-399, 2006.

OVERALL, C. M.; DEAN, R. A. Degradomics: systems biology of the protease web. Pleiotropic roles of MMPs in cancer. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 25, p. 69-75, 2006.

PAGE, M. J.; Di CERA, E. Evolution of peptidase diversity. **J. Biol. Chem.**, v. 283, p. 30010-30014, 2008a.

PAGE, M. J.; Di CERA, E. Serine peptidases: classification, structure and function. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 65, p. 1220-1236, 2008b.

PALMER, T.; BERKS, B. C. The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 10, p. 483-96, 2012.

PARHAM, N. J.; SRINIVASAN, U.; DESVAUX, M.; FOXMAN, B.; MARRS, C. F.; HENDERSON, I. R. PicU, a second serine protease autotransporter of uropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 230, p. 73-83, 2004.

PARK, S. Y.; KIM, K. M.; LEE, J. H.; SEO, S. J.; LEE, I. H. Extracellular gelatinase of *Enterococcus faecalis* destroys a defense system in insect hemolymph and human serum. **Infect. Immun.**, v. 75, p. 1861-1869, 2007.

PARK, S. Y.; SHIN, Y. P.; KIM, C. H.; PARK, H. J.; SEONG, Y. S.; KIM, B. S.; SEO, S. J.; LEE, I. H. Immune evasion of *Enterococcus faecalis* by an extracellular gelatinase that cleaves C3 and iC3b. **J. Immunol.**, v. 181, p. 6328-6336, 2008.

PARREIRA, V. R.; GYLES, C. L. A novel pathogenicity island integrated adjacent to the thrW tRNA gene of avian pathogenic *Escherichia coli* encodes a vacuolating autotransporter toxin. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 5087-5096, 2003.

PATEL, S. K.; DOTSON, J.; ALLEN, K. P.; FLECKENSTEIN, J. M. Identification and molecular characterization of EatA, an autotransporter protein of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 1786-1794, 2004.

PATERSON, D. L. Resistance in Gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. **Am. J. Infect. Control**, v. 34, p. 20-28, 2006.

PATON, A. W.; MORONA, R.; PATON, J. C. A new biological agent for treatment of Shiga toxigenic *Escherichia coli* infections and dysentery in humans. **Nat. Med.**, v. 6, p. 265-270, 2000.

PINHEIRO DA SILVA, F.; MACHADO, M. C. Antimicrobial peptides: clinical relevance and therapeutic implications. **Peptides**, v. 36, p. 308-314, 2012.

PODEWILS, L. J.; MINTZ, E. D.; NATARO, J. P.; PARASHAR, U. D. Acute, infectious diarrhea among children in developing countries. **Semin. Pediatr. Infect.**, v. 15, p. 155-168, 2004.

PROVENCE, D. L.; CURTISS, R. 3RD. Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 1369-1380, 1994.

PUGSLEY, A. P. The complete general secretory pathway in gram negative bacteria. **Microbiol. Rev.**, v. 57, p. 50-108, 1993.

PUKATZKI, S.; MCAULEY, S. B.; MIYATA, S. T. The type VI secretion system: translocation of effectors and effector-domains. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 12, p. 11-17, 2009.

PUPO, G. M.; LAN, R.; REEVES, P. R. Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics. **Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.**, v. 97, p. 10567-10572, 2000.

QADRI, F.; SVENNERHOLM, A. M.; FARUQUE, A. S.; SACK, R. B. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 18, p. 465-483, 2005.

RAJAKUMAR, K.; SASKAWA, C; ADLER, B. Use of a novel approach, termed island probing, identifies the *Shigella flexneri* she pathogenicity island which encodes a homolog of the immunoglobulin A protease-like family of proteins. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 4606-4614, 1997.

RAJKUMAR, R.; DEVARAJ, H.; NIRANJALI, S. Binding of *Shigella* to rat and human intestinal mucin. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 178, p. 261-268, 1998.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 62, p. 597-635, 1998.

RASKO, D. A.; WEBSTER, D. R.; SAHL, J. W.; BASHIR, A.; BOISEN, N.; SCHEUTZ, F.; PAXINOS, E. E.; SEBRA, R.; CHIN, C. S.; ILIOPOULOS, D.; KLAMMER, A.; PELUSO, P.; LEE, L.; KISLYUK, A.O.; BULLARD, J.; KASARSKIS, A.; WANG, S.; EID, J.; RANK, D.; REDMAN, J. C.; STEYERT, S. R.; FRIMODT-MOLLER, J.; STRUVE, C.; PETERSEN, A. M.; KROGFELT, K. A.; NATARO, J. P.; SCHADT, E. E.; WALDOR, M. K. Origins of the *E. coli* strain causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany. **N. Engl. J. Med.**, v. 365, p. 709-717, 2011.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; BATEMAN, A. Asparagine peptide lyases: a seventh catalytic type of proteolytic enzymes. **J. Biol. Chem.**, v. 286, p. 38321-38328, 2011.

REMAUT, H.; TANG, C.; HENDERSON, N. S.; PINKNER, J. S.; WANG, T.; HULTGREN, S. J.; THANASSI, D. G.; WAKSMAN, G.; LI, H. Fiber formation across the bacterial outer membrane by the chaperone/ushe pathway. **Cell**, v. 133, p. 640-652, 2008.

RESTIERI, C.; GARRISS, G.; LOCAS, M. C.; DOZOIS, C. M. Autotransporter encoding sequences are phylogenetically distributed among *Escherichia coli* clinical isolates and reference strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 73, p. 1553–1562, 2007.

RHEE, K. J.; CHENG, H.; HARRIS, A.; MORIN, C.; KAPER, J. B.; HECHT, G. Determination of spatial and temporal colonization of enteropathogenic *E. coli* and enterohemorrhagic *E. coli* in mice using bioluminescent *in vivo* imaging. **Gut Microbes**, v. 2, p. 34-41, 2011.

RIGEL, N. W.; SCHWALM, J.; RICCI, D. P.; SILHAVY, T. J. BamE modulates the *Escherichia coli* beta-barrel assembly machine component BamA. **J. Bacteriol.**, v. 194, p. 1002-1008, 2012.

RIJKEN, D. C.; LIJNEN, H. R. New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. **J. Thromb. Haemost.**, v. 7, p. 4–13, 2009.

RILEY, L. W.; REMIS, R. S.; HELGERSON, S. D.; MCGEE, H. B.; WELLS, J. G.; DAVIS, B. R.; HEBERT, R. J.; OLCOTT, E. S.; JOHNSON, L. M.; HARGRETT, N. T.; BLAKE, P. A.; COHEN, M. L. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **N. Engl. J. Med.**, v. 308, p. 681-685, 1983.

ROBERT, V.; VOLOKHINA, E. B.; SENF, F.; BOS, M. P.; VAN GELDER, P.; TOMMASSEN, J. Assembly factor Omp85 recognizes its outer membrane protein substrates by a species-specific C-terminal motif. **PLoS Biol.**, v. 4, p. 1984-1995, 2006.

ROBINS-BROWNE, R. M. Traditional enteropathogenic *Escherichia coli* of infantile diarrhea. **Rev. Infect. Dis.**, v. 9, p. 28-53, 1987.

ROBINS-BROWNE, R. M.; TAUSCHEK, M.; BENNETT-WOOD, V. R.; RUSSEL, J.; OPPEDISANO, F.; LISTER, N. A.; BETTELHEIM, K. A.; FARLEY, C. K.; SINCLAIR, M. I.; HELLARD, M. E. *Escherichia coli* and community-acquired gastroenteritis, Melbourne, Australia. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 10, p. 1797-1805, 2004.

RODRIGUES, J.; SCALETISKY, I. C. A.; CAMPOS, L. C.; GOMES, T. A. T.; WHITTAM, T. S.; TRABULSI, L. R. Clonal structure and virulence factors in strains of *Escherichia coli* of the classic serogroup O55. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 2680-2686, 1996.

RÖMER, W.; BERLAND, L.; CHAMBON, V.; GAUS, K.; WINDSCHIEGL, B.; TENZA, D.; ALY, M. R.; FRAISIER, V.; FLORENT, J. C.; PERRAIS, D.; LAMAZE, C.; RAPOSO, G.; STEINEM, C.; SENS, P.; BASSEREAU, P.; JOHANNES, L. Shiga toxin induces tubular membrane invaginations for its uptake into cells. **Nature**, v. 450, p. 670-675, 2007.

ROSSITER, A. E.; LEYTON, D. L.; TVEEN-JENSEN, K.; BROWNING, D. F.; SEVASTSYANOVICH, Y.; KNOWLES, T. J.; NICHOLS, K. B.; CUNNINGHAM, A. F.; OVERDUIN, M.; SCHEMBRI, M. A.; HENDERSON, I. R. The essential β -barrel assembly machinery complex components BamD and BamA are required for autotransporter biogenesis. **J. Bacteriol.**, v. 193, p. 4250-4253, 2011.

RUIZ-PEREZ, F.; HENDERSON, I. R.; LEYTON, D. L.; ROSSITER, A. E.; ZHANG, Y.; NATARO, J. P. Roles of periplasmic chaperone proteins in the biogenesis of serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae. **J. Bacteriol.**, v. 191, p. 6571-6583, 2009.

RUIZ-PEREZ, F.; HENDERSON, I. R.; NATARO, J. P. Interaction of FkpA, a peptidyl-prolyl cis/trans isomerase with EspP autotransporter protein. **Gut Microbes**, v. 1, p. 339-344, 2010.

RUIZ-PEREZ, F.; WAHID, R.; FAHERTY, C. S.; KOLAPPASWAMY, K.; RODRIGUEZ, L.; SANTIAGO, A.; MURPHY, E.; CROSS, A.; SZTEIN, M. B.; NATARO, J. P. Serine protease autotransporters from *Shigella flexneri* and pathogenic *Escherichia coli* target a broad range of leukocyte glycoproteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 108, p. 12881-12886, 2011.

RUIZ-PEREZ, F.; NATARO, J. P. Bacterial serine proteases secreted by the autotransporter pathway: classification, specificity, and role in virulence. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 71, p. 745-770, 2014.

SADER, H. S.; GALES, A. C.; PFALLER, M. A.; MENDES, R. E.; ZOCCOLI, C.; BARTH, A.; JONES, R. N. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: Summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 5, p. 200-214, 2001.

SAEKI, K.; OZAKI, K.; KOBAYASHI, T.; ITO, S. Detergent alkaline proteases: enzymatic properties, genes, and crystal structures. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 103, p. 501-508, 2007.

SAIER, M. H. JR. Evolution of the bacterial type III protein secretion systems. **Trends Microbiol.**, v. 12, p. 113-115, 2004.

SALACHA, R.; KOVACIĆ, F.; BROCHIER-ARMANET, C.; WILHELM, S.; TOMMASSEN, J.; FILLOUX, A.; VOULHOX, R.; BLEVES S. The *Pseudomonas aeruginosa* patatin-like protein PlpD is the archetype of a novel Type V secretion system. **Environ. Microbiol.**, v. 12, p. 1498-1512, 2010.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SAMPAIO, S. C.; GOMES, T. A.; PICHON, C.; DU MERLE, L.; GUADAGNINI, S.; ABE, C. M.; SAMPAIO, J. L.; LE BOUGUÉNEC, C. 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*. **Infect Immun.**, v. 77, p. 4406-4413, 2009.

