Fernando Henrique Martins

Papel da proteína EspFU 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 2017

Fernando Henrique Martins

Papel da proteína EspFU 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 2017

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Martins, Fernando Henrique Papel da proteína EspFU em Escherichia coli enteropatogênica atípica / Fernando Henrique Martins; orientador Waldir Pereira Elias Junior. --São Paulo, 2017. 144 p.
Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.
1. Escherichia coli. 2. Patogenicidade. 3. Proteína efetora. 4. Transcriptoma. 5. Inflamação. I. Elias Junior, Waldir Pereira, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato:	Fernando Henrique Martins		
Título da Tese:	Papel da proteína EspFU em <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica atípica		
Orientador:	Dr. Waldir Pereira Elias Junior		
A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a / / , considerou			
()	Aprovado () Reprovado		
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 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000 Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que a solicitação de licença de uso de animais intitulada "*Papel da proteína EspFu em Escherichia coli enteropatogênica atípica*", registrada sob **nº 97**, nas fls. 36, do livro 3, foi analisada e aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-ICB/USP) em 22/09/2015.

Por esta licença, estão autorizados a manipular animais dentro dos limites do projeto proposto e no âmbito da Lei Federal nº 11.794, o Dr.(Dra.) *Waldir Pereira Elias Junior* (Investigador Principal) e os membros da equipe: *Fernando Henrique Martins*. Esta licença de uso de animais expira em 22/09/2019.

Havendo interesse na renovação da proposta, a solicitação deverá ser protocolada pela secretaria da CEUA-ICB/USP *até o último dia de validade da atual proposta*. Após essa data, uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that permission for the use of animals was granted to the research proposal "*Role of EspFu protein on atypical enteropathogenic Escherichia coli*", registered as **Number 97**, in pages 36, of book 3, by the local ETHICS COMMITTEE ON THE USE OF ANIMALS (CEUA-ICB/USP) in 9/22/2015.

Under this license, *Waldir Pereira Elias Junior* (Principal Investigator) and team members *Fernando Henrique Martins* are authorized to make use of animals within the limits of the research proposal presented to this committee and of the Brazilian Federal Law nº 11.794.

This license expires in 9/22/2019. In case the investigators wish to renew this license, this must be presented to CEUA-ICB/USP before the last day of validity of the present license. After such date, a new research proposal must be presented.

São Paulo, 25 de setembro de 2015.

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes Coordenador CEUA-ICB/USP

Eliane Aparecida G. M. Nascimento Secretária CEUA-ICB/USP

Av Vital Brasil 1500 - Casa 82 05503-900 São Paulo SP T +55 11 3723-2132 ceuaib@butantan.gov.br www.butantan.gov.br



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUAIB) INSTITUTO BUTANTAN

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Papel da proteína EspFu em *Escherichia coli* enteropatogênica atípica", protocolo nº 1393/15, sob a responsabilidade de Waldir Pereira Elias Junior e Edson Luiz da Silva e Fernando Henrique Martins – que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 16/11/2016.

This is to certify that the proposal "Role of EspFu protein in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*", protocol nº 1393/15, under the responsibility of Waldir Pereira Elias Junior and Edson Luiz da Silva e Fernando Henrique Martins – which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings) – has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee and approved in 11/16/2016. This proposal is in accordance with standards outlined by Brazilian laws for use of experimental animals, and with ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

Vigência do Projeto: 06/2015 - 12/2017	N° de animais/espécie	Observação
Laboratório de Bacteriologia	Sem adição de animais	Alteração de vigência

São Paulo, 18 de novembro de 2016

ardo Jensen Dr. José da CEUAIB Coordenado

Dedico este trabalho à minha amada esposa Camila, minha companheira, que sempre esteve ao meu lado nesta difícil jornada. E toda minha família, que sempre me motivou e incentivou.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Waldir Pereira Elias Junior, pela confiança, incentivo, amizade, e por toda contribuição para o meu desenvolvimento profissional.

À Dra. Vanessa Sperandio e todo seu grupo, por ter me recebido de braços abertos em Dallas e pela ajuda nos experimentos realizados em seu laboratório.

À Dra. Cecília M. Abe, pela ajuda nos experimentos de microscopia.

Ao Dr. Roberto Nepomuceno, pela ajuda nos experimentos de mutagênese e purificação de proteínas.

À Dra. Roxane Fontes Piazza, pela amizade e auxílio na produção de anticorpos.

À Dra. Maria Leonor Sarno de Oliveira e às técnicas Aline e Vera, pelo inestimável auxílio nos ensaios de colonização.

À Dra. Solange Serrano, pelas análises de espectrometria de massas.

À Dra. Kate Phelps (Live Cell Imaging Core Facility – UT Southwestern), pela ajuda com os ensaios de microscopia de fluorescência.

Ao Dr. Chao Xing e seu grupo (Bioinformatics Core – UT Southwestern Medical Center), pela ajuda com as análises dos dados de RNA-seq.

Aos amigos do Lab. Bacteriologia (Instituto Butantan) e colegas de bancada Afonso, Bia, Bruno, Bruna, Camila, Claudia F., Claudia T., Daniela, Danielle, Emerson, Fernanda, Francielli, Inarei, Jonatas, Jonathan, Ju Higa, Kamila, Keyde, Larissa, Lidia, Ludmila, Matilde, Paulo, Roberto e Thaís pela amizade, auxílio nos experimentos, "rolês miados dos pegas", anos de convivência, enfim...por tornarem o laboratório um ambiente "sucesso" de trabalho.

Aos caras do Clube da Luta, pelos bons momentos e por me abrigar em suas humildes residências quando precisei.

À minha esposa Camila que, além de me aturar em muitos momentos de estresse, auxiliou nas análises estatísticas e formatação da tese.

Aos funcionários do Lab Bacteriologia (Instituto Butantan), pelo auxílio no preparo de materiais.

Aos demais pesquisadores e alunos do Laboratório de Bacteriologia e todos que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho.

MUITO OBRIGADO!!

AGRADECIMENTO À AGÊNCIA DE FOMENTO

Este trabalho foi desenvolvido com o auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan (São Paulo, Brasil), Processo nº 2013/17403-0, e na *University of Texas Southwestern Medical Center* (Dallas, Estados Unidos), Processo nº 2016/08401-2.

Agradeço à FAPESP pela concessão das bolsas e auxílio financeiro, essenciais para a elaboração deste trabalho.

RESUMO

MARTINS, F. H. **Papel da proteína EspFU em** *Escherichia coli* **enteropatogênica atípica.** 2017. 144 f. Tese (Doutorado em Microbiologial) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Escherichia coli enteropatogênica atípica (aEPEC) é considerada um dos principais agentes etiológicos da diarreia em várias regiões do mundo. O mecanismo central da patogenicidade de aEPEC é a capacidade de induzir rearranjo do citoesqueleto de actina, culminando em lesões attaching-effacing (A/E) no epitélio intestinal. Esta propriedade é desencadeada por proteínas codificadas pela ilha de patogenicidade locus of enterocyte effacement (LEE). No entanto, proteínas efetoras codificadas fora de LEE também podem contribuir para a virulência de aEPEC. Enquanto algumas cepas utilizam a via de fosforilação de Tir (Y-P) para induzir a formação de pedestais, outras cepas podem empregar o efetor não-LEE EspFU (TccP/TccP2) para uma eficiente polimerização de actina. Neste estudo foi avaliada a prevalência e produção de EspFU, como também o papel desempenhado por esta proteína na interação com células epiteliais e colonização intestinal, aspectos essenciais da patogênese de aEPEC. O gene espFU foi detectado em 45,8% das cepas de aEPEC, com uma predominância do alelo tccP2. A maioria das cepas apresentou o tir fosforilado (Y-P), sugerindo que possam utilizar diferentes mecanismos para a polimerização de actina. As cepas positivas para tccP e tccP2 foram significativamente associadas com os filogrupos E e B1, respectivamente. A produção de EspFU (TccP/TccP2) foi favorecida em DMEM e variou de cepa-a-cepa, independentemente dos genótipos e filogrupos. A deleção do gene espFU em uma cepa de aEPEC O55:H7 (BA320) resultou em menor aderência bacteriana e comprometeu a capacidade de induzir polimerização de actina em células HeLa após 6 h de infecção. Adicionalmente, o mutante em espFU apresentou uma menor eficiência na colonização intestinal em um modelo murino de infecção. A análise da cinética da formação de pedestais por aEPEC mostrou que, embora cepas expressando EspFU tenham sido mais aderentes e induziram polimerização de actina mais rapidamente em comparação à via de TirY-P, não foram observadas diferenças significativas no número de pedestais formados após 6 h. Os ensaios de gRT-PCR demonstraram que a adesão bacteriana e formação de pedestais mediada por EspFU regulou negativamente a expressão de LEE durante o curso da infecção. Além disso, a análise da resposta transcricional epitelial por RNA-seg revelou uma maior ativação de genes pró-inflamatórios (NF-KB, IL-6, IL-8, TNF, etc) em células infectadas por cepas expressando EspFU. Em contraste, a infecção pelo mutante em espFU resultou em uma forte supressão da resposta inflamatória, indicando a presença de mecanismos opostos de regulação da resposta imune em aEPEC. Em suma, a proteína EspFU é ampla e filogeneticamente distribuída em cepas de aEPEC, desempenha um importante papel na adesão bacteriana e colonização intestinal, e pode contribuir direta ou indiretamente para a indução de resposta inflamatória.

Palavras-chave: *Escherichia coli*. Patogenicidade. Proteína efetora. Transcriptoma. Inflamação.

ABSTRACT

MARTINS, F. H. **Role of EspFU protein in atypical enteropathogenic** *Escherichia coli* **.** 2017. 144 p. Ph. D. thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Atypical enteropathogenic Escherichia coli (aEPEC) is one of the most important pathogens causing diarrhea disease worldwide. The hallmark of aEPEC pathogenesis is the ability to manipulate the host actin cytoskeleton, culminating in attaching and effacing (A/E) lesions on intestinal epithelium, a property triggered by proteins encoded on a pathogenicity island called locus of enterocyte effacement (LEE). However, non-LEE encoded effectors could also contribute to the virulence of aEPEC strains. While some aEPEC require tyrosine phosphorylation (Y-P) of Tir to trigger actin assembling, certain strains whose Tir is not tyrosine phosphorylated utilize the non-LEE T3SS-translocated effector Tir-cytoskeleton coupling protein (TccP/TccP2, also named EspFU) for efficient actin polymerization. In the present study, we evaluated the prevalence, production, and functions played by the EspFU protein on important aspects of aEPEC pathogenesis, such as interaction with epithelial cells and intestinal colonization. The tccP and/or tccP2 genes were detected in 45.8% of the aEPEC strains, with a predominance of *tccP2* allele. Most of these strains carried *tir*Y-P, suggesting that can trigger actin polymerization using both Tir tyrosine phosphorylation and TccP/TccP2 pathways. aEPEC strains carrying tccP or tccP2 were significantly associated to phylogroups E and B1, respectively. We also observed a differential production of TccP/TccP2 among the strains, regardless genotypes and phylogeny. Deletion of espFU from aEPEC BA320 (serotype O55:H7) significantly decreased bacterial adherence and impaired the ability to induce actin rearrangement in HeLa cells after 6 h of infection. Also, the espFU mutant showed lower colonization levels compared to the wild-type strain in a murine infection model. Analysis of the kinetics of pedestal formation showed that, even though EspFU-expressing strains were more adherent and induced actin rearrangement more rapidly than Tir-phosphorylated (TirY-P) producing aEPEC, no significant differences were observed regarding the pedestal numbers at 6 h postinfection. Importantly, bacterial adherence and pedestal formation driven by EspFU downregulated the LEE expression, and also induced changes in the epithelial transcriptional response, specifically by activating pro-inflammatory genes such as NF- κ B, IL-6, IL-8 and TNF α . In summary, our data suggest that EspFU protein is wide and phylogenetically distributed among aEPEC strains, and plays an important role on bacterial attachment and intestinal colonization. Moreover, aEPEC could induce inflammation in an EspFU-dependent manner.

Keywords: *Escherichia coli.* Pathogenesis. Effector protein. Transcriptome. Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Lesão histopatológica attaching and effacing (A/E).	22
Figura 2 - Estrutura genética da ilha de patogenicidade locus of enterocyte effament (LEE EPEC.) de 23
Figura 3 - Representação esquemática do sistema de secreção do tipo III de patógenos A/E.	. 24
Figura 4 - Papel dos efetores de EPEC na modulação da inflamação e apoptose	. 26
Figura 5 - Papel de EspFU na polimerização de actina	. 29
Figura 6 - Transmissão célula-a-célula mediada por EspFU	30
Figura 7 - Diferentes vias para formação de lesões A/E	32
Figura 8 - Distribuição de <i>tccP</i> e <i>tccP</i> 2 entre cepas de aEPEC	57
Figura 9 - Alinhamento múltiplo das sequências de TccP e TccP2 de aEPEC O55:H7 e ONT:	119. 59
Figura 10 - Clonagem do gene <i>espFU</i> no vetor de expressão pET28a(+)	61
Figura 11 - Análise da sequência e parâmetros fisico-químicos de EspFU _{BA320} -His	62
Figura 12 - Indução da produção da proteína recombinante EspFU _{BA320} -His com diferer concentrações de IPTG.	ntes 63
Figura 13 - Análise da solubilidade da proteína recombinante EspFU _{BA320} -His	. 64
Figura 14 - Purificação da proteína recombinante EspFU _{BA320} -His por cromatografia afinidade ao níquel	de 65
Figura 15 - Análise da proteína recombinante EspFU _{BA320} -His por espectrometria de mas (LC-MS/MS).	sas 66
Figura 16 - Análise do soro policional anti-EspFU.	67
Figura 17 - Produção de EspFU (TccP/TccP2) por cepas de aEPEC	. 69
Figura 18 - Correlação entre produção de EspFU (TccP/TccP2), genótipos, tamanho dos ge e filogenia	nes 70
Figura 19 - Análise da sequência de EspFU da cepa BA320	71
Figura 20 - Análise da sequência de Tir da cepa BA320	. 72
Figura 21 - Mutação do gene <i>espFU</i> da cepa BA320	. 73
Figura 22 - Confirmação da mutação do gene <i>espFU</i> por sequenciamento	. 74
Figura 23 - Complementação da mutação do gene <i>espFU</i>	75
Figura 24 - Análise da expressão e produção de EspFU para confirmação da mutaçã complementação	ое 76
Figura 25 - Curvas de crescimento e motilidade das cepas BA320, Δ <i>espFU</i> , Δ <i>espFU</i> +pEspF Δ <i>espFU</i> +vetor	⁼U e 77
Figura 26 - Perfis de adesão das cepas BA320, ΔespFU, ΔespFU+pEspFU e ΔespFU+vetor…	77
Figura 27 - Ensaio de FAS com as cepas BA320, Δ <i>espFU</i> , Δ <i>espFU</i> +pEspFU e Δ <i>espFU</i> +vetor	. 78
Figura 28 - Fotomicrografia da superfície de células HeLa após interação com as cepas BA3 Δ <i>espFU</i> , Δ <i>espFU</i> +pEspFU e Δ <i>espFU</i> +vetor	320, 80
Figura 29 - Colonização intestinal de camundongos tratados com estreptomicina	. 82
Figura 30 - Construção das cepas de aEPEC com diferentes mecanismos de polimerização actina.	o de 83
Figura 31 - Mutação do gene <i>tir</i> nas cepas BA320 e ΔespFU	. 83

Figura 32 - Complementação da mutação do gene <i>tir</i>
Figura 33 - Confirmação da mutação e complementação de Tir
Figura 34 - Análise do crescimento e produção de proteínas codificadas por LEE em condições de infecção
Figura 35 - Confirmação dos fenótipos de polimerização de actina
Figura 36 - Imunodetecção da translocação e fosforilação de Tir após infecção por cepas de aEPEC
Figura 37 - Ensaio piloto da cinética de formação de pedestais por BA320
Figura 38 - Adesão bacteriana e formação de pedestais por cepas de aEPEC após 3 h de infecção
Figura 39 - Adesão bacteriana e formação de pedestais por cepas de aEPEC após 4,5 h de infecção
Figura 40 - Adesão bacteriana e formação de pedestais por cepas de aEPEC após 6 h de infecção
Figura 41 - Análise em tempo real da formação de pedestais por cepas de aEPEC
Figura 42 - Expressão temporal de LEE durante a infecção por cepas de aEPEC
Figura 43 - Expressão relativa de LEE em cepas de aEPEC após 3 h de infecção
Figura 44 - Expressão relativa de LEE em cepas de aEPEC após 4,5 h de infecção
Figura 45 - Expressão relativa de LEE em cepas de aEPEC após 6 h de infecção
Figura 46 - Transcrição do gene espFU durante a infecção por cepas de aEPEC 100
Figura 47 - Análise da produção de EspA e EspB durante a infecção por cepas de aEPEC 101
Figura 48 - Análise da qualidade dos RNAs e bibliotecas de cDNA utilizados nos ensaios de RNA-seq
Figura 49 - Clusterização hierárquica dos transcriptomas de células HeLa infectadas por aEPEC e do controle não-infectado
Figura 50 - Genes diferencialmente expressos em resposta à formação de pedestais de actina por cepas de aEPEC
Figura 51 - Padrões de expressão dos genes mais significativamente modulados em resposta à infecção por aEPEC
Figura 52 - Categorização funcional dos genes diferencialmente expressos em resposta à formação de pedestais de actina por cepas de aEPEC
Figura 53 - Comparação dos principais genes diferencialmente expressos em resposta à formação de pedestais
Figura 54 - Secreção de IL-8 induzida por diferentes vias de formação de pedestais 111
Figura 55 - As dez vias canônicas mais significativamente moduladas em resposta aos diferentes mecanismos de formação de pedestais
Figura 56 - Modelo proposto de comunicação patógeno-hospedeiro durante a infecção de células epiteliais por aEPEC

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características das cepas bacterianas e plasmídeos utilizados neste estudo. 34
Tabela 2 - Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste estudo
Tabela 3 - Sorotipos, subtipos de intimina, genótipos e filogrupos das cepas de aEPEC positivas para espFU. 58
Tabela 4 - Distribuição de tccP e tccP2 entre cepas de aEPEC de acordo com os filogrupos 60
Tabela 5 - Identificação dos genes mais significativamente modulados entre os diferentesmecanismos de formação de pedestais.109
Tabela 6 - Níveis de expressão de genes relacionados a processos imunes que foram diferencialmente modulados em resposta à formação de pedestais por aEPEC. 110
Tabela 7 - Os dez reguladores mais significativamente ativados ou reprimidos em resposta aos diferentes mecanismos de formação de pedestais

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	adesão agregativa	
AD	adesão difusa	
ADM	adrenomedulina	
A/E	attaching-effacing	
AEEC	Escherichia coli attaching-effacing	
aEPEC	Escherichia coli enteropatogênica atípica	
AL	adesão localizada	
ALL	Adesão localizada- <i>like</i>	
ANOVA	análise de variância	
Arp	actin-related protein	
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato	
BFP	Bundle-Forming Pilus	
BIRC3	Baculoviral IAP Repeat Containing 3	
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	
BSA	albumina sérica bovina	
C. rodentium	Citrobacter rodentium	
Cdc42	Cell division control portein 42 homolog	
cDNA	DNA complementar	
Cif	Cycle inhibiting factor	
CO2	dióxido de carbono	
CXCL1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	
DAB	diaminobenzidina	
DAPI	diaminofenilindol	
DMEM	meio de Eagle modificado por Dulbecco	
DNA	ácido desoxirribonucleico	
dNTPS	desoxirribonucleotídeos	
DO	densidade óptica	
E. coli	Escherichia coli	
eae	E. coli attaching and effacing	
ECL	Enhanced chemiluminescence	
EDTA	acido etilenodiaminotetracetico	
EHEC	Escherichia coli enterohemorrágica	
ELISA	Enzyme Lynked Immuno Sorbent Assay	
EPEC	Escherichia coli enteropatogênica	
ERG1	Early growth response protein 1	
Esc	E. coli secreted apparatus component	
Esp	E. coli secreted protein	
ExPEC	E. coli patogênicas extra-intestinais	
FAS	Fluorescent actin staining	
FDR	False Discovery Rate	
FITC	isotiocianato de fluoresceína	
g	gramas	
GBD	GTPase-binding domain	
GDEs	genes diferencialmente expressos	
gDNA	DNA genômico	
GFP	proteína verde fluorescente	

GrlA	Global regulator LEE-activator		
GrIR	Global regulator LEE-repressor		
h	horas		
H2O2	peróxido de hidrogênio		
HIF1A	fator induzido de hipóxia		
His	cauda de histidina		
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência		
lgG	imunoglobulina G		
IL	interleucina		
IPA	Ingenuity Pathway Analysis		
IPTG	isopropil–β-D-tiogalactosidase		
IRSp53	Insulin receptor substrate protein of 53 kDa		
IRTKS	Insulin receptor tvrosine kinase substrate		
kb	kilobases		
kDa	kilodalton		
ka	kilogramas		
ky kV	kilovolts		
I.	litros		
L	Luria-Bertani		
	cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas		
	locus of enterocyte effacement		
	Linopolissacarídeo		
M	molar		
mhu	massa/volume		
Mon	Mitochondrial-associated protein		
мар мау	microscopia eletrônica de varredura		
	miliaramas		
nig	minutos		
())() ml	mililitros		
	milimeler		
	multiplicidada da infacaño		
	PNA meneografico		
NBI	4-hitroazul de tetrazolio		
NCBI	National Center for Biotechnology Information		
NCK	Non-catalytic region of tyrosine kinase		
NFKB	Tator nuclear KB		
ng	nanogramas		
NIe			
nm	nanometros		
nM	nanomolar		
NPY	residuo asparagine-prolina-tirosina		
N-WASP	Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein		
ONPG	o-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo		
ORF	open reading frame		
PAI	ilha de patogenicidade		
pb	pares de bases		
PBS	tampão-salino-fosfato		
PBS-T	PBS+Tween-20 (0,02%)		

PCR	reação em cadeia da polimerase		
pEAF	plasmídeo EPEC adherence fator		
рН	potencial hidrogeniônico		
pl	ponto isoelétrico		
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonil		
PRRs	resíduos repetitivos ricos em prolina		
PVDF	fluoreto de polivinilideno		
qRT-PCR	PCR quantitativo em tempo real		
RIN	RNA integrity number		
RNA	ácido ribonucleico		
RNA-seq	sequenciamento de RNA		
rpm	rotação por minutos		
RpoA	subunidade alfa da RNA polimerase		
rRNA	RNA ribossômico		
RT-PCR	PCR transcriptase reversa		
S	Svedberg		
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio		
SFB	soro fetal bovino		
SH2	Src homology 2		
SH3	Src homology 3		
SPF	Specific pathogen-free		
sRNA	small RNA		
SST3	sistema de secreção do tipo 3		
Stx	toxina Shiga		
TBE	Tris-borato-EDTA		
TccP	Tir-cytoskeleton coupling protein		
tEPEC	Escherichia coli enteropatogênica típica		
Tir	Translocated intimin receptor		
TLR5	Toll-like receptor 5		
ТМВ	tetrametilbenzidina		
TNF	fator de necrose tumoral		
TNFR	receptor de TNF		
TSB	caldo tríptico de soja		
U	unidade		
UFC	unidade formadora de colônia		
V	volts		
v/v	volume/volume		
Y	tirosina		
Δ	delta/mutante		
λ	lambda		
μF	microfarad		
μg	microgramas		
μL	microlitros		
μM	micromolar		
Ω	ohms		

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Escherichia coli enteropatogênica (EPEC)	19
1.2	Lesão A/E e locus of enterocyte effacement (LEE)	21
1.3	Modulação da resposta imune por EPEC	24
1.4	Mecanismos de indução da polimerização de actina por patógenos A/E	26
1.4.1	Fosforilação de Tir (via Nck)	26
1.4.2	EspFU	27
1.4.3	Vias alternativas	31
2	OBJETIVOS	33
2.1	Gerais	33
2.2	Específicos	33
3	MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1	Cepas bacterianas e plasmídeos	34
3.2	Reações em cadeia da polimerase (PCR) e eletroforese em gel de agarose	35
3.3	Pesquisa de <i>espFU</i> em aEPEC	37
3.4	Tipagem do gene <i>tir</i>	38
3.5	Determinação dos grupos filogenéticos (filogrupos)	38
3.6	Obtenção da proteína recombinante EspFU-His	38
3.6.1	Clonagem de espFU no vetor de expressão pET28a(+)	38
3.6.2	Indução da produção de EspFU-His	39
3.6.3	Purificação de EspFU-His por cromatografia de afinidade	40
3.6.4 imunode	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGI etecção da produção de EspFU-His	E) e 40
3.7	Obtenção de soro policional anti-EspFU	41
3.8	Titulação do soro anti-EspFU por ensaio imunoenzimático (ELISA)	42
3.9	Detecção da produção de EspFU (TccP/TccP2) por ELISA	42
3.10	Detecção da produção de EspFU (TccP/TccP2) por <i>immunoblot</i>	43
3.11	Sequenciamento dos genes <i>espFU</i> e <i>tir</i> da cepa BA320	44
3.12	Mutação dos genes <i>espFU</i> e <i>tir</i> por recombinação homóloga	44
3.13	Construção dos plasmídeos de complementação	45
3.14	Análise da expressão de <i>espFU</i> por PCR-transcriptase reversa (RT-PCR)	46
3.15	Detecção da proteína EspFU-Myc por <i>immunoblot</i>	47
3.16	Curva de crescimento	47
3.17	Detecção das proteínas EspA, EspB e Tir por <i>immunoblot</i>	48
3.18	Ensaio de motilidade	49
3.19	Ensaios de interação com células epiteliais <i>in vitro</i>	49
3.19.1	Cultivo celular	49

SUMÁRIO

3.19.2	Infecção bacteriana	49
3.19.3	Teste de adesão	50
3.19.4	Teste de FAS (fluorescent actin staining)	50
3.19.5	Live-cell imaging	51
3.19.6	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	51
3.19.7	Ensaios de imunofluorescência	52
3.19.8	Análise e processamento das imagens de microscopia	52
3.19.9	Preparo de extratos proteicos e imunodetecção de EspA e EspB	52
3.19.10	Extração dos RNAs bacterianos	53
3.19.11 real (qR1	Síntese de cDNA e análise da expressão gênica de LEE por PCR quantitativo em t T-PCR)	<i>empo</i> 53
3.19.12	Análise transcriptômica (RNA-seq)	54
3.19.13	Análise dos dados de RNA-seq	54
3.19.14	Dosagem de IL-8 por ELISA de captura	55
3.20	Modelo de colonização intestinal em camundongos tratados com estreptomicina	55
3.21	Análises estatísticas	56
4	RESULTADOS	57
4.1	Prevalência de <i>espFU</i> em cepas de aEPEC	57
4.2	Produção de soro policional anti-EspFU	61
4.3	Produção de EspFU por cepas de aEPEC	67
4.4	Papel de EspFU na patogênese de aEPEC	70
4.4.1	Análise dos genes espFU e tir da cepa BA320	70
4.4.2.	Construção e caracterização do mutante isogênico em espFU	72
4.4.3	Análise da interação com células epiteliais in vitro	77
4.5	Dinâmica da formação de pedestais por cepas de aEPEC	82
4.5.1	Construção e caracterização das cepas de aEPEC com diferentes fenótipos A/E	82
4.5.2	Cinética da formação de pedestais de actina	90
4.5.3	Cinética da expressão de LEE e espFU	95
4.5.4	Cinética da produção de EspA e EspB	100
4.6 de pede	Resposta transcricional de células epiteliais aos diferentes mecanismos de forma stais empregados por aEPEC	ição 102
4.6.1	Análise das interações biológicas entre os genes diferencialmente expressos	111
5	DISCUSSÃO	115
6	CONCLUSÕES	129
REFERE	NCIAS*	130

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)

Bactérias patogênicas têm desenvolvido mecanismos complexos е sofisticados de virulência para manipular vias de sinalização do hospedeiro e, deste modo, estabelecer condições mais favoráveis para sua sobrevivência e colonização. Uma importante estratégia de infecção empregada por patógenos bacterianos é a produção de sistemas de secreção que translocam uma variedade de proteínas efetoras para a célula hospedeira (DEAN; KENNY, 2009). Uma vez translocados para a célula hospedeira, os efetores ligam-se especificamente a seus alvos celulares, possibilitando deste modo que, mesmo em baixas concentrações, possam desempenhar suas funções. Interessantemente, o mecanismo de ação de muitos efetores consiste em mimetizar proteínas do hospedeiro envolvidas em várias vias de sinalização, como a dinâmica do citoesqueleto, tráfego de membrana, transcrição, progressão do ciclo celular, transdução de sinal e ubiquitinação (HICKS; GALAN, 2013).

Um modelo extensivamente explorado de como patógenos podem utilizar a maquinaria da célula hospedeira em seu benefício é a modulação do citoesqueleto de actina promovido por *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), uma das principais causas bacterianas de diarreia aguda e persistente em várias regiões do mundo, especialmente entre crianças menores de cinco anos de idade (HU; TORRES, 2015; LANATA et al., 2013).

Historicamente, o termo EPEC foi utilizado pela primeira vez para descrever cepas de *E. coli* pertencentes a certos sorogrupos que foram epidemiologicamente associadas com surtos de diarreia infantil entre os anos 1940 e 1950 na Europa e América do Norte (BRAY, 1945; NETER et al., 1955). A atual definição de EPEC refere-se a cepas diarreiogênicas de *E. coli* que induzem uma histopatologia no epitelio intestinal denominada lesão *attaching and effacing* (A/E) e não produzem toxinas Shiga (Stx), uma característica que as difere de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (NATARO; KAPER, 1998).

Cepas de EPEC são divididas em típicas (tEPEC) e atípicas (aEPEC) com base na presença ou ausência do plasmídeo *EPEC adherence fator* (EAF), respectivamente (KAPER, 1996). Este plasmídeo codifica a fímbria *Bundle-Forming* *Pilus* (BFP) (GIRÓN et al., 1991), que é responsável pela formação do padrão de adesão localizada (AL), um fenótipo característico de tEPEC (SCALETSKY et al., 1984). Já aEPEC podem apresentar diferentes fenótipos de aderência, como adesão localizada-*like* (ALL), tido como o mais comum (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002), além de adesão difusa (AD), adesão agregativa (AA), padrões indefenidos e cepas não-aderentes (NA) *in vitro* (ABE et al., 2009; DULGUER et al., 2003; GOMES et al., 2004; NUNES et al., 2003; ROBINS-BROWNE et al., 2004; SCALETSKY et al., 2010; VIEIRA et al., 2001).

Enquanto que as cepas de tEPEC geralmente pertencem a um conjunto bem estabelecido de sorogrupos (O55, O86, O111, O114, O119, O127 e O142), aEPEC estão distribuídas em uma grande diversidade de sorotipos (GOMES et al., 2016a; HERNANDES et al., 2009; INGLE et al., 2016a).

Nos últimos anos, diversos estudos epidemiológicos demonstraram que aEPEC tem sido frequentemente detectada tanto em países industrializados quanto em desenvolvimento (GOMES et al., 2016b; HERNANDES et al., 2009; HU; TORRES, 2015; OCHOA et al., 2008; SAKKEJHA et al., 2013), sendo até mesmo descritos surtos de doença diarreica associados a este patotipo (PARK et al., 2014; VIEIRA et al., 2016). Já a prevalência de tEPEC diminuiu significativamente nestas regiões, com exceção de áreas sub-desenvolvidas, onde este patotipo parece ser ainda uma importante causa de diarreia infantil (IFEANYI et al., 2015; SANTONA et al., 2013; SINGH et al., 2017).

Embora aEPEC seja mais comumente associada com diarreia aguda, casos de diarreia persistente (AFSET et al., 2004; NGUYEN et al., 2006) e até mesmo diarreia com sangue (BIELASZEWSKA et al., 2007) têm sido descritos.

Diferentemente de tEPEC, quase que exclusivamente isoladas de humanos (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002), cepas de aEPEC têm sido frequentemente detectadas em diferentes espécies de animais e seus ambientes (ÁLVAREZ-SUARÉZ et al., 2016; BERALDO et al., 2014; BOLTON; ENNIS; McDOWELL, 2014; COMERY et al., 2013; MARTINS et al., 2013; MARTINS et al., 2016; MONAGHAN et al., 2013; MOURA et al., 2009; OTERO et al., 2013; SANCHES et al., 2017; WATSON et al., 2017), bem como em alimentos (ALONSO et al., 2016; GONZÁLEZ et al., 2017; ZHANG et al., 2016).

Cepas de aEPEC podem apresentar um repertório de virulência bastante heterogêneo, especialmente devido à plasticidade de seus genomas que permitem a aquisição de genes de virulência derivados de outros patotipos de *E. coli* diarreiogênicas ou que causam doenças extra-intestinas (ExPEC) (BANDO et al., 2009; HERNANDES et al., 2009). Deste modo, aEPEC pode carregar genes que codificam adesinas fimbriais e afimbriais (AFSET et al., 2006; GOMES et al., 2011; HERNANDES et al., 2011; SCALETSKY et al., 2009), enterotoxinas (DUTTA et al., 2015; HAZEN et al., 2017a; SILVA et al., 2014), hemolisinas (MAGALHÃES et al., 2011; MURASE et al., 2012; PIAZZA et al., 2013) e uma série de proteínas autotransportadoras (ABREU et al., 2013; ABREU et al., 2016; RUIZ et al., 2014). Adicionalmente, algumas cepas apresentam a capacidade de invadir células epiteliais (PACHECO et al., 2014) ou formar biofilmes em superfícies abióticas (CULLER et al., 2014; NASCIMENTO et al., 2014).

1.2 Lesão A/E e locus of enterocyte effacement (LEE)

O mecanismo central da patogenicidade de EPEC, tanto típicas guanto atípicas, é a habilidade de utilizar proteínas efetoras para a subversão de vias de sinalização na célula hospedeira, especialmente aquelas relacionadas à dinâmica do citoesqueleto de actina, o que permite a adesão aos enterócitos e colonização do trato intestinal por estas bactérias (FRANKEL; PHILLIPS, 2008). A reorganização do citoesqueleto promovido por aEPEC resulta em lesões histopatológicas denominadas attaching and effacing (A/E) (Figura 1), caracterizadas pela destruição das microvilosidades, polimerização dos filamentos de actina e formação de estruturas semelhantes a pedestais, sobre as quais as bactérias permanecem intimamente aderidas (MOON et al., 1983). A capacidade de causar lesões A/E in vitro pode ser verificada pelo teste de FAS (fluorescent actin staining), que detecta o acúmulo de actina polimerizada nos sítios de adesão bacteriana (KNUTTON et al., 1989).



Figura 1 – Lesão histopatológica attaching and effacing (A/E).

(A) Fotomicrografia eletrônica de varredura e (B) eletrônica de transmissão dos pedestais induzidos sob as bactérias aderidas (seta branca) e do apagamento das microvilosidades intestinais (seta preta). Fonte: WONG et al. (2011).

A capacidade em promover lesões A/E no epitélio intestinal é crítica para a patogênese de EPEC, estando este fenótipo associado à expressão de genes contidos em uma ilha de patogenicidade (PAI) cromossômica conhecida como *locus of enterocyte effacement*, ou região LEE (MCDANIEL et al., 1995). A regulação da expressão de LEE é um processo complexo que envolve condições ambientais, *quorum sensing*, além de uma rede de fatores transcricionais e pós-transcricionais (BHATT et al., 2016; FRANZIN; SIRCILI, 2015).

A região LEE é composta por pelo menos 41 genes, divididos em sete operons (Figura 2): LEE1, LEE2, LEE3, LEE4, LEE5, LEE6 e LEE7 (GAYTÁN et al., 2016; MELLIES et al., 1999; SÁNCHEZ-SANMARTIN et al., 2001; YERUSHALMI et al., 2014). De um modo geral, os operons LEE1, LEE2 e LEE3 codificam os componentes de um sistema de secreção do tipo III (SST3), além do regulador Ler (*LEE-encoded regulator*), que controla a expressão dos demais operons de LEE e alguns genes contidos fora dessa região (ELLIOTT et al., 2000; MELLIES et al., 1999). LEE4 codifica as proteínas secretadas EspA, EspB, EspD e EspF, entre outras (ELLIOTT et al., 1998). LEE5 codifica a proteína de membrana externa intimina e seu receptor translocado Tir (DONNENBERG; YU; KAPER, 1993; JERSE; KAPER, 1991; KENNY et al., 1997a). Intimina desempenha um importante papel na adesão íntima à célula epitelial (KENNY et al., 1997a) e diferentes subtipos desta adesina têm sido descritos em aEPEC (FRANCO et al., 2012; XU et al., 2016). LEE6

contém os genes *espG* e *orf1* (DENG et al., 2001) e LEE7 codifica os reguladores GrIA (*global regulator of LEE-activator*) e GrIR (*global regulator of LEE-regulator*) (DENG et al., 2004).



Figura 2 - Estrutura genética da ilha de patogenicidade *locus of enterocyte effament* (LEE) de EPEC.

O SST3 de EPEC, ou injetossomo, é formado por mais de 20 proteínas (**Figura 3**) que, de um modo geral, compõe o complexo fornecedor de energia com atividade de ATPase (EscN, EscL e EscO), o corpo basal (EscC, EscR, EscS, EscT, EscU, EscV e EscJ), a agulha EscF onde ocorre a polimerização dos filamentos de EspA, formando um canal para a secreção de proteínas, além de EspB e EspD, que formam o poro translocador (GAYTÁN et al., 2016).

Análises filogenômicas demonstraram que EPEC compreende diversas linhagens clonais, as quais têm evoluído em múltiplas ocasiões por meio da aquisição de diferentes subtipos de LEE e efetores (HAZEN et al., 2013; INGLE et al., 2016b). O repertório de efetores de EPEC é composto por cerca de 20 a 30 proteínas (DEAN; KENNY, 2009), algumas codificadas por LEE (EspF, EspG, EspH, EspZ, Map e Tir) e outras cujos genes não estão contidos nesta região (*Non-Lee encoded effectors*), como Cif, EspJ, EspM, EspT, NIeA, NIeB, NIeC, NIeD, NIeE, NIeF, NIeG e NIeH (GOMES et al., 2016b; PEARSON et al., 2016; SALVADOR et al., 2014; WONG et al., 2011; XU et al., 2017). Interessantemente, a maioria destas proteínas está envolvida na modulação da resposta imune por patógenos A/E (SANTOS; FINLAY, 2015; PEARSON; HARTLAND, 2014; PEARSON et al., 2016).

Figura 3 – Representação esquemática do sistema de secreção do tipo III de patógenos A/E.



O SST3 é dividido em três partes: componentes citoplasmáticos, corpo basal e apêndice extracelular (agulha, filamento e poro translocador). Fonte: GAYTÁN et al. (2016).

1.3 Modulação da resposta imune por EPEC

A infecção por patógenos A/E geralmente resulta na ativação de uma resposta inflamatória decorrente do reconhecimento de produtos microbianos, como flagelina (KHAN et al., 2008; SAMPAIO et al., 2009; SCHULLER et al., 2009) ou SST3 (LITVAK et al., 2017), pelos receptores de superfície e intracelulares e até mesmo como resultado da adesão íntima (SALAZAR-GONZALEZ; NAVARRO-GARCIA, 2010). Consequentemente, ocorre a ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B), desencadeando a sinalização para a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-8, IL-6, TNF- α e IL-1 β , que culmina na infiltração de neutrófilos (NEURATH et al., 1998).

No entanto, a infecção por EPEC induz pouca inflamação quando comparada a outros enteropatógenos como Salmonella e Shigella (RUCHAUD-SPARAGANO; MARESCA; KENNY, 2007), indicando a presença de uma resposta atenuante. De fato, diversos estudos têm demonstrado que a ativação de NF-KB é diminuída durante o curso da infecção (NOBE et al., 2009; RUCHAUD-SPARAGANO; MARESCA; KENNY, 2007; SAVKOVIC et al., 1997; SHARMA et al., 2006). Estudos posteriores reportaram que a atividade anti-inflamatória era dependente de um SST3 funcional (HAUF; CHARKRABORTY, 2003) e da translocação de efetores para a célula hospedeira, especialmente aqueles codificados fora de LEE, que podem atuar em diferentes etapas da resposta inflamatória (Figura 4) (BARUCH et al., 2011; MUHLEN et al., 2011; NADLER et al., 2010; NEWTON et al., 2010; PEARSON et al., 2011; PEARSON; HARTLAND, 2014; PEARSON et al., 2016; VOSSENKAMPER et al., 2010). Estes efetores não-LEE são altamente conservados entre os patógenos A/E e geralmente codificados por profagos ou ilhas de patogenicidade, sugerindo que a aquisição destes elementos foi necessária em algum ponto da evolução para atenuar a resposta inflamatória ativada pela interação com a célula hospedeira. De fato, uma cepa de EPEC E2348/69 mutante em duas ilhas genômicas (PP4 e IE6) que codificam sete efetores, induziu uma maior resposta inflamatória que a cepa selvagem (NEWTON et al., 2010; PEARSON et al., 2011). Em conjunto, estes estudos indicam que a inflamação produzida por EPEC resultaria do balanço entre as respostas pró- e anti-inflamatórias (SHARMA et al., 2006).

Além da inflamação, os efetores translocados por EPEC também podem modular as vias de sinalização de morte celular (GIOGHA et al., 2014). Estes efetores atuam em conjunto, em diferentes pontos da via, para prevenir a apoptose e promover a sobrevivência da célula hospedeira a fim de manter o nicho de infecção (PEARSON et al., 2016).



Figura 4 – Papel dos efetores de EPEC na modulação da inflamação e apoptose.

Fonte: PEARSON et al. (2016).

1.4 Mecanismos de indução da polimerização de actina por patógenos A/E

Tem sido proposto que a formação de lesões A/E ocorre em quatro estágios distintos: interação inicial com a célula hospedeira, translocação de efetores pelo SST3, adesão íntima mediada pela ligação Tir-intimina e rearranjo do citoesqueleto com formação de pedestal (CLARKE et al., 2003). Consequentemente, há uma expressão coordenada dos genes envolvidos nos diferentes estágios deste processo (LEVERTON; KAPER, 2005). Como exemplo, a montagem do SST3 e translocação de efetores obedece a uma ordem hierárquica e temporal durante o curso da infecção (KATSOWICH et al., 2017; MILLS et al., 2008; MILLS et al., 2013; SHAULOV et al., 2017; YERUSHALMI et al., 2014). A presença ou ausência de pEAF também pode ser correlacionada com diferenças na cinética da formação de lesões A/E (BUERIS et al., 2015).

1.4.1 Fosforilação de Tir (via Nck)

Embora seja um efetor absolutamente requerido para a formação de pedestais, o Tir das cepas canônicas de EPEC (E2348/69) e EHEC (EDL933)

apresentam apenas 40% de similaridade em seus domínios carboxi-terminais e são, portanto, funcionalmente distintos, o que reflete os diferentes mecanimos moleculares empregados por estes patógenos para promover o fenótipo A/E (DE VINNEY et al., 2001). Após translocação e inserção na membrana citoplasmática, o Tir de EPEC é fosforilado por quinases celulares no resíduo de tirosina (Y) 474, localizado dentro de um polipeptídeo de 12 aminoácidos presente no domínio carboxi-terminal desta proteína (CAMPELLONE et al., 2002; KENNY, 1999). Em isolados clínicos, a posição deste resíduo de tirosina pode ser sutilmente modificada devido a pequenas inserções ou deleções. A fosforilação de Y474 propicia a ligação do motivo consenso YPPDEP/D/V com o domínio SH2 (Src homology 2) da proteína adaptadora Nck (non-catalytic region of tyrosine kinase), que por sua vez utiliza seus domínios SH3 (Src homology 3) para ligar aos resíduos ricos de prolina e ativar N-WASP (Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein). A ativação desta proteína estimula a polimerização de actina mediada pelo complexo Arp2/3 (actin-related protein), culminando na formação de pedestais sob os sítios de adesão bacteriana (CAMPELLONE et al., 2002).

1.4.2 EspFU

Em contraste, o Tir de EHEC não possui um resíduo equivalente à tirosina 474, não é fosforilado e, portanto, não se liga a Nck para iniciar a polimerização de actina (DE VINNEY et al., 1999; DE VINNEY et al., 2001). Além disso, o fato de que apenas a região LEE de EPEC poderia conferir o fenótipo A/E quando clonada em uma *E. coli* K-12 indicava que algum outro fator além de Tir era necessário para a formação de pedestais por EHEC (ELLIOTT et al., 1999). De fato, dois estudos independentes, conduzidos quase que simultaneamente, descreveram o elo que faltava entre Tir e a polimerização de actina em EHEC, uma proteína efetora codificada fora de LEE denominada EspFU (CAMPELLONE; ROBBINS; LEONG, 2004; GARMENDIA et al., 2004).

O primeiro estudo baseou-se no fato que muitos determinantes de virulência são codificados por elementos genéticos móveis presentes em bactérias patogênicas e ausentes em comensais (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). A deleção de regiões especificas do genoma de EHEC EDL933 resultou na identificação da ORF Z3072 (PERNA et al., 2001) contida no profago CP-933U (**Figura 5A**), que foi associada com polimerização de actina. Estes autores a identificaram como *espFU*, devido à similaridade com a proteína EspF (CAMPELLONE; ROBBINS; LEONG, 2004). O segundo estudo utilizou dados de transcriptoma, onde a expressão da ORF Z3072 foi reprimida durante o curso da infecção por EHEC EDL933, assim como *eae* e *tir*, indicando um possível papel na patogênese (DAHAN et al., 2004). Análises funcionais de Z3072 confirmou o papel da proteína correspondente, denominada TccP (*Tir-cytoskeleton coupling protein*), na formação de pedestais (GARMENDIA et al., 2004). Deste modo, EspFU e TccP correspondem a duas diferentes nomenclaturas para a mesma proteína. Em EHEC, a expressão de *espFU* é regulada pelo sistema de dois-componentes QseEF (READING et al., 2007) e de maneira pós-transcricional pelos *small* RNAs (sRNAs) GImY e GImZ (GRUBER; SPERANDIO, 2014).

EspFU é composta por uma região amino-terminal que promove sua translocação para a célula hospedeira via SST3 (GARMENDIA et al., 2006), seguida por seis quase idênticos resíduos conservados de 47 aminoácidos, ricos em prolina, que se repetem pela sequência da proteína. Diferentemente de Nck, EspFU não liga-se diretamente a Tir; a ligação entre estes efetores é mediada por proteínas da família I-BAR, como IRSp53 (Insulin receptor substrate protein of 53 kDa) e IRTKS (Insulin receptor tyrosine kinase substrate) (VINGADASSALOM et al., 2009; WEISS et al., 2009). A porção carboxi-terminal dos resíduos repetitivos ricos em prolina (PRRs) de EspFU liga-se ao domínio SH3 de IRSp53 e IRTKS (Figura 5B), que por sua vez ligam-se ao motivo conservado asparagina-prolina-tirosina (NPY₄₅₈) da região carboxi-terminal de Tir (VINGADASSALOM et al., 2009; WEISS et al., 2009). O motivo NPY, assim como Y474, encontra-se dentro de um polipeptídeo de 12 aminoácidos, indicando que estas pequenas regiões contêm a informação necessária para a formação de pedestais por EPEC e EHEC, respectivamente (ALLEN-VERCOE et al., 2006; CAMPELLONE et al., 2002). A interação entre EspFU e as proteínas I-BAR recruta N-WASP, a qual se liga à porção amino-terminal dos resíduos repetidos de EspFU, promovendo sua ativação, que por sua vez recruta e ativa o complexo Arp2/3, culminando na polimerização local de actina (CAMPELLONE; ROBBINS; LEONG, 2004).

Interessantemente, EspFU desempenha suas funções por mimetizar ativadores endógenos, competindo pelos sítios de ligação. Especificamente, EspFU liga-se com maior afinidade ao domínio SH3 de IRTKS do que seus ligantes naturais devido à presença de um resíduo de triptofano entre as repetições em sequência PxxP (AITIO et al., 2012). Similarmente, EspFU desativa o estado autoinibitório de N-WASP ao se ligar com maior afinidade ao domínio GBD (*GTPase-binding*) desta proteína em relação a ativadores endógenos como Cdc42 (*cell division control*) (CHENG et al., 2008). Outra característica importante da atividade de EspFU é a multivalência (**Figura 5B e C**). A presença do domínio amino-terminal e dois PRRs são suficientes para EspFU desencadear polimerização de actina (GARMENDIA et al., 2005). No entanto, um maior número de PRRs é correlacionado com uma atividade potencializada (SALLEE et al., 2008). Portanto, o fato de EspFU apresentar múltiplos PRRs indica que pode se ligar a vários dominios GBD de N-WASP, potencializando o sinal e culminando em maior ativação do complexo Arp2/3 (CAMPELLONE et al., 2008; SALLEE et al., 2008).





(A) Os genes que codificam EspFU (TccP/TccP2) em EHEC (EDL933) estão contidos na extremidade 5' e 3' dos profagos CP-933U e CP-933M. (B) Após translocação para a célula hospedeira, a interação de EspFU com IRTKS/IRSp53 e N-WASP desencadeia a polimerização de actina mediada pelo complexo Arp2/3. A multivalência de EspFU resulta na ativação de muitas moléculas de N-WASP e potencialização do sinal. (C) Representação de um resíduo repetitivo rico em prolina. As regiões destacadas representam os sítios de ligação à N-WASP e ao domínio SH3 de IRTKS/IRSp53. Fonte: GARMENDIA et al. (2004); CAMPELLONE (2010).

Recentemente, foi mostrado que EspFU pode contribuir para a expansão da bactéria pelo epitélio (**Figura 6**), em um mecanismo de motilidade mediado por actina (VELLE; CAMPELLONE, 2017). De acordo com esse modelo, as bactérias aderidas utilizariam os pedestais para o deslocamento até uma célula vizinha, translocando efetores, promovendo a polimerização de um segundo pedestal e, desta forma, expandindo a área de colonização, mantendo-se intimamente aderida ao epitelio. Outra atividade também atribuída a EspFU é a capacidade de romper a barreira *trans* epitelial de células polarizadas, muito devidamente à similaridade com EspF (VISWANATHAN et al., 2004).



Figura 6 – Transmissão célula-a-célula mediada por EspFU.

Após a adesão inicial (1), patógenos AE translocam uma sérei de efetores (2), dentre os quais EspFU, que resulta na formação de pedestais (3). Por meio da motilidade mediada por actina, o patógeno pode atingir uma célula vizinha, translocando novamente efetores (4) e formando um novo pedestal (5), após o qual ocorre a multiplicação (6) e separação das bactérias (7). Fonte: VELLE e CAMPELLONE (2017).

As cepas EHEC O157:H7 EDL933 e Sakai também apresentam um pseudogene (Z1385 e ECs2715, respectivamente) contido no profago CP-933M/Sp4 (**Figura 5A**), que apresenta uma deleção na posição 28, tornando-o inativo. Interessantemente, formas intactas deste gene foram encontradas em cepas de EHEC O157 que não fermentam sorbitol (OGURA et al., 2007). A proteína correspondente apresentou uma porção amino-terminal com 80 aminoácidos 69,5% similar ao respectivo domínio de EspFU, além de PRRs praticamente idênticos. Análises funcionais demonstraram que essa proteína, denominada EspFM ou

TccP2, também foi translocada via SST3 para a célula hospedeira e induziu a polimerização de actina em células epiteliais (OGURA et al., 2007).

Posteriormente, os genes *espFU/tccP* e *tccP2* foram detectados em outras cepas de *E. coli* formadoras de lesões A/E (AEEC) isoladas de humanos e animais, como EHEC não pertencente ao sorogrupo O157 e EPEC, típicas e atípicas, (GARMENDIA et al., 2005; OGURA et al., 2007; OOKA et al., 2007; WHALE et al., 2006; WHALE et al., 2007). Estes genes apresentaram polimorfismos de tamanho, que correspondiam à presença de um número variável (2 a 9) de PRRs (GARMENDIA et al., 2005; OOKA et al., 2007). Interessantemente, os genes *tccP* e *tccP2* foram associados com EPEC das linhagens 2 (WHALE et al., 2006) e 4 (WHALE et al., 2007), respectivamente, sobretudo em cepas que apresentavam Tir contendo Y474 (similar ao de E2348/69), sugerindo a presença de mecanismos redundantes (Tir:NcK e Tir:EspFU) de polimerização de actina. No entanto, não é certo se a habilidade de utilizar ambos os mecanismos para formação de pedestais poderia conferir alguma vantagem competitiva para estas cepas de EPEC.

1.4.3 Vias alternativas

Embora a fosforilação de TirY474 e EspFU sejam mecanismos mais potentes, cepas AEEC também podem empregar vias alternativas de polimerização de actina (**Figura 7**), porém menos eficientes (LAI et al., 2013). Os resíduos Y454 e Y458 são conservados em moléculas de Tir de EPEC e EHEC. A fosforilação destes resíduos pode iniciar a polimerização de actina independentemente de Nck, muito possivelmente mediado pela ligação de proteínas I-BAR ao receptor Tir, embora esse mecanismo não esteja completamente elucidado (BRADY et al., 2007; CAMPELLONE; LEONG, 2005). Isso sugere que a ocorrência de uma via comum de polimerização de actina, que foi potencializada durante a evolução pela aquisição do sítio contendo Y474 no Tir de EPEC e pelo profago codificando EspFU em EHEC. Essa via canônica poderia explicar o fato de uma cepa de aEPEC O125:H6, cujo Tir não é fosforilado e não expressa EspFU, ser capaz de induzir a formação de lesões A/E na mucosa intestinal (BAI et al., 2008). Um mecanismo independente de N-WASP relacionado com a atividade multivalente dos resíduos repetitivos de EspFU também tem sido reportado (VINGADASSALOM et al., 2010).



Figura 7 – Diferentes vias para formação de lesões A/E.

A fosforilação do resíduo de tirosina 474 de Tir é crítico para cepas de EPEC da linhagem 1 (E2348/69) induzirem polimerização de actina mediante o recrutamento de Nck (1). Em EHEC O157, os resíduos NPY458 são necessários para o recrutamento de EspFU (2). As duas vias culminam na ativação de N-WASP e polimerização de actina mediada pelo complexo Arp2/3. O Tir de algumas cepas de EPEC e EHEC não-O157 contém ambos os resíduos, Y474 e NPY458, podendo gerar pedestais por ambas as vias. Outros mecanismos alternativos, independentes de Nck (a e b) e/ou N-WASP (c) têm sido descritos. Fonte: LAI et al. (2013).

Um estudo previamente conduzido por nosso grupo (ROCHA et al., 2011) demonstrou que a introdução de um plasmídeo expressando EspFU em uma aEPEC O88:H-, não aderente a células epiteliais *in vitro*, restabeleu a aderência e capacidade de induzir a polimerização de actina desta cepa. Esses dados interessantes indicaram uma possível participação de EspFU na adesão bacteriana, aspecto ainda pouco abordado na literatura, sobretudo em aEPEC. Além disso, a alta prevalência dos genes *espFU* em determinados grupos de aEPEC, em especial cepas pertencentes ao sorotipo O55:H7 (GARMENDIA et al., 2005), indica que EspFU poderia ser importante para a patogênese deste patotipo. Patógenos A/E podem induzir uma resposta transcricional muito divergente nas células hospedeiras (STEKEL et al., 2005), que pode ser associado às diferentes vias de polimerização de actina utilizadas. Deste modo, a comparação de cepas que utilizam diferentes mecanismos para promover o fenótipo A/E seria extremamente importante para melhor compreender a interação de aEPEC com a célula hospedeira.

Diante do exposto, este estudo teve por interesse explorar o papel desempenhado pela proteína EspFU em aEPEC.

2 OBJETIVOS

2.1 Gerais

Analisar o papel desempenhado pela proteína EspFU (TccP/TccP2) em aspectos associadas à patogênese de aEPEC

2.2 Específicos

- I. Determinar a distribuição dos genes *tccP* e *tccP2*;
- II. Analisar a produção das proteínas TccP e TccP2;
- III. Verificar a contribuição de EspFU na adesão, formação de pedestais e colonização intestinal;
- IV. Comparar os diferentes mecanismos utilizados por aEPEC para indução da polimerização de actina;
- V. Analisar a resposta transcricional da célula hospedeira à infecção por aEPEC.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cepas bacterianas e plasmídeos

As cepas bacterianas e os plasmídeos utilizados no presente estudo estão listados na **Tabela 1**.