SAMPAIO, S. C.; MOREIRA, F. C.; LIBERATORE, A. M.; VIEIRA, M. A.; KNOBL, T.; ROMÃO, F. T.; HERNANDES, R. T.; FERREIRA, C. S.; FERREIRA, A. P.; FELIPE SILVA, A.; SINIGAGLIA-COIMBRA, R.; KOH, I. H.; GOMES, T. A. Analysis of the virulence of an atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strain *in vitro* and *in vivo* and the influence of type three secretion system. **Biomed. Res. Int.**, v. 2014, n. 797508, 2014.

SANDKVIST, M. Type II secretion and pathogenesis. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 3523-3535, 2001.

SANSONETTI, P. Host-pathogen interactions: the seduction of molecular cross talk. **Gut**, v. 50, p. 2-8, 2002.

SAVARINO, S. J.; FASANO, A.; ROBERTSON, D. C.; LEVINE, M. M. Enteroaggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an *in vitro* rabbit intestinal model. **J. Clin. Invest.**, v. 87, p. 1450-1455, 1991.

SAVARINO, S. J.; FASANO, A.; WATSON, J.; MARTIN, B. M.; LEVINE, M. M.; GUANDALINI, S.; GUERRY, P. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 90, p. 3093-3097, 1993.

SAVARINO, S. J.; MCVEIGH, A.; WATSON, J.; MOLINA, J.; CRAVIOTO, A.; ECHEVERRIA, P.; BHAN, M. K.; LEVINE, M. M.; FASANO, A. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.**, v. 173, p. 1019-1022, 1996.

SCALETISKY, I. C.; PEDROSO, M. R.; OLIVA, C. A.; CARVALHO, R. L.; MORAIS, M. B.; FAGUNDES-NETO, U. A. Localized adherence-like pattern as a second pattern of adherence of classic enteropathogenic *Escherichia coli* to Hep-2 cells that is associated with infantile diarrhea. **Infect. Immun.**, v. 67 p. 3410-3415, 1999.

SCALETISKY, I. C. A.; ARANDA, K. R.; SOUZA, T. B.; SILVA, N. P. Adherence factors in atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains expressing the localized adherence-like pattern in HEp-2 cells. **J. Clin. Microbiol.**, v. 48, p. 302-306, 2010.

SCHMIDT, H.; KNOP, C.; FRANKE, S.; ALEKSIE, S.; HEESEMAN, J.; KARCH, H. Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, p. 701-705, 1995.

SCHMIDT, H.; KERNBACH, C.; KARCH, H. Analysis of the EHEC hly operon and its location in the physical map of the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Microbiology**, v. 142, p. 907-914, 1996.

SCHMIDT, H.; ZHANG, W. L.; HEMMRICH, U.; JELACIC, S.; BRUNDER, W.; TARR, P. I.; DOBRINDT, U.; HACKER, J.; KARCH, H. Identification and characterization of a novel genomic island integrated at selC in locus of enterocyte effacement-negative, shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 6863-6873, 2001.

SCHUBERT, S.; RAKIN, A.; KARCH, A.; CARNIEL, E.; HEESEMANN, J. Prevalence of the high-pathogenicity island of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 480-485, 1998.

SERVIN, A. L. Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 18, p. 264-292, 2005.

SHAMES, S. R.; AUWETER, S. D.; FINLAY, B. B. Co-evolution and exploitation of host cell signaling pathways by bacterial pathogens. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 41, p. 380-389, 2009.

SHAW, R. K.; SMOLLETT, K.; CLEARY, J.; GARMENDIA, J.; STRAATMAN-IWANOWSKA, A.; FRANKEL, G.; KNUTTON, S. Enteropathogenic *Escherichia coli* type III effectors EspG and EspG2 disrupt the microtubule network of intestinal epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 4385-4390, 2005.

SHERE, K. D.; SALLUSTIO, S.; MANESSIS, A.; D'AVERSA, T. G.; GOLDBERG, M. B. Disruption of IcsP, the major *Shigella* protease that cleaves IcsA, accelerates actin-based motility. **Mol. Microbiol.**, v. 25, p. 451-462, 1997.

SILVERMAN, J. M.; BRUNET, Y. R.; CASCALES, E.; MOUGOUS, J. D. Structure and regulation of the type VI secretion system. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 66, p. 453-72, 2012.

SKATTUM, L.; VAN DEUREN, M.; VAN DER POLL, T.; TRUEDSSON, L. Complement deficiency states and associated infections. **Mol. Immunol.**, v. 48, p. 1643-1655, 2011.

STATHOPOULOS, C.; HENDRIXSON, D. R.; THANASSI, D. G.; HULTGREN, S. J.; ST GEME, J. W. III.; CURTISS, R. III. Secretion of virulence determinants by the general secretory pathway in Gram-negative pathogens: an evolving story. **Microbes Infect.**, v. 2, p. 1061-1072, 2000.

STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 17, p. 463-516, 2001.

SUAREZ, G.; SIERRA, J. C.; EROVA, T. E.; SHA, J.; HORNEMAN, A. J.; CHOPRA, A. K. A type VI secretion system effector protein, VgrG1, from *Aeromonas hydrophila* that induces host cell toxicity by ADP ribosylation of actin. **J. Bacteriol.**, v. 192, p. 155-68, 2010.

TADDEI, C. R.; FASANO, A.; FERREIRA, A. J.; TRABULSI, L. R.; MARTINEZ, M. B. Secreted autotransporter toxin produced by a diffusely adhering *Escherichia coli* strain causes intestinal damage in animal model assays. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 250, 263-269, 2005.

TAPADER, R.; CHATTERJEE, S.; SINGH, A. K.; DAYMA, P.; HALDAR, S.; PAL, A.; BASU, S. The high prevalence of serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae (SPATEs) in *Escherichia coli* causing neonatal septicemia. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 33, p. 2015-2024, 2014.

TAPIA-PASTRANA, G.; CHAVEZ-DUEÑAS, L.; LANZ-MENDOZA, H.; TETER, K.; NAVARRO-GARCÍA, F. VirK is a periplasmic protein required for efficient secretion of plasmid-encoded toxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 80, p. 2276-2285, 2012.

THANASSI, D. G.; SAULINO, E. T.; HULTGREN, S. J. The chaperone/Usher pathway: a major terminal branch of the general secretory pathway. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 1, p. 223-231, 1998.

THANASSI, D. G.; HULTGREN, S. J. Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 12, p. 420-430, 2000.

THANASSI, D. G.; STATHOPOULOS, C.; KARKAL, A.; LI, H. Protein secretion in the absence of ATP: the autotransporter, two-partner secretion and chaperone/usher pathways of gram-negative bacteria. **Mol. Membr. Biol.**, v. 22, p. 63-72, 2005.

THAPAR, N.; SANDERSON, I. R. Diarrhoea in children: an interface between developing and developed countries. **Lancet**, v. 363, p. 641-653, 2004.

THRELFALL, E. J.; ROWE, B.; FERGUSON, J. L.; WARD, L. R. Characterization of plasmids conferring resistance to gentamicin and apramycin in strains of *Salmonella typhimurium* phage type 204c isolated in Britain. **J. Hyg.**, 97: 419-426, 1986.

TOBE, T.; HAYASHI, T.; HAN, C. G.; SCHOOLNIH, G. K.; OHTSUBO, E.; SASAKAWA, C. Complete DNA sequence and structural analysis of the enteropathogenic *Escherichia coli* adherence factor plasmid. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 5455-5463, 1999.

TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; GOMES, T. A. T. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, p. 508-513, 2002.

TRAUTNER, B. W.; DAUROWCH, R. O. Role of biofilm in catheter-associated urinary tract infection. **Amer. J. Infect. Control.**, v. 32, p. 177-183, 2004.

TURNER, D. P.; MARIETOU, A. G.; JOHNSTON, L.; HO, K. K.; ROGERS, A. J.; WOOLDRIDGE, K. G.; ALA'ALDEEN, D. A. Characterization of MspA, an immunogenic autotransporter protein that mediates adhesion to epithelial and endothelial cells in *Neisseria meningitidis*. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 2957-2964, 2006.

TURNER, S. M.; SCOTT-TUCKER, A.; COOPER, L. M.; HENDERSON, I. R. Weapons of mass destruction: virulence factors of the global killer enterotoxigenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 263, p. 10–20, 2006.

TZIPORI, S.; MONTANARO, J.; ROBINS-BROWNE, R. M.; VIAL, P.; GIBSON, R.; LEVINE, M. M. Studies with enteroaggregative *Escherichia coli* in the gnotobiotic piglet gastroenteritis model. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 5302-5306, 1992.

ULETT, G. C.; TOTSIKA, M.; SCHAALE, K.; CAREY, A. J.; SWEET M. J.; SCHEMBRI, M. A. Uropathogenic *Escherichia coli* virulence and innate immune responses during urinary tract infection. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 16, p. 100-107, 2013.

UNICEF (United Nations Children's Fund). **Pneumonia and Diarrhoea: Tackling the deadliest diseases for the world's poorest children**. New York: UNICEF, 2012.

VAN ULSEN, P.; ADLER, B.; FASSLER, P.; GILBERT, M.; VAN SCHILFGAARDE, M.; VAN DER LEY, P.; VAN ALPHEN, L.; TOMMASSEN, J. A novel phase variable autotransporter serine protease, AusI, of *Neisseria meningitidis*. **Microbes Infect.**, v. 8, p. 2088-2097, 2006.

VAN ULSEN, P.; VAN ALPHEN, L.; TEN HOVE, J.; FRANSEN, F.; VAN DER LEY, P.; TOMMASSEN, J. A neisserial autotransporter NalP modulating the processing of other autotransporters. **Mol. Microbiol.**, v. 50, p. 1017-1030, 2003.

VASCONCELLOS, F. M. **Estudo do padrão de adesão agregativa de *Escherichia coli* do sorotipo O142:H34**. 2014. 95 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2014.

VIEIRA, M. A. M.; ANDRADE, J. R. C.; TRABULSI, L. R.; ROSA, A. C. P.; DIAS, A. M. G.; RAMOS, S. R. T. S.; FRANKEL, G.; GOMES, T. A. T. Phenotypic and genotypic characteristics of *Escherichia coli* strains of non-enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) serogroups that carry *eae* and lack the EPEC adherence factor and Shiga toxin DNA probe sequences. **J. Infect. Dis.**, v. 183, p. 762-772, 2001.

VILJANEN, M. K.; PELTOLA, T.; JUNNILA, S. Y.; OLKKONEN, L.; JÄRVINEN KUISTILA, H. M.; HUOVINEN, P. Outbreak of diarrhoea due to *Escherichia coli* O111:B4 in school children and adults: association of Vi antigen-like reactivity. **Lancet**, v. 336, p. 831-834, 1990.

VOULHOX, R.; BALL, G.; IZE, B.; VASIL, M. L.; LAZDUNSKI, A.; WU, L. F.; FILLOUX, A. Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. **Eur. Mol. Biol. Organ. J.**, v. 20, p. 6735-6741, 2001.