Cepas	Descrição relevante	Referência/fonte
Coleção aEPEC (BA)	72 cepas isoladas de crianças com diarreia na Bahia	ABE et al. (2009); BUERIS et al. (2007)
BA320	Cepa selvagem aEPEC O55:H7	ABE et al. (2009); ROCHA et al. (2011)
∆espFU	BA320 mutante em espFU	Este estudo
∆espFU+pEspFU	BA320 mutante em espFU + pEspFU	Este estudo
∆espFU+vetor	BA320 mutante em espFU + pmyc	Este estudo
∆espFU+pTir _{Y-P}	BA320 mutante em <i>espFU</i> + pTir _{Y-P}	Este estudo
∆espFU+pTir	BA320 mutante em <i>espFU</i> + pTir	Este estudo
∆tir	BA320 mutante em tir	Este estudo
∆tir+pTir _{Y-P}	BA320 mutante em <i>tir</i> + pTir _{Y-P}	Este estudo
∆tir+pTir	BA320 mutante em <i>tir</i> + pTir	Este estudo
∆tir+vetor	BA320 mutante em <i>tir</i> + pACYC184	Este estudo
∆∆espFU:tir	BA320 duplo mutante em espFU e tir	Este estudo
ΔΔespFU:tir+pTir _{Y-P}	BA320 duplo mutante em espFU e tir + pTir _{Y-P}	Este estudo
∆∆espFU:tir+pTir	BA320 duplo mutante em espFU e tir + pTir	Este estudo
∆∆espFU:tir+vetor	BA320 duplo mutante em espFU e tir + pACYC184	Este estudo
∆∆espFU:tir+pEspFU	BA320 duplo mutante em espFU e tir + pEspFU	Este estudo
EDL933	Cepa selvagem EHEC O157:H7	WELLS et al. (1983)
E2348/69	Cepa selvagem EPEC típica O127:H6	LEVINE et al. (1978)
UMD872	E2348/69 mutante em espA	KENNY et al. (1996)
DH5α	E. coli K-12 (propagação plasmidial)	Stratagene
BL21(DE3)	E. coli B (produção heteróloga de proteínas)	Novagen
BL21(pETespFU _{BA320})	Clone para produção heteróloga de EspFU _{BA320} -His	MARTINS et al. (2017)
Plasmídeos		
pKD46	Expressa as recombinases do fago λ Red	DATSENKO; WANNER (2000)
pKD3	Contém o cassete de resistência a cloranfenicol	DATSENKO; WANNER (2000)
pKD4	Contém o cassete de resistência a kanamicina	DATSENKO; WANNER (2000)
pCP20	Expressa a enzima flipase (resolução da mutação)	DATSENKO; WANNER (2000)
ртус	Vetor de expressão contendo o epitopo Myc	CAMPELLONE; ROBBING; LEONG, 2004
pEspFU	Gene espFU de BA320 no vetor pmyc	Este estudo
pKC471	Gene espFU de EDL933 no vetor pmyc	CAMPELLONE; ROBBING; LEONG, 2004
pACYC184	Vetor de expressão com baixo número de cópias	CHANG; COHEN (1978)
pEP23 (pTir _{Y-P})	Gene tir de E2348/69 no vetor pACYC184	DE VINNEY et al. (2001)
pTir320	Gene tir de BA320 no vetor pACYC184	Este estudo
pDP151	Expressa a proteína fluorescente mCherry	GRUBER; SPERANDIO (2014)
pGEM-T Easy	Vetor de clonagem	Promega
pET28a(+)	Vetor para produção heteróloga de proteínas	Novagen
pETespFU _{BA320}	Gene espFU de BA320 no vetor pET28a(+)	MARTINS et al. (2017)

Tabela 1 - Características das cepas bacterianas e plasmídeos utilizados neste estudo.

Foram estudadas 72 cepas de aEPEC, previamente caracterizadas como pertencentes a este patotipo pela presença do gene *eae*, ausência dos genes *stx* e do plasmídeo EAF, além da falta de produção da fímbria BFP (ABE et al., 2009; BUERIS et al, 2007; NARA et al., 2009). Todas as cepas foram isoladas de crianças com diarreia durante um estudo epidemiológico realizado na cidade de Salvador (BA) (BUERIS et al., 2007). Os sorotipos, subtipos de intimina e propriedades de virulência destas cepas têm sido previamente determinados (ABE et al., 2009; ABREU et al., 2013; BUERIS et al, 2007; CULLER et al, 2014; ROCHA et al, 2011).

Os cultivos bacterianos foram realizados rotineiramente a 37 °C em meio Luria-Bertani (LB; Difco, Estados Unidos) ou meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) com baixa concentração de glicose (Cultilab, Brasil). Quando adequado, os meios foram suplementados com os antibióticos ampicilina (100 µg/mL), kanamicina (50 µg/mL), cloranfenicol (25 µg/mL) ou estreptomicina (100 µg/mL). Todos os estoques bacterianos foram mantidos a -20 °C ou -80 °C em meio LB acrescido de glicerol (20 a 40%).