WALPORT, M. J. Complement. First of two parts. **N. Engl. J. Med.**, v. 344, p. 1058-1066, 2001.

WALTHER, D. M.; RAPAPORT, D.; TOMMASSEN, J. Biogenesis of beta barrel membrane proteins in bacteria and eukaryotes: evolutionary conservation and divergence. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 66, p. 2789–2804, 2009.

WANG, L.; ROTHEMUND, D.; CURD, H.; REEVES, P. R. Species-wide variation in the *Escherichia coli* flagellin (H-antigen) gene. **J. Bacteriol.**, v. 185, p. 2936–2943, 2003.

WANKE, C. A.; SCHORLING, J. B.; BARRETT, L. J.; DESOUZA, M. A.; GUERRANT, R. L. Potential role of adherence traits of *Escherichia coli* in persistent diarrhea in an urban Brazilian slum. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 10, p. 746-751, 1991.

WATERS, V. L. Conjugation between bacterial and mammalian cells. **Nature Genet.**, v. 29, p. 375-376, 2001.

WEI, J.; GOLDBERG, M. B.; BURLAND, V.; VENKATESAN, M. M.; DENG, W.; FOURNIER, G.; MAYHEW, G. F.; PLUNKETT, G. 3RD.; ROSE, D. J.; DARLING A.; MAU, B.; PERNA, N. T.; PAYNE, S. M.; RUNYEN-JANECKY, L. J.; ZHOU, S.; SCHWARTZ, D. C.; BLATTNER, F. R. Complete genome sequence and comparative genomics of *Shigella flexneri* serotype 2a strain 2457T. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 2775-2786, 2003.

WELCH, R. A.; DELLINGER, P.; MINSHEW, B.; FALKOW, S. Haemolysin contributes to virulence of extra-intestinal *E. coli* infections. **Nature**, v. 294, p. 665-667, 1981.

WELLS, T. J.; SHERLOCK, O.; RIVAS, L.; MAHAJAN, A.; BEATSON, S. A.; TORPDAHL, M.; WEBB, R. I.; ALLSOPP, L. P.; GOBIUS, K. S.; GALLY, D. L.; SCHEMBRI, M. A. Eha is a novel autotransporter protein of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 that contributes to adhesion and biofilm formation. **Environ. Microbiol.**, vol. 10, p. 589–604, 2008.

WERNER, J.; MISRA, R. YaeT (Omp85) affects the assembly of lipid-dependent and lipid-independent outer membrane proteins of *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 57, p. 1450-1459, 2005.

WILSON I, VOGEL J, SOMERVILLE S. Signalling pathways: a common theme in plants and animals? **Curr. Biol.**, v. 7, p. 175-178, 1997.

WILSON, R. K.; SHAW, R. K.; DANIELL, S.; KNUTTON, S.; FRANKEL, G. Role of EscF, a putative needle complex protein, in the type III protein translocation system of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Cell Microbiol.**, v. 3, p. 753-762, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Improving diarrhoea estimates. Child and adolescent health and development.** Geneva: World Health Organization, 2002.

YAMAMOTO, D.; HERNANDES, R. T.; BLANCO, M.; GREUNE, L.; SCHMIDT, M. A.; CARNEIRO, S. M.; DAHBI, G.; BLANCO, J. E.; MORA, A.; BLANCO, J.; GOMES, T. A. Invasiveness as a putative additional virulence mechanism of some atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* strains with different uncommon intimin types. **BMC Microbiol.**, v. 9: 146, 2009.

YAMAMOTO, T.; WAKISAKA, N.; SATO, F.; KATO, A. Comparison of the nucleotide sequence of enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 genes among diarrhea-associated *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 147, p. 89-95, 1997.

YATSUYANAGI, J.; SAITO, S.; MIYAJIMA, Y.; AMANO, K. I.; ENOMOTO, K. Characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains harboring the *astA* gene that were associated with a waterborne outbreak of diarrhea in Japan. **J. Clin. Microbiol.**, p. 41, v. 2033-2039, 2003.

YEN, M. R.; PEABODY, C. R.; PARTOVI, S. M.; ZHAI, Y.; TSENG, Y. H.; SAIER, D M. H. Protein-translocating outer membrane porins of Gram-negative bacteria. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1562, p. 6-31, 2002.

YOSHIDA, T.; FURUYA, N.; ISHIKURA, M.; ISOBE, T.; HAINO-FUKUSHIMA, K.; OGAWA, T.; KOMANO, T. Purification and characterization of thin pili of Inc11 plasmids Collb-P9 and R64: formation of PilV-specific cell aggregates by type IV pili. **J. Bacteriol.**, v. 180, p. 2842-2848, 1998.

YOUNG, J.; HOLLAND, I. B. ABC transporters: bacterial exporters-revisited five years on. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1461, p. 177-200, 1999.

ZOUED, A.; BRUNET, Y. R.; DURAND, E.; ASCHTGEN, M. S.; LOGGER, L.; DOUZI, B.; JOURNET, L.; CAMBILLAU, C.; CASCALES, E. Architecture and assembly of the Type VI secretion system. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1843, p. 1664-1673, 2014.

ZIPFEL, P. F, SKERKA, C. Complement regulators and inhibitory proteins. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 9, p. 729-740, 2009.

ZIPFEL, P. F.; HALLSTRÖM, T.; RIESBECK, K. Human complement control and complement evasion by pathogenic microbes-tipping the balance. **Mol. Immunol.**, v. 56, p. 152-160, 2013.

ANEXOS

Autotransporter Protein-Encoding Genes of Diarrheagenic *Escherichia coli* Are Found in both Typical and Atypical Enteropathogenic *E. coli* Strains

Afonso G. Abreu,^a Vanessa Bueris,^{a,b} Tatiane M. Porangaba,^a Marcelo P. Sircili,^{a,b} Fernando Navarro-Garcia,^c Waldir P. Elias^a

Laboratory of Bacteriology, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil^a; Laboratory of Genetics, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil^b; Department of Cell Biology, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV), Mexico DF, Mexico^c

Autotransporter (AT) protein-encoding genes of diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC) pathotypes (*cah*, *eatA*, *ehaABCDJ*, *espC*, *espI*, *espP*, *pet*, *pic*, *sat*, and *tibA*) were detected in typical and atypical enteropathogenic *E. coli* (EPEC) in frequencies between 0.8% and 39.3%. Although these ATs have been described in particular DEC pathotypes, their presence in EPEC indicates that they should not be considered specific virulence markers.

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) was the first pathotype of diarrheagenic *E. coli* (DEC) described (1). In 1995, EPEC strains were classified into typical (tEPEC) and atypical (aEPEC) groups on the basis of the presence and absence of the EPEC adherence factor plasmid (pEAF), respectively (2). Later, additional differential characteristics of the members of these groups, such as serotypes, virulence characteristics, adherence patterns, and reservoir, were reported (3, 4). However, the two groups have in common the central mechanism of EPEC pathogenesis: an intestinal histopathological lesion called attaching and effacing, whose genetic determinants are located on the locus of enterocyte effacement (LEE) (5).

In the past, tEPEC strains were more common in developing countries, where they have been found to be strongly associated with acute diarrhea in children <1 year of age, while aEPEC strains were more frequently isolated from children of industrialized countries (4). Recent epidemiological studies have demonstrated that aEPEC is more prevalent than tEPEC in both developing and industrialized countries, where strains have been found in association with endemic diarrhea in children and diarrhea outbreaks (3, 6).

In general, tEPEC strains are more homogeneous than aEPEC strains in their virulence traits. tEPEC strains mainly produce the virulence factors encoded by LEE and pEAF, while aEPEC strains frequently express non-LEE-encoded effectors and carry genes encoding virulence factors of other DEC pathotypes, in addition to the LEE-encoded factors (3, 4).

Indeed, phylogenetic studies have indicated that aEPEC strains have a genomic background with characteristics that allow the acquisition, retention, and expression of genes encoding virulence factors of other DEC pathotypes (7, 8).

In the past decade, several autotransporter (AT) proteins have been described. Members of this family of proteins have been identified in *E. coli* and other Gram-negative bacteria and are often associated with virulence functions such as adherence, aggregation, invasion, biofilm formation, and toxicity (9–11). The ATs are secreted by the type V secretion system, the most widespread secretion pathway for the transportation of molecules across the outer membrane of Gram-negative bacteria, including the AT pathway (also known as AT-1 or type Va), the two-partner secretion pathway (also known as type Vb), and the Oca system, also

known as AT-2, type Vc, or trimeric AT adhesion (10). AT proteins possess an overall unifying structure comprising three functional domains: the amino-terminal leader sequence, which initiates transport of the precursor across the inner membrane; the passenger domain, which confers the function of the secreted protein; and a carboxy-terminal (β) domain, which forms a β -barrel pore to allow secretion of the passenger protein through the outer membrane (12).

Thus, the aim of this study was to evaluate the presence of genes encoding AT virulence proteins produced by DEC pathotypes among tEPEC and aEPEC strains.

The 117 EPEC strains selected for this study were characterized in previous studies (4, 13–15). The 72 aEPEC strains of several serotypes were isolated during an epidemiological study of the etiology of acute diarrhea in the city of Salvador (State of Bahia, Brazil), between 2003 and 2004 (14). The 45 tEPEC strains belonging to the 12 classic EPEC O serogroups (4) were isolated from sporadic cases of acute diarrhea in Brazil and other countries, during different time periods (4, 15).

PCR was used to detect the presence of 17 genes encoding autotransporter proteins: *aida-I*, *cah*, *eatA*, *ehaABCDJ*, *epeA*, *espC*, *espI*, *espP*, *pet*, *pic*, *sab*, *sat*, and *tibA*. The specific primers, cycle conditions, sizes of amplified fragments, and controls are described in Table 1. Amplification was performed in a total volume of 50 μ l containing 40 pmol of each primer; dATP, dTTP, dCTP, and dGTP (0.1 mM each); 1.5 U *Taq* DNA polymerase (Invitrogen); 5.0 μ l 10 $\times$ PCR buffer (Invitrogen); MgCl₂ (2 mM); and 2.0 μ l of DNA template, obtained from a colony from culture on Luria-Bertani agar boiled in 500 μ l of water for 10 min. Statistical analyses were performed using Fisher's exact and χ^2 tests.

The frequencies of AT genes in EPEC and their distribution among the tEPEC and aEPEC groups are shown in Table 2. With the exception of *aida-I*, *epeA*, and *sab*, all of the genes investigated

Received 28 August 2012 Accepted 23 October 2012

Published ahead of print 26 October 2012

Address correspondence to Waldir P. Elias, wpelias@butantan.gov.br.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AEM.02635-12

TABLE 1 Primers used for PCR, size of amplified products, annealing temperatures, origin, and description of target genes^a

Gene	Description of target (DEC pathotype)	Known function (reference)	Primer sequence (5'–3')	Size of PCR product (bp)	Annealing temp (°C)	Primer source or reference
<i>aida-I</i>	Adhesin involved in diffuse adherence (DAEC)	Adherence and biofilm formation (25)	GTTCTCTCTGATGGTTATGC AACATTGACCATAACGCCG	342	60	This study (GenBank accession no. GU810159.1)
<i>cah</i>	Calcium-binding antigen 43 homologue (EHEC)	Biofilm formation and autoaggregation (26)	CGTATCGCTGTGCCGATAAC CCGTATACGAGTTGTCAGAATCA	707	58	27
<i>eatA</i>	EPEC autotransporter A (EPEC)	Serine protease (28)	CAGGAGTGGGAACATTAAGTCA CGTACGCCTTTGATTTCAGGAT	743	60	27
<i>ehaA</i>	EHEC autotransporter A (EHEC)	Biofilm formation (11)	CACAGATGACAGAAGGGAC GTTTACCCCACTCGTCAG	326	59	This study (GenBank accession no. AE005174.2)
<i>ehaB</i>	EHEC autotransporter B (EHEC)	Biofilm formation (11)	CAG GGTATGAGTGGGAAG CCACTTGCTGCCGTTGTT	423	59	This study (GenBank accession no. AE005174.2)
<i>ehaC</i>	EHEC autotransporter C (EHEC)	Unknown (11)	TAATGACGGCAAAGGTGGT CATTTCATCAGGGAGTTGCT	599	59	This study (GenBank accession no. AE005174.2)
<i>ehaD</i>	EHEC autotransporter D (EHEC)	Biofilm formation (11)	GGCAGTTGACACGATTATTA CTGTCGCTTTGCCATTATC	821	59	This study (GenBank accession no. AE005174.2)
<i>ehaJ</i>	EHEC autotransporter J (EHEC/EPEC)	Biofilm formation (9)	ACGGGCTGCTGAGTATTTT GTAGTTTGCCACATCACCG	455	60	This study (GenBank accession no. NC_011601.1)
<i>epeA</i>	EHEC plasmid-encoded autotransporter (EHEC)	Protease and mucinolytic activity (29)	GGGAGAGTTCAGGCATTTA CAGCGTTACCTTACTTGAG	783	57	This study (GenBank accession no. AY258503.2)
<i>espC</i>	<i>E. coli</i> secreted protein C (EPEC)	Enterotoxin activity and cleavage of spectrin, pepsin, and factor V (30)	TAGTGCAGTGCAGAAAGCAGTT AGTTTTCTGTTGCTGTATGCC	301	55	27
<i>espI</i>	<i>E. coli</i> secreted protease (EHEC)	Degradation of plasma proteins (19)	ATGGACAGAGTGGAGACAG GCCACCTTTATTCTCACCA	560	52	19
<i>espP</i>	Extracellular serine protease (EHEC)	Cleavage of spectrin, pepsin, and factor V (31)	GTCCATGCAGGGACATGCCA TCACATCAGCACCGTTCTCTAT	547	55	27
<i>pet</i>	Plasmid-encoded toxin (EAEC)	Enterotoxin and cytopathic toxin effects and cleavage of spectrin (32)	GGCAGAGAATAAAGGGGTGTTT CCTCTTGTTCCACGACATAC	302	58	27
<i>pic</i>	Protein involved in colonization (EAEC)	Mucinase activity and cleavage of factor V (33)	GGGTATTGTCCGTTCCGAT ACAACGATACCGTCTCCCG	1,176	60	33
<i>sab</i>	STEC autotransporter (EHEC)	Biofilm formation (34)	GGTGGATACAGCAGGTAATG TATCTCACCACTGCTATCG	163	59	34
<i>sat</i>	Secreted autotransporter toxin (DAEC)	Cytopathic toxin effects and cleavage of spectrin and factor V (35)	TCAGAAGCTCAGCGAATCATTG CCATTATCACCAAGTAAACGCACC	930	59	17
<i>tibA</i>	Tib A (EPEC)	Biofilm formation, adherence, and autoaggregation (36)	ATGGTTGGCAGTGACGGTA GGTTGTTGACGGACGGAAA	480	58	This study (GenBank accession no. FN649414.1)

^a EPEC, enteropathogenic *E. coli*; ETEC, enterotoxigenic *E. coli*; STEC, Shiga toxin-producing *E. coli*; EHEC, enterohemorrhagic *E. coli*; EAEC, enteroaggregative *E. coli*; DAEC, diffusely adherent *E. coli*. Positive controls: *cah*, *ehaABCD*, and *espP*, EHEC EDL933 (26); *eatA* and *tibA*, ETEC H10407 (28); *pet* and *pic*, EAEC 042 (32); *ehaJ* and *espC*, EPEC E2348/69 (30); *epeA* and *sab*, EHEC EH41 (29); *aida-I*, DAEC 2787 (25); *sat*, DAEC FBC114 (37); *espI*, STEC O113:H21 (38).

TABLE 2 Distribution of autotransporter virulence genes among typical and atypical EPEC strains

Gene	No. (%) of positive strains		
	tEPEC (<i>n</i> = 45)	aEPEC (<i>n</i> = 72)	Total (<i>n</i> = 117)
<i>aida-I</i>	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
<i>cah</i>	0 (0.0)	3 (4.2)	3 (2.6)
<i>eatA</i>	4 (8.8)	3 (4.2)	7 (6.0)
<i>ehaA</i>	13 (28.9)	33 (45.8)	46 (39.3)
<i>ehaB</i>	22 (48.9)	24 (33.3)	46 (39.3)
<i>ehaC</i>	7 (15.5)	32 (44.4) ^a	39 (33.3)
<i>ehaD</i>	12 (26.7)	31 (43.1)	43 (36.7)
<i>ehaJ</i>	13 (28.9) ^a	3 (4.2)	16 (13.7)
<i>epeA</i>	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
<i>espC</i>	22 (48.8)	21 (29.2)	43 (36.7)
<i>espI</i>	0 (0.0)	5 (6.9)	5 (4.3)
<i>espP</i>	0 (0.0)	3 (4.2)	3 (2.6)
<i>pet</i>	8 (17.8) ^a	4 (5.6)	12 (10.3)
<i>pic</i>	0 (0.0)	1 (1.4)	1 (0.8)
<i>sab</i>	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
<i>sat</i>	2 (4.4)	0 (0.0)	2 (1.7)
<i>tibA</i>	1 (2.2)	0 (0.0)	1 (0.8)

^a *P* < 0.05 by Fisher's exact test (tEPEC versus aEPEC).

were detected. The five most frequent genes were *ehaABCD* and *espC*, found in both groups of EPEC. The other investigated genes were detected at low frequencies: *ehaJ*, *eatA*, and *pet* were detected in both groups; *cah*, *espI*, *espP*, and *pic* were detected only in the aEPEC group; and *sat* and *tibA* were detected only in the tEPEC group. On the basis of their comparative frequencies in the tEPEC and aEPEC groups, *ehaJ* and *pet* were statistically associated with the typical EPEC group and *ehaC* with the atypical EPEC group (Table 2).

A few previous studies have investigated the presence of AT genes in EPEC, but none of them searched for all sequences as in the present work or used a bigger strain collection. *ehaDJ*, *espC*, *espP*, *espI*, *pet*, and *pic* have been previously detected at frequencies similar to those detected in our collection (9, 16–19). On the other hand, Easton et al. (9) found higher frequencies of *ehaABC* than in our study when they examined the prevalence of these genes (100% for *ehaAB* and 86% for *ehaC*) in a collection of 21 EPEC strains isolated in Australia.

We further evaluated the distribution of the AT genes in tEPEC, classifying the strains into two groups: EPEC 1, possessing flagellar antigens H6 or H34, and EPEC 2, possessing flagellar antigen H2 (4, 20). The majority of the AT genes detected were found in strains belonging to group 1. Genes *ehaB*, *ehaJ*, *espC*, and *pet* were statistically associated with EPEC 1 and genes *eatA* and *ehaA* with EPEC 2 (Table 3).

Thus, we conclude that the majority of the AT virulence genes studied here, originally described as corresponding to specific pathotypes of DEC, are also present in EPEC. However, analysis of our data should take into consideration that we have not evaluated a very large number of strains.

The detection of these genes, particularly in the aEPEC subgroup, is in accordance with a study showing that aEPEC strains belonging to particular phylogenetic clusters have genetic similarity to enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), diffusely adherent *E. coli* (DAEC), or enteroaggregative *E. coli* (EAEC) (8).

The AT proteins encoded by the genes found in our study have

TABLE 3 Distribution of DEC autotransporter virulence genes among the typical EPEC groups

Gene	No. (%) of positive strains	
	EPEC 1 ^a (<i>n</i> = 26)	EPEC 2 ^b (<i>n</i> = 19)
<i>eatA</i>	0 (0.0)	4 (21.0) ^c
<i>ehaA</i>	1 (3.8)	12 (63.2) ^c
<i>ehaB</i>	18 (69.2) ^c	4 (21.0)
<i>ehaC</i>	5 (19.2)	2 (10.5)
<i>ehaD</i>	6 (23.1)	6 (31.6)
<i>ehaJ</i>	12 (46.1) ^c	1 (5.3)
<i>espC</i>	18 (69.2) ^c	4 (21.0)
<i>pet</i>	8 (30.8) ^c	0 (0.0)
<i>sat</i>	0 (0.0)	2 (10.5)
<i>tibA</i>	0 (0.0)	1 (5.3)

^a Serotypes: O55:H6, O86:H34, O119:H6, O127:H6, O142:H6, and O142:H34.

^b Serotypes: O111:H2, O114:H2, O119:H2, O126:H2, and O128:H2.

^c *P* < 0.05 by Fisher's exact test (EPEC 1 versus EPEC 2).

several distinct functions, such as enterotoxicity, cytotoxicity, adherence, invasion, biofilm formation, and protease and mucinase activities (9–11). The role of these proteins in EPEC pathogenesis is unclear. Additional factors involved in adherence (such as *cah* and *tibA*) may compensate for the lack of bundle-forming pili (BFP) in early stages of intestinal colonization in aEPEC (21, 22). Other studies have shown the presence of adherence factors, other than EspA, in aEPEC (21, 23, 24), but none of them are ATs. Also, genes encoding proteins involved in biofilm formation (such as *cah*, *ehaABCDJ*, *sab*, and *tibA*) might be important in the persistence of both EPEC groups in the intestine.

It is worthwhile to mention the presence of *espC*, *espP*, and *pet*, cytotoxin-encoding genes of EPEC, EHEC, and EAEC, respectively, and *pic*, encoding a mucinase of EAEC involved in colonization (10). Expression of Pet and Pic was detected in all aEPEC strains bearing their respective encoding genes in this study (data not shown). The role of these toxins in aEPEC pathogenesis is currently under study by our group. In summary, our data show that several AT protein-encoding genes are present in EPEC. Consequently, they should not be considered markers for any specific DEC pathotype.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) grants to W.P.E. and a fellowship to A.G.A.