3.2 Reações em cadeia da polimerase (PCR) e eletroforese em gel de agarose

As técnicas gerais de biologia molecular utilizadas neste estudo estão descritas em Sambrook et al. (1989) e Ausubel et al. (1987), exceto quando indicado. As reações de amplificação foram geralmente realizadas em termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf, Estados Unidos) ou *ProFlex 3 x 32-well PCR System* (Applied Biosystems, Estados Unidos), empregando-se 10 pmoles de cada oligonucleotídeo iniciador (listados na **Tabela 2**), 2 mM de cloreto de magnésio (Invitrogen, Estados Unidos), 200 nM de dNTPs (Invitrogen), 1 U de *Taq DNA Polymerase Recombinant* ou *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Invitrogen), tampão da enzima 1 X (Invitrogen) e água ultrapura estéril em um volume final de 25 µL. Como DNA molde foram utilizados: 1) lisados bacterianos, obtidos a partir da fervura de uma suspensão de bactérias em água ultrapura estéril; 2) DNA genômico (gDNA) extraído com o *kit illustra*™ *Bacteria Genomic Prep Mini Spin* (GE Healthcare, Reino Unido), segundo as recomendações do fabricante; ou 3) colônias obtidas diretamente do crescimento bacteriano em placas de ágar LB (LBA).
tecb-Pr15-ATGATTAACAATGTTTCTTCACTT-3' tccPartAmplificação de tccPGARMENDIA et al. (2005)tccP.F5'-ATGATAATAGCGATGATTAATTCC-3' tccParAmplificação de tccP2OGKA et al. (2007)tccP.R5'-CACGGACGCGTAGAGGTCGATCA3' trS478-FTipagem de tirOGURA et al. (2007)chuA. 105'-ATAAGTTCAGAGGTCGCACA3' sylaA.105'-ATAGGTACCGAACCAAC3' sylaA.20Quadruplex PCR (filogenia)chuA. 25'-GCGCGCATACCCAAAGACA3' sylaA.205'-AGGTTCACCAAGACCAAC3' sylaA.21Quadruplex PCR (filogenia)chuA.25'-GCGCGATACCCAAAGACCAAC3' sylaA.215'-AAGGTGAGGTCACCAAGACA3' s'-ATGCGTTCACCAGGTCCC-3'CLERMONT et al. (2013)apApaEr5'-AGTTTATCGCAAGGTCACC3' s'-AGGTCATCCCATCCGGCGGCGCC-3' caceK.f5'-AGCGCATATCGCAGGTCCC-3' caceK.fCLERMONT et al. (2013)apAgpEr5'-GACAGTATTCGCAAGACGCC3' s'-CTGCGCCGGTCACGCCCC-3' trpAgpC.15'-GCACGCGCAGTACCCGACGCCC-3' c-CGCCGATAAGAAAAGAATCCCCATGCGAAG-3' c-CGCCGACACGCCGCCC-3' c-CDistinção entre filogrupos A e CtrpAgpC.15'-CGCGCGATAAGAGACTCTTCACC3' s'-CGGCCAACAGCGCGCCCA3' s'-CGGCCGATAAGAACAGCTCTCCC3' s'-TGCCTCGCGCGGAGC3'Controle internotpAgpC.25'-TCTGCCACCGGCCGAAGC3' s'-CGCCACAGCGCGCCCCACGCCGCGCGCGCGCGCCC3' s'-TGCCTCTGAGATGATATTCACCCTGCACAGCGCCAAGCCCTGATCGCACAGCGCGAGCCC ATATGAATATCCACTCGCGCGCGCCCAAGCCCGAGCCCGAGCCCCAGACGCCGAGCCCCAGCGCCGAGCCCCAGCGCCGC	Iniciador	Sequência	Descrição relevante	Referência/fonte
tccP-R15-TCACGAGCGCTTAGATGTATTAATGCC-3'Implificação de tccP2(2005)tccP-R5-TCACGAGCGCTTAGATGTATTAATG-3'Amplificação de tccP2OCKA et al. (2007)tirY474-F5'-CATATTTAGATGAGGTCGCTC-3'Tipagen de tirOGURA et al.tirS478-F5'-TCGTTCAGAATATGGGGAACCA-3'Quadruplex PCR (filogenia)(2005)chuA.15'-TGGTGCCGCGCGGACCAACA-3'Quadruplex PCR (filogenia)(2007)chuA.25'-AATGCGTTCCTCACCTGTG-3'Quadruplex PCR (filogenia)(2013)chuA.25'-AATGCGTTCCTCACCTGTG-3'S'-AATGCGTTCCTCACCTGTG-3'(2013)TspE4C2.2b5'-AATGCGTTCCCCCATCCCTA-3'Distinção entre filogrupos D(2013)ArpA.1r5'-CTCGCCCCGGTACGCAC-3'Distinção entre filogrupos D(2013)ArpAgpE.f5'-GAAAAGAAATGCCCA3'Distinção entre filogrupos A(2013)ArpAgpE.f5'-GCAACGCGGCAGCAGCAG-3'Distinção entre filogrupos A(2013)trpAgpC.15'-AGTATCAGAGCAGCTCTCCC-3'Controle interno5'-ATGCGCGCGAACAGCCCC3'EtrpAgpC.25'-TCGGCCCGGAACACACCTCTCA-3'Controle internoE5'-ATGCCTATGGAACTCCCCACGGCAGCCCGGAACCCC6'-CCEfrabartactCCTCTCAGAGCCTCTGCCCCGGGAACCCACCCGGAACCCCTG6'-CEEfrabartactCCCTCCTGCACCCTGCGCGAACCCCCGTAAC5'-GGAACCCCGGAGCGCTGCTC-3'Controle internoEfrabartactCCCCTGCAGCCCCGGCACCCACGCCGGACCCCCGTAACCCCCCGTAACCCCCCGTAACCCCCCGTAACCCCCCGTAACCCCCCCGTAACCCCCCGTAACCCCCCCGTAACCCCCCGTAACCCCCCCGTAACCCCCCCGTAACCCCCCCC	tccP-F1	5'-ATGATTAACAATGTTTCTTCACTT-3'	Amplificação do tecP	GARMENDIA et al.
tccP2-F 5-ATGATAAATAGCATTAATTCTTT-3' 5-TCGTCGAGGCGCTTAGATGATTATTAT-3' tirY474-F Amplificação de tccP2 OGKA et al. (2007) tirS478-F 5'-CTCGTTCAGAGATATGGGGAATA-3' tirS478-F Tipagem de tir QGURA et al. (2007) chuA.1b 5'-ATAGTTCAGACCACCAC-3' S'-ATGCGTACCCGACAGACCAA-3' ylaA.1b Quadruplex PCR (filogenia) Cultury (2007) spE4C2.1b 5'-CACCATATTCGTAAGGTCATCC-3' S'-ATGCGTATCCGCACAGTCC-3' AceK f Guadruplex PCR (filogenia) CLERMONT et al. (2013) ArpA.1r 5'-CACCATATCGCCAGGTGCC-3' S'-ATGCCTAAGGTCACCGCGCC-3' AceK f S'-ACGCGTATCGCCAGGTCC-3' S'-ATGCCTATCCGCAGGTCC-3' ArpAgpE.f CLERMONT et al. (2013) (2013) ArpApE.f 5'-AGTTTTATGCCAGGTCAC-3' S'-ATGCCTAAGACAAGAATATCCC-3' TrpAgpC.1 Distinção entre filogrupos A e C (2013) trpAgpC.1 5'-AGATTTAACAGCAGCCCACCCC-3' CTCGCCCGCAAAAGACAATTCCCAAGAC-3' TrpAgpC.2 Distinção entre filogrupos A e C (2013) spFucat-1 CCGTCAACCCGGCCGAAG-3' CCGCCCAACCCGCCCGCGGCGGAAG-3' TrbAgA.7 Controle interno Este estudo s'-ATGATTAACAATGTTCTTAACGCTGCCGAAG-3' TrbAgA.7 S'-CACCGGGCCTTAGATGTATTATGCCATG S'-CACCGGGCCCTGGCGGGAAG-3' CCTTGCGAACGCCGCCCGCGCGGGGGTTATTACAAGCCTGT ATGGAATATCCCTCTTAG-3' S'-GCACCGAGGCCTTAGATGTATCACCCCCCCCCCGTG ATATGAATATCCCTCCTTAG-3' S'-GCCGCAAGTCCGAGGCGCTTAGATGTACCATG TrAGGCTGAAGCCGCGCGCGGGGGTTATTACCACTG' CCTATGGAATCCCGCCGGCGGGGTTAGATGTCC-3' Kta Amplificação do cassete de kanamicina (interno) <t< td=""><td>tccP-R1</td><td>5'-TCACGAGCGCTTAGATGTATTAATGCC-3'</td><td>Amplificação de ICCF</td><td>(2005)</td></t<>	tccP-R1	5'-TCACGAGCGCTTAGATGTATTAATGCC-3'	Amplificação de ICCF	(2005)
tccP-R5-TCACGAGCGCTTAGATGTATTAAT-3'Timpinitaduo de teor 2Control di (2007)tirS474-F5'-CTGTTCAGATATTGGGGGATA-3'Tipagem de tirQGURA et al.tir-R5'-TAAAAGTTCAGATCTTGATGACAT-3'Quadruplex PCR (filogenia)chuA.1b5'-ATGGTACCGAGGACCAAC-3'Quadruplex PCR (filogenia)chuA.25'-TCGCGCCAGTACCAAAGGCA-3'yjaA.1b5'-ATAGGTTCCTCAACCTGTG-3'TspE4C2.2b5'-AGTTTCGTAAGGTCATCC-3'TspE4C2.2b5'-AATGGTAAGGGTCATCC-3'LERMONT et al.7pAgbE.15'-CTCTCCCCATACCGTACGTA-3'Distinção entre filogrupos DArpAgpE.15'-GGATCCATCTGTGCAGGCG-3'Distinção entre filogrupos AtrpAgpC.15'-AGTTTAGAAGATTCCCAAGGA-3'Distinção entre filogrupos AtrpAgpC.15'-CGCGCGATAAAGAAAAACAAGACTTCTCA-3'Controle interno5'-ATGGTAACCGCGGCAGGCCC-3'Controle interno5'-ATGGTAACACGCGCATGCCGGAA-3'Distinção de espFUEspFucat-1CCGTCAACCCGCAGTGCACGTATATGTGCGCTCAACCCGCGCATTGGCAGAGCGTAAATCCCMutação de espFUEspFucat-2CTCTGCAAAGCGCGGGTGGTCT-3'Tirkan-1AATGGAATGATCCCTAG-3'S'-GGATCCCAGGCGTGGGGGTTATCGCAACCCTGTMutação de tirEspFucat-2CTCTGCAAGCGCGGGGGGTTATCGCAACCCAGTirkan-2TATTGAACAGGCAATGAATCCCCharGGAAGTCCCGAGGCGTTAGATGCC-3'Mutação do cassete de kanamicina (interno)S'-GGACCCCGGAGCCTATGATTAACAGCG'Clonagem/complementação de EspFUS-GGAAGCCCGAGGCGTTAGAATGATCC-3'Clonagem/complementação de EspFUCharGGC35'-GGCCCGAGGCGCTAGAAGGCGATTATACAAGCG'' CATTTGAATAAT	tccP2-F	5'-ATGATAAATAGCATTAATTCTTT-3'	Amplificação de tccP2	OOKA et al. (2007)
tirY474-F 5'-CATATTATGATGAGGTCGCTC-3' tirS478-F 5'-TCTGTCAGAATATGGGGAATA-3' Tipagem de <i>tir</i> OGURA et al. (2007) chuA.1b 5'-ATGGTACCGGAGGAACCAAC-3 ylaA.1b 5'-CACGGCACGAAGCAACCAAC-3 ylaA.2b 5'-GACTGATGCGTGAGGAGCAAC-3' ylaA.2b 5'-CACTATTGGTAAGGTCATCC-3' TspE4C2.2b 5'-CACTATTGGTAAGGTCATCC-3' TspE4C2.2b 5'-CACTATTGGTAAGGTCATCC-3' TspE4C2.2b 5'-CACTATTGGCAGGGTCGC-3' AceK.f 5'-AACGCTATTCGCCAGGGTCGC-3' ArpAgpE.f 5'-GATTCCATCTGTGCAGGAG-3' phyAgpC.1 5'-CATTCCACCGTGCGGGTCGC-3' CLERMONT et al. (2013) ArpAgpE.f 5'-GATTCCATCTGTGCAAGGTGCA-3' trpAgpC.1 5'-GATAGGTCACCGCA-3' trpAgpC.1 5'-GATAAGAAAAAGAATTCCCAAGGAG-3' trpAgpC.1 5'-GATAAGAAAAAAGAATTCCCAAGGAG-3' trpAgpC.1 5'-GATAAGGAAAAAGAATTCCCAAGGAG-3' trpAgpC.1 5'-GATAAGGAAAAAGAATTCCCAAGGAG-3' trpAgpC.2 5'-TCTGCGCCGGTCACCGCC-3' CCTTCGCCCCGATAACGGCTGCCGCA-3' Controle interno 5'-GCGGGATAAAGAATTCACAGTGTTTTATCGCAAGGAG-3' trpAgpC.1 CCTCTCCAACGCGCCCCAGCGTGAGGAG-3' trpAgpC.1 5'-GCGGGATAAAGAATTCCCAAGGCGCTAATGTG TAGGCTGGAGCTGCTCC-3' CCTTCGCAGAGTGCTCCCAGGCCGAG-3' trpAgp.2 5'-CTGGCGCGCTGGCGGAG-3' 5'-GCGGGCGCTCCGGCGCAAGCGTGAGCC ATATGAATATCCTCCTTAG-3' S'-TCGCCGCGACTGCCCCAGCCGTGAGGCAAGGC Tirkan-2 TATCACAGCGCCTATTACTGCTGCACGCC Kt 5'-CGGGCCCCCGGCTGGTGGGCTTATTCGATG Tirkan-2 5'-CGGGGCCCCATTGGCTGCACACGCC Kt 5'-CGGGCCCCCGGCGGGTGGTGGCTTATCGAG K2 5'-CGGTGCCCCGAGCGCTTAGCAGGTCTTATCGAG K2 5'-CGGTGCCCTGAAGACGCTATTACTGCCCCCCCGTTAAC K2 5'-CGGTGCCCCGAGCGCTTAGATTACCC Tirkan-2 7ATTCACAGCGCTATTACTGCTCGCCCCCGTTAAC K2 5'-CGGTGCCCCGAGCGCTTAGCATTACTGCT K2 5'-CGGTGCCCCGAGCGCTTAGATTACTGC K4 5'-CGGGCCCCCCGAGCGCCTAGATTACTTGGTAATCTCC Conagem/complementação de EspFU BamHI-R GCC-3' TirO04+ 5'-CGGGACTCCGAGGCCTTAGATTATCGC Conagem/complementação de Tir (2011) Este estudo CCATTTTGG-3' Sequenciamento de <i>tir</i> Sequenciamento de <i>tir</i> Este estudo	tccP-R	5'-TCACGAGCGCTTAGATGTATTAAT-3'		
tirS478-F 5'-TCTGTTCAGAATATGGGGAATA3' Tipagem de <i>tir</i> (2007) chuA.1b 5'-ATGGTACCGGACGAACCA3' Quadruplex PCR (filogenia) chuA.2 5'-TGCCGCAGTACCAAAGACA-3' yjaA.2b 5'-CAACGTGAAGGTGTCATGAGGA-3' yjaA.2b 5'-CAACGTGAAGGTCATGAGGAGGA-3' TspE4C2.2b 5'-AGTTTATCGCTGGGGTCGC-3' ArpA1r 5'-TCTCCCCATACGTAAGGTCATCC-3' TspE4C2.2b 5'-AGTTTCCCCAACGTGCGGAGGA3' bistinção entre filogrupos D ArpAgpE.f 5'-GAATTCCCATCTTGTCAAAATATGCC-3' trpAgpC.1 5'-AGTTTCACCCGGGCGCGAGG-3' Distinção entre filogrupos A trpAgpC.2 5'-TCTGCGCCGGGTCACGCGGAGG-3' Distinção entre filogrupos A trpAgpC.2 5'-TCTGCGCCGGGTCACGCGGAG-3' Distinção entre filogrupos A trpAgpC.2 5'-TCTGCGCCGGCGAAGGA3' Controle interno 5'-ATGATTAACAATGTTTCTCAAGCTGTATATGTG TAGGCTGGAGCGGCTTAGAGTGTTATATGTG TAGGCTGGAGGAGTGTTCC-3' Controle interno 5'-ATGATTAACAATGTTTCTTAAGCCATGTATTATGTG TAGGCTGGAGGTGCTTC-3' trikan-1 AATGTGAATATCCACTGCAGAGGGCC ATATGAATATCCACTTGGTAAATCCCC Tirkan-1 AATGTGGAATAATCACCTGTATATGTG TAGGCTGGAGGCGCTTGGCGCGAAG-3' kt 5'-CGGGACCCGGCCTGGCGGGGTATTCGAAG Kt 5'-CGGGACTCCGGGCGTGGGTTATCGCAGG kt 5'-CGGGCCCCGATGAATCCCCATGGACGCC Kt 5'-CGGGGACTCCGGGAGAACGCTGTACCCCCCCCGTTAAC Kt 5'-CGGGACTCCGGAGCGCTGGGCTTATCGAAG Kt 5'-CGGGCACTCAGGCCGATGAACTGC-3' kt 5'-CGGGCACTCCGGAGAACGCTGGTTCCCCCCCCGTTAAC Tirkan-2 TATTCACAGCGCTTGATGAACTGC-3' kt 5'-CGGGCACTCCGGAGCGCTGGGCTGATTACGACGCG Kt 5'-CGGGCACTCCGGAGAGACGCTGGATGAACTGC-3' kt 5'-CGGGAATCCCGAGAGAGCTGATTCACCCCCCCGTTAAC TirKan-2 5'-CGGGAATCCCGAGGAGAGAGATTATTCGAAG CCATTTTGCAAGCGCCTATGAACTGC-3' kt 5'-CGGGCACTCCGAGGAGAGACGCTGAGTGGATGACTGC-3' kt 5'-CGGGCACTCCGAGAGAGACGCTAGAGAGCG-3' triC04+ 5'-CGGGAATCCCGAGGCGCTAGAGAGAGAGATTATTCGC CATTTGG-3' CDATSENKC); WANNER (2000) CAMPELLONE; ROBBINS; LEONG (204) DE VINNEYet al. (2011) trSeq.F 5'-TGGGAGATCTCGCGAGGCGCTATGAGCG-3' triSeq.F 5'-GGGAGGATCTTGAAGGAGAGACGC-3' triSeq.F 5'-GGGAGGATCTTGAAGGAGAGCG-3' triSeq.F 5'-GGGAGGATCTTGGCGCTATT-3' Sequenciamento de <i>tir</i> Este estudo	tirY474-F	5'-CATATTTATGATGAGGTCGCTC-3'		OGURA et al
tir-R 5'-TAAAAGTTTCAGATCTTGATGACAT-3' (LCOT) chuA 1b 5'-ATGCTACCGAGCAACCAACA-3' Quadruplex PCR (filogenia) chuA.2 5'-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3' Quadruplex PCR (filogenia) yjaA.1b 5'-CAACCGTGCAGTCCAACGTG-3' TspE4C2.1b 5'-CATTATCGCTGCCGGCGCCGCCGC-3' AceK.f 5'-AACGTATTCGCCAGCTTGC-3' ArpAgpE.f 5'-GATTTCCATCTTGTCAAAGATCACGCT-3' Distinção entre filogrupos D ArpAgpE.f 5'-GATTTTCCACCTTGCCAAGGGA-3' e E trpAgpC.1 5'-GGCCGCATACCGCAGCCC-3' Distinção entre filogrupos A trpAgpC.2 5'-TCTGCGCCCGGTCACGCCC-3' e C trpAgpC.1 5'-GGCAACCGCGGCCCAGGCCC-3' e C trpAgpC.1 5'-GGCAACCGCGGCTGCCGCGAG-3' Distinção entre filogrupos A trpAgpC.2 5'-TCTGCGACCGCGATACACACGCTGACGCAG-3' Controle interno trpAgpC.1 5'-GGCAACCGCGATAATGACATGTATTACGCCTG Mutação de <i>espFU</i> Este estudo EspFucat-1 CCGCAACGCGATTAATCACGTGTAATCCC Mutação de <i>espFU</i> Este estudo 5'-GGCCTGGAACGCCTTAGACTGCAACCTGGACGAACGCG Mutação do cassete de kanamicina (interno) DATSENKO; k2 5'-CGGGGACTCCCGAGACGCAGATTACCC3' Amplificação do cassete de kanamicina (intern	tirS478-F	5'-TCTGTTCAGAATATGGGGAATA-3'	Tipagem de <i>tir</i>	(2007)
chuA.1b 5'-ATGGTACCGACGAACCAAC-3' Quadruplex PCR (filogenia) yijaA.1b 5'-CAAACGTGAAGTGTCAGGAG-3' yijaA.2b 5'-CACTATTCGTACCAAAGCTGTC-3' TspE4C2.2b 5'-CACTATTCGAGGCACCC-3' AceK.f 5'-AACGCTATTCGCAGGCTGC-3' AcpA.1r 5'-TCTCCCCATACGGTAGCC-3' ArpAgpE.f 5'-GATTCCATCTTGTCAAAGATATACCC-3' trpAgpC.1 5'-GATTCACCATCCTGCGGGGCGC-3' trpAgpC.1 5'-GACGCGGTCACCGCC-3' trpAgpC.1 5'-GACGCGGTCACCGCC-3' trpAgpC.1 5'-GACGCGGTCACCGCCC-3' trpAgpC.1 5'-GATTCACCATGTTCACCCAGGCGAG-3' trpAgpC.1 5'-GGACGCGGCGCAG-3' trpAgpC.2 5'-TCTGCGCGGCGAAG-3' trpAgpC.1 5'-GGACGCGCGCCGCGGGGGAG-3' trpAgpC.1 5'-GGACGCGGCGCGCGGGGGAG-3' trpAgpC.2 5'-TCTGCGCGGCGAAG-3' trpAgpC.1 5'-GGACACGCCGGCCCGCGCGGGGAG-3' trpAgpC.1 5'-GGCGGTAAGGACATCTTCAC-3' trpBA.f 5'-CGGCGGTAAAGACATCTTCAC-3' trpBA.r 5'-GCGACACGCGCGCTGGCGGAAG-3' COntrole interno 5'-TCTGCAACCGCGATATTTACAGCTGTATATGTG TAGGCTGGAGCTGCTTC-3' S'-TGCCTAACGGCGGTTAGTGTTTATATGCCATG Trkan-1 AATGTGAATATTCATTTGGTCATTATCCC Trkan-1 AATGTGAATATTCATTCGCCTGTGGGGGGGTTATTCGAAG Trkan-2 TATTCACAGCGCGCTGGGGGGGTTATTCGAAG Kt 5'-CGGGACCCCGGAGCGCTGGAGCC3' kt 5'-CGGGACCCCGGAGGCGGTGAAGC-3' kt 5'-CGGGACCCCGGAGGCGTTAACGACGCCGGTGAGCC Kt 5'-CGGGACTCCCGAGAGAGCGCTTACC-3' kt 5'-CGGGACTCCCGGAGGCGTTAACGCGCCCGGGGGGTTATTCGAAG frican-2 TATTCACAGCGCGTGGATGATC-3' kt 5'-CGGGACTCCGGAGGCGTTAACGACGCG-3' kt 5'-CGGGACTCCGGAGGCGTTAACCGCG-3' kt 5'-CGGGACTCCGGAGGCGTTAACGAGGGGCTATATTAGC CACTTTTGC-3' kt 5'-CGGGACTCCGGAGGAGGATTATACGCCCGGCGCGGGGGGTTATTAGGCGAGGCG-3' kt 5'-CGGGACTCCGAGGGGCTTAGACTGC-3' kt 5'-CGGGACTCCGAGGGGCTTAGGCGAAGGGGCACGCG-3' kt 5'-CGGGACTCCGAGGGGCTTAGGCGAAGGACG-3' kt 5'-CGGGACTCCGGAGGACGCTTAGGACGGC3' kt 5'-CGGGACTCCGGAGGACGCTTAGGAAACG-3' kt 5'-CGGGCCCCGGAGGCGTTAGGGAAAGG-3' kt 5'-CGGGACTCAGGAGAGGGAGAATTTAGCC CACTTTTGG-3' kt 5'-CGGGACTCAGGAGAGGCCTAAGGAAACG-3' kt 5'-CGGGACTCAGGAGAGGCCTAGGCCGACGC-3' kt 5'-CGGGACTCAGGGAGGAGGCTTAGGCGA-3' kt 5'-CGGGACTCCGGAGGAGGACGCTTAGGCGCG-3' kt 5'-CGGGACTCAGGAGAGGCCTAGGCCG-3' kt 5'-CGGGACTCCGGAGGAGGCTTAGGCGAACG-3' kt 5'-CGGGACTCCGGAGGACGCTTAGGCGCG-3' kt 5'-CGGGACTC	tir-R	5'-TAAAAGTTCAGATCTTGATGACAT-3'		(2007)
chuA 2 5'-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3' yjaA.2b 5'-AAACGTGAAGGAGGTGCAGGAG-3' yjaA.2b 5'-AATGCGTTCCTCAACCTGTG-3' TspE4C2.2b 5'-AGTTTATCGCTAAGGTCATCC-3' AceK.f 5'-AACGCTATTCGCCAGCTGCCGC-3' ArpAgpE.f 5'-GATTCCATCCTTGTCAAAATATGCC-3' ArpAgpE.r 5'-GATACCATATTCGCCAGGCGAG-3' trpAgpC.2 5'-TCTGCGCGGTCACGCCC-3' trpBA.r 5'-GCGCGATAAAGAAAAGAATTCCCCAGTGGCGA-3' trpBA.r 5'-GCGACCCGCCCTGGCGAG-3' EspFucat-1 CCGTCAACGCCCGTCACGCCC-3' EspFucat-1 CCGTCAACGCCTGCCGAGGCGAG-3' Tirkan-1 AATGTGATAATTCACTCCTTGTCAACGCTGATCGCATAATGCCC TrkRan-1 AATGTGATAATTCAATCGCTGTGGGGTTAACGCCCGTTAAGGCCGATGGCGAGG-3' kt 5'-CGGGGACTCCGCGGGGGGGTTAACGCCCGCTGGCGAGC-3' EspFUcat-2 CTCTGCAAGCGCGCTGGCGAGC-3' trkRan-2 TATTCACACGCTGCTCGC-3' kt 5'-CGGGGACTGCTCGC-3' kt 5'-CGGGGACTGCTGC-3' kt 5'-CGGGGAATCCCGGAGGCGCTTAACGCCGCTGGCGGGGTTAACGCCGCTGGCGGCTG-3' trkAn-2 TATGAATATCCTCCTTAG-3' S'-GGATCCCGGCGCTTGGGGGTTATTCGAAG trkAn-2 TATGCATATCGCCGGTGGCG-3' kt 5'-CGGGGACTCGCTGGACG-3' kt 5'-CGGGGACTCCCGAGGGCTTAACGCCGCCGCTGACGCGCCGCTGGCGGGGGCTTAACGCGCGCTGG-3' kt 5'-CGGGGACTCCCGATGAATCTC-3' kt 5'-CGGGGACTCCCGATGAATCC-3' kt 5'-CGGGGATCCCGAGGGCGTTAACGCGCCGCCGCCGGGGGGTTAACGCGCGCCTGGGGGGTTACGCGCGCCGCCGGGGGCTTAACGCGGCCGCCGCCGGGGGGCTTAACTGCCCCCCCC	chuA.1b	5'-ATGGTACCGGACGAACCAAC-3'	Quadruplex PCR (filogenia)	
yjaA.1b 5'-CAAACGTGAAGTGTCAGGAG-3' yjaA.2b 5'-AATGCGTTCCTCACCCGTG-3' TspE4C2.2b 5'-AGTTATCGCTGCGGGTCGC-3' AceK.f 5'-AACGCTATTCGCCAGCTGC-3' ArpA.1r 5'-TCTCCCCCATCCGTACCGTA-3' ArpAgpE.f 5'-GATTCATCTGCCAGAGCTA-3' ArpAgpC.1 5'-GATTCATCTGCCAGAGG-3' trpAgpC.2 5'-TCTGCGCCGGTCAGCCG-3' c trpAgpC.2 5'-TCTGCGCCGGTCAGCCG-3' bistinção entre filogrupos A e C trpAgpC.1 5'-GATAAAGAAAAGAATTCCCAAGAG-3' trpBA.f 5'-CGGCGATAAAGACATCTTCAC-3' Controle interno 5'-ATGATTACCATGTTCCGCCGGGAGAG-3' Controle interno 5'-TCACGAGCGGCTTGGCGGAAG-3' Controle interno 5'-TCACGAGCGGCTTGGCGGAAG-3' Controle interno 5'-TCACGAGCGCCTTGGCGGAAG-3' Controle interno 5'-TCACGAGCGCCTTGGCGGAAG-3' Controle interno 5'-TCACGAGCGCCTTGGCGGAAG-3' Controle interno 5'-TCACGAGCGCCTTGGCGGAAG-3' Controle interno 5'-TCACGAGCGCCTTGGCGGAAG-3' Controle interno 5'-TCACGAGCGCCTTGGCGGAAG-3' Controle interno 5'-TCACGAGCGCCTTGGCGGAAG-3' Controle interno 5'-TCACGAGCGCCTTGGCGGAAG-3' Controle interno 5'-TCACGAGCGCCTTGGTGGGTATTCGCATG Trikan-1 AATGTGAATATTCCACTGGTCATAATCCC Trikan-2 TATTCGACAGCGCCTGGTGGGGTTATCGAAG Kt 5'-CGGGTCCCCGCATGAGTGGGGTTATCGAAG kt 5'-CGGGATCCCGACGGCGCTGGGGGTTATCGAAG kt 5'-CGGGATCCCGACGGCGCTTGGAGGTATTCGAAG tricag-7 5'-CGGGATCCCGAGCGGCTTAGATGATTATGGC TirtO04+ 5'-GGCGACACTGAGGAGAAGGAGGACGC-3' TirtO05- 5'-CGGCGCACAGGCGCTTAGCAGGAGGACG-3' TirtO05- 5'-CGGGATCCCGAGCGGCTTAGATGATTATGGAAGGAGAAGGAGGACG-3' TirtO05- 5'-CGGGATCCCGAGCGCTTGGAGGTATTCG-3' K2 5'-CGGGATCCCGAGGGCTTAGATGATTATGGC CAMPELLONE; CGCGGATCCCGAGGGCTTGGAGGTATTCATCG Clonagem/complementação de Tir (2011) Este estudo CAMPELLONE; COBBINS; LEONG (2004) CAMPELLONE; COBBINS; LEONG (2004) CAMPELLONE; COBGCOCACGGCTGGAGGACGC-3' TIFO05- 5'-CGGCGGATCTAGGAAGGAGGACG-3' TIFO05- 5'-CGGGATCCCGAGGGCTTAGATGTATTAT CCCGGGATCCCGAGGGCTTAGCC-3' LEONG (2004) CAMPELLONE; COGGCGCCCGGGATATTCGACGGCCC-3' TIFO05- 5'-CGGGATCCCGAGGGCTTAGCC-3' Clonagem/complementação de Tir (2011) Este estudo	chuA.2	5'-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3'		
yjaA.2b 5'-AATGCGTTCCTCAAQCTGTG-3' TSpE4C2.2b 5'-AGTTTATCGCTAAQGTCATCC-3' TspE4C2.2b 5'-AGTTTATCGCCAGGTGCG-3' AceK.f 5'-AACGCTATTCGCCAGGTGC-3' ArpAgpE.f 5'-GATTCATCGTTGTCAAAATTATGCC-3' ArpAgpE.r 5'-GAAAAGAAAAAGAAATTCCCAAGAG-3' trpAgpC.1 5'-AGTTTTATCGCCAGTGCGAG-3' trpAgpC.2 5'-TCTGCCGGTCACGCCC-3' 5'-GCAACGCGGCTGCGGGAAG-3' Controle interno 5'-ATGATTAACAATGTTCTCAC-3' Controle interno 5'-ATGATTAACAATGTTCTCAC-3' Controle interno 5'-ATGATTAACAATGTTCTCAC-3' Controle interno 5'-ATGATTAACAATGTTCTCAC-3' Controle interno 5'-ATGACTGAGGCTGGTGGTAATGTG TAGGCTGGAGGCTGGTCTC-3 5'-TCACGAGCGCCTTGGCGGAAG-3' Controle interno 5'-TCACGAGCGCCTTGGCGGAAG-3' Controle interno 5'-TCACGAGCGCCTTGGCGGAAG-3' Controle interno 5'-TCACGAGCGCCTTGGCGGAAG-3' Controle interno 5'-TCACGAGCGCCTTGGTGGTATATGTG TAGGCTGGAGGCTGCTTC-3 5'-TCACGAGCGCCTTGGTGGTTATTCGAAG Tirkan-1 ACTGGATAATTCATTCCTCCTGCACCGTATA Tirkan-2 TATTCACAGCGCGTTATCGGAGC TIrkan-2 TATTCACAGCGCGTATTCGAAG K2 5'-CGGGCCCCGAATGAATCTGC-3' K2 5'-CGGGCCCCGAATGAATCGC-3' K2 5'-CGGGCCCCGAATGAATCGC-3' K2 5'-CGGCCACATCCGATGGAATCC-3' K2 5'-CGGGCCCCGAATGGAATCC-3' K2 5'-CGGGCCCCGAATGAATGACTGC-3' K4 5'-CGGCCCAGATCCGATGGAATCC-3' CATTTGCAATCCCGATGGAATCC-3' CATTTTCC-3' CCGCGCACATCCGATGGACTGC-3' CATTTTCC-3' CATTTGC-3' CAMPELLONE; CACTTTTCC-3' CAMPELLONE; CACTTTTCC-3' CCGGGATCCCGAGGCGCTTAGATGTATTAATGCC Tirt004 5'-CGGCGCACGAGCGCTTAGATGTATTAATGCC Tirt05- 5'-CGGGATCCCGAGGCGCTTAGATGATTAATGCC TATTGG-3' CAMPELLONE; CACTTTTCC-3' CAMPELLONE; COGGGATCCCGAGGCGCTTGGAAGGAAGCG-3' CAMPELLONE; COBBINS; LEONG (2004) CAMPELLONE; COCGGGATCCCGAGCGCTTGGAAGGAACG-3' CONPelLONE; COCGGATCCCGAGCGCTTGGAAGGAACG-3' COCGCCACGGACTCCCGAGCGCTTAGAAGGAGGACG-3' CAMPELLONE; COCGCCACGGACTCCGGAGCGCTTAGAAGGAGCG-3' COCGCCGGATCCCGGAGCCTGGAAGGAACG-3' COCGGACTCCGGAGCCTGGCGCTAGATGCC-3' COCGCGACTCCGGAAGGCGCTAGACG-3' COCGCCGCCGGGATCCCGGGCCTGGCGCATTT-3' COCGGACTCCGGGACTCCGGGCCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG	yjaA.1b	5'-CAAACGTGAAGTGTCAGGAG-3'		
TspE4C2.1b5'-CACTATTCGTAAGGTCATCC-3'TspE4C2.2b5'-AGTTATTCGCTGCGGTGCGC-3'AceK.f5'-AACGCTATTCGCCAGCTGCGC3'ArpA,1r5'-TCTCCCCCATACCGTACGCTA-3'ArpAgpE.f5'-GATAAGAAAAGAATTCCCAAGAG-3'ArpAgpC.15'-GAAAAGAAAAGAATTCCCAAGAG-3'trpAgpC.15'-AGTTTTATGCCCAGTCGCGC-3'Distinção entre filogrupos AtrpAgpC.15'-CTGCGCCGGCGCGGCGGAAC-3'trpAgpC.15'-CGGCGATAAAGACATCTTCAC-3'trpAgr.15'-CGGCGATAAAGACATCTTCAC-3'trpBA.r5'-GCAACCGCGCCTGGCGGAAC-3'CCTTGCACCGGCCCTGCCGCGAAC-3'CCGTCAACCGCCCTTC-3'S'-ATGATTAACAATGTTCTTCACTTTCAC-3'CCTCTGCAAGATGCTGCACCAGACGCTGAGCCATATGAATATCCTCCTTAG-3'S'-ATGCCTATTGGTAATTCGCCATGS'-ATGCCTATGGTAATTCGCCCTGGCGGTAAGCGCCTGAGCCTirkan-1AATGTGAATAATCCATTCGCCCTTGGCGCTTAACTCCCTirkan-2TATCCACGAGCGCGCTTGGGTTATTCGACGTirkan-2TATCCACGGCGCCTGGATGAATCC-3'ktS'-GGGCCCCGAGGGCTTAACTCCC3'KtS'-GGGCCACAGTCGATGAATCC-3'KtS'-GGGCGACCCGAGGCGCTTAGATGATTAATGCCCCCCCGTAACCACTTTTCC-3'CCG3'CLCGGAATTCCATATGGTATACCCC3'Chargem/complementaçãoGCC3'CCGCGGATCCCGAGGCGCTTAGATGATTAATGCCCCGGAACCCGAGCGCTGAGAGCACGC3'S'-GGCGGATCCCGAGCGCTTAGATGATTAATCCCGGCCGCGGGCTAGAAGGAGAACGA3'CCCGGCCTGGATATATTAGCCCA3'CCCGGCCTGGATATATTAGCCCA3'CCGCGCGCGGCGGCGGCTAGAGCGCA3'CCCGGCCGCGGGCTAGAAGGAGAACGA3'	yjaA.2b	5'-AATGCGTTCCTCAACCTGTG-3'		
TspE4C2.2b 5'-AGTTTATCGCCGGGTCGC-3' CLERMONT et al. (2013) Acek.f 5'-ACCCATACCGTACCGTAGCCA' (2013) ArpAgpE.f 5'-GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC-3' bistinção entre filogrupos D ArpAgpC.1 5'-AGTTTATGCCCAGTGCGAG-3' Distinção entre filogrupos A trpAgpC.1 5'-AGTTTATGCCCAGTGCGAG-3' Distinção entre filogrupos A trpAgpC.2 5'-TCTCGCGCGGTCACGCCC-3' e C TspEAr 5'-GGCGGATAAGACATGTTCAC-3' Controle interno trpBA.r 5'-GGCGAATAAGACATGTTCACCAGCGGGCAGAG-3' Distinção entre filogrupos A EspFucat-1 CCGCGCAATAAGACATGTTCCCAA EC S-ATGATTAACAATGTTTCTTCACATATGTG Mutação de espFU Este estudo EspFucat-2 CTCTGCAAGCGCGCTGGTGGGGTTATTCGAAG Mutação de tir Este estudo Tirkan-1 AATGGAATATCCTCCTTAG-3' Mutação do cassete de kanamicina (interno) DATSENKO; kt 5'-CGGGCCACAGTCGATGAATCC-3' Amplificação do cassete de kanamicina (interno) CAMPELLONE; EspFUNdel-F C-CGGGATTCCAGACAGGCTTAGATGTATTATGCC Clonagem/complementação de EspFU CAMPELLONE; EspFUBamHI-R 5'-GGGGATCCCGAGGAGAGGAGAATTTAGCC Clonagem/complementação de Tir C2001)	TspE4C2.1b	5'-CACTATTCGTAAGGTCATCC-3'		
Acek.f. ArpA.1r5'-AACGCTATTGGCCAGCTGC-3' S'-CTCTCCCCATACCGTACCGTACGCTA-3' (2013)CLERMONT et al. (2013)ArpA.1r5'-CTCTCCCCATACCGTACCGTACGCTA-3' ArpAgpE.fDistinção entre filogrupos D e E(2013)ArpAgpE.r5'-GATTACACTTTGCCAAGAGC-3' S'-ATGATTATGCCCAGTGCGGCGGAG-3'Distinção entre filogrupos A e Ce CtrpAgpC.25'-TCTGCGCCGGCGGCGGAGG-3' S'-GCAACGCGCGCTGGCGGGAGA-3'Distinção entre filogrupos A e Ce CtrpAgpC.25'-TCTGCGCCGGCGGGAGA-3' S'-ATGATTAACAATGTTTCTCAC-3' S'-ATGATTAACAATGTTTCTCACCTTTACCAC-3' S'-ATGCATATACACGCGCTTGCACCAGACGCTGAGCC ATATGCAACGCGCGTGCGCCGCAGCGCGCGCGCGGGCGCGAGCC ATATGCAACACGCTGCACCAGACGCTGAGCC ATATGCAACAATGTTCACTCCTCCTGCACCAGA S'-ATGCCTATTGGTAATCCCCCCCCCGGTGAGCGCACGAGCGCTGAGC CATATGCAATATCCCCCCCCCGGTCACG S'-ATGCCTATTGGTAATCCCCCCCCCGGTCACG Tirkan-1Mutação de espFUEste estudoEspFucat-2CTCTGCAAGAGCGCTGCTC-3' S'-ATGCCTATTGGTAATCCCCCCCCCGGTGAGCGCTGCGGCGTGGGGGTTATTCCGAGA GAAGGCTGCACGAGCGCTTAGATTCCCCCCCCCGTTAAC ATATGCAATATCCTCCTCTAG-3' K2Mutação de espFUEste estudoTirkan-2TATTCACAGCGCGCTGAGACTGC-3' S'-CGGGCCCCGAAGCAGTGCAGAACGC-3' CCCGGCCCCGAAGCACGCCTAGATTACCCCCCCCCCGTTAAC ATATGCAATATCCTCCTCTAG-3' CCCGGCATCCCGAGCGCTTAGATTACACAATGTTTCTC CCCGGCATCCCGAGCGCTTAGAACGAGCC-3'Amplificação do cassete de kanamicina (interno)DATSENKO; WANNER (2000)EspFUBamHI-R5'-CGCGCGATCCCGAGCGCTTAGATGTATTAAT GCC-3'Clonagem/complementação de EirCAMPELLONE; (2001)Tir00+5'-CGGCCTGGATATATGATCCAAGC3' CTATTGG-3'Clonagem/complementação de TirDE VINNEY et al. (2001)Tir00+5'-CGGCCTGGATATATGATCCAA	TspE4C2.2b	5'-AGTTTATCGCTGCGGGTCGC-3'		
ArpA.1r5'-TCTCCCCATACCGTA-3'(2013)ArpAgpE.f5'-GATTCCATCTTGTCAAATATGCC-3'Distinção entre filogrupos DArpAgpE.r5'-GAAAAGAAAAAGAATTCCCAAGAG-3'e EtrpAgpC.15'-AGTTTTATGCCCAGTGCGAG-3'Distinção entre filogrupos AtrpAgpC.15'-AGTTTATGCCCAGTGCGAG-3'Controle internotrpAgpC.35'-GCGCGATAAAGACATCTTCAC-3'Controle internotrpAgAr5'-GCGCGCGCCGCGCCTGGCGGAGC3'Controle interno5'-ATGATTAACAATGTTTCTTCACTTTTCCCAT5'-ATGACTAGCGCGCCTAGAGCGCTGACGCGCGCSpFucat-1CCGCCAACGCGCCTTAGATGTGATATGGCATGEspFucat-2CTCTGCAAGAGTGCTGCACCAGAGCGCTGAGCGCTAGATGGCGCACCAGAGCGCTTAGATGCTGC-3'S'-ATGCCTATTGGTAATCTTGGTCATAATCCCMutação de <i>spFU</i> Este estudo5'-GGATCCCGGCGCTGGCGGGTATTCGAAGTirkan-1AATGGAATAATCCTCCTTAG-3'K25'-CGGTGCCCTGAATGAACGC-3'K25'-CGGTCCCCGAATGAATCCC-3'K25'-CGGGCACCTGATGAATCC-3'K25'-CGGGCATCCGAGAGCGCTTAGATGATTACGCK25'-CGGGCATCCCGAGGCGCTTAGATGATTACC-3'K25'-CGGGATCCCGAGGCGCTTAGATGATTAATChartTGC-3'SpFUNdel-F5'-CCGGAATCCCGAGGCGCTTAGATGATTAATCCGCGGATCCCGAGGCGCTTAGATGATTATCGCCTATTGG-3'CTATTGG-3'SpFUBamHI-R5'-GGAAGATCTAGGAAAGGAGAACGGA'CCCCGGATCCCGGAGCGCTTAGATGATTATGCCTATTGG-3'Tir004+5'-GGAAGATCTAGGAAAGGAGAACG-3'Tir005-5'-CGGCATCCGGAGCCTAAGACGA'Tir26-3'Tir26-45'-CGGAACAATCTAGACAAGCC-3'Tir26-7Co	AceK.f	5'-AACGCTATTCGCCAGCTTGC-3'		CLERMONT et al.
ArpAgpE.f5'-GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC-3' PAgpE.rDistinção entre filogrupos D e E Distinção entre filogrupos A e CArpAgpE.15'-AGTTTTATGCCCAGTGCGAG-3' S'-AGTTTTATGCCCAGTGCGAG-3'Distinção entre filogrupos A e CtrpAgpC.25'-TCTGCGCCGGTCACGCCC-3' S'-GCAACGCGCCTGGCGGAAGA-3'Distinção entre filogrupos A e CtrpBA.r5'-CGGCGATAAAGACATCTTCAC-3' S'-ATGATTAACAATGTTTCTCACATTTTCCACControle internotrpBA.r5'-ATGATTAACAATGTTTCTCACATTTTCCACControle internotrpBA.r5'-ATGCATACGCGAACATCTTACACGTGATATGTG TAGGCTGGAGCGCGTTC-3' S'-TCACGAGCGCGCTTAGATGTATTAATGCCATGMutação de espFUEspFucat-2CTCTGCAACGGCACAGACGCGAGCCCTAGACCMutação de tirEspFucat-2CTCTGCAAGATGCTGCTC-3' S'-GGATCCCGGCGCTGGTGGGGTTATTCGAAGMutação de tirFirkan-1ATAGTGAATATTCCTCCTTAG-3' S'-GGATCCCGGCGCTGGTGGGGTTATTCGAAGMutação do cassete de kanamicina (interno)DATSENKO; WANNER (2000)k25'-CGGGGATCCCGAGAGCGCTTAGATGCC-3' S'-CGCGCATTTCCATAGGATGAACCC-3'Amplificação do cassete de kanamicina (interno)DATSENKO; WANNER (2000)EspFUNdel-FC-CGGAATCCAGAGCGCTTAGATGAATCC-3' S'-CGGCGATCCCGAGGCGCTTAGATGATTAAT GCC-3'Clonagem/complementação de TirCAMPELLONE; ROBBINS; LEONG (2004)Tir004+5'-CGGCATCAGAGAGAGAGAGAACG-3' S'-CGGGATCCAGGCGCTATATTAGAGCGAAACG-3' LEONGClonagem/complementação de TirCVINNEYet al. (2001)Tir005-5'-CGGGATCCAGAGCGCTATATTAGACAATGTTCC-3' CGGACTCCGGGCCTGATATTCGC-3' S'-CGGGATCCCGGCCTATTT-3' LEONG (2004)Clonagem/complementação de TirTir004+5'-CGGAGATCT	ArpA.1r	5'-TCTCCCCATACCGTACGCTA-3'		(2013)
ArpAgpE.r5'-GAAAAGAAAAGAATTCCCAAGAG-3'e EtrpAgpC.15'-AGTTTATGCCCAGTGCGAG-3'Distinção entre filogrupos AtrpAgpC.25'-TCTGCGCCGGCCCGCC-3'e CtrpBA.r5'-GCAACCCGGCCTGCCGGAAG-3'Controle interno5'-ATGATTAACAATGTTCTTCACACTTTTCCAAEspFucat-1CCGTCAACCGCAATATTACAGCTGTATATGTG TAGGCTGGAGCTGCTTC-3'Mutação de espFUEspFucat-2CTCTGCAAAGATGCTGCACCAGACCGTGAGCC ACTGCCTATGGTAATCCTCCTTAG-3'Mutação de espFUEspFucat-2CTCTGCAAGATGCTACTGGCACCAGACCCTGAGCC ATATGAATATCCTCCTTAG-3'Mutação de tirEspFucat-2CTCTGCAAGAGCGCTGGTGCTC-3'Mutação de tirTirkan-1AATGTGAATATTCCTCCTTAG-3'Mutação de tirTirkan-2TATTGAATATTCCTCCTTAG-3'Mutação de tirTirkan-25'-CGGTGCCCTGATGATCC-3'Mutação do cassete de ktDATSENKO; WANNER (2000)EspFUNdel-F5'-CGGGGATCCCGGACGCTTAGATCC-3'kanamicina (interno)CAMPELLONE; ROBBINS; LEONG (2004)EspFUBamHI-R5'-GGGAACCCGGAGCGCTTAGATGTATTATGC CCC-3'Clonagem/complementação de TirDE VINNEYet al. (2011)Tir004+5'-GGGAATCCAGGAAAGGAGARATTTAGC CTATTGG-3'Clonagem/complementação de TirDE VINNEYet al. (2011)TirSeq-F5'-CGGGATCCCGAACAGGCCTAAGA3'Sequenciamento de tirEste estudo	ArpAgpE.f	5'-GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC-3'	Distinção entre filogrupos D	
trpAgpC.1 5'-AGTTTTATGCCCAGTGCGAG-3' Distinção entre filogrupos A e C trpAgpC.2 5'-TCTGCGCCGGTAAGACCCCC-3' e C trpBA.r 5'-GGCGCGATAAAGACATCTTCAC-3' Controle interno 5'-ATGATTAACAATGTTTCTTCACTTITTCCAA S'-ATGATTAACAATGTTTCTTCACTTITTCCAA EspFucat-1 CCGTCAACCGCGCAGAG-3' Mutação de espFU EspFucat-2 CTCTGCAACAGATGCTGCAGCAGACCCTGAGCC ATATGAATATCCTCCTTAG-3' Mutação de espFU EspFucat-2 CTCTGCACAGCGCTGCTTC-3' Mutação de tir F'-AGGCTGGAGCTGCTTC-3' 5'-ATGCTATTGGTAATCTCCCCTGCACCAGA Mutação de tir Tirkan-1 AATGCAACGGCGCTATACTCCCCCCCCGTTAAC Mutação de tir Este estudo Tirkan-2 TATTCACAGCGCGCTATACTCCCCCCCCGTTAAC Mutação de tir Este estudo Tirkan-2 TATTCACAGCGCCTGATGACTGC-3' Mutação de cassete de kanamicina (interno) DATSENKO; k2 5'-CGGGCACCAGATCCAACGACGC-3' Kanamicina (interno) WANNER (2000) EspFUBamHI-R 5'-GGCGATCCCGAGCGCTTAGATGTTCAT Clonagem/complementação de EspFU CAMPELLONE; ROBBINS; LEONG (2004) Tir004+ 5'-GGGATCCCGAGAGGAGAACGA3' Clonagem/complementação de Tir DE VINNEYet al. (2011) Tir004+ 5'-GGATAGATATAGATATGATCC-3'	ArpAgpE.r	5'-GAAAAGAAAAAGAATTCCCAAGAG-3'	e E	
trpAp.2.25'-TCGGCCGGTCACGCCC-3'e CtrpBA.f5'-CGGCGATAAAGACATCTTCAC-3'Controle internotrpBA.r5'-CGCACGCGCCTGCGCGGAAG-3'Controle internos'-ATGATTAACAATGTTTCTCACTTTTCCAAEspFucat-1CCGTCAACCGCAATATTACAGCCTGATATATGTG TAGGCTGGAGCGCTTAGATGTATTAATGCCATG S'-TCACGAAGACGCTGCTC-3'Mutação de espFUEspFucat-2CTCTGCAACAGATGCTCCACCAGACGCTGAGCC ATATGAATATCCTCCTTAG-3'Mutação de espFUs'-ATGCCTATTGGTAATCTTGGTCATAATCCCF-ATGCCTATTGGTAATCTCGCACCTGT GTAGCTGGAGCTGCTTC-3'Mutação de tirTirkan-1AATGTGAATAATTCAATTCCTCCTGCACCTGT GTAGCCTGGAGCCGCTGAGCCGCTGAGGCTATTCCCCCCCC	trpAgpC.1	5'-AGTTTTATGCCCAGTGCGAG-3'	Distinção entre filogrupos A	
trpBA.f trpBA.r5'-CGGCGATAAAGACATCTTCAC-3' S'-GCAACGCCGGCCTGGCGGAGAG-3'Controle interno5'-ATGATTAACAATGTTGTTCTTCACTTTTCCAA5'-ATGATTAACAATGTTCACTGCACGAGCGCTAATGTGAMutação de espFUEste estudoEspFucat-2CTCTGCAAGAGCGCTAGGCGACCCAGACGCTGAGCCC ATATGAATATCCTCCTTAG-3' S'-ATGGCTATTGGTAATCTTGGTCATATCCCMutação de espFUEste estudoTirkan-1AATGTGAATATCCACTGCTGCACCAGACGCTGAGCC ATATGAATATCCCCGGCGCTGGTGGGGTTATTCGAAG S'-GGATCCCGGCGCTGGTGGGGTTATTCGAAG Tirkan-2Mutação de tirEste estudoTirkan-2TATTCACAGCGCTGCTGC3' S'-CGGCCCCGGACGCGAGCCCAGTGAATCCCC3' KtS'-CGGCCCCGAATGACTGC-3' CACTTTTCC-3'Mutação do tirEste estudoEspFUNdel-FS'-CGGGCACAGTCGATGAATCC-3' CCCGGGATCCCGAGCGATTAGAATCC-3' CACTTTTCC-3'Amplificação do cassete de kanamicina (interno)DATSENKO; WANNER (2000)EspFUNdel-FS'-CGCGGATCCCGAGCGCTTAGATGAATCC-3' CACTTTTCC-3'Amplificação do cassete de kanamicina (interno)CAMPELLONE; ROBBINS; LEONG (2004)Tir004+S'-GGAAGATCTAGGAAAGGAGARATTTATGC CTATTGG-3'Clonagem/complementação de TirDE VINNEYet al. (2001)Tir005-S'-CGCGCATGGTCCCAAGGCCTAGCAAGGAGAACG-3' map-tir (F)S'-CGGAATCTCACAAGTCCC-3' S'-GGAAGATCTAGAAAAGAGTCTACAAGACG-3' tirSeq-FSequenciamento de tirBCCHA et al. (2011) Este estudo	trpAgpC.2	5'-TCTGCGCCGGTCACGCCC-3'	e C	
trpBA.r5'-GCAACGCGGCCTGGCGGAAG-3'Countole interno5'-ATGATTAACAATGTTTCTTCACTTTTTCCACEspFucat-1CCGTCAACCGCAATATTACAGCTGATATGTG TAGGCTGGAGCTGCTC-3'Mutação de espFUEste estudoEspFucat-2CTCTGCAAGATGCTGCACCAGACGCTGAGCC ATATGAATATCCTCCTTAG-3' 5'-ATGCCTATTGGTAATCTCGCCGCACCGCTG GTAGGCTGGAGCTGCTTC-3'Mutação de espFUEste estudoTirkan-1AATGTGAATATTCAATTCCTCCTGCACCTGT GTAGGCTGGAGCTGCTTC-3' 5'-GGATCCCGGCGCTGGTGGGTTATTCGAAG Tirkan-2Mutação de tirEste estudoTirkan-2TATTCACAGCGCGCTGTGGGGTGGGTTATTCGAAG S'-GGGTCCCCGGCGCTGGAGCTGCTC-3' S'-GGGTCCCCGACCAGTCGAATGCACC3' ktMutação do cassete de kanamicina (interno)DATSENKO; WANNER (2000)EspFUNdel-F5'-CGGGAATCCAATGAATCC-3' S'-GGGAGATCCCGAGGGGTTATACAATGTTCTT CACTTTTCC-3'Amplificação do cassete de kanamicina (interno)DATSENKO; WANNER (2000)EspFUBamHI-R5'-CGGGAATCCCGAGCGCTTAGAATCC-3' S'-GGAAGATCTAGGAAAGGAGAAATTATGC CCA3'Clonagem/complementação de EspFUCAMPELLONE; ROBBINS; LEONG (2004)Tir005-5'-CGGCCTGGATATATTTAGACAATGTTCTA GCC-3'Clonagem/complementação de TirDE VINNEYet al. (2011)Tir005-5'-CGGCCTGGATATATTTAGACGAAACG-3' map-tir (F)5'-TCATTAAGAACAAGTCTCACAAG-3' S'-TGGATCTCGTGCGCTATTT-3'Clonagem/complementação de TirTirSeq-R5'-TGGAAGATCTAGGAAAGGCC-3' S'-GGAGAGTCTCGGCCGCTTTT-3'Sequenciamento de tirEste estudo	trpBA.f	5'-CGGCGATAAAGACATCTTCAC-3'	Controle interno	
5'-ATGATTAACAATGTTTCTCACTTTTTCCAAEspFucat-1CCGTCAACCGCAATATTACAGCTGATATGTG TAGGCTGGAGCGCGCTTC-3'b:TCACGAGCGCTTGCACCAGACGCTGAGCC ATATGAATATCCTCCTTAG-3'Mutação de espFUEspFucat-2CTCTGCAAGATGCTGCACCAGACGCTGAGCC ATATGAATATCCTCCTTAG-3'Tirkan-1AATGTGATAATTCAATTCCTCCTGCACCTGT GTAGGCTGGAGCGGCTGCTGC-3'Tirkan-2TATTCACAGCGCTGATGATCCCCCCCGTTAAC S'-CGGCGCCCGGAGCTGCTCC-3'k25'-CGGGCCCCGAATGAACCGC-3' S'-CGGGCCACAGTCCATAGAACTGC-3'k25'-CGGGCCCCGAATGAACCGC-3' S'-CGGGCACCAGTCCATATGATCAATCCCC3'k25'-CGGGCACCAGTCGATGAATCC-3' CCGGAATTCCATAGATATCCATCCATAGATTAACAATGTTCTT CACTTTTTCC-3'EspFUBamHI-R5'-CGCGGAATCCCGAGGGCTTAGCAATGATTAAC GCC-3'Tir004+5'-GGAAGATCTAGGAAAGGAGARATTTATGC CTATTGG-3'Tir005-5'-CGGGCATGGCGCTAGAAGCGAAACG-3' Tir005-Tir005-5'-CGGGATCCCGAGGAAAGGAGAAACG-3' CTATTGG-3'Tir005-5'-CGGGATCTCAGGAAAAGTCCC3' GCAAGATCTAGAACAAGTCTCACAAG-3' CTATTGG-3'Tir005-5'-CGGGATCCCGAGCGCATTAGATCCA3' (2001)Tir005-5'-CGGGATCCCGAGCGCAAGCG-3' (2001)Tir005-5'-CGGGATCCCGAGCGCAAGCG-3' (2001)Tir005-5'-CGGGATCTCCGTGAGATATATTTAGACGAAACG-3' (2001)Tir005-5'-CGGCCTGGATATATTTAGATCC-3' (2001)Tir005-5'-CGGCCTGGATATATTTAGACGAAACG-3' (2001)Tir005-5'-CGGGATCTCGTGCGCTATT-3' (5'-TGGATCTCGTGCGCTATTT-3' (1rSeq-RSequenciamento de tirEste estudo	trpBA.r	5'-GCAACGCGGCCTGGCGGAAG-3'	Controle Interno	
EspFucat-1CCGTCAACCGCAATATTACAGCTGTATATGTG TAGGCTGGAGCGCTTAGATGTATTAATGCCATG 5'-TCACGAGCGCTTAGATGTATTAATGCCATG 5'-TCACGAGCGCTTAGATGTATTAATGCCATG 5'-ATGCCTATTGGTAATCCTCCTAG-3' 5'-ATGCCTATTGGTAATCCATCCCCCCCCGTTAGA 5'-GGATCCCGGCGCTGGTGGGGTATTCCGACCGTGAGC Tirkan-2Mutação de <i>espFU</i> Este estudoTirkan-2AATGTGAATAATTCAATTCCTCCTGCACCTGT GTAGGCTGGAGCTGCTTC-3' 5'-GGATCCCGGCGCTGGTGGGGTTATTCGAAG ATATGAATATCCTCCTTAG-3' ktMutação de <i>tir</i> Este estudoTirkan-2TATTCACAGCGCTATTACTCCCCCCCCGTTAAC ATATGAATATCCTCCTTAG-3'Mutação de <i>tir</i> Este estudoK25'-CGGGCCCTGAATGAACTGC-3' CCGGCACAGTCCGATGAATCC-3'Amplificação do cassete de kanamicina (interno)DATSENKO; WANNER (2000)EspFUNdel-F5'-CGGGCAACAGTCCAATGAATCC-3' CCCGGGATCCCGAGCGCTTAGATGAATCC-3' CCATTTGG-3'Amplificação do cassete de kanamicina (interno)DATSENKO; WANNER (2000)Tir004+5'-CGGGAATCCCGAGCGCTTAGATGATTATGC CTATTGG-3'Clonagem/complementação de EspFUCAMPELLONE; ROBBINS; LEONG (2004)Tir005-5'-CGGCCTGGATATATTTAGACGAAACG-3' tircesT (R)5'-CGGCATCCGGGCTATTA-TTTAGACGAAACG-3' 5'-TGGGATCTCGGGCTATTT-3' tirSeq-FDE VINNEYet al. (2011) Este estudo		5'-ATGATTAACAATGTTTCTTCACTTTTTCCAA		
TAGGCTGGAGCTGCTTC-3' 5'-TCACGAGCGCTTAGATGTATTAATGCCATGMutação de espFUEste estudoEspFucat-2CTCTGCAAGATGCTGCACCAGACGCTGAGCC ATATGAATATCCTCCTTAG-3' 5'-ATGCCTATTGGTAATCTTGGTCATAATCCCMutação de espFUEste estudoTirkan-1AATGTGAATAATTCAATTCCTCCTGCACCTGT GTAGGCTGGAGCTGCTGCGGCTGGTGGGTTATTCGAAG 5'-GGATCCCGGCGCTGGTGGGGTTATTCGAAG ATATGAATATCCTCCTTAG-3'Mutação de tirEste estudoTirkan-2TATTCACAGCGCTATTACTCCCCCCCGTTAAC ATATGAATATCCTCCTTAG-3'Mutação de tirEste estudoK25'-CGGTGCCCTGAATGAACTGC-3' ATATGAATATCCTCCTTAG-3'Amplificação do cassete de kanamicina (interno)DATSENKO; WANNER (2000)EspFUNdel-F5'-CGGGAATTCCATATGATTAACAATGTTTCTT CACTTTTCC-3'Clonagem/complementação de EspFUCAMPELLONE; ROBBINS; LEONG (2004)Tir004+5'-GGAAGATCTAGGAAAGGAGARATTTAGC CTATTGG-3'Clonagem/complementação de TirDE VINNEYet al. (2001)Tir005-5'-CGGCCTGGATATATTTAGACGAAACG-3' tir-cesT (R)5'-GGAAGATCTAGAACAAGTCTCACAAG-3' 5'-GGAAGATCTGGTGCGCTATTT-3' tirSeq-RDE VINNEYet al. (2011)ROCHA et al. (2011)	EspFucat-1	CCGTCAACCGCAATATTACAGCTGTATATGTG		
5'-TCACGAGCGCTTAGATGTATTAATGCCATGInitiação de espí oEste estudoEspFucat-2CTCTGCAAGATGCTGCACCAGACGCTGAGCC ATATGAATATCCTCTTAG-3' 5'-ATGCCTATTGGTAATCTCTGGTCATAATCCCMutação de espí oEste estudoTirkan-1AATGTGAATATCCTCCTTAG-3' 5'-GGATCCCGGCGCTGGTGGGGTTATTCGAAG TGAGCTGGAGCTGCTC-3' 5'-GGATCCCGGCCCTGATGAACTGC-3'Mutação de tirEste estudoK25'-GGATCCCGGCGCTGGTGGGGTTATTCGAAG ATATGAATATCCTCCTCTAG-3' kt5'-CGGGCCCCGAATGAACTGC-3' S'-CGGCCACAGTCGATGAATCC-3'Amplificação do cassete de kanamicina (interno)DATSENKO; WANNER (2000)EspFUNdel-F5'-CGGGATTCCATATGATTAACAATGTTTCTT CACTTTTCC-3'Clonagem/complementação de EspFUCAMPELLONE; ROBBINS; LEONG (2004)Tir004+5'-GGAAGATCTAGGAAAGGAGGARATTTAGC CTATTGG-3'Clonagem/complementação de TirDE VINNEYet al. (2001)Tir005-5'-CGGCCTGGATATATTTAGACGAAACG-3' tir-cesT (R)5'-CGGAACAAGTCTCACAAG-3' 5'-GGAAGATCTGAGCGCTATTATATGATCCA' S'-GGAGGATCTCAGGACGCTATTT-3' tirSeq-FDE VINNEYet al. (2011)		TAGGCTGGAGCTGCTTC-3'	Mutação do espELL	Esto ostudo
EspFucat-2CTCTGCAAGATGCTGCACCAGACGCTGAGCC ATATGAATATCCTCCTTAG-3' 5'-ATGCCTATTGGTAATCTTGGTCATAATCCCMutação de tirEste estudoTirkan-1AATGTGAATAATTCAATTCCTCCTGCACCTGT GTAGGCTGGAGCTGCTGC-3' S'-GGATCCCGGCGCTGGTGGGTTATTCGAAG ATATGAATATCCTCCTTAG-3'Mutação de tirEste estudoTirkan-2TATTCACAGCGCTATTACTCCCCCCCGTTAAC ATATGAATATCCTCCTTAG-3'Mutação do cassete de kanamicina (interno)DATSENKO; WANNER (2000)K25'-CGGGCCCCGAATGAACTGC-3' S'-CGGCACACGTCGATGAATCC-3'Amplificação do cassete de kanamicina (interno)DATSENKO; WANNER (2000)EspFUNdel-F5'-CCGGGATCCCGAGCGCTTAGATGATTCAT GC-3'Clonagem/complementação de EspFUCAMPELLONE; ROBBINS; LEONG (2004)Tir004+5'-GGAAGATCTAGGAAAGGAGAAACG-3' map-tir (F)5'-GGCCTGGATATATTTAGACGAAACG-3' S'-GGAAGATCTAGAACAAGTCTCACAAG-3' tir-cesT (R)Clonagem/complementação de TirDE VINNEYet al. (2001)Tir005-5'-CGGCCTGGATATATTTAGACCAAGC-3' map-tir (F)5'-GGAAGAACAAGTCTCACAAG-3' S'-TGATAAATGAATATGATCC-3' S'-GGAAGATCTAGGAGCGTATTT-3'Sequenciamento de tirROCHA et al. (2011)tirseq-F5'-GGAAGATCTGGTGCGCTATTT-3' tirseq-R5'-GGAAGATGTTGAATGGTGCT-3'Sequenciamento de tir		5'-TCACGAGCGCTTAGATGTATTAATGCCATG	Mulação de espí o	
ATATGAATATCCTCCTTAG-3' 5'-ATGCCTATTGGTAATCTTGGTCATAATCCCMutação de tirEste estudoTirkan-1AATGTGAATAATTCAATTCCTCCTGCACCTGT GTAGGCTGGAGCTGCTTC-3' 5'-GGATCCCGGCGCTGGTGGGTTATTCGAAGMutação de tirEste estudoTirkan-2TATTCACAGCGCTATTACTCCCCCCCGTTAAC ATATGAATATCCTCCTTAG-3'Mutação do cassete de kanamicina (interno)DATSENKO; WANNER (2000)k25'-CGGCACACGTCGATGAACTGC-3' 5'-CGGCAACAGTCCATATGATTCACACATGTTCTT CACTTTTCC-3'Amplificação do cassete de kanamicina (interno)DATSENKO; WANNER (2000)EspFUNdel-F5'-CCGGGAATTCCATATGATTAACAATGTTTCT CACTTTTCC-3'Clonagem/complementação de EspFUCAMPELLONE; ROBBINS; LEONG (2004)Tir004+5'-GGAAGATCTAGGAAAGGAGARATTTATGC CTATTGG-3'Clonagem/complementação de TirDE VINNEYet al. (2001)Tir005-5'-CGGCCTGGATATATTTAGACGAAACG-3' itr-cesT (R)5'-TCATTAGAATAGATCC-3' 5'-TGGGATCTCGTGCGCTATTT-3'ROCHA et al. (2011)tirSeq-F5'-GGAAGATGTTGAATGGTGCT-3'Sequenciamento de tirEste estudo	EspFucat-2	CTCTGCAAGATGCTGCACCAGACGCTGAGCC		
5'-ATGCCTATTGGTAATCTTGGTCATAATCCCTirkan-1AATGTGAATAATTCAATTCCATTCGTGCGCCTGT GTAGGCTGGAGCTGGTGGTGGTGTTCTCA' S'-GGATCCCGGCGCTGGTGGGGTTATTCGAAG TATTCACAGCGCTATTACTCCCCCCCGTTAAC ATATGAATATCCTCCTTAG-3'Mutação de <i>tir</i> Este estudoK2TATTCACAGCGCTATTACTCCCCCCGGTAAC ATATGAATATCCTCCTTAG-3'Amplificação do cassete de kanamicina (interno)DATSENKO; WANNER (2000)EspFUNdel-F5'-CGGCGCACAGTCGATGAATCC-3' CACTTTTCC-3'Amplificação do cassete de kanamicina (interno)DATSENKO; WANNER (2000)EspFUBamHI-R5'-CGCGGATCCCGAGCGCTTAGATGTATTAAT GCC-3'Clonagem/complementação de EspFUCAMPELLONE; ROBBINS; LEONG (2004)Tir004+5'-GGAAGATCTAGGAAAGGAGAGAATTTAGC CTATTGG-3'Clonagem/complementação de TirDE VINNEYet al. (2001)Tir005-5'-CGGCCTGGATATATTAGACGAAACG-3' map-tir (F)5'-CATAGAACAAGTCTCACAAG-3' S'-TCATTAATGAATCAATGATCC-3' tirSeq-RS'-GGAGGATCTCGTGCGCTATTT-3' S'-GGAGGATGTTGAATGGTGCT-3'Bequenciamento de <i>tir</i> Este estudo		ATATGAATATCCTCCTTAG-3'		
Tirkan-1AATGTGAATAATTCAATTCCATCCTGCACCTGT GTAGGCTGGAGCTGCTTC-3' 5'-GGATCCCGGCGCGGGGGGTGTATTCGAAG ATATGAATATCCCCCGCGCGTGGGGTTATTCGAAG ATATGAATATCCTCCTTAG-3'Mutação de tirEste estudoK25'-CGGTGCCTGAATGAACTGC-3' S'-CGGCCCACAGTCGATGAATCC-3'Amplificação do cassete de kanamicina (interno)DATSENKO; WANNER (2000)EspFUNdel-F5'-CCGGAATTCCATATGATTAACAATGTTTCTT CACTTTTTCC-3'Amplificação do cassete de kanamicina (interno)DATSENKO; WANNER (2000)EspFUBamHI-R5'-CCGGGATCCCGAGCGCTTAGATGTATTAAT GCC-3'Clonagem/complementação de EspFUCAMPELLONE; ROBBINS; LEONG (2004)Tir004+5'-GGAAGATCTAGGAAAGGAGARATTTAGC CTATTGG-3'Clonagem/complementação de TirDE VINNEYet al. (2001)Tir005-5'-CGGCCTGGATATATTTAGACGAAACG-3' map-tir (F)5'-TAGAACAAGTCTCACAAG-3' S'-TGGGATCTCGTGCGCTATTT-3' tirSeq-FSequenciamento de tirROCHA et al. (2011)tirSeq-R5'-GGAGGATGTTGAATGGTGCT-3'Sequenciamento de tirEste estudo		5'-ATGCCTATTGGTAATCTTGGTCATAATCCC		
GTAGGCTGGAGCTGCTTC-3' 5'-GGATCCCGGCGCTGGTGGGTTATTCGAAG TIrkan-2Mutação de tirEste estudoTirkan-2TATTCACAGCGCTATTACTCCCCCCCGTTAAC ATATGAATATCCTCCTTAG-3'Amplificação do cassete de kanamicina (interno)DATSENKO; WANNER (2000)k25'-CGGCCACAGTCGATGAACTGC-3' 5'-CGGCAATTCCATATGATTCAATGATTAACAATGTTTCT CACTTTTTCC-3'Amplificação do cassete de kanamicina (interno)DATSENKO; WANNER (2000)EspFUNdel-F5'-CGGGAATTCCATATGATTAACAATGTTTCT CACTTTTTCC-3'Clonagem/complementação de EspFUCAMPELLONE; ROBBINS; LEONG (2004)Fir004+5'-GGAAGATCTAGGAAAGGAGARATTTATGC CTATTGG-3'Clonagem/complementação de TirDE VINNEYet al. (2001)Tir005-5'-CGGCCTGGATATATTTAGACGAAACG-3' tirseq-F5'-TCATTAAATGAATATGATCC-3' 5'-GGAGGATCTCCGTGCGCTATTT-3' tirSeq-RROCHA et al. (2011)	Tirkan-1	AATGTGAATAATTCAATTCCTCCTGCACCTGT		
5'-GGATCCCGGCGCTGGTGGGGTTATTCGAAG Tirkan-2Mutação de tilEste estudoTirkan-2TATTCACAGCGCTATTACTCCCCCCCCGTTAAC ATATGAATATCCTCCTTAG-3'Amplificação do cassete de kanamicina (interno)DATSENKO; WANNER (2000)k25'-CGGCCACAGTCGATGAATCC-3'Amplificação do cassete de kanamicina (interno)DATSENKO; WANNER (2000)EspFUNdel-F5'-CCGGAATTCCATATGATTAACAATGTTTCTT CACTTTTTCC-3'Clonagem/complementação de EspFUCAMPELLONE; ROBBINS; LEONG (2004)Tir004+5'-GGAAGATCTAGGAAAGGAGARATTTATGC CTATTGG-3'Clonagem/complementação de TirDE VINNEYet al. (2001)Tir005-5'-CGGCCTGGATATATTTAGACGAAACG-3' map-tir (F)5'-GATAGAACAAGTCTCACAAG-3' S'-TGGGATCTCGTGCGCTATTT-3' tirSeq-FCoccas S'-TGGGATCTCGTGCGCTATTT-3' Sequenciamento de <i>tir</i> DE VINNEYet al. (2011)		GTAGGCTGGAGCTGCTTC-3'	Mutação do tir	Ecto octudo
Tirkan-2TATTCACAGCGCTATTACTCCCCCCGTTAAC ATATGAATATCCTCCTTAG-3'Amplificação do cassete de kanamicina (interno)DATSENKO; WANNER (2000)k25'-CGGCCACAGTCGATGAATGAATCC-3'Amplificação do cassete de kanamicina (interno)DATSENKO; WANNER (2000)EspFUNdel-F5'-CCGGAATTCCATATGATTAACAATGTTTCTT CACTTTTTCC-3'Clonagem/complementação de EspFUCAMPELLONE; ROBBINS; LEONG (2004)Tir004+5'-GGAAGATCTAGGAAAGGAGARATTTAGC CTATTGG-3'Clonagem/complementação de TirDE VINNEYet al. (2001)Tir005-5'-CGGCCTGGATATATTTAGACGAAACG-3' map-tir (F)5'-GATAGAACAAGTCTCACAAG-3' 5'-TGGGATCTCGTGCGCTATTT-3' tirSeq-RClonagem/complementação de TirDE VINNEYet al. (2001)		5'-GGATCCCGGCGCTGGTGGGTTATTCGAAG		
ATATGAATATCCTCCTTAG-3'Amplificação do cassete de kanamicina (interno)DATSENKO; WANNER (2000)k25'-CGGCCACAGTCGATGAATCC-3'Amplificação do cassete de kanamicina (interno)DATSENKO; WANNER (2000)EspFUNdel-F5'-CCGGAATTCCATATGATTAACAATGTTTCTT CACTTTTCC-3'Clonagem/complementação de EspFUCAMPELLONE; ROBBINS; LEONG (2004)EspFUBamHI-R5'-CGCGGATCCCGAGCGCTTAGATGTATTAAT GCC-3'5'-CGCGGATCTAGGAAAGGAGARATTTATGC CTATTGG-3'Clonagem/complementação de TirDE VINNEYet al. (2001)Tir005-5'-CGGCCTGGATATATTTAGACGAAACG-3' tir-cesT (R)5'-CGATAGAACAAGTCTCACAAG-3' 5'-TGGGATCTCGTGCGCTATTT-3'ROCHA et al. (2011)tirSeq-F5'-GGAAGGATGTTGAATGGTGCT-3'Sequenciamento de tir(2011)Este estudoEste estudo	Tirkan-2	TATTCACAGCGCTATTACTCCCCCCCGTTAAC		
k25'-CGGTGCCCTGAATGAACTGC-3' S'-CGGCCACAGTCGATGAATCC-3'Amplificação do cassete de kanamicina (interno)DATSENKO; WANNER (2000)EspFUNdel-F5'-CCGGAATTCCATATGATTAACAATGTTTCTT CACTTTTTCC-3'Conagem/complementação de EspFUCAMPELLONE; ROBBINS; LEONG (2004)EspFUBamHI-R5'-CGCGGATCCCGAGCGCTTAGATGTATTAAT GCC-3'5'-CGGCAGAGATCTAGGAAAGGAGARATTTATGC CTATTGG-3'Clonagem/complementação de TirCAMPELLONE; ROBBINS; LEONG (2004)Tir005-5'-CGGCCTGGATATATTTAGACGAAACG-3' tir-cesT (R)5'-GATAGAACAAGTCTCACAAG-3' 5'-TGGGATCTCGTGCGCTATTT-3' 5'-TGGGATCTCGTGCGCTATTT-3'Clonagem/complementação de TirDE VINNEYet al. (2001)tirSeq-R5'-GGAGGATGTTGAATGGTGCT-3'Sequenciamento de tir(2011) Este estudo		ATATGAATATCCTCCTTAG-3'		
kt5'-CGGCCACAGTCGATGAATCC-3'kanamicina (interno)WANNER (2000)EspFUNdel-F5'-CCGGAATTCCATATGATTAACAATGTTTCT CACTTTTCC-3'Comagem/complementação de EspFUCAMPELLONE; ROBBINS; LEONG (2004)EspFUBamHI-R5'-CGCGGATCCCGAGCGCTTAGATGTATTAAT GCC-3'5'-CGGAAGATCTAGGAAAGGAGARATTTATGC CTATTGG-3'Clonagem/complementação de TirDE VINNEYet al. (2001)Tir004+5'-CGGCCTGGATATATTTAGACGAAACG-3' S'-CGGCCTGGATATATTTAGACGAAACG-3'Clonagem/complementação de TirDE VINNEYet al. (2001)Tir005-5'-CGGCCTGGATATATTTAGACGAAACG-3' S'-GGATGACAAGTCTCACAAG-3'Sequenciamento de tirROCHA et al. (2011)tir-cesT (R)5'-TCATTAAATGAATATGATCC-3' S'-TGGGATCTCGTGCGCTATTT-3'Sequenciamento de tirEste estudo	k2	5'-CGGTGCCCTGAATGAACTGC-3'	Amplificação do cassete de	DATSENKO;
EspFUNdel-F5'-CCGGAATTCCATATGATTAACAATGTTTCTT CACTTTTCC-3'Clonagem/complementação de EspFUCAMPELLONE; ROBBINS; LEONG (2004)EspFUBamHI-R5'-CGCGGATCCCGAGCGCTTAGATGTATTAAT GCC-3'5'-CGGAAGATCTAGGAAAGGAGARATTTATGC CTATTGG-3'Clonagem/complementação de TirDE VINNEYet al. (2001)Tir004+5'-CGGCCTGGATATATTTAGACGAAACG-3' S'-CGGCCTGGATATATTTAGACGAAACG-3'Clonagem/complementação de TirDE VINNEYet al. (2001)Tir005-5'-CGGCCTGGATATATTTAGACGAAACG-3' S'-CGATAGAACAAGTCTCACAAG-3'ROCHA et al. (2011)2001)tir-cesT (R)5'-TCATTAAATGAATATGATCC-3' S'-TGGGATCTCGTGCGCTATTT-3'Sequenciamento de tirROCHA et al. (2011)tirSeq-R5'-GGAGGATGTTGAATGGTGCT-3'Sequenciamento de tirEste estudo	kt	5'-CGGCCACAGTCGATGAATCC-3'	kanamicina (interno)	WANNER (2000)
EspFUNdel+FCACTTTTTCC-3'Clonagem/complementação de EspFUCAMPELLONE, ROBBINS; LEONG (2004)EspFUBamHI-R5'-CGCGGATCCCGAGCGCTTAGATGTATTAAT GCC-3'5'-GGAAGATCTAGGAAAGGAGARATTTATGC CTATTGG-3'Clonagem/complementação de TirDE VINNEYet al. (2001)Tir005-5'-CGGCCTGGATATATTTAGACGAAACG-3' 5'-CGGCCTGGATATATGATCCAAAG-3' tir-cesT (R)5'-TCATTAAATGAATATGATCC-3' 5'-TGGGATCTCGTGCGCTATTT-3'Clonagem/complementação de TirDE VINNEYet al. (2001)tirSeq-F5'-GGAGGATCTCGTGCGCTATTT-3' 5'-GGAGGATGTTGAATGGTGCT-3'Sequenciamento de tirROCHA et al. (2011)		5'-CCGGAATTCCATATGATTAACAATGTTTCTT		
EspFUBamHI-R5'-CGCGGATCCCGAGCGCTTAGATGTATTAAT GCC-3'de EspFUKOBBINS, LEONG (2004)Tir004+5'-GGAAGATCTAGGAAAGGAGARATTTATGC CTATTGG-3'Clonagem/complementação de TirDE VINNEYet al. (2001)Tir005-5'-CGGCCTGGATATATTTAGACGAAACG-3' 5'-CGGCCTGGATATATGATCAAGAGCGAAGCG-3'Clonagem/complementação de TirDE VINNEYet al. (2001)tir-cesT (R)5'-TCATTAAATGAATATGATCC-3' 5'-TGGGATCTCGTGCGCTATTT-3'Sequenciamento de tirROCHA et al. (2011)tirSeq-F5'-GGAGGATGTTGAATGGTGCT-3'Sequenciamento de tirEste estudo	Espronuel-r	CACTTTTTCC-3'	Clonagem/complementação	
EsproballineGCC-3'LEONG (2004)Tir004+5'-GGAAGATCTAGGAAAGGAGARATTTATGC CTATTGG-3'Clonagem/complementação de TirDE VINNEYet al. (2001)Tir005-5'-CGGCCTGGATATATTTAGACGAAACG-3' S'-CGGCCTGGATATATGATCCAAGG-3'de TirDE VINNEYet al. (2001)tir-cesT (R)5'-TCATTAAATGAATATGATCC-3' S'-TGGGATCTCGTGCGCTATTT-3'Sequenciamento de tir(2011) Este estudotirSeq-R5'-GGAGGATGTTGAATGGTGCT-3'Sequenciamento de tir(2011)	EanEl IRom II D	5'-CGCGGATCCCGAGCGCTTAGATGTATTAAT	de EspFU	
Tir004+5'-GGAAGATCTAGGAAAGGAGARATTTATGC CTATTGG-3'Clonagem/complementação de TirDE VINNEYet al. (2001)Tir005-5'-CGGCCTGGATATATTTAGACGAAACG-3' 5'-GGAGGATCTCACAAG-3'de TirDE VINNEYet al. (2001)tir-cesT (R)5'-TCATTAAATGAATATGATCC-3' 5'-TGGGATCTCGTGCGCTATTT-3'Sequenciamento de tir(2011)tirSeq-F5'-GGAGGATGTTGAATGGTGCT-3'Sequenciamento de tirEste estudo	сэрговашпі-к	GCC-3'		LEONG (2004)
Tir004+CTATTGG-3'Clohagen/complementaçãoDE vinve retai.Tir005-5'-CGGCCTGGATATATTTAGACGAAACG-3'de Tir(2001)map-tir (F)5'-GATAGAACAAGTCTCACAAG-3'ROCHA et al.tir-cesT (R)5'-TCATTAAATGAATATGATCC-3'Sequenciamento de tirtirSeq-F5'-TGGGATCTCGTGCGCTATTT-3'Sequenciamento de tirtirSeq-R5'-GGAGGATGTTGAATGGTGCT-3'Este estudo	TirOOA	5'-GGAAGATCTAGGAAAGGAGARATTTATGC	Clanagom/complementação	
Tir005-5'-CGGCCTGGATATATTTAGACGAAACG-3'de fill(2001)map-tir (F)5'-GATAGAACAAGTCTCACAAG-3'ROCHA et al.tir-cesT (R)5'-TCATTAAATGAATATGATCC-3'Sequenciamento de tirtirSeq-F5'-TGGGATCTCGTGCGCTATTT-3'Sequenciamento de tirtirSeq-R5'-GGAGGATGTTGAATGGTGCT-3'Este estudo	111004+	CTATTGG-3'	cionagem/complementação	
map-tir (F)5'-GATAGAACAAGTCTCACAAG-3'ROCHA et al.tir-cesT (R)5'-TCATTAAATGAATATGATCC-3'Sequenciamento de tirtirSeq-F5'-TGGGATCTCGTGCGCTATTT-3'Sequenciamento de tirtirSeq-R5'-GGAGGATGTTGAATGGTGCT-3'Este estudo	Tir005-	5'-CGGCCTGGATATATTTAGACGAAACG-3'		(2001)
tir-cesT (R)5'-TCATTAAATGAATATGATCC-3'Sequenciamento de tir(2011)tirSeq-F5'-TGGGATCTCGTGCGCTATTT-3'Este estudotirSeq-R5'-GGAGGATGTTGAATGGTGCT-3'Este estudo	map-tir (F)	5'-GATAGAACAAGTCTCACAAG-3'		ROCHA et al.
tirSeq-F 5'-TGGGATCTCGTGCGCTATTT-3' Este estudo	tir-cesT (R)	5'-TCATTAAATGAATATGATCC-3'	Soquenciamente de <i>tir</i>	(2011)
tirSeq-R 5'-GGAGGATGTTGAATGGTGCT-3'	tirSeq-F	5'-TGGGATCTCGTGCGCTATTT-3'	Sequenciamento de Il	Ecto cotudo
	tirSeq-R	5'-GGAGGATGTTGAATGGTGCT-3'		