REFERENCES

- Neter E, Westphal O, Luderitz O, Gino RM, Gorzynski EA. 1955. Demonstration of antibodies against enteropathogenic *Escherichia coli* in sera of children of various ages. *Pediatrics* 16:801–808.
- Kaper JB. 1996. Defining EPEC. *Rev. Microbiol.* 27:130–133.
- Hernandes RT, Elias WP, Vieira MAM, Gomes TAT. 2009. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 297:137–149.
- Trabulsi LR, Keller R, Gomes TAT. 2002. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.* 8:508–513.
- Clements A, Young JC, Constantinou N, Frankel G. 2012. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes* 3:71–87.
- Ochoa TJ, Contreras CA. 2011. Enteropathogenic *Escherichia coli* infection in children. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 24:478–483.
- Afset JE, Anderssen E, Bruant G, Harel J, Wieler L, Bergh K. 2008. Phylogenetic backgrounds and virulence profiles of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains from a case-control study using multilocus sequence typing and DNA microarray analysis. *J. Clin. Microbiol.* 46:2280–2290.

8. Bando SY, Andrade FB, Guth BEC, Elias WP, Moreira-Filho CA, Pestana de Castro AF. 2009. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* genomic background allows the acquisition of non-EPEC virulence factors. *FEMS Microbiol. Lett.* 299:22–30.
9. Easton DM, Totsika M, Allsopp LP, Phan MD, Idris A, Worpel DJ, Sherlock O, Zhang B, Venturini C, Beatson SA, Mahony TJ, Cobbold RN, Schembri MA. 2011. Characterization of EhaJ, a new autotransporter protein from enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.* 2:120. doi:10.3389/fmicb.2011.00120.
10. Henderson IR, Navarro-Garcia F, Desvaux M, Fernandez RC, Ala'Aldeen D. 2004. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68:692–744.
11. Wells TJ, Sherlock O, Rivas L, Mahajan A, Beatson SA, Torpdahl M, Webb RI, Allsopp LP, Venturini C, Gally DL, Schembri MA. 2008. Eha is a novel autotransporter protein of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 that contributes to adhesion and biofilm formation. *Environ. Microbiol.* 10:589–604.
12. Benz I, Schmidt MA. 2011. Structures and functions of autotransporter proteins in microbial pathogens. *Int. J. Med. Microbiol.* 301:461–468.
13. Abe CM, Trabulsi LR, Blanco J, Blanco M, Dahbi G, Blanco JE, Mora A, Franzolin MR, Taddei CR, Martinez MB, Piazza RMF, Elias WP. 2009. Virulence features of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* identified by the *eae*⁺ EAF-negative *stx*[−] genetic profile. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 64:357–365.
14. Bueris V, Sircili MP, Taddei CR, dos Santos MF, Franzolin MR, Martinez MB, Ferrer SR, Barreto ML, Trabulsi LR. 2007. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102:839–844.
15. Mairena EC, Neves BC, Trabulsi LR, Elias WP. 2004. Detection of LEE 4 region-encoded genes from different enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotypes. *Curr. Microbiol.* 48:412–418.
16. Afset JE, Bruant G, Brousseau R, Harel J, Anderssen E, Bevanger L, Bergh K. 2006. Identification of virulence genes linked with diarrhea due to atypical enteropathogenic *Escherichia coli* by DNA microarray and PCR. *J. Clin. Microbiol.* 44:3703–3711.
17. Boisen N, Ruiz-Perez F, Scheut F, Krogfelt KA, Nataro JP. 2009. Short report: high prevalence of serine protease autotransporter cytotoxins among strains of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 80:294–301.
18. Gomes TAT, Irino K, Girão DM, Girão VBC, Guth BEC, Vaz TMI, Moreira FC, Chinarelli SH, Vieira MAM. 2004. Emerging enteropathogenic *Escherichia coli* strains? *Emerg. Infect. Dis.* 10:1851–1855.
19. Schmidt H, Zhang WL, Hemmrich U, Jelacic S, Brunder W, Tarr PI, Dobrindt U, Hacker J, Karch H. 2001. Identification and characterization of a novel genomic island integrated at *selC* in locus of enterocyte effacement-negative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 69:6863–6873.
20. Whittam TS, McGraw EA. 1996. Clonal analysis of EPEC serogroups. *Rev. Microbiol.* 27:7–16.
21. Hernandez RT, Velsko I, Sampaio SCF, Elias WP, Robins-Browne RM, Gomes TAT, Girón JA. 2011. Fimbrial adhesins produced by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:8391–8399.
22. Moreira CG, Palmer K, Whiteley M, Sircili MP, Trabulsi LR, Castro AFP, Sperandio V. 2006. Bundle-forming pili and EspA are involved in biofilm formation by enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 188:3952–3961.
23. Gomes TAT, Hernandez RT, Torres AG, Salvador FA, Guth BEC, Vaz TMI, Irino K, Silva RM, Vieira MAM. 2011. Adhesin-encoding genes from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* are more prevalent in atypical than in typical enteropathogenic *E. coli*. *J. Clin. Microbiol.* 49:3334–3337.
24. Scaletsky ICA, Aranda KRS, Souza TB, Silva NP. 2010. Adherence factors in atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains expressing the localized-like pattern in HEP-2 cells. *J. Clin. Microbiol.* 48:302–306.
25. Suhr M, Benz I, Schmidt MA. 1996. Processing of the AIDA-I precursor: removal of AIDA and evidence for the outer membrane anchoring as a beta-barrel structure. *Mol. Microbiol.* 22:31–42.
26. Torres AG, Perna NT, Burland V, Ruknudin A, Blattner FR, Kaper JB. 2002. Characterization of Cah, a calcium-binding and heat-extractable autotransporter protein of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 45:951–966.
27. Restieri C, Garriss G, Locas MC, Dozois CM. 2007. Autotransporter encoding sequences are phylogenetically distributed among *Escherichia coli* clinical isolates and reference strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:1553–1562.
28. Patel SK, Dotson J, Allen KP, Fleckenstein JM. 2004. Identification and molecular characterization of EatA, an autotransporter protein of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 72:1786–1794.
29. Leyton DL, Sloan J, Hill RE, Doughty S, Hartland EL. 2003. Transfer region of pO113 from enterohemorrhagic *Escherichia coli*: similarity with R64 and identification of a novel plasmid-encoded autotransporter, EpeA. *Infect. Immun.* 71:6307–6319.
30. Mellies JL, Navarro-Garcia F, Okeke I, Frederickson J, Nataro JP, Kaper JB. 2001. *espC* pathogenicity island of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes an enterotoxin. *Infect. Immun.* 69:315–324.
31. Brunder W, Schmidt H, Karch H. 1997. EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. *Mol. Microbiol.* 24:767–778.
32. Eslava C, Navarro-Garcia F, Czeizulin JR, Henderson IR, Cravioto A, Nataro JP. 1998. Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 66:3155–3163.
33. Henderson IR, Czeizulin J, Eslava C, Noriega F, Nataro JP. 1999. Characterization of Pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 67:5587–5596.
34. Herold S, Paton JC, Paton AW. 2009. Sab, a novel autotransporter of locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* O113:H21, contributes to adherence and biofilm formation. *Infect. Immun.* 77:3234–3243.
35. Guyer DM, Henderson IR, Nataro JP, Mobley HL. 2000. Identification of Sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 38:53–66.
36. Elsinghorst EA, Weitz JA. 1994. Epithelial cell invasion and adherence directed by the enterotoxigenic *Escherichia coli* *tib* locus is associated with a 104-kilodalton outer membrane protein. *Infect. Immun.* 62:3463–3471.
37. Taddei CR, Moreno AC, Fernandes Filho A, Montemor LP, Martinez MB. 2003. Prevalence of secreted autotransporter toxin gene among diffusely adhering *Escherichia coli* isolated from stools of children. *FEMS Microbiol. Lett.* 227:249–253.
38. dos Santos LF, Irino K, Vaz TMI, Guth BEC. 2010. Set of virulence genes and genetic relatedness of O113:H21 *Escherichia coli* strains isolated from the animal reservoir and human infections in Brazil. *J. Med. Microbiol.* 59:634–640.

The Serine Protease Pic From Enteroaggregative *Escherichia coli* Mediates Immune Evasion by the Direct Cleavage of Complement Proteins

Afonso G. Abreu,¹ Tatiana R. Fraga,² Adriana P. G. Martínez,² Marcia Y. Kondo,³ Maria A. Juliano,³ Luiz Juliano,³ Fernando Navarro-García,⁴ Lourdes Isaac,² Angela S. Barbosa,¹ and Waldir P. Elias¹

¹Laboratory of Bacteriology, Butantan Institute, ²Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, and ³Department of Biophysics, Federal University of São Paulo, Brazil; and ⁴Department of Cell Biology, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), Mexico City, Mexico

Enteroaggregative and uropathogenic *Escherichia coli*, *Shigella flexneri* 2a, and the hybrid enteroaggregative/Shiga toxin-producing *E. coli* strain (O104:H4) are important pathogens responsible for intestinal and urinary tract infections, as well as sepsis and hemolytic uremic syndrome. They have in common the production of a serine protease called Pic. Several biological roles for Pic have been described, including protection of *E. coli* DH5 α from complement-mediated killing. Hereby we showed that Pic significantly reduces complement activation by all 3 pathways. Pic cleaves purified C3/C3b and other proteins from the classic and lectin pathways, such as C4 and C2. Cleavage fragments of C3, C4, and C2 were also observed with HB101(pPic1) culture supernatants, and C3 cleavage sites were mapped by fluorescence resonance energy transfer peptides. Experiments using human serum as a source of complement proteins confirmed Pic proteolytic activity on these proteins. Furthermore, Pic works synergistically with the human complement regulators factor I and factor H, promoting inactivation of C3b. In the presence of both regulators, further degradation of C3 α' chain was observed. Therefore, Pic may contribute to immune evasion of *E. coli* and *S. flexneri*, favoring invasiveness and increasing the severity of the disorders caused by these pathogens.

Keywords. pic; *Escherichia coli*; immune evasion; complement system.

Serine proteases are enzymes whose active sites contain the catalytic triad Ser/His/Asp, in which the serine residue contributes with the nucleophilic hydroxyl group [1]. These enzymes are involved in several cellular and extracellular processes in living cells [2]. In gram-negative bacteria, some of these proteases are secreted through the type V secretion system, also known as the autotransporter pathway [3, 4]. The serine protease autotransporters of the Enterobacteriaceae (SPATE)

represent a family of large and multidomain autotransporters, divided into 2 classes: class 1, including those with cytotoxic activity, and class 2, including the lectin-like immunomodulators [5–8].

One member of the class 2 SPATE is the protein involved in colonization (Pic) [3], produced by enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC), uropathogenic *E. coli* (UPEC), and *Shigella flexneri* 2a [9–13]. In addition, the hybrid EAEC/Shiga toxin-producing *E. coli* strain O104:H4, which was responsible for the large outbreak of bloody diarrhea associated with hemolytic-uremic syndrome reported in Europe in 2011, also produces Pic [14, 15]. EAEC is recognized as an agent of acute and persistent diarrheal illness, affecting both children and adults [16], and UPEC is the primary cause of lower and upper urinary tract infections, which in some cases may lead to bacteremia and sepsis [17, 18]. In recent years, EAEC was also implicated as a causative agent of urinary tract infections [19, 20], including a case

Received 15 July 2014; accepted 22 December 2014.

Presented in part: 25th International Complement Workshop, Rio de Janeiro, Brazil, 14–18 September 2014. Abstract 158.