Tabela 2 - Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste estudo.

(continua)

(continuação)			
Iniciador	Sequência	Descrição relevante	Referência/fonte
rpoA-F	5'-GTGACCCTTGAGCCTTTAGAG-3'		
rpoA-R	5'-ACACCATCAATCTCAACCTCG-3'		
ler-F	5'-CGAGAGCAGGAAGTTCAAAGTG-3'		
ler-R	5'-ACACCTTTCGATGAGTTCCG-3'		
escC-F	5'-CTGAAGACAATGGCAAGTAATGG-3'		
escC-R	5'-ACTGCATTAAGACGTGGATCAG-3'		Sporandio Lab
escV-F	5'-GAGTGCAAAAGGAAAGCCAG-3'	qixi-FOIX	
escV-R	5'-ATGATACCAGCAATAGCGTCC-3'		
espA-F	5'-AGCTATTTGAGGAACTCGGTG-3'		
espA-R	5'-CATCTTTTGTGCCGTGGTTG-3'		
eae-F	5'-TGGGATGTTCAACGGTAAGTC-3'		
eae-R	5'-TTTAACCTCAGCCCCATCAC-3'		
EAE-V3F	5- CATTGATCAGGATTTTTCTGGT	Dotocoão do gono oco	MORA at al. (2011)
EAE-MBF	5- TCCAGAATAATATTGTTATACG	Delecção do gene eae	MORA et al. (2011)
M13/pUC-F	5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3'	Sequenciamento de	Dramaga
M13/pUC-R	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	clonagens em pGEM-T	Plomega
T7 promoter - F	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	Sequenciamento de	Thormo Eichor Sciontific
T7 terminator - R	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'	clonagens em pET28a(+)	

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose (0,8%), corados com *GelRed* (Biotium, Estados Unidos) durante corrida eletroforética a 60 V em tampão TBE (Tris-borato 44,5 mM; acido etilenodiaminotetracetico [EDTA] 1 mM) e posteriormente visualizados sob luz ultravioleta nos sistemas de captação de imagens *Alliance 6.7* (UVItec Cambridge, Reino Unido) ou *ChemiDoc Touch Imaging System* (Bio-Rad, Estados Unidos).

3.3 Pesquisa de espFU em aEPEC

A presença do gene *espFU* entre as 72 cepas de aEPEC foi investigada por PCR, empregando-se os oligonucleotídeos iniciadores tccP-F1/tccP-R1 e tccP2-F/tccP-R, conforme as condições previamente descritas (GARMENDIA et al., 2005; OOKA et al., 2007). Neste estudo, as nomenclaturas *tccP* e *tccP2* são utilizadas como sinônimo de *espFU* e correspondem a dois alelos distintos deste gene. As cepas EHEC EDL933 e DH5 α foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente.

Produtos de PCR com tamanhos distintos e/ou amplificados de cepas do mesmo sorotipo foram purificados empregando-se o *kit GFX PCR DNA and Band Purification* (GE Healthcare), de acordo as instruções do fabricante, quantificados por espectrofotometria no comprimento de onda de 260 nm e sequenciados com auxílio dos respectivos iniciadores (**Tabela 2**). Todas as reações de sequenciamento

foram realizadas no Centro de Estudos do Genoma Humano (Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo). As sequências obtidas foram analisadas com a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (ALTSCHUL et al., 1990) e depositadas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) sob os seguintes números de acesso: KY070367 (*tccP* de aEPEC O55:H7 BA320), KY951967 (*tccP* de aEPEC O55:H7 BA467), KY951968 (*tccP* de aEPEC O55:H7 BA1244), KY951973 (*tccP* de aEPEC O55:H7 BA4147), KY951970 (*tccP* de aEPEC ONT:H19 BA3800), KY951972 (*tccP* de aEPEC ONT:H19 BA3836), KY951966 (*tccP2* de aEPEC ONT:H19 BA365), KY951969 (*tccP2* de aEPEC ONT:H19 BA3836). A comparação entre as sequências foi realizada por alinhamento múltiplo com a ferramenta *Clustal Omega* (SIEVERS et al., 2011).

3.4 Tipagem do gene tir

A discriminação entre os tipos fosforilado (Y-P) e não-fosforilado (S) do gene *tir* das cepas *espFU*-positivas foi realizada por PCR de acordo com a metodologia descrita por Ogura et al. (2007). As cepas tEPEC E2348/69 e EHEC EDL933 foram utilizadas como controles positivos para *tirY-P* e *tirS*, respectivamente.

3.5 Determinação dos grupos filogenéticos (filogrupos)

Os filogrupos (A, B1, B2, C, D, E ou F) das cepas positivas para *espFU* foram determinados por PCR, de acordo com o esquema de classificação proposto por Clermont et al. (2013).

3.6 Obtenção da proteína recombinante EspFU-His

3.6.1 Clonagem de espFU no vetor de expressão pET28a(+)

O gene *espFU* foi amplificado por PCR a partir do genoma da cepa BA320 com os oligonucleotideos iniciadores EspFUNdeI-F/EspFUBamHI-R, conforme previamente descrito (CAMPELLONE; ROBBINS; LEONG, 2004). O produto de amplificação foi purificado após eletroforese em gel de agarose (0,8%) com o *kit GFX PCR DNA and Band Purification* (GE Healthcare), segundo as instruções do

fabricante. O fragmento purificado e o vetor de expressão pET28a(+) (Novagen, Estados Unidos) foram digeridos com as endonucleases *Ndel* e *BamHI* (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante. Após nova purificação dos fragmentos, foram determinadas as concentrações do inserto e do vetor por espectrofotometria a 260 nm.

A reação de ligação inserto/vetor foi realizada em um volume final de 10 µL, empregando-se 30 ng de espFU, 10 ng de pET28a(+), 1 U de T4 DNA Ligase (Invitrogen), tampão da enzima 1 X e água ultrapura estéril, seguido por incubação à temperatura ambiente durante 1 h e a 4 °C por mais 18 h. Os produtos de ligação foram então transformados em células competentes de E. coli DH5a por choque térmico (incubação em gelo por 30 min, 42 ºC por 2 min e novamente em gelo por mais 10 min). As células foram recuperadas em 1 mL de meio LB sem antibiótico a 37 °C por 1 h e, posteriormente, semeadas em placas de LBA suplementadas com kanamicina (50 µg/mL), que foram incubadas a 37 °C por 18 h. Para confirmação dos clones recombinantes, colônias obtidas foram aleatoriamente selecionadas e utilizadas como DNA molde em reações de PCR para amplificação do gene espFU com os iniciadores tccP-F1/tccP-R1. O sucesso da ligação e obtenção de clones recombinantes foi confirmado em definitivo após a extração plasmidial com o kit PureYield[™] Plasmid Miniprep System (Promega, Estados Unidos) das colônias positivas por PCR, seguido por análise de restrição com as enzimas Ndel e BamHI. O plasmídeo pET*espFU*_{BA320} foi então sequenciado empregando-se os iniciadores T7 promoter-F/T7 terminator-R. As sequências obtidas foram analisadas por BLAST e pela ferramenta ProtParam (GASTEIGER et al., 2005).

3.6.2 Indução da produção de EspFU-His

Para a produção de EspFU-His, o plasmídeo recombinante foi transformado em células competentes de *E. coli* BL21(DE3) por eletroporação com o sistema *Gene Pulser II* (Bio-Rad, Estados Unidos), empregando as seguintes condições: 2,5 kV, 200 Ω e 25 µF. As células recuperadas foram semeadas em placas de LBA suplementadas com kanamicina (50 µg/mL) e incubadas a 37 °C por 18 h. Clones de BL21(pET*espFU*_{BA320}) foram então cultivados a 37 °C em meio LB suplementado com kanamicina (50 µg/mL) até atingir a fase intermediária de crescimento exponencial (densidade óptica a 600 nm = 0,6 a 0,8). Nesse ponto a produção da proteína heteróloga foi induzida pela adição de 0,2, 0,5 ou 1 mM de isopropil–β-Dtiogalactosidase (IPTG), mantendo-se a incubação por mais 4 h a 37 °C. Alíquotas dos cultivos bacterianos foram coletadas antes (pré) e após 4 h da adição de IPTG (pós-indução) para monitoramento da produção da proteína recombinante por *immunoblot*, conforme descrito a seguir.

3.6.3 Purificação de EspFU-His por cromatografia de afinidade

O volume total das culturas induzidas foi centrifugado a 10.000 rpm por 30 min sob refrigeração de 4 ºC. Os sedimentos celulares foram ressuspensos em tampão de lise (Tris 100 mM, cloreto de sódio 500 mM, inibidor de protease fluoreto de fenilmetilsulfonil [PMSF] 1 mM, lisozima 50 µg/mL; pH 7,0). As suspensões foram sonicadas e as frações solúvel (citoplasmática) e insolúvel (corpúsculos de inclusão) separadas após centrifugação a 13.000 rpm por 40 min sob refrigeração. A fração insolúvel foi então ressuspensa em tampão de solubilização/ligação (Tris 100 mM, cloreto de sódio 500 mM, ureia 8 M, pH 7,0) e utilizada para purificação de EspFU_{BA320}-His por cromatografia de afinidade ao níquel, empregando-se colunas His-Trap de 5 mL (GE Healthcare) no sistema de cromatografia líquida (HPLC) automatizado AKTAprime Plus (GE Healthcare). O material adsorvido à coluna foi eluído com o tampão de ligação acrescido de concentrações gradativas (0 a 1 M) de imidazol. Após a purificação, foi realizado o remodelamento (refolding) da proteína recombinante por meio da diálise contra tampão de ligação com concentrações diminutas (6, 4, 2, 1 e 0,5 M) ou sem ureia. A proteína purificada foi então quantificada e armazenada a -20 °C ou -80 °C.

3.6.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e imunodetecção da produção de EspFU-His

A análise da proteína recombinante foi realizada durante todo o processo de expressão e purificação por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), em condições redutoras e desnaturantes (LAEMMLI, 1970), seguido por coloração com *Coomassie Blue* (Bio-Rad).

A detecção da proteína EspFU-His também foi realizada por *immunoblot*. Para tal, as frações proteicas resolvidas por SDS-PAGE foram transferidas para membranas de nitrocelulose (GE Healthcare) segundo a metodologia de Towbin et al. (1979), utilizando o aparato de transferência *Trans-Blot SD Semi-Dry* (Bio-Rad). Após bloqueio por 2 h à temperatura ambiente com tampão salina fosfato (PBS) (cloreto de sódio 137 mM; cloreto de potássio 2,7 mM; fosfato de sódio dibasico 4,3 mM; fosfato de potássio monobásico 1,5 mM) contendo 5% (m/v) de leite em pó desnatado, as membranas foram incubadas com anticorpos monoclonais anti-His (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) diluídos 1:2.000 em solução de bloqueio durante 2 h à temperatura ambiente sob constante agitação. As membranas foram lavadas três vezes com PBS/Tween 0,02% (PBS-T) e então incubadas por 1 h à temperatura ambiente sob constante agitação de cabra anti-IgG de camundongo conjugados à peroxidase (Sigma-Aldrich) diluídos 1:5.000 em solução de bloqueio. Após novo ciclo de lavagens, o ensaio foi revelado com 3-3'diamonibenzidina (DAB; Sigma-Aldrich) e peróxido de hidrogênio (H $_2O_2$).

3.6.5 Análise de EspFU-His por espectrometria de massas (LC-MS/MS)

Para confirmação de sua identidade, a banda correspondente à proteína recombinante EspFU-His foi excisada do gel de SDS-PAGE (12%) corado com *Coomassie Blue* e enviada ao Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada (LETA) do Instituto Butantan, onde foi processada e analisada por espectrometria de massas (LC-MS/MS) no aparelho *Pro Mass Spectrometer* (GE Healthcare), sob coordenação da Dra. Solange Serrano. Os espectros de massas obtidos foram analisados por meio da ferramenta MASCOT (Matrix Science).

3.7 Obtenção de soro policional anti-EspFU

Todos os experimentos neste estudo foram aprovados pelas Comissões de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (Certificado 97/2015) e do Instituto Butantan (Protocolo 1393/15).

Um coelho branco Nova Zelândia fêmea com aproximadamente 2,5 kg foi imunizado via intramuscular com 1 mL de solução contendo 100 µg da proteína recombinante EspFU-His e 2,5 mg do adjuvante hidróxido de alumínio, sendo duas doses de reforço administradas a cada quinze dias. Amostras de sangue foram coletadas pela veia auricular antes (pré-imune) e durante (hiperimune) o protocolo de imunização para análise da resposta do animal ao antígeno. Após 45 dias, foi realizada a sangria total por punção cardíaca após anestesia do animal com quetamina (50 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). Para a obtenção do soro, o sangue foi

incubado a 37 °C por 30 min para coagulação, seguido por centrifugação a 1.000 rpm por 10 min a 4 °C. A seguir, o soro foi incubado a 56 °C por 1 h para a inativação de componentes que poderiam causar reações inespecíficas.

O soro hiperimune também foi adsorvido contra extratos bacterianos de *E. coli* BL21(DE3) e E2348/69 para a eliminação de anticorpos inespecíficos. Para tal, as cepas bacterianas foram cultivadas em 100 mL de caldo tríptico de soja (TSB; Difco) a 37 °C sob agitação (200 rpm) por 18 h. Volumes de 25 mL dos cultivos bacterianos foram transferidos para tubos *Falcon* (TPP, Suíça), centrifugados a 5.000 rpm por 10 min e os sedimentos celulares lavados com PBS contendo inibidor de proteases (PMSF 1 mM). Após nova centrifugação, os sedimentos celulares foram ressuspensos em 20 mL de soro, incubados sob agitação por 2 h à temperatura ambiente e, posteriormente, a 4 °C por 18 h. O soro adsorvido foi obtido após centrifugação a 10.000 rpm por 10 min sob refrigeração, aliquotado em volumes de 1 mL e armazenado a -20 °C até seu uso.

3.8 Titulação do soro anti-EspFU por ensaio imunoenzimático (ELISA)

A titulação do soro policional anti-EspFU foi realizada por ensaio imunoenzimático (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*, ELISA) indireto (ENGVALL; PERLMANN, 1971). Para tal, microplacas *MaxiSorp* (Thermo Fisher Scientific) foram sensibilizadas com 1 µg da proteína EspFU-His por poço (em duplicatas), bloqueadas com PBS contendo 5% de leite em pó desnatado, incubadas com diluições seriadas do soro hiperimune ou pré-imune e anticorpos de cabra anti-IgG de coelho conjugados à peroxidade (1:5.000), sendo o ensaio revelado com tetrametilbenzidina (TMB; BD Biosciences, Estados Unidos) e os valores de densidade óptica (DO) a 450 nm aferidos no leitor de ELISA *Multiskan EX* (Labsystems, Estados Unidos).

3.9 Detecção da produção de EspFU (TccP/TccP2) por ELISA

As cepas de aEPEC foram cultivadas em 3 mL de meio LB a 37 °C sob constante agitação (200 rpm) por 18 h. Em seguida as culturas bacterianas foram inoculadas (1:100) em 3 mL de meio LB, caldo *E. coli* (EC) ou DMEM com baixa concentração de glicose, sendo os cultivos mantidos a 37 °C sob constante agitação

(200 rpm) por 18 h. As culturas bacterianas foram centrifugadas a 13.000 rpm por 10 min e os sobrenadantes (100 μL/poço) utilizados na sensibilização de placas *Maxisorb* (Thermo Fisher Scientific) a 4 °C por 18 h. Em seguida, as placas foram lavadas quatro vezes com PBS-T (200 μL/poço), bloqueadas com solução de leite em pó desnatado (5%) em PBS (150 μL/poço) por 1 h e 30 min a 37 °C e incubadas com o soro anti-EspFU (100 μL/poço) diluído 1:100 em solução de bloqueio. Após incubação a 37 °C por 1 h, as placas foram novamente lavadas com PBS-T e incubadas por 45 min a 37 °C com anticorpos de cabra anti-IgG de coelho conjugados à peroxidade (100 μL/poço) diluídos 1:5.000 em solução de bloqueio. Por fim, após um novo ciclo de lavagens, o ensaio foi revelado com TMB ou o-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo (ONPG; Sigma-Aldrich) e os valores de densidade óptica (DO) a 450 ou 492 nm, respectivamente, aferidos no leitor de ELISA *Multiskan EX*. Todas as cepas foram testadas em triplicatas e pelo menos dois experimentos independentes foram realizados.

3.10 Detecção da produção de EspFU (TccP/TccP2) por immunoblot

As culturas bacterianas em DMEM foram centrifugadas a 13.000 rpm por 10 min e as proteínas do sobrenadante precipitadas com ácido tricloroacético 20% (v/v) a 4 °C por 1 h. Após centrifugação a 13.000 rpm por 40 min sob refrigeração (4 °C), as proteínas precipitadas foram ressuspensas em tampão de Laemmli suplementado com Tris 1 M (pH 9,0) para neutralizar qualquer resquício de ácido, e então resolvidas por SDS-PAGE (12%). Após transferência para membranas de nitrocelulose e bloqueio, as proteínas foram incubadas com o soro policional anti-EspFU (1:100) e anticorpos de cabra anti-IgG de coelho conjugados à fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich) diluídos 1:5.000, sendo o ensaio revelado com 4-nitroazul de tetrazólio (NBT; Thermo Fisher Scientific) e 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP; Thermo Fisher Scientific).

3.11 Sequenciamento dos genes espFU e tir da cepa BA320

A cepa BA320 foi selecionada para um estudo mais detalhado do papel de EspFU em aEPEC. Esta cepa pertence ao sorotipo O55:H7, apresenta o padrão de adesão ALL em ensaios de interação com células epiteliais *in vitro* e tem sido amplamente caracterizada por nosso grupo (ABE et al., 2009; ROCHA et al., 2011).

Os genes *espFU* e *tir* de BA320 foram amplificados por PCR com os iniciadores tccP-F1/tccP-R1 e map-tir (F)/tir-cesT (R) (ROCHA et al., 2011), respectivamente. Os produtos de amplificação foram purificados e clonados no vetor pGEM-T Easy (Promega), conforme as recomendações do fabricante. Células competentes de *E. coli* DH5α foram transformadas por choque térmico com os produto de ligação e semeadas em placas de LBA contendo ampicilina (100 µg/mL), IPTG 0,5 mM e X-gal (80 µg/mL), seguido por incubação a 37 °C por 18 h. Colônias brancas foram testadas por PCR para a confirmação da clonagem, sendo os clones positivos selecionados para a extração dos plasmídeos pGEM*espFU* e pGEM*tir*, os quais foram sequenciados com os iniciadores M13/pUC-F e M13/pUC-R. Visando a cobertura total da sequência de *tir*, foram desenhados os iniciadores internos tirSeq-F/tirSeq-R. As sequências obtidas foram analisadas por BLAST e na base de dados Pfam (FINN et al., 2016).

3.12 Mutação dos genes espFU e tir por recombinação homóloga

A deleção dos genes *espFU* e *tir* foi realizada segundo o método descrito por Datsenko e Wanner (2000), empregando o sistema de recombinases codificadas pelo fago λ *Red.* Com base nas respectivas sequências gênicas, foram desenhados os iniciadores EspFucat-1/EspFucat-2 e Tirkan-1/Tirkan-2, cada qual apresentando 60 nucleotídeos homólogos a *espFU* ou *tir* e outros 20 específicos para a amplificação por PCR do gene de resistência ao cloranfenicol ou kanamicina, empregando-se os plasmídeos pKD3 e pKD4 como DNA molde, respectivamente. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose (0,8%), purificados e posteriormente tratados com a endonuclease *DpnI* (Invitrogen) para eliminação de qualquer DNA genômico (metilado) remanescente. Após nova purificação, diluições seriadas dos fragmentos lineares espFU:cat ou tir:kan foram transformadas por eletroporação (2,5 kV, 200 Ω e 25 µF) em células competentes de BA320(pKD46) expressando as recombinases codificadas por este plasmídeo, após indução com arabinose 0,1 M. As células foram então recuperadas em LB a 37 °C e semeadas em placas de LBA suplementadas com cloranfenicol (25 µg/mL) ou kanamicina (50 µg/mL), que foram incubadas a 37 °C por 18 h.

Para a eliminação do plasmídeo termolábil pKD46 foram realizados repiques sucessivos dos candidatos a mutantes em duas placas de LBA, uma contendo ampicilina (100 µg/mL) e outra cloranfenicol (25 µg/mL) ou kanamicina (50 µg/mL), seguido por incubação a 42 °C por 18 h. As colônias resistentes a cloranfenicol ou kanamicina e sensíveis à ampicilina foram consideradas curadas, sendo posteriormente analisadas para confirmação da mutação por PCR com os iniciadores tccP-F1/tccP-R1 (*espFU*) ou Tir004+/Tir005- e k2/kt (*tir*). Os produtos de PCR dos candidatos a mutantes foram clonados em pGEM-T Easy e sequenciados com os iniciadores M13/pUC-F e M13/pUC-R, sendo as sequências obtidas analisadas por BLAST.

Também foi realizada a deleção do gene *tir* na cepa $\Delta espFU$ para a obtenção do duplo mutante $\Delta \Delta espFU$:tir, seguindo-se o mesmo procedimento descrito acima.

Após a confirmação das mutações, foi utilizado o plasmídeo termolábil pCP20 para remoção dos cassetes de resistência. Para tal, as cepas $\Delta espFU$, Δtir e $\Delta\Delta$ espFU:tir foram transformadas com pCP20 por eletroporação (2,5 kV, 200 Ω e 25 μ F), recuperadas em LB a 30 °C por 1 h e então semeadas em placas de LBA suplementado com ampicilina (100 μ g/mL). A seguir, foram realizados repiques sucessivos das colônias obtidas em três placas de LBA, a primeira contendo ampicilina (100 μ g/mL), a segunda cloranfenicol (25 μ g/mL) ou kanamicina (50 μ g/mL) e a última sem qualquer marca seletiva, seguido por incubação a 42 °C por 18 h. As colônias que cresceram apenas nas placas de LBA sem antibiótico foram consideradas curadas do plasmídeo pCP20 e livres dos cassetes de resistência.

3.13 Construção dos plasmídeos de complementação

O gene *espFU* foi amplificado por PCR empregando-se o gDNA de BA320 e os iniciadores EspFuNdeI-F/EspFuBamHI-R, conforme descrito previamente. O produto de PCR foi purificado, digerido com *NdeI* e *BamHI* e clonado no plasmídeo p-myc, que contém a região promotora de *espFU* (CAMPELLONE; ROBBINS; LEONG, 2004). Células competentes de *E. coli* DH5α foram transformadas por

choque térmico com o produto de ligação e semeadas em placas de LBA contendo kanamicina (50 µg/mL), seguido por incubação a 37 °C por 18 h. Colônias resistentes foram testadas quanto à presença do gene *espFU* por PCR, sendo um dos clones positivos selecionado para a extração do plasmídeo pEspFU e posterior análise de restrição com as enzimas *Ndel* e *BamHI*. O plasmídeo recombinante foi então transformado em células competentes de $\Delta espFU$ por eletroporação (2,5 kV, 200 Ω e 25 µF) e os clones transformantes $\Delta espFU$ +pEspFU selecionados em LBA contendo kanamicina (50 µg/mL) após incubação a 37 °C por 18 h. Simultaneamente, foram realizadas transformações com o plasmídeo p-myc para obtenção da cepa $\Delta espFU$ +vetor utilizada como controle nos experimentos seguintes.

O gene tir foi amplificado por PCR empregando-se o gDNA de E2348/69 (fosforilado) ou BA320 (não-fosforilado) e os iniciadores Tir004+/Tir005-, conforme descrito previamente (DE VINNEY et al., 2001). Os produtos de PCR foram purificados, digeridos com BgIII (Invitrogen) e XhoI (Invitrogen) e clonado nos sítios de BamHI e Sall do plasmídeo pACYC184 sob controle do promotor do gene de resistência à tetraciclina (CHANG; COHEN, 1978). Os produtos de ligação foram transformados em células competentes de E. coli DH5a por choque térmico e os clones recombinantes selecionados em placas de LBA contendo cloranfenicol (25 µg/mL) após incubação a 37 °C por 18 h. Colônias resistentes foram testadas quanto à presença do gene tir por PCR, sendo os clones positivos selecionados para a análise plasmidial por eletroforese em gel de agarose (0,8%). Os plasmídeos recombinantes pTir_{Y-P} ou pTir foram então transformados em células competentes de Δtir ou $\Delta \Delta espFU:tir$ por eletroporação (2,5 kV, 200 Ω e 25 µF) e os clones transformantes selecionados em LBA contendo cloranfenicol (25 µg/mL) após incubação a 37 °C por 18 h. Simultaneamente, foram realizadas transformações com o plasmídeo pACYC184 para obtenção de cepas contendo o vetor vazio, utilizadas como controle nos experimentos seguintes.

3.14 Análise da expressão de espFU por PCR-transcriptase reversa (RT-PCR)

As cepas bacterianas foram cultivadas em meio LB a 37 °C por 18 h, diluídas 1:100 em DMEM e incubadas a 37 °C sob constante agitação (200 rpm) até atingirem a fase final de crescimento exponencial ($DO_{600nm} \approx 1,0$). Neste ponto, o

RNA total foi extraído utilizando-se o *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Alemanha), de acordo com as recomendações do fabricante. As extrações foram tratadas com *DNAse I* (Invitrogen), quantificadas por espectrofotometria a 260 nm e 2 µg dos RNAs livres de DNA foram utilizados nas reações de síntese de cDNA com o kit *SuperScript First-Strand Synthesis System* (Invitrogen), conforme as instruções do fabricante. Os cDNAs gerados foram utilizados em reações de PCR para amplificação do gene *espFU* com os iniciadores tccP-F1/tccP-R1. Os respectivos gDNAs e RNAs das cepas foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel agarose (0,8%).

3.15 Detecção da proteína EspFU-Myc por immunoblot

As cepas Δ espFU+pEspFU e Δ espFU+vetor foram cultivadas em meio LB suplementado com kanamicina (50 µg/mL), diluídas 1:100 em DMEM e incubadas a 37 °C por 18 h sob agitação de 200 rpm. As culturas foram centrifugadas a 13.000 rpm por 10 min e as proteínas do sobrenadante precipitadas com ácido tricloroacético 20% (v/v) a 4 °C por 1 h. Após centrifugação a 13.000 rpm por 40 min sob refrigeração (4 °C), as proteínas precipitadas foram ressuspensas em tampão de Laemmli contendo Tris 1 M (pH 9,0) e resolvidas por SDS-PAGE (12%). Após transferência para membrana de nitrocelulose e bloqueio com solução de leite em pó desnatado (5%) em PBS, as proteínas foram incubadas com anticorpos monoclonais anti-Myc 9E10 (Santa Cruz Biotechnology, Estados Unidos) diluídos 1:200 e anticorpos de cabra anti-IgG de camundongo conjugados à peroxidase (1:5.000), sendo o ensaio revelado com DAB e H₂O₂.

3.16 Curva de crescimento

As cepas bacterianas foram cultivadas em 3 mL de LB com ou sem antibiótico a 37 °C por 18 h sob constante agitação (200 rpm). As densidades celulares (DO_{600nm}) das culturas foram ajustadas para aproximadamente 1,0, a partir da qual foi realizada uma diluição de 1:100 em 100 mL de meio LB fresco. Os cultivos foram mantidos a 37 °C sob constante agitação (200 rpm), sendo os valores de DO_{600nm} determinados por espectrofotometria a cada 30 min durante 7 h. Para avaliar os padrões de crescimento bacteriano em condições de infecção, as culturas em LB foram diluídas 1:1.000 em placas de 6 poços (Falcon, Estados Unidos) contendo 3 mL de DMEM com baixa concentração de glicose, seguido por incubação estática a 37 °C sob 5% de CO₂ por 6 h. Alíquotas de 10 µL foram regularmente coletadas (0, 1,5, 3, 4,5 e 6 h), serialmente diluídas em PBS estéril e semeadas em placas de LBA para a enumeração das unidades formadoras de colônias (UFC/mL). Todas as cepas foram testadas em triplicatas e pelo menos dois experimentos independentes foram realizados.

3.17 Detecção das proteínas EspA, EspB e Tir por immunoblot

Para a obtenção das proteínas totais e secretadas, culturas bacterianas em meio LB foram diluídas 1:1.000 em DMEM com baixa concentração de glicose, seguido por incubação a 37 °C sob agitação até atingir DO_{600nm} ≈ 1,0, ou incubadas em condições de infecção (37 °C e 5% de CO₂, sem agitação). Após centrifugação dos cultivos bacterianos a 13.000 rpm por 10 min a 4 °C, os sedimentos celulares foram ressuspensos em PBS suplementado com ureia (8 M) e incubados sob agitação à temperatura ambiente por 18 h. Já os sobrenadantes foram filtrados em membranas de 0,22 µm (Millipore, Estados Unidos), inibidores de proteases e 1 µg de albumina sérica bovina (BSA) foram adicionados e as proteínas concentradas com o auxílio de um sistema de filtragem Amicon Ultra 10 kDa (Millipore). As proteínas totais (lisados) e secretadas (sobrenadantes concentrados) foram então resolvidas em géis Mini-PROTEAN TGX Stain-Free (Bio-Rad), que possibilitam a visualização das amostras por fluorescência, sem necessidade de coloração por Coomassie Blue. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (Bio-Rad), bloqueadas com solução de leite desnatado (5%) ou BSA (2%) e então incubadas com anticorpos policionais anti-Tir (1:10.000), anti-EspA (1:10.000), anti-EspB (1:10.000) ou anticorpos monoclonais anti-RpoA (Santa Cruz Biotechnology) (1:10.000). Após lavagens com PBS-T, as membranas foram incubadas com anticorpos secundários anti-IgG de coelho ou camundongo (1:30.000),sendo ensaio revelado 0 por quimioluminescência com o reagente ECL (GE Healthcare). Os anticorpos policionais foram produzidos em coelhos e gentilmente cedidos pela Dra. Vanessa Sperandio.

3.18 Ensaio de motilidade

As cepas bacterianas foram cultivadas em 3 mL de LB com ou sem antibiótico a 37 °C por 18 h. Uma alíquota de 2 µL desses cultivos foi aplicada no centro de placas contendo meio semi-sólido (LB contendo 0,3% de ágar), as quais foram incubadas a 37 °C por 18 h, sendo a motilidade evidenciada pelo espalhamento bacteriano em torno do inóculo inicial.

3.19 Ensaios de interação com células epiteliais in vitro

3.19.1 Cultivo celular

Células HeLa (adenocarcinoma cervical humano) foram rotineiramente mantidas a 37 °C e atmosfera com 5% de CO₂ em DMEM com alta concentração de glicose (Cultilab) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), antibióticos (penicilina 1000 U/mL e estreptomicina 1 mg/mL) e glutamina. As células HeLa expressando actina fluorescente foram obtidas por transfecção com *Lifeact::GFP*, conforme descrito por Gruber e Sperandio (2014). Esta linhagem celular foi mantida nas mesmas condições que as células HeLa convencionais, exceto pela adição de higromicina (50 µg/mL) ao meio de cultivo.

Para a realização dos ensaios, 10⁵ células/mL foram semeadas em diversos tipos de placas (detalhadamente descritos a seguir) e incubadas a 37 °C e 5% de CO₂ por 48 h até atingir cerca de 80% de confluência. Posteriormente, o meio de cultura foi removido, as monocamadas subconfluentes lavadas com PBS (pH 7,4) estéril para remoção dos antibióticos e, em seguida, foi adicionado DMEM com baixa concentração de glicose, sem manose, suplementado com SFB (10%).

3.19.2 Infecção bacteriana

Os ensaios de interação bactéria-célula foram realizados segundo Cravioto et al. (1979), com algumas modificações. Basicamente, as cepas bacterianas foram semeadas em placas de LBA e incubadas a 37 °C por 18 h. No dia seguinte, uma colônia isolada foi cultivada em meio LB a 37 °C por 18 h, sem agitação. As culturas bacterianas foram então adicionadas (1:1.000) às monocamadas subconfluentes de células em uma multiplicidade de infecção (MOI) de 10, exceto quando indicado. As

infecções foram mantidas por até 6 h a 37 °C e 5% de CO₂, havendo a troca do meio e lavagem das células após as 3 h iniciais nos ensaios mais prolongados. Os inóculos bacterianos foram verificados por plaqueamento em LBA e contagem de células viáveis (UFC).

3.19.3 Teste de adesão

Os ensaios de adesão foram realizados em placas de 24 poços (TPP) com lamínulas de vidro. Após 3, 4,5 ou 6 h de infecção, as células foram extensivamente lavadas com PBS estéril para remoção das bactérias não aderidas, fixadas com metanol 70% (v/v) por 30 min à temperatura ambiente e coradas em soluções de May-Grunwald (Merck) (1:1) e Giemsa (Merck) (1:2) diluídos em tampão Sørensen (fosfato de sódio monobásico 8,6 mM; fosfato de sódio dibasico 28,6 mM). As lâminas foram montadas com Entellan (Merck, Estados Unidos) e analisadas por microscopia óptica sob aumento de 1.000 X.

Para a análise quantitativa da adesão, ao final do período de incubação, as células foram lavadas, lisadas com PBS acrescido de Triton X-100 (1%) por 30 min e diluições seriadas dos lisados celulares foram semeadas em placas de LBA para a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). Os ensaios foram realizados em triplicatas e pelo menos dois experimentos independentes foram realizados.

3.19.4 Teste de FAS (fluorescent actin staining)

O teste de detecção do acúmulo de actina após contato bactéria-célula foi realizado segundo Knutton et al. (1989), com modificações. As células HeLa foram cultivadas em câmaras de incubação (com 8 poços) sobre lâminas de vidro Lab-Tek (Thermo Fisher Scientific) ou placas de 24 poços e então infectadas por 1,5, 3, 4,5 ou 6 h. Ao final dos períodos de incubação, as células foram extensivamente lavadas com PBS estéril, fixadas com formaldeído 2% (v/v) por 20 min à temperatura ambiente e permeabilizadas com Triton X-100 0,2% (v/v) por 5 min. As preparações foram então tratadas com faloidina conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC; Thermo Fisher Scientific) ou faloidina-rodamina (Molecular Probes, Estados Unidos) na diluição de 1:25 por 30 min a 37 °C sob abrigo da luz para marcação da actina. Após lavagens, as preparações foram tratadas com iodeto de propídio (Sigma-Aldrich) ou diaminofenilindol (DAPI; Molecular Probes) na diluição 1:1.000 para

marcação do DNA. As lâminas foram então montadas com *ProLong antifade* (Molecular Probes) e visualizadas em microscópio de fluorescência DMi8 (Leica, Alemanha), Axiovert (Zeiss, Aleamanha) ou de fluorescência confocal LSM880 (Zeiss), sob aumento de 630 X ou 1.000 X. A cepa de tEPEC E2348/69 foi utilizada como controle positivo.

Para quantificação dos pedestais, os sítios de acúmulo de actina foram enumerados nas 100 primeiras células, contadas em diferentes campos das lâminas. Todas as cepas foram testadas em triplicatas e pelo menos três experimentos independentes foram realizados.

3.19.5 Live-cell imaging

Células HeLa expressando *Lifeact::GFP* foram semeadas em placas de 35 mm com lamínulas de vidro no fundo (MatTek, Estados Unidos), e então infectadas (MOI de 100) com as cepas de aEPEC previamente transformadas por eletroporação (2,5 kV, 200 Ω e 25 µF) com o plasmídeo expressando a proteína fluorescente mCherry, de modo a propiciar a visualizacao das bactérias (marcação em vermelho). Após 2 h de infecção, as células foram lavadas, o meio foi trocado e as preparações foram então observadas em tempo real por mais 2 h em um microscópio de fluorescência confocal A1R (Nikon, Japão), sob aumento de 630 X. As imagens foram captadas a cada 2 min durante o período de 2 h.

3.19.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Após 6 h de infecção em placas de 24 poços, as amostras foram processadas de acordo com Knutton (1995) para visualização da interação bacteriana com a superfície celular. Brevemente, as preparações foram fixadas com uma solução de paraformaldeído (4%) e glutaraldeído (3%) em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M (pH 7,2), pós-fixadas com tetróxido de ósmio a 1% e desidratadas com 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 colocadas em um suporte para microscopia de varredura, receberam uma fina camada de ouro e foram observadas em microscópio FEI QUANTA 250 (FEI Corporate, Estados Unidos) operando em 12,5 kV e distância de trabalho de 6,6 mm. As análises de MEV foram

realizadas pela Dra. Cecilia Mari Abe no Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan.

3.19.7 Ensaios de imunofluorescência

As células HeLa foram cultivadas em câmaras LabTek e infectadas por 6 h. Em seguida, as preparações foram lavadas, fixadas com formaldeído 2%, permeabilizadas com Triton X-100 0,2% e bloqueadas com solução de BSA a 2% em PBS por 1 h à temperatura ambiente. As amostras foram então incubadas com anticorpos policionais anti-Tir (1:2.000) ou anti-EspA (1:2.000) por 1 h, seguido por anticorpos de cabra anti-IgG de coelho conjugados a Alexa-Fluor 647 (Molecular Probes) na diluição 1:1.000 por 30 min. Para detecção da fosforilação de Tir, as preparações foram tratadas com anticorpos monocionais anti-fosfotirosina (cione PY20) conjugados a FITC (Thermo Fisher Scientific) na diluição 1:100 a 4 ºC por 18 h. As lâminas foram montadas com *ProLong antifade* e visualizadas com um microscópio de fluorescência confocal LSM880 (Zeiss, Alemanha) sob aumento de 630 X.

3.19.8 Análise e processamento das imagens de microscopia

Todas as imagens obtidas foram processadas com o software *ImageJ* (SCHNEIDER et al., 2012). No caso das imagens de microscopia confocal obtidas em camadas (*Z*-stack), foram selecionadas as projeções que melhor representavam o fenômeno observado.

3.19.9 Preparo de extratos proteicos e imunodetecção de EspA e EspB

Células HeLa foram cultivadas em placas de 6 poços e infectadas por 3, 4,5 ou 6 h. Após as lavagens, as células foram coletadas em 1,5 mL de PBS gelado com o auxílio de um raspador (*cell scraper*, Falcon) e então centrifugadas a 1.500 rpm por 5 min sob refrigeração. O sedimento celular foi ressuspenso em 50 uL do tampão de lise composto por Tris 50 mM (pH 7,4), Triton X-100 (1%) e coquetel de inibidores de proteases (Sigma-Aldrich), incubado à temperatura ambiente por 30 min, seguido por centrifugação a 13.000 rpm por 30 min a 4 °C para separação das frações solúvel (contendo proteínas citoplasmáticas e de membrana) e insolúvel (componentes do citoesqueleto e bactérias). As proteínas foram misturadas com tampão de Laemmli, resolvidas por SDS-PAGE (12%), transferidas para membranas de PVDF, bloqueadas com solução de leite em pó desnatado a 5% em PBS e então incubadas com anti-Tir_{Y-P} (1:10.000), anti-EspA (1:10.000) ou anti-EspB (1:10.000). Após as lavagens com PBS-T, as membranas foram incubadas com anticorpos de cabra anti-IgG de coelho conjugados à peroxidase (1:30.000), sendo o ensaio revelado por quimioluminescência.

3.19.10 Extração dos RNAs bacterianos

As células HeLa foram cultivadas em placas de 6 poços, infectadas por 3, 4,5 ou 6 h, lavadas com PBS e então tratadas por 30 min à temperatura ambiente com 1,5 mL de uma solução de Triton X-100 (1%). Em seguida, o conteúdo dos poços foi coletado com o auxílio de um raspador (*cell scraper*) e transferido para microtubos, seguido por centrifugação a 1.000 rpm por 10 min a 4 °C. Os sedimentos celulares foram ressuspensos em TRIzol (Thermo Fisher Scientific) e utilizados para a extração dos RNAs com o *kit RiboPure Bacterial RNA Isolation* (Ambion, Estados Unidos), de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade e concentração dos RNAs extraídos foram analisadas por espectrofotometria a 260 nm no aparelho NanoDrop (Thermo Fisher Scientific).

3.19.11 Síntese de cDNA e análise da expressão gênica de LEE por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

Um total de 300 ng dos RNAs livre de DNA foi utilizado na síntese de cDNAs, empregando-se o *SuperScript® cDNA syntesis Kit* (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. Os cDNAs sintetizados foram então empregados em reações de PCR quantitativo em tempo real para avaliar os níveis de expressão dos genes *ler* (LEE1), *escC* (LEE2), *escV* (LEE3), *espA* (LEE4) e *eae* (LEE5). As reações de amplificação foram realizadas em microplacas de 384 poços no sistema *QuantStudio 6 Flex* (Applied Biosystems), sendo constituídas por 2 µL dos cDNAs diluídos (1:10), 0,2 µL do mix de iniciadores na concentração final de 50 nM, 5 µL de *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) 2 X concentrado e 2,8 µL de água *nuclease-free* (Ambion), em um volume final de 10 µL. A coleção de dados foi analisada com o programa *QuantStudio Realtime PCR* (Applied Biosystems). Os dados foram normalizados aos níveis de transcrição do gene *rpoA* e analisados pelo método de crítico *threshold* (C_T) comparativo (ou $\Delta\Delta C_T$), conforme descrito no manual *Applied Biosystems Bulletin number 2.* Os dados obtidos foram apresentados como as diferenças (*n-fold*) dos níveis de expressão em relação a BA320. Todas as amostras foram testadas em triplicatas e pelo menos dois experimentos independentes foram realizados.

3.19.12 Análise transcriptômica (RNA-seq)

As células HeLa foram cultivadas em placas de 6 poços e infectadas por 6 h. Após o período de infecção, as preparações foram extensivamente lavadas com PBS e os RNAs totais foram extraídos com o kit RNEasy Mini (QIAgen), segundo as recomendações do fabricante. Os RNAs foram tratados com DNAsel e novamente purificados com as colunas do kit RNEasy Mini. Em seguida, as amostras foram analisadas com relação à pureza e concentração por espectrofotometria no aparelho NanoDrop no comprimento de onda de 260 nm. Finalmente, um total de 10 µg de cada amostra (duplicatas biológicas) de RNA livre de DNA foi enviado para o Next Generation Sequencing Core (McDermott Center) na University of Texas Southwestern Medical Center (Dallas, Estados Unidos), onde os experimentos de RNA-seq foram realizados. Resumidamente, a qualidade e integridade das amostras de RNA foram analisadas no aparelho BioAnalyzer (Agilent Technologies, Estados Unidos). Em seguida, foi realizado um enriquecimento de RNAs poli-adenilados (eucarióticos), que foram utilizados na preparação das bibliotecas de cDNA com o kit TruSeq RNA Sample Prep (Illumina, Estados unidos) de acordo com as recomendações do fabricante. Por fim, foram realizadas as corridas de sequenciamento na plataforma Illumina HiSeq 2500 utilizando reagentes SBS v3.

3.19.13 Análise dos dados de RNA-seq

Os dados brutos gerados após o sequenciamento dos RNAs foram transferidos ao *Bioinformatics Core* (*McDermott Center*) na *University of Texas Southwestern Medical Center*, onde eles foram analisados e processados conforme o delineamento descrito por Trapnell et al. (2012). A normalização dos dados e análise dos genes diferencialmente expressos (GDEs) foram realizadas com o pacote *edgeR* (ROBINSON, 2010). Um gene foi considerado diferencialmente expresso quando valores de *false discovery rate* (FDR) menores que 0,01 foram

observados. A categorização funcional dos genes diferencialmente expressos foi determinada com o servidor PANTHER. Também foram realizadas análises com a ferramenta *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA; QIAgen) a fim de verificar as relações biológicas entre os genes diferencialmente expressos.

3.19.14 Dosagem de IL-8 por ELISA de captura

As células HeLa foram cultivadas em placas de 24 poços e então infectadas por 6 h. Após este período, o meio de cultivo de cada poço foi coletado e os sobrenadantes obtidos após centrifugação a 1.500 rpm por 10 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram então testados para a detecção da citocina IL-8 por ELISA de captura com o kit Human IL-8 BD OptEIA (BD Biosciences), de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, placas Maxisorb (Thermo Fisher Scientific) foram sensibilizadas a 4 °C por 18 h com os anticorpos de captura anti-IL-8 (100 µL/poço) diluídos 1:500 em tampão carbonato-bicarbonato. Em seguida, as placas foram lavadas extensivamente com PBS-T (200 µL/poço) e bloqueadas com solução de soro fetal bovino a 10% em PBS (150 µL/poço) por 2 h à temperatura ambiente. A seguir, as placas foram novamente lavadas e incubadas por 1 h e 30 min à temperatura ambiente com a curva padrão de IL-8 recombinante (nas concentrações de 400 pg/mL a 3,125 pg/mL) ou com os sobrenadantes diluídos 1:10 em solução de bloqueio (100 µL/poço). Após novo ciclo de lavagens, as placas foram incubadas por 1 h à temperatura ambiente sob abrigo da luz com os anticorpos de detecção anti-IL-8 conjugados à peroxidase diluídos 1:250 em solução de bloqueio (100 µL/poço). Por fim, as placas foram extensivamente lavadas e o ensaio revelado com TMB, sendo os valores de DO aferidos em um leitor de ELISA Multiskan EX. Todas as amostras foram testadas em triplicatas e pelo menos três experimentos independentes foram realizados.

3.20 Modelo de colonização intestinal em camundongos tratados com estreptomicina

O modelo de camundongos tratados com estreptomicina foi adaptado de Harrington et al. (2009) e Royan et al. (2010) para avaliar a capacidade de colonização intestinal das cepas de aEPEC. Camundongos BALB/c fêmeas com sete semanas de idade, livres de patógenos específicos (*specific pathogen-free*,

SPF) foram adquiridos junto ao Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram divididos em grupos (n=3), acondicionados em caixas de polipropileno com filtro de ar e aclimatados por pelo menos cinco dias antes do início do experimento. Todos os camundongos foram livres de bactérias resistentes à estreptomicina, como também cepas positivas para *eae* (intimina) ou *espFU*, conforme análise por PCR.

Os animais foram tratados (48 h antes da inoculação e durante todo o experimento) com água ad libitum contendo estreptomicina (5 g/L). As cepas bacterianas foram cultivadas em 10 mL de meio LB suplementado com estreptomicina (100 µg/mL) a 37 °C por 18 h sem agitação. No dia seguinte, as culturas foram centrifugadas a 5.000 rpm por 10 min e os sedimentos celulares ressuspensos em 2 mL de PBS estéril. Antes da infecção, os animais receberam via oral 200 µL de solução de bicarbonato de sódio 0,4 M para neutralizar o pH gástrico. Aproximadamente 15 min depois, 200 µL das suspensões bacterianas (~10⁹ UFC) foram administrados por gavagem e as fezes frescas foram coletadas diariamente por ao menos 10 dias após infecção. As fezes foram pesadas, homogeneizadas em PBS estéril e diluições seriadas semeadas em ágar MacConkey suplementado com estreptomicina (100 µg/mL) para a contagem de células viáveis após crescimento a 37 °C por 18 h. A confirmação da presença da cepa BA320 e cepas derivadas foi realizada por aglutinação em lâmina com o soro anti-O55 (Probac, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. Ao menos dois experimentos independentes foram realizados, sendo os dados compilados para as análises estatísticas.

3.21 Análises estatísticas

Associações entre a presença de *espFU* (*tccP/tccP2*) com determinados sorotipos, tipos de intimina ou filogrupos foram investigadas por teste exato de Fisher com o *software* BioEstat 5.3, sendo *P*<0,05 considerado significativo. O *software* GraphPad Prism v. 6.0 foi utilizado para as demais análises de significância estatística e preparação das representações gráficas. Para comparações entre dois grupos, foi empregado o teste t (*Student*) não pareado, enquanto que análise de variância (ANOVA) foi utilizada em múltiplas comparações (três grupos ou mais). As diferenças foram consideradas significativas quando valores de *P*<0,05 foram observados.

4 RESULTADOS

4.1 Prevalência de espFU em cepas de aEPEC

Genes codificando EspFU (*tccP* e *tccP2*) foram detectados em 33 (45,8%) das 72 cepas de aEPEC investigadas. Com relação à distribuição dos alelos, 11 cepas foram positivas para *tccP*, 18 para *tccP2* e quatro apresentavam ambos (**Figura 8A**). Foram detectados polimorfismos com relação ao tamanho dos produtos de PCR, que variaram de 750 a 1.800 pb (**Figura 8B**). O sequenciamento de fragmentos com diferentes tamanhos confirmou a identidade dos fragmentos *tccP* e *tccP2*, além de revelar que as proteínas preditas poderiam apresentar entre dois e nove resíduos ricos em prolinas (PRRs). Interessantemente, todas as cepas que continham ambos os alelos foram positivas para um fragmento *tccP* de 750 pb.





(A) Frequência de distribuição dos alelos *tccP* e *tccP2* entre as 72 cepas de aEPEC. (B) Eletroforese em gel de agarose (0,8%) corado com GelRed dos diferentes tamanhos de produtos de PCR observados para *tccP* e *tccP2*. M: marcador de peso molecular *GeneRuler 1 kb DNA ladder* (Thermo Fisher Scientific).

As cepas *espFU*-positivas pertenciam a 23 sorotipos e apresentaram nove diferentes tipos de intimina (**Tabela 3**). Associações significativas foram observadas entre a ocorrência de *espFU* com os sorotipos O55:H7 e ONT:H19, como também com a presença de intimina *epsilon* (P<0,05).

Сера	Sorotipo ^a	Intimina	PCI	PCR (<i>espFU/tir</i>)		
			tccP ^b	tccP2 ^b	tir	
BA320	O55:H7*	gamma	+(900)	-	S	E
BA487	O55:H7*	gamma	+(1.050)	-	S	E
BA1244	O55:H7*	gamma	+(1.050)	-	S	E
BA1652	O131:H4	epsilon	+(900)	-	Y-P	E
BA1738	O80:H26	epsilon*	+(900)	-	Y-P	E
BA2468	ONT:H19*	beta	+(900)	-	Y-P	B1
BA3160	O110:H-	epsilon*	+(900)	-	Y-P	B1
BA4135	O108:H25	iota	+(750)	-	Y-P	B1
BA4147	O55:H7*	gamma	+(900)	-	Y-P	А
BA4192	O111:H25	iota	+(1.050)	-	Y-P	А
BA3977	ONT:H45	gamma	+(750)	-	Y-P	B2
BA4047	O1:H6	beta	+(750)	+(1.050)	Y-P	А
BA3836	ONT:H19*	epsilon*	+(750)	+(1.050)	Y-P	B1
BA3800	ONT:H19*	epsilon*	+(750)	+(1.050)	S	B2
BA3851	ONT:H38	kappa	+(750)	+(1.500)	Y-P	Desc. ^c
BA151	ONT:H9	epsilon*	-	+(1.050)	Y-P	B1
BA365	ONT:H19*	epsilon*	-	+(1.050)	Y-P	B1
BA442	O35:H19	epsilon*	-	+(1.050)	Y-P	B1
BA1649	O111:H38	epsilon*	-	+(1.650)	Y-P	B1
BA1887	O111:H38	epsilon*	-	+(1.350)	Y-P	B1
BA2103	O26:H11	beta	-	+(900)	Y-P	B1
BA2459	O26:H11	lambda	-	+(1.350)	Y-P	B1
BA2923	O34:H6	beta	-	+(1.200)	Y-P	B1
BA2991	O34:H-	theta	-	+(1.200)	Y-P	B1
BA3148	O35:H19	epsilon*	-	+(1.200)	Y-P	B1
BA3443	O88:H25	epsilon*	-	+(1.200)	Y-P	B1
BA3574	ONT:H28	epsilon*	-	+(1.200)	Y-P	B1
BA3690	O111:H38	epsilon*	-	+(1.500)	Y-P	B1
BA558	O111:H40	epsilon*	-	+(1.050)	Y-P	А
BA585	O157:H16	beta	-	+(900)	Y-P	А
BA2294	O9:H33	lambda	-	+(1.350)	S	А
BA92	O2:H16	beta	-	+(900)	Y-P	Desc.
BA589	O5:H2	beta	-	+(1.800)	Y-P	Desc.

Tabela 3 - Sorotipos, subtipos de intimina, genótipos e filogrupos das cepas de aEPEC positivas para *espFU*.

^a ONT: O não-tipável; ^b o tamanho dos fragmentos de PCR (pb) é indicado dentro dos parênteses; ^c filogrupo desconhecido; *, associação significativa com a presença de *espFU* (*P*<0,05).