Correspondence: Angela S. Barbosa, Laboratory of Bacteriology, Instituto Butantan, Av Vital Brazil 1500, São Paulo, SP 05503-900, Brazil (angela.barbosa@butantan.gov.br).

The Journal of Infectious Diseases®

© The Author 2015. Published by Oxford University Press on behalf of the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com.

DOI: 10.1093/infdis/jiv013

55 followed by bacteremia and sepsis [21]. *S. flexneri* is a highly in-
vasive pathogen that uses the intracellular milieu of intestinal
epithelial cells as its replicative niche, causing bacillary dysen-
tery or shigellosis [22]; it may also cause bacteremia and sepsis
as unusual complications of dysentery in immunodeficient pa-
tients or children [23,24], with a few reported cases occurring in
60 immunocompetent adults [25,26].

These pathogens, albeit using distinct mechanisms of patho-
genesis, have in common the production of the autotransporter
Pic, which is well conserved among them [27]. Several biological
roles for Pic were described, including species-specific hemag-
glutination, mucinolytic activity, degradation of coagulation
65 factor V, and cleavage of surface glycoproteins involved in leu-
kocyte trafficking, migration, and inflammation [7,10,11,13,
28]. It has also been shown that Pic promotes intestinal coloni-
zation of mice and rabbits, causing mucus hypersecretion and
an increase in the number of mucus-producing goblet cells
70 [12,15,29]. Furthermore, Pic can protect *E. coli* DH5 α from
complement-mediated killing [10]. Based on these data, it is
very likely that Pic degrades components of the complement
system. However, the exact mechanism of serum resistance me-
diated by Pic remains unclear.

The complement system is an important component of both
innate and acquired immunity. This system can be activated by
the alternative, the classic and the lectin pathways. All of them
converge to a common terminal pathway which leads to the for-
80 mation of the membrane attack complex (C5b-9_n), causing cy-
tolysis. Moreover, complement activation also generates a wide
variety of effector molecules that play important roles in elim-
ination of pathogens, such as opsonization, recruitment
of inflammatory cells, release of inflammatory mediators,
85 proliferation of B lymphocytes, and increase of antibody
production [30].

Pic-producing pathogens can disrupt the epithelial barrier,
causing bacterial persistence, invasion, and migration into the
urinary tract, and some have the ability to eventually reach
the bloodstream and fully disseminate in the host, causing bac-
90 teremia and sepsis, which may reflect the low efficacy of com-
plement against them. Because Pic protects *E. coli* DH5 α from
complement-mediated killing and is an important serine prote-
ase by its ability to degrade several biological substrates, we
wondered whether this SPATE could also target key comple-
95 ment molecules.

MATERIALS AND METHODS

Proteins, Antibodies and Serum Samples

100 Complement proteins purified from human plasma (C1q, C2,
C3, C3b, C4, C4b, C5, and factor H (FH)), goat polyclonal anti-
bodies against them, and normal human serum (NHS) were
purchased from Complement Technology. Anti-goat immuno-
globulin G conjugated with peroxidase was purchased from

KPL, and anti-Pic polyclonal antibody was produced as de-
scribed elsewhere [28].

105

Bacterial Strains

The EAEC strain 042 (serotype O44:H18), isolated from a child
with diarrhea in Peru, was employed as the prototype Pic pro-
ducer [10,31]. HB101 *E. coli* B/K12 hybrid was used as a
negative control for Pic production [32]. A minimal clone ex-
pressing Pic [HB101(pPic1)] was also employed in some exper-
iments. HB101(pPic1) contains the Pic coding region cloned in
pACYC184 and secretes Pic in culture supernatants [10].

110

Culture Supernatants and Pic Production

Culture supernatant fractions of *E. coli* HB101 and HB101
(pPic1) were obtained as follows. Strains were grown overnight
at 37°C in 100 mL of Luria-Bertani broth. After centrifugation
at 12 000 g for 10 minutes, supernatants were concentrated 100-
fold with an Ultrafree centrifugal filter device with a 100-kDa
cutoff (Millipore). Pic protein was purified as described else-
where and analyzed by immunoblotting using polyclonal spe-
cific antibodies [12,33].

115

Q5

Inhibition of Complement Pathways

The ability of Pic to inhibit the classic and lectin pathways was
evaluated as described elsewhere [34,35]. To evaluate the inhib-
itory effects of Pic, different dilutions of NHS were preincubated
with Pic (1 μ g), bovine serum albumin (1 μ g), or phosphate-
buffered saline (PBS) for 1 hour at 37°C before complement ac-
tivity was evaluated. Complement activation was measured by
deposition of C4b with anti-C4 polyclonal antibodies, followed
by peroxidase-conjugated anti-goat immunoglobulin G. Sub-
strate reaction was performed with o-phenylenediamine dihy-
drochloride, and absorbance was measured at a wavelength of
130 492 nm. Heat-inactivated NHS was used as a control. The abil-
ity of Pic to inhibit the alternative pathway was evaluated by cal-
culating the hemolytic AP50 units per milliliter for untreated
NHS compared with bovine serum albumin- or Pic-treated
NHS, using rabbit erythrocytes [36].

125

Q6

Q7

Proteolytic Activity Assays

E. coli HB101 and HB101(pPic1) culture supernatants (0.5 μ g
of total secreted proteins) or purified Pic (0.1, 0.5, and 1.0 μ g)
were incubated for 5 hours at 37°C with purified complement
proteins (0.5 μ g of C1q, C2, C3, C3b, C4, C4b, C5, or FH) or
NHS (amount supposed to contain 0.25 μ g of the complement
protein studied). C3 cleavage was also analyzed in the presence
of the regulatory proteins factor I (FI) (0.2 μ g) and/or FH (0.5
 μ g), in the presence or absence of Pic (1.0 μ g). The cleavage
products were analyzed by Western blotting [37].

140

Q8

145

Fluorescence Resonance Energy Transfer Peptides

Fluorescence resonance energy transfer (FRET) peptides (Abz-
GLARNLDEIIA-EDDnp, Abz-LNEQRYYGGGYG-EDDnp,

150

Abz-SLQLPSRSSKI-EDDnp, and Abz- KLSINTHPSQKPL-EDDnp) were designed based on surface-exposed, hydrophilic, and antigenic regions of the C3 molecule, according to the bioinformatics programs Pymol (Schrödinger) and Protean (DNASTar). The peptides were synthesized by solid-phase synthesis using the N-(9-fluorenyl)methoxycarbonyl procedure, in an automated bench-top simultaneous multiple solid-phase peptide synthesizer (PSSM 8 system; Shimadzu) [38, 39]. The molecular mass and purity of the peptides were checked with analytic high-performance liquid chromatography and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (Microflex-LT; Bruker-Daltonics). Stock solutions of peptides were prepared in dimethyl sulfoxide, and the concentration was measured spectrophotometrically using the molar extinction coefficient of 17 300 mol/L⁻¹ cm⁻¹ at 365 nm.

Hydrolysis of FRET Peptides

Hydrolysis of FRET peptides by Pic protein was performed in PBS (pH 7.4) and followed in a Hitachi F-2500 spectrofluorimeter at 37°C. Fluorescence changes were monitored continuously at λ_{ex} = 320 nm and λ_{em} = 420 nm. The concentration of dimethyl sulfoxide in all buffers was kept at <1%. The enzyme concentration was chosen such that <5% of the substrate was hydrolyzed during the course of the assay. The reaction rate was converted into micromoles of substrate hydrolyzed per minute based on a calibration curve obtained from the complete hydrolysis of each peptide. The kinetic parameters of hydrolysis, *k*_{cat}, *K*_M, and *k*_{cat}/*K*_M were determined from initial rate measurements at FRET substrate concentrations up to 10 μmol/L. The data were fitted with respective standard errors to the Michaelis-Menten equation using GraFit software (version 5.0; Erithacus Software). When necessary, the specificity rate constants (*k*_{cat}/*K*_M) were directly determined by dividing the pseudo first-order rate constant by the active enzyme concentration present in the reaction mixture [40]. Pseudo first-order rate constants of hydrolysis were measured at [S] ≪ *K*_M and calculated by means of nonlinear regression data analysis, using GraFit software. In all assays data were collected at least in triplicate, and the error values were <10% for each of the obtained kinetic parameters.

Determination of FRET Peptides Cleavage Sites

After the hydrolysis assays, 20 μmol/L concentrations of each substrate were incubated at 37°C overnight and the scissile bonds of hydrolyzed FRET peptides were identified by isolation of the fragments using analytic high-performance liquid chromatography, followed by the amino acid analysis and molecular mass determinations with liquid chromatography–mass spectrometry, using an LCMS-2010EV model, equipped with an ESI-probe (Shimadzu). Additional experiments using the FRET peptide Abz-GLARSNLDEIIAQ-EDDnp were also performed, with the reactions interrupted at different time points (5 minutes, 1 hour, and 12 hours).

RESULTS

Pic Protease Inhibition of Complement Activation Mediated by All 3 Pathways

To avoid the presence of any other virulence factor purified Pic protein was obtained from a minimal clone HB101(pPic1) and antibodies against Pic detected a strong band of 109 kDa, which was absent in the empty vector (HB101) (Supplementary Figure 1). First, to address whether Pic would be able to inhibit the complement cascade, we tested its activity in assays where the 3 pathways could be assessed separately. Pretreatment of NHS (1:50 dilution) with Pic decreased complement activation mediated by the classic and lectin pathways by approximately 75% and 80%, respectively (Figure 1). The activity mediated by the alternative pathway was quantified considering the percentage of lysis observed when rabbit erythrocytes were incubated in the presence of NHS. In this case, pretreatment of serum with Pic caused approximately 40% inhibition, compared with serum treated with PBS (Figure 1).

Inhibition of Complement Pathways by Pic Due to Specific Cleavage of Complement Proteins

The complement cascade inhibition caused by Pic prompted us to investigate whether this protease could target complement molecules. Pic was examined for the ability to cleave C1q, C2, C3, C3b, C4, C4b, C5, and FH. Pic protease at different concentrations (0.1, 0.5, and 1.0 μg) was incubated with each of the purified complement molecules (0.5 μg) for 5 hours at 37°C, and its effect on protein degradation was evaluated by WB with specific antibodies. A 5-hour incubation period was adopted in all assays because that was the best condition to detect cleavages for all complement molecules, as determined by a set of experiments performed at different incubation periods (data not shown). Pic was able to cleave complement proteins from the 3 pathways (C2, C3, C3b, C4, and C4b) in a dose-dependent manner (Figure 2), but it could not cleave C1q, C5, and FH (data not shown). By augmenting the Pic dose, more degradation subproducts were detected as bands of different molecular weights (Figure 2). To adequately address the relevance of Pic activity on C2 and C4, we performed comparisons with the cleaving activities of activated C1s, a physiological enzyme. Activated C1s cleaved C2 more efficiently than Pic with total consumption of C2, but in both cases a 70-kDa degradation product was detected. On the other hand, cleavage of C4 was more pronounced in the presence of Pic (Supplementary Figure 2).

To analyze whether Pic-secreting *E. coli* HB101 was able to cleave complement molecules, we compared the cleavage profiles of supernatants from either *E. coli* HB101 or *E. coli* HB101(pPic1). As expected, cleavage fragments of C3 and C4 were detected only in the presence of HB101(pPic1) culture supernatants (Figure 3). Cleavage profiles for C2 were quite similar when supernatants of HB101(pPic) and HB101 were used.

Figure 1. Pic inhibits the activity of the 3 complement pathways. Immunoglobulin G or mannan was immobilized on microtiter plates to activate the classic and lectin pathways, respectively. To assess the inhibitory effect, normal human serum (NHS) was preincubated with Pic, bovine serum albumin (BSA), or phosphate-buffered saline for 1 hour at 37°C. Complement activation was measured by deposition of C4b (classic and lectin pathways) with anti-C4 polyclonal antibodies, followed by peroxidase-conjugated secondary antibodies. Optical densities were determined at 492 nm. Heat-inactivated NHS (iNHS) was used as a control. The complement activity mediated by the alternative pathway was expressed in AP50 units per milliliter. Data represent means and standard deviations of 3 independent experiments, each performed in duplicate. * $P < .05$ (Student t test).

However, a more intense cleavage product of approximately 70 kDa could be observed for HB101(pPic), as seen in Figure 3.

Pic Mediation of Cleavage of Complement Protein Cleavage in Human Serum

Secreted proteases of a given pathogen must also be active in human serum to effectively contribute to immune evasion. To investigate this issue, we performed further proteolytic assays, which revealed that Pic also cleaves C2, C3, and C4 present in human serum (Figure 4). These cleavages were less pronounced than those observed with the purified complement proteins in the case of C3 and C4, which could be partially explained by the presence of protease inhibitors in serum, such as serpins and α_2 -macroglobulin. Alternatively, it is also possible that the cleavages were affected by a competition among the different substrates, which are present all together in serum. In this more physiological context, cleavage of C2 was quite efficient in the presence of HB101(pPic) supernatant and showed a

distinct profile compared with the one observed with purified C2. In this case, the molecule was almost completely consumed (Figure 4). Moreover, it is important to mention that cleavages of C3 and C2 by Pic were more pronounced than the C4 degradation in serum (Figure 4).

Synergistic Work by Pic and Host Factors to Inactivate C3

Pathogenic leptospires [41] and *Neisseria meningitidis* are able to bind the negative complement regulator FH, and in this way they can evade complement activation mediated by the alternative pathway. On the bacterium surface, FH acts as a cofactor for FI in C3b cleavage [42]. Interestingly, C3 degradation by Pic generates a band of approximately 100 kDa suggestive of a C3b-like molecule that might be produced as a result of the C3 α -chain degradation (Figure 2). To address this hypothesis, the host regulators FI and FH were added to the proteolytic reaction to assess whether the C3b-like molecule could be further degraded. As shown in Figure 5A (lane 8), a complete

Figure 2. Cleavage of complement proteins by Pic. Increasing amounts of Pic (0.1, 0.5, and 1.0 µg) or phosphate-buffered saline (PBS) were incubated with the purified complement proteins C3, C3b, C4, C4b, or C2 (0.5 µg) for 5 hours at 37°C. The cleavages were analyzed by Western blotting with polyclonal antibodies against the complement proteins. Arrows point to less exposed images for each complement protein.

degradation of the 100-kDa band occurred in the presence of FI and FH, confirming the generation of a C3b-like molecule and indicating that the host factors work in synergy with Pic to effectively inactivate C3 and its fragments. To exclude the possibility of Pic degradation by FI/FH, Pic was incubated with FI and/or FH, and no degradation was observed (Figure 5B).

Hydrolysis of FRET Peptides Derived From Complement C3 Protein

FRET peptides containing the sequence of complement C3 protein were synthesized and assayed with Pic protein. Table 1 shows the cleavage sites and kinetic parameters obtained for each peptide. Peptide 3 presented the highest k_{cat}/K_M , whereas

Figure 3. Pic present in the supernatant of *Escherichia coli* HB101 cleaves purified complement proteins. Supernatants of *E. coli* HB101 (lane 1) or *E. coli* HB101(pPic1) (lane 2) (0.5 µg of total secreted proteins) were incubated with the purified complement proteins C3, C4, or C2 (0.5 µg) for 5 hours at 37°C. The cleavages were analyzed by Western blotting with specific antibodies against the complement proteins. Less exposed images are shown to the left of each profile.

Table 1. Hydrolysis of FRET Peptides Derived From Complement C3 Protein by *Escherichia coli* Pic Protein

Peptide ^a	Amino Acid Numbering Within C3 Sequence	Cleavage Sites (%)	k_{cat}/K_M , mM · s ^{-1b}
1. Abz-GLA↓R↓SNLDEIIA↓Q-EDDnp	745–757	A↓R (5.5), R↓S (91.0), and A↓Q (3.5)	1.4
2. Abz-LNE↓QRYYYGGGY↓GQ-EDDnp	1256–1266	E↓Q (45.0) and Y↓G (55.0)	1.0
3. Abz-SLQ↓LP↓SRSSKIQ-EDDnp	1296–1307	Q↓L (1.0) and P↓S (99.0)	2.5
4. Abz-KLSINTHPSQ↓K↓PLQ-EDDnp	408–420	Q↓K (62.0) and K↓P (38.0)	0.98

Abbreviation: FRET, fluorescence resonance energy transfer.

^a Abz (ortho-aminobenzoic acid) is the fluorescence donor, and Q-EDDnp (glutamine-[N-(2,4-dinitrophenyl)-ethylenediamine]) is the fluorescence acceptor.

^b The ratio k_{cat}/K_M indicates the catalytic efficiency of an enzyme on determined hydrolysis reaction conditions.

Q33

Q34

Q35

data obtained with Pic of EAEC 042 may also be extended to UPEC and *S. flexneri* 2a. Strains of UPEC and EAEC causing sepsis have in common the presence of Pic. In some cases these 3 pathogens (EAEC, UPEC, and *S. flexneri* 2a) may reach the bloodstream, causing bacteremia and sepsis [18, 21, 24, 44]. The hybrid EAEC/Shiga toxin-producing *E. coli* strain O104:H4 also produces Pic [14]. Munera et al [15] demonstrated that the deletion of *pic* in this outbreak strain reduced the intestinal colonization and the ability to cause diarrhea in infant rabbits, suggesting that Pic may promote the persistence of the pathogen in the gastrointestinal tract. Interestingly, antibodies against Pic have been detected in serum samples from 72% of children recovering from acute diarrhea associated with EAEC, indicating that this protein is able to induce an immune response during natural infection, either by contact with the gut immune cells or by translocation to the bloodstream [45].

In this context the production of Pic by these pathogens may confer an important advantage, protecting these bacteria from the innate immunity. Human pathogens have evolved different mechanisms to circumvent the complement system and promote a successful infection. Among them, the secretion of proteases constitutes an important immune evasion strategy for a wide variety of pathogens, such as *Aspergillus fumigatus* [46], *N. meningitidis* [42], and *Leptospira interrogans* [35]. These microorganisms secrete alkaline serine protease 1 [46], an auto-transporter serine protease called NalP [42], and thermolysins [35], respectively. Alkaline serine protease 1 cleaves diverse complement proteins, including C3, C3b, C4, C4b, and C5 [46]. NalP and one of the thermolysins produced by pathogenic *Leptospira* have a more specific activity, degrading only the central complement molecule C3 [35, 42].

In this work, we have shown that Pic significantly reduces complement activation by all 3 pathways. We demonstrated that it is able to cleave C3, a central molecule of the complement cascade, as well as C3b and proteins from the classic and lectin pathways, such as C4 and C2. Degradation of complement components was observed with both the purified protein and the supernatant of *E. coli* HB101 expressing Pic. Additional proteolytic assays using human serum as a source of complement

proteins indicated that Pic is also active in a more physiological milieu, able to cleave C3, C4 and C2. In this context, the cleavages of C3 and C2 by Pic are more pronounced than the C4 degradation. Curiously, cleavage of C2 present in NHS showed a different profile and was more efficient than the degradation observed with purified C2. One possible mechanism could be the action of a serum component (eg, cofactors) that could eventually favor C2 degradation by Pic in serum. Therefore, among the complement proteins tested, we believe that the main targets of Pic are C2, C3, and its fragments (Figure 6).

Another interesting finding that emerged from our study is that Pic works synergistically with human complement regulators FI and FH, promoting an efficient inactivation of C3. In the presence of Pic, C3b-like molecules are generated, and they are further degraded when FI and FH are added to the reaction (Figure 5A). Synergy between bacterial proteases and complement host regulators is not uncommon and has been reported for other pathogenic microorganisms, including *Enterococcus faecalis* [47, 48], *Staphylococcus aureus* [49], *N. meningitidis* [42], and *L. interrogans* [35]. In a recent report, the autotransporter protease NalP from *N. meningitidis* was shown to cleave C3, producing a C3b-like fragment containing 4 additional amino acids, which was degraded in the presence of FI and FH. As a consequence, lower deposition of C3b on the bacterial surface was observed [42].

To further analyze the C3 cleavage by Pic, FRET peptides corresponding to surface exposed regions of the molecule were synthesized. Pic was able to degrade the FRET peptide Abz-GLARSNLDEIIAQ-EDDnp, which contains the cleavage site where the C3 convertases degrade the α chain of C3 (underlined in the sequence). Pic targeted mainly (91%) the same amino acids that the C3 convertases in P1 and P1' positions (arginine and serine residues, respectively). Therefore, because of this cleavage, C3a- and C3b-like molecules may be generated (Figure 6). We have also demonstrated here that this C3b-like molecule can be cleaved by the host regulators FI and FH (Figures 5 and 6), and also by Pic itself, which degrades the FRET peptides 2, 3, and 4 (Table 1), which are located in the C3b fragment of the C3 molecule.

360

Q22

365

Q23

370

375

380

385

Q24

390

395

Figure 6. Cleavage of complement proteins by Pic. A, Pic protease cleaves C3, producing C3a- and C3b-like fragments. Additional cleavage experiments demonstrated that C3a-like molecules might be further degraded by Pic. In the presence of Pic, the C3b-like fragment is further degraded when factor I (FI) and factor H (FH) are added to the reaction. B, Pic also promotes direct cleavage of C2 and C, C4 producing C4a- and C4b-like fragments. C4 cleavage is less efficient than that observed with the other purified complement proteins. Purified C3b and C4b are also cleaved by Pic (not shown in this figure).

Furthermore, we must also consider that, as a consequence of the C3 cleavage by Pic, a C3a-like molecule may be produced. C3a fragments are important inflammatory molecules, recruiting basophils and mast cells to the infection sites and therefore promoting degranulation and release of vasoactive mediators. We cannot exclude the possible roles of this anaphylatoxin in the infection by Pic-producing pathogens. However, additional cleavage experiments demonstrated that the N-terminal arginine residue (R), which is essential for the inflammatory activity, might be further removed by Pic (Supplementary Figure 3A–D). Therefore, the physiological consequences of the final balance between the different C3a fragments generated are an important issue to be further addressed using animal models.

The ability of Pic to inactivate key proteins of all complement pathways is a new finding demonstrating its function in immune evasion. Several years ago, the ability of EspP (another serine protease of enterohemorrhagic *E. coli*) to degrade

C3/C3b and C5 in vitro was demonstrated [50]. Our data add another piece to the multitask nature of these immune-modulating SPATEs. Although bacteremia and sepsis caused by Pic-producing pathogens are not common, these diseases are difficult to treat and associated with lethality [21, 23, 25]. The presence of Pic is an important feature that may be related to the greater ability of these pathogens to survive in human serum, thus favoring their invasiveness and increasing the severity of disease. Therefore, Pic represents a potential target for the development of therapeutic and preventive measures against *E. coli* and *Shigella* bacteremia and sepsis.

Supplementary Data

Supplementary materials are available at *The Journal of Infectious Diseases* online (<http://jid.oxfordjournals.org>). Supplementary materials consist of data provided by the author that are published to benefit the reader. The posted materials are not copyedited. The contents of all supplementary

data are the sole responsibility of the authors. Questions or messages regarding errors should be addressed to the author.

Notes

Financial support. This work was supported by the São Paulo Research Foundation (grants 2011/14103-0, 2010/50043-0, and 2012/50191-4) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (grants 471340/2011-1 and 470388/2010-2).

Potential conflicts of interest. All authors: No reported conflicts. All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

References

- Page MJ, Di Cera E. Serine peptidases: classification, structure and function. *Cell Mol Life Sci* **2008**; 65:1220–36.
- Page MJ, Di Cera E. Evolution of peptidase diversity. *J Biol Chem* **2008**; 283:30010–4.
- Henderson IR, Navarro-Garcia F, Desvaux M, Fernandez RC, Ala'Aldeen D. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* **2004**; 68:692–744.
- Leyton DL, Rossiter AE, Henderson IR. From self sufficiency to dependence: mechanisms and factors important for autotransporter biogenesis. *Nat Rev Microbiol* **2012**; 10:213–25.
- Dautin N. Serine protease autotransporters of enterobacteriaceae (SPATEs): biogenesis and function. *Toxins* **2010**; 2:1179–206.
- Yen YT, Kostakioti M, Henderson IR, Stathopoulos C. Common themes and variations in serine protease autotransporters. *Trends Microbiol* **2008**; 16:370–9.
- Dutta PR, Cappello R, Navarro-García F, Nataro JP. Functional comparison of serine protease autotransporters of enterobacteriaceae. *Infect Immun* **2002**; 70:7105–13.
- Ruiz-Perez F, Nataro JP. Bacterial serine proteases secreted by the autotransporter pathway: classification, specificity, and role in virulence. *Cell Mol Life Sci* **2014**; 71:745–70.
- Rajakumar K, Sasakawa C, Adler B. Use of a novel approach, termed island probing, identifies the *Shigella flexneri* she pathogenicity island which encodes a homolog of the immunoglobulin A protease-like family of proteins. *Infect Immun* **1997**; 65:4606–14.
- Henderson IR, Czeckulin J, Eslava C, Noriega F, Nataro JP. Characterization of Pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* **1999**; 67:5587–96.
- Parham NJ, Srinivasan U, Desvaux M, Foxman B, Marrs CF, Henderson IR. PicU, a second serine protease autotransporter of uropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **2004**; 230:73–83.
- Navarro-García F, Gutierrez-Jimenez J, Garcia-Tovar C, Castro LA, Salazar-Gonzalez H, Cordova V. Pic, an autotransporter protein secreted by different pathogens in the Enterobacteriaceae family, is a potent mucus secretagogue. *Infect Immun* **2010**; 78:4101–9.
- Ruiz-Perez F, Wahid R, Faherty CS, et al. Serine protease autotransporters from *Shigella flexneri* and pathogenic *Escherichia coli* target a broad range of leukocyte glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**; 108:12881–6.
- Rasko DA, Webster DR, Sahl JW, et al. Origins of the *E. coli* strain causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany. *N Engl J Med* **2011**; 365:709–17.
- Munera D, Ritchie JM, Hatzios SK, et al. Autotransporters but not pAA are critical for rabbit colonization by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4. *Nat Commun* **2014**; 5:3080.
- Estrada-García T, Navarro-García F. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathotype: a genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. *FEMS Immunol Med Microbiol* **2012**; 66:281–98.
- Bower JM, Eto DS, Mulvey MA. Covert operations of uropathogenic *Escherichia coli* within urinary tract. *Traffic* **2005**; 6:18–31.
- Ulett GC, Totsika M, Schaale K, Carey AJ, Sweet MJ, Schembri MA. Uropathogenic *Escherichia coli* virulence and innate immune responses during urinary tract infection. *Curr Opin Microbiol* **2013**; 16:100–7.
- Olesen B, Scheutz F, Andersen RL, et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* O78:H10, the cause of an outbreak of urinary tract infection. *J Clin Microbiol* **2012**; 50:3703–11.
- Boll EJ, Struve C, Boisen N, Olesen B, Stahlhut SG, Krogfelt KA. Role of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in uropathogenesis. *Infect Immun* **2013**; 81:1164–71.
- Herzog K, Engeler Dusel J, Hugentobler M, et al. Diarrheagenic enteroaggregative *Escherichia coli* causing urinary tract infection and bacteremia leading to sepsis. *Infection* **2014**; 42:441–4.
- Marteyn B, Gazi A, Sansonetti P. *Shigella*: a model of virulence regulation in vivo. *Gut Microbes* **2012**; 3:104–20.
- De Mol P, Brasseur D, Schatteman E, Kassam S. *Shigella* and shigellae-mia. *Scand J Infect Dis* **1981**; 13:75–7.
- Keddy KH, Sooka A, Crowther-Gibson P, et al. Systemic shigellosis in South Africa. *Clin Infect Dis* **2012**; 54:1448–54.
- Orr D, Hedderwick S. *Shigella flexneri* bacteraemia in an immunocompetent male treated with oral ciprofloxacin. *J Infect* **2002**; 45: 275.
- Grondin C, Imbert P, Ficko C, et al. *Shigella flexneri* bacteremia in two immune-competent adult travelers. *J Travel Med* **2012**; 19:258–60.
- Heimer SR, Rasko DA, Lockatell CV, Johnson DE, Mobley HL. Autotransporter genes *pic* and *tsh* are associated with *Escherichia coli* strains that cause acute pyelonephritis and are expressed during urinary tract infection. *Infect Immun* **2004**; 72:593–7.
- Gutiérrez-Jiménez J, Arciniega I, Navarro-García F. The serine protease motif of Pic mediates a dose-dependent mucolytic activity after binding to sugar constituents of the mucin substrate. *Microb Pathog* **2008**; 45:115–23.
- Harrington SM, Sheikh J, Henderson IR, Ruiz-Perez F, Cohen PS, Nataro JP. The Pic protease of enteroaggregative *Escherichia coli* promotes intestinal colonization and growth in the presence of mucin. *Infect Immun* **2009**; 77:2465–73.
- Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* **2010**; 11:785–97.
- Nataro JP, Deng Y, Cookson S, et al. Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated in volunteers. *J Infect Dis* **1995**; 171:465–8.
- Boyer HW, Roulland-Dussoix D. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **1969**; 41: 459–72.
- Navarro-García F, Eslava C, Villaseca JM, et al. In vitro effects of a high-molecular-weight heat-labile enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* **1998**; 66: 3149–54.
- Roos A, Bouwman LH, Munoz J, et al. Functional characterization of the lectin pathway of complement in human serum. *Mol Immunol* **2003**; 39: 655–68.
- Fraga TR, Courrol DS, Castiblanco-Valencia MM, et al. Immune evasion by pathogenic *Leptospira* strains: the secretion of proteases that directly cleave complement proteins. *J Infect Dis* **2014**; 209:876–86.
- Sánchez-Corral P, González-Rubio C, Rodríguez de Córdoba S, López-Trascasa M. Functional analysis in serum from atypical hemolytic uremic syndrome patients reveals impaired protection of host cells associated with mutations in factor H. *Mol Immunol* **2004**; 41:81–4.
- Barbosa AS, Abreu PA, Vasconcellos SA, et al. Immune evasion of *Leptospira* species by acquisition of human complement regulator C4BP. *Infect Immun* **2009**; 77:1137–43.
- Hirata IY, Cezari MHS, Nakaie C, et al. Internally quenched fluorogenic protease substrates: solid-phase synthesis and fluorescence spectroscopy of peptides containing ortho-aminobenzoyl/dinitrophenyl groups as donor-acceptor pairs. *Lett Pept Sci* **1994**; 1:299–308.
- Korkmaz B, Attucci S, Juliano MA, et al. Measuring elastase, proteinase 3 and cathepsin G activities at the surface of human neutrophils with fluorescence resonance energy transfer substrates. *Nat Protocols* **2008**; 3:991–1000.

40. Kondo MY, Okamoto DN, Santos JA, et al. Studies on the catalytic mechanism of a glutamic peptidase. *J Biol Chem* **2010**; 285:21437–45.
- 560 41. Meri T, Murgia R, Stefanel P, Meri S, Cinco M. Regulation of complement activation at the C3-level by serum resistant leptospires. *Microb Pathog* **2005**; 39:139–47.
42. Del Tordello E, Vacca I, Ram S, Rappuoli R, Serruto D. *Neisseria meningitidis* NalP cleaves human complement C3, facilitating degradation of C3b and survival in human serum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2014**; 111:427–32.
- 565 43. Schechter I, Berger A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun* **1967**; 27:157–62.
44. Justice SS, Hunstad DA, Seed PC, Hultgren SJ. Filamentation by *Escherichia coli* subverts innate defenses during urinary tract infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**; 103:19884–9.
- 570 45. Bellini EM, Elias WP, Gomes TA, et al. Antibody response against plasmid-encoded toxin (Pet) and the protein involved in intestinal colonization (Pic) in children with diarrhea produced by enteroaggregative *Escherichia coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **2005**; 43:259–64.
46. Behnsen J, Lessing F, Schindler S, et al. Secreted *Aspergillus fumigatus* protease Alp1 degrades human complement proteins C3, C4, and C5. *Infect Immun* **2010**; 78:3585–94.
47. Park SY, Kim KM, Lee JH, Seo SJ, Lee IH. Extracellular gelatinase of *Enterococcus faecalis* destroys a defense system in insect hemolymph and human serum. *Infect Immun* **2007**; 75:1861–9.
- 580 48. Park SY, Shin YP, Kim CH, et al. Immune evasion of *Enterococcus faecalis* by an extracellular gelatinase that cleaves C3 and iC3b. *J Immunol* **2008**; 181:6328–36.
49. Laarman AJ, Ruyken M, Malone CL, van Strijp JA, Horswill AR, Rooijakkers SH. *Staphylococcus aureus* metalloprotease aureolysin cleaves complement C3 to mediate immune evasion. *J Immunol* **2011**; 186:6445–53.
- 585 50. Orth D, Ehrlenbach S, Brockmeyer J, et al. EspP, a serine protease of enterohemorrhagic *Escherichia coli*, impairs complement activation by cleaving complement factors C3/C3b and C5. *Infect Immun* **2010**; 78:4294–301.
- 590