O alinhamento das sequências preditas de aminoácidos revelou que EspFU/TccP é altamente conservada em aEPEC O55:H7 e ONT:H19, embora pequenas alterações tenham sido observadas entre os sorotipos (**Figura 9**). Do mesmo modo, as sequências de EspFU/TccP2 das cepas ONT:H19 apresentaram uma alta similaridade. Além disso, as porções amino-terminal de TccP e TccP2 apresentaram grandes diferenças, enquanto que os PRRs destas proteínas foram praticamente idênticos.

Figura 9 - Alinhamento múltiplo das sequências de TccP e TccP2 de aEPEC O55:H7 e ONT:H19.

TCCP2 (BA3800 /ONT + H19)	22	SSA TO CHIS DITITTS DESPENDED STATET RUKISYTS STOP TO YTOS TEKN
TCCP2 (0471-1/ONT:H19)	22	SOM TO UNIT OF TO THE OTHER OF THE OTHER OTHER OTHER OF THE OTHER O
TCCP2 (3632-1/ONT:H19)	22	SCT TV/COHKSTDNT/KTCSDFSDSNSDASATTTEKVKNSYTESGLORETCYTOSSTEKN
TccP2 (BA365/ONT:H19)	22	SSTET/SOHKSTPNTVKTSSPFSPSNSPASATTTEKVKNSYTESGLOBETSYTOSSTEKN
TCCP2 (BA3836/ONT:H19)	22	SSTOT/SOHKSTPNTVKTSSPESPSNSPASATT TEKVKNSYTESGLOPPTSYTOSSTEKN
TccP(BA320/055:H7)	22	KSS SVSPOKTTINPVKTSSPFSPSSSSTSATTI BAPVAHSASFHROSTAES
TccP (BA467/055:H7)	22	KSS SVSPOKITLNPVKISSPFSPSSSSISATTL RAPNAHSASFHROSTAES
TccP(BA1244/055:H7)	22	KSSISVSPOKITINPVKISSPFSPSSSSISATTLERAPNAHSASFHROSTAES
TccP(BA4147/055:H7)	22	KSSSSVSPOKITLNPVKISSPFSPSSSSISATTLERAPNAHSASFHROSTAES
TccP(st957/055:H7)	22	KSSESVSPOKITINPVKISSPESPSSSSISATTIERAPNAHSASFHROSTAES
TccP(CB9615/055:H7)	22	KSSESVSPOKITLNPVKISSPESPSSSSISATTLERAPNAHSASFHROSTAES
TccP(TB182A/055:H7)	22	KSS SVSPOKITLNPVKISSPFSPSSSSISATTLERAPNAHSASFHROSTAES
TccP(WC211/055:H7)	22	KSSESVSPOKITINPVKISSPESPSSSSISATTIERAPNAHSASFHROSTAES
TccP(DEC5d/055:H7)	22	KSSESVSPOKITLNPVKISSPESPSSSSISATTLERAPNAHSASFHROSTAES
TccP(BA3800/ONT:H19)	22	KSS SVSPOKITLNPVKISSPFSPSSSSISATTLERAPNAHSASFHROSTAES
TccP(BA3836/ONT:H19)	22	KSSESVSPOKITINPVKISSPESPSSSSISATTIERAPNAHSASFHROSTAES
,		
TccP2 (BA3800/ONT:H19)	82	AL HRP EDVAORT VOHLAEHGTOPARNMAEHTPPAPNWPAPTPPVONEOSRPLPDVAORL
TccP2 (0471-1/ONT:H19)	82	AL HRPLEDVAORLVOHLAEHGTOPARNMAEHTPPAPNWPAPTPPVONEOSRPLPDVAORL
TccP2(3632-1/ONT:H19)	82	AL HRPLEDVAORLVOHLAEHGIOPARNMAEHIPPAPNWPAPTPPVONEOSRPLPDVAORL
TccP2 (BA365/ONT:H19)	82	ALERPLEDVAKELVOHLAEHGTOPARNMAEHTPPAPNWPAPTPPVONEOSRPLPDVAORL
TccP2 (BA3836/ONT:H19)	82	AL HRP EDVAORT VOHLAEHGTOPARNMAEHTPPAPNWPAPTPPVONEOSRPLPDVAORL
TccP(BA320/055:H7)	75	SLHOO PNVRORLIOHLAEHGIKPARSMAEHIPPAPNWPAPPPPVONEOSRPLPDVAORL
TccP(BA467/055:H7)	75	SLFOO ENVRORLIOHLAEHGIKPARSMAEHIPPAPNWPAPPPPVONEOSRPLPDVAORL
TccP(BA1244/055:H7)	75	SLHOO ENVRORLIOHLAEHGIKPARSMAEHIPPAPNWPAPPPPVQNEQSRPLPDVAQRL
TccP(BA4147/055:H7)	75	SLHQQLENVRQRLIQHLAEHGIKPARSMAEHIPPAPNWPAPPPPVQNEQSRPLPDVAQRL
TccP(st957/055:H7)	75	SLHQQLENVRQRLIQHLAEHGIKPARSMAEHIPPAPNWPAPPPPVQNEQSRPLPDVAQRL
TccP(CB9615/055:H7)	75	SLHQQLENVRQRLIQHLAEHGIKPARSMAEHIPPAPNWPAPPPPVQNEQSRPLPDVAQRL
TccP(TB182A/055:H7)	75	SLHQQLPNVRQRLIQHLAEHGIKPARSMAEHIPPAPNWPAPPPPVQNEQSRPLPDVAQRL
TccP(WC211/055:H7)	75	SLHQQLP <mark>NVRQRLIQHLAEHGI</mark> KPARSMAEHIPPAPNWPAP <mark>P</mark> PPVQNEQSRPLPDVAQRL
TccP(DEC5d/055:H7)	75	SLHQQLP <mark>NVRQRLIQHLAEHGI</mark> KPARSMAEHIPPAPNWPAPPPPVQNEQSRPLPDVAQRL
TccP(BA3800/ONT:H19)	75	SLHQQLP <mark>NVGQRLI</mark> QHLAEHGI <mark>Q</mark> PARNMAEHIPPAPNWPAPPPPVQNEQSRPLPDVAQRL
TccP(BA3836/ONT:H19)	75	SLHQQLP <mark>NVGQRLI</mark> QHLAEHGI <mark>Q</mark> PARNMAEHIPPAPNWPAPPPPVQNEQSRPLPDVAQRL
TccP2 (BA3800/ONT:H19)	142	M <mark>QHLAEHGIQPARNMAEHIPPAPNWPAP</mark> TPPVQNEQSRPL
TccP2(0471-1/ONT:H19)	142	M <mark>QHLAEHGIQPARNMAEHIPPAPNWPAP</mark> TPPVQNEQSRPL
TccP2(3632-1/ONT:H19)	142	M <mark>QHLAEHGIQPARNMAEHIPPAPNWPAP</mark> TPPVQNEQSRPL
TccP2 (BA365/ONT:H19)	142	M <mark>QHLAEHGIQPARNMAEHIPPAPNW</mark> TAP <mark>TP</mark> PVQNEQSRPL
TccP2 (BA3836/ONT:H19)	142	M <mark>QHLAEHGIQPARNMAEHIPPAPNW</mark> TAP <mark>TP</mark> PVQNEQSRPL
TccP(BA320/055:H7)	135	V <mark>QHLAEHGIQPARNMAEHIPPAPNWPAP</mark> PIPVQNEQSRPL
TccP(BA467/055:H7)	135	V <mark>QHLAEHGIQPARNMAEHIPPAPNWPAP</mark> PIPVQNEQSRPL
TccP(BA1244/055:H7)	135	VQHLAEHGIQPARNMAEHIPPAPNWPAP <mark>PI</mark> PVQNEQSRPL
TccP(BA4147/055:H7)	135	V <mark>QHLAEHGIQPARNMAEHIPPAPNWPAP</mark> PIPVQNEQSRPL
TccP(st957/055:H7)	135	V <mark>QHLAEHGIQPARNMAEHIPPAPNWPAP</mark> PIPVQNEQSRPL
TccP(CB9615/055:H7)	135	V <mark>QHLAEHGIQPARNMAEHIPPAPNWPAP</mark> PLPVQNEQSRPL
TccP(TB182A/055:H7)	135	VQHLAEHGIQPARNMAEHIPPAPNWPAPPIPVQNEQSRPL
TccP(WC211/055:H7)	135	V <mark>QHLAEHGIQPARNMAEHIPPAPNWPAP</mark> PPVQNEQSRPL
TccP(DEC5d/055:H7)	135	VQHLAEHGIQPARNMAEHIPPAPNWPAPPIPVQNEQSRPL
TccP(BA3800/ONT:H19)	135	VQHLAEHGIQPARSMAEHIPPAPNWPAPTPPVQNEQSRPL
TccP(BA3836/ONT:H19)	135	VQHLAEHGIQPARSMAEHIPPAPNWPAPTPPVQNEQSRPL

Os genes *tccP* e *tccP2* das cepas de aEPEC O55:H7 e ONT:H19 foram parcialmente sequenciados. As sequências de aminoácidos preditas foram então alinhadas e comparadas às seguintes sequências de TccP e TccP2 disponíveis no banco de dados *GenBank*: cepa *E. coli* O55:H7 TB182A (número de acesso BAG11995), cepa *E. coli* O55:H7 DEC5d (número de acesso BAG11996), cepa *E. coli* O55:H7 WC211 (número de acesso BAG11997), cepa *E. coli* O55:H7 st957 (número de acesso BAG11998), cepa *E. coli* O55:H7 CB9615 (número de acesso ADD56988), cepa *E. coli* ONT:H19 0471–1 (número de acesso BAF52361) e cepa *E. coli* ONT:H19 3632–1 (número de acesso BAF52365). A porção amino-terminal (parcial) e dois resíduos ricos em prolinas (PRRs) são destacados em cinza e preto, respectivamente. As alterações de aminoácidos estão destacadas em branco.

A tipagem do gene *tir* demonstrou que a grande maioria das cepas *espFU*positivas apresentaram o tipo fosforilado (Y-P), das quais 17 portavam *tccP2*, oito *tccP* e três ambos os alelos. Já o tipo não-fosforilado (S) foi verificado em apenas cinco cepas, três das quais positivas para *tccP*, uma para *tccP2* e outra portava ambos (**Tabela 3**). Com base nos genótipos *espFU* e *tir*, as 33 cepas de aEPEC puderam ser divididas em: *tccP2/tir*Y-P (17), *tccP/tir*Y-P (8), *tccP/tir*S (3), *tccP/tccP2/tir*Y-P (3), *tccP2/tir*S (1) and *tccP/tccP2/tir*S (1).

Com relação à distribuição filogenética, as cepas *espFU*-positivas foram alocadas em quatro filogrupos distintos (**Tabela 3**) de acordo com o esquema de classificação de Clermont et al. (2013). Especificamente, as cepas *tccP*-positivas pertenciam aos filogrupos E (5), B1 (3), A (2) e B2 (1), enquanto aquelas que apresentavam apenas *tccP2* foram distribuídas em B1 (13) e A (3), além de outras duas cepas que não puderem ser classificados por este método (filogrupo desconhecido). Três cepas que apresentavam ambos *tccP* e *tccP2* pertenciam aos filogrupos A, B1 e B2, e uma não pôde ser classificada. As cepas positivas apenas para *tccP* ou *tccP2* foram significativamente associadas com os filogrupos E e B1 (*P*<0,05), respectivamente, o que indica uma distribuição filogenética destes alelos na coleção de aEPEC estudada (**Tabela 4**).

Genótipo	No. (%) de cepas	No (%) de cepas por filogrupo				
		Α	B1	B2	E	Desconhecido
tccP	11 (33,3)	2 (18,2)	3 (27,3)	1 (9,1)	5 (45,4)*	0 (0,0)
tccP2	18 (54,5)	3 (16,7)	13 (72,2)*	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (11,1)
tccP/tccP2	4 (12,2)	1 (25,0)	1 (25,0)	1 (25,0)	0 (0,0)	1 (25,0)
Total	33 (100,0)	6 (18,2)	17 (51,5)	2 (6,1)	5 (15,1)	3 (9,1)

Tabela 4 - Distribuição de *tccP* e *tccP*2 entre cepas de aEPEC de acordo com os filogrupos.

**P*<0,05

4.2 Produção de soro policional anti-EspFU

A alta prevalência de genes codificando EspFU observada levou-nos também a avaliar a produção desta proteína por cepas de aEPEC. Para tal, foi necessária inicialmente a produção de um soro policlonal anti-EspFU, que seria utilizado nos ensaios de imunodetecção da proteína alvo. Visando a obtenção da proteína recombinante EspFU-His para a imunização dos animais e produção do soro, foi realizada a clonagem do gene *espFU* da cepa BA320 (representativa do grupo das aEPEC O55:H7) no vetor de expressão pET28a(+). O inserto foi amplificado por PCR, purificado, digerido com *Ndel* e *BamHI* e ligado no vetor previamente tratado com as mesmas enzimas (**Figura 10A**). A construção resultante pET*espFU*_{BA320} foi transformada em células competentes de *E. coli* DH5 α , sendo o sucesso da clonagem confirmado por PCR (**Figura 10B**) e análise de restrição (**Figura 10C**).



Figura 10 - Clonagem do gene espFU no vetor de expressão pET28a(+).

Eletroforese em gel de agarose (0,8%) corado com GelRed: **(A)** do inserto e vetor digeridos com *Ndel e BamHI*; **(B)** dos produtos de amplificação para o gene *espFU* na seleção dos clones recombinantes; **(C)** e da análise de restrição do plasmídeo pET*espFU*. As setas indicam os fragmentos correspondentes a *espFU* e pET28a(+). LM: *Low Mass DNA ladder* (Thermo Fisher Scientific); HM: *High Mass DNA ladder* (Thermo Fisher Scientific); M: marcador de peso molecular *1 Kb DNA ladder* (Thermo Fisher Scientific).

O sequenciamento do plasmídeo pET*espFU*_{BA320} demonstrou a ausência de códons de terminação ou alterações na sequência genica (inserção, deleção ou mutação) que pudessem comprometer a produção da proteína recombinante (**Figura 11A**). Com base na predição da sequência de aminoácidos de EspFU_{BA320}-His e análises dos parâmetros físico-químicos, verificou-se então tratar de uma proteína com cerca de 344 aminoácidos, massa molecular de 37,7 kDa e ponto isoelétrico (pl) de aproximadamente 10,9 (**Figura 11B**).

Figura 11 - Análise da sequência e parâmetros fisico-químicos de EspFU_{BA320}-His.

1.00	
•	
A	
•••	

>pETespFU

ATTCCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACCAGCAGCGGC
TTGGTGCCGCGCGCGCAGCCATATGATTAACAATGTTTCTTCACTTTTTCCAACCGTCAACCGCAATATTACAGCTGTATATAAAAAA
AGCAGCTTCTCTGTATCACCACAGAAAATCACATTAAATCCTGTAAAAATCAGCTCACCTTTTTCACCAAGCAGTAGCTCCATCAGC
3CAACAACTCTCTTTCGAGCCCCAAACGCCCATTCGGCATCATTTCATCGACAGTCTACTGCTGAAAGTTCGTTACATCAACAACTT
CCTAATGTGAGGCAGCGCCTGATACAACATCTTGCAGAGCATGGCATTAAACCTGCCCGGAGTATGGCTGAACATATTCCTCCGGCA
CTAACTGGCCTGCGCCACCACCGCCAGTACAAAATGAACAATCAAGACCTCTGCCTGATGTGGCTCAGCGTCTGGTGCAGCATCTT
3CAGAGCATGGCATTCAACCAGCCCGGAATATGGCTGAACATATTCCTCCGGCACCTAACTGGCCTGCGCCACCACTGCCAGTACAA
AATGAACAATCAAGACCTCTGCCTGATGTGGCTCAGCGTCTGGTGCAGCATCTTGCAGAGCATGGCATTCAACCAGCCCGGAGTATG
3CTGAACATATTCCTCCGGCACCTAACTGGCCTGCGCCACCACCAGCAGTACAAAATGAACAATCAAGACCTCTGCCTGATGTGGCT
CAGCGTCTGGTGCAGCATCTTGCAGAGCATGGCATTCAACCAGCCCGGAATATGGCTGAACATATTCCTCCGGCACCTAACTGGCCT
3CGCCACCACCGCCAGTACAAAATGAACAATCAAGACCTCTGCCTGATGTGGCTCAGCGTCTGGTGCAGCATCTTGCAGAGCATGGC
ATTAATACATCTAAGCGCTCGGGCATTAATACATCTAAGCGCTCGGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGCACT
CGAGCACCACCACCACCACTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAG
B ProtParam (EspFU _{BA320} -His)

ProtParan	n (EspFU _l	_{BA320} -His)				
User-provid	ded sequen	ce:				
1 <u>0</u> Mgsshhhhhh	2 <u>0</u> SSGLVPRGSH	3 <u>0</u> MINNVSSLFP	4 <u>0</u> TVNRNITAVY	5 <u>0</u> KKSSFSVSPQ	6 <u>0</u> KITLNPVKIS	
7 <u>0</u> SPFSPSSSSI	8 <u>0</u> SATTLFRAPN	9 <u>0</u> AHSASFHRQS	10 <u>0</u> TAESSLHQQL	11 <u>0</u> PNVRQRLIQH	12 <u>0</u> LAEHGIKPAR	
13 <u>0</u> SMAEHIPPAP	14 <u>0</u> NWPAPPPPVQ	15 <u>0</u> NEQSRPLPDV	16 <u>0</u> AQRLVQHLAE	17 <u>0</u> HGIQPARNMA	18 <u>0</u> EHIPPAPNWP	Number of amino acids: 344 Molecular weight: 37731.6
19 <u>0</u> APPLPVQNEQ	20 <u>0</u> SRPLPDVAQR	21 <u>0</u> LVQHLAEHGI	22 <u>0</u> QPARSMAEHI	23 <u>0</u> PPAPNWPAPP	24 <u>0</u> PPVQNEQSRP	Theoretical pI: 10.91
25 <u>0</u> LPDVAQRLVQ	26 <u>0</u> HLAEHGIQPA	27 <u>0</u> RNMAEHIPPA	28 <u>0</u> PNWPAPPPPV	29 <u>0</u> QNEQSRPLPD	30 <u>0</u> VAQRLVQHLA	
31 <u>0</u> EHGINTSKRS	32 <u>0</u> GINTSKRSGS	33 <u>0</u> EFELRRQACG	34 <u>0</u> RTRAPPPPPL	RSGC		
EHGINTSKRS	GINTSKRSGS	EFELRRQACG	RTRAPPPPPL	RSGC		

(A) Sequência de nucleotídeos de pET*espFU*, destacando-se a região codificante (sublinhado) e o gene *espFU* (vermelho). (B) Sequência predita de aminoácidos, massa molecular e ponto isoelétrico de EspFU_{BA320}-His determinadas pelo servidor ProtParam.

Posteriormente, foi realizada a subclonagem do plasmídeo recombinante na cepa *E. coli* BL21(DE3) para expressão heteróloga. Com o intuito de otimizar as melhores condições para os ensaios de indução, inicialmente foi avaliada a influência da concentração de IPTG na quantidade de proteína produzida. Para tal, foram selecionados dois clones recombinantes BL21(pET*espFU*_{BA320}), que foram

cultivados em 10 mL de LB suplementado com kanamicina (50 µg/mL) até a fase intermediária do crescimento exponencial, sendo a expressão heteróloga induzida com três diferentes concentrações (0,2, 0,5 e 1 mM) de IPTG a 37 °C por 4 h sob constante agitação de 200 rpm. As análises por *immunoblot* demonstraram que ambos os clones recombinantes produziram a proteína EspFU_{BA320}-His (~38 kDa), não sendo possível detectar diferenças significativas de produção entre as concentrações de IPTG testadas (**Figura 12**).

Figura 12 - Indução da produção da proteína recombinante EspFU_{BA320}-His com diferentes concentrações de IPTG.



BL21(pETespFu)-1 BL21(pETespFu)-2

Imunodetecção da proteína EspFU_{BA320}-His nos extratos totais de clones recombinantes BL21(pET*espFU_{BA320}*) após indução com 0,2, 0,5 ou 1 mM de IPTG. A seta indica a banda correspondente à proteína recombinante após detecção com anticorpos monoclonais anti-His. M: padrão de massa molecular *PageRuler Prestained Protein ladder* (Thermo Fisher Scientific).

Com base nestes resultados, foi selecionado aleatoriamente um dos clones recombinantes de BL21(pET*espFU*_{BA320}) para continuidade dos experimentos de indução e, posteriormente, purificação de EspFU_{BA320}-His. Para verificar se a concentração de IPTG afetava a solubilidade da proteína recombinante, foram realizadas induções com 0,2 e 1 mM de IPTG a 37 °C por 4 h sob agitação constante (200 rpm). Após fracionamento das culturas induzidas, foi observado que em ambas as condições testadas a proteína heteróloga apresentava-se majoritariamente presente em corpúsculos de inclusão (fração insolúvel), conforme

análise por eletroforese SDS-PAGE com coloração por *Coomassie Blue* (Figura 13A) e *immunoblot* (Figura 13B).



Figura 13 - Análise da solubilidade da proteína recombinante EspFU_{BA320}-His.

(A) Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) 12% corado com *Coomassie Blue* e (B) correspondente *immunoblot* com anticorpos anti-His dos extratos totais de clones recombinantes BL21(pET*espFU*_{BA320}) após indução com 0,2 ou 1 mM de IPTG. A seta indica a proteína recombinante EspFU_{BA320}-His. M: padrão de massa molecular *PageRuler Unstained Protein* (superior) ou *PageRuler Prestained Portein ladder* (inferior) (Thermo Fisher Scientific). Pré: pré-indução. Pós: pós-indução. FS: fração solúvel. FI: fração insolúvel.

Para a produção em larga escala de EspFU_{BA320}-His, o clone recombinante foi cultivado em 1 L de LB suplementado com kanamicina (50 µg/mL) até a fase intermediária de crescimento exponencial, sendo a expressão induzida com 1 mM de IPTG por 4 h a 37 °C sob constante agitação de 200 rpm. Em seguida, a cultura induzida foi fracionada por sonicação, podendo-se novamente observar a presença majoritária da proteína recombinante em corpúsculos de inclusão após análise por SDS-PAGE corado por *Coomassie Blue* (**Figura 14A**) ou *immunoblot* (**Figura 14B**).

A fração insolúvel foi, então, solubilizada em tampão com uréia (8 M) e utilizada para purificação de EspFU_{BA320}-His por cromatografia de afinidade ao níquel. A eluição do material ligado à coluna foi realizada entre 110 e 160 mM de imidazol, conforme observado no cromatograma (**Figura 14C**). A análise das frações eluídas demonstrou uma alta concentração de proteína obtida. No entanto, algumas bandas contaminantes foram observadas no material purificado, embora EspFU_{BA320}-His correspondesse à porção majoritária (**Figura 14D**). As frações eluídas foram então dialisadas para eliminação do imidazol e ureia, assim como para o remodelamento da proteína. A presença de EspFU_{BA320}-His no material dialisado foi confirmada por SDS-PAGE corado com *Coomassie Blue* (**Figura 14E**) e *immunoblot* (**Figura 14F**). A quantificação do material purificado revelou um rendimento total de 1 mg de proteína, que foi considerado suficiente para a imunização dos animais. A proteína purificada foi então armazenada a 4 e -20 °C.

Figura 14 - Purificação da proteína recombinante EspFU_{BA320}-His por cromatografia de afinidade ao níquel.



(A) Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) 12% corado com *Coomassie Blue*; (B) *immunoblot* com anti-His da produção em larga escala de EspFU_{BA320}-His após indução com 1 mM de IPTG. (C) Cromatograma e (D) SDS-PAGE (12%) corado com Coomassie das frações obtidas durante a purificação de EspFU_{BA320}-His. (E) Após a diálise, a proteína purificada foi analisada por SDS-PAGE (12%) corado com *Coomassie Blue* e (F) *immunoblot* com anti-His. A seta indica a banda correspondente à proteína recombinante EspFU_{BA320}-His. M: padrão de massa molecular *PageRuler Prestained Protein ladder* (Thermo Fisher Scientific). Pré: pré-indução. Pós: pós-indução. FS: fração solúvel. FI: fração insolúvel. FL: material não ligado à coluna (*flow*). E1-12: frações eluídas.

Também foi confirmada a identidade da proteína recombinante por espectrometria de massas, cujas análises demonstraram realmente tratar-se de EspFU-His (Figura 15).

Figura 15 - Análise da proteína recombinante EspFU_{BA320}-His por espectrometria de massas (LC-MS/MS).

(MATRIX (SCIENCE)	Mascot Search Results
Enzyme Fixed modif: Variable mo Mass values Protein Mas Protein Mas Fragment Ma Max Missed Instrument Number of q Protein hit	: Trypsin ications : Carbamidomethyl (C) difications : Oxidation (M) : Monoisotopic s : Unrestricted s Tolerance : 1 0.2 Da iss Tolerance : 1 0.6 Da Cleavages : 3 type : Orbitrap ueries : 6899 : S : <u>SSPEU ECOS7</u> Secreted effector protein EspF(U) OS=Escherichia coli 0157:H7 GN=espF(U) PE=1 SV: <u>ESFU2 ECOS7</u> Secreted effector protein EspF(U) OS=Escherichia coli 0157:H7 GN=espF(U) PE=3 SV: <u>ESFU2 ECOS7</u> Secreted effector protein EspF(U) OS=Escherichia coli 0157:H7 GN=espF(U) PE=3 SV: <u>ESFU2 ECOS7</u> Secreted effector protein EspF(U) OS=Escherichia coli 0157:H7 GN=espF(U) PE=3 SV: <u>ESFU2 ECOS7</u> Secreted effector protein EspF(U) OS=Escherichia coli 0157:H7 GN=espF(U) PE=3 SV: <u>ESFU2 ECOS7</u> Secreted effector protein EspF(U) OS=Escherichia coli 0157:H7 GN=espF(U) PE=3 SV: <u>ESFU2 ECOS7</u> Secreted effector protein EspF(U) OS=Escherichia coli 0157:H7 GN=espF(U) PE=3 SV: <u>ESFU2 ECOS7</u> Secreted effector protein EspF(U) OS=Escherichia coli 0157:H7 GN=espF(U) PE=3 SV: <u>ESFU2 ECOS7</u> Secreted effector protein EspF(U) OS=Escherichia coli 0157:H7 GN=espF(U) PE=3 SV: <u>ESFU2 ECOS7</u> Secreted effector protein EspF(U) OS=Escherichia coli 0157:H7 GN=espF(U) PE=3 SV: <u>ESFU2 ECOS7</u> Secreted effector protein EspF(U) OS=Escherichia coli 0157:H7 GN=espF(U) PE=3 SV: <u>ESFU2 ECOS7</u> Secreted effector protein EspF(U) OS=Escherichia coli 0157:H7 GN=espF(U) PE=3 SV: <u>ESFU2 ECOS7</u> Secreted effector protein EspF(U) OS=Escherichia coli 0157:H7 GN=espF(U) PE=3 SV: <u>ESFU2 ECOS7</u> Secreted effector protein EspF(U) OS=Escherichia coli 0157:H7 GN=espF(U) PE=3 SV: <u>ESFU2 ECOS7</u> Secreted effector protein EspF(U) OS=Escherichia coli 0157:H7 GN=espF(U) PE=3 SV: <u>ESFU2 ECOS7</u> Secreted effector protein EspF(U) OS=Escherichia coli 0157:H7 GN=espF(U) PE=3 SV: <u>ESFU2 ECOS7</u> Secreted effector protein EspF(U) OS=Escherichia coli 0157:H7 GN=espF(U) PE=3 SV: <u>ESFU2 ECOS7</u> Secreted effector protein EspF(U) OS=Escherichia coli 0157:H7 GN=espF(U) PE=3 SV: <u>ESFU2 ECOS7</u> Secreted effector protein EspF(U) OS=Escherichia coli 0157:H7 GN=espF(U) OS=E
Select Sun	nmary Report
Format As	Select Summary (protein hits)
	Significance threshold p< 0.05 Max. number of hits AUTO
	Standard scoring O MudPIT scoring O Ions score or expect cut-off O Show sub-sets O
	Show pop-ups Suppress pop-ups Require bold red
	Preferred taxonomy All entries
Re-Search	All queries O Unassigned O Below homology threshold O Below identity threshold
1. ESPEU Secre	LECOS7 Mass: 42445 Score: 745 Matches: 155(28) Sequences: 33(8) emPAI: 2.86 eted effector protein EspF(U) OS=Escherichia coli O157:H7 GN=espF(U) PE=1 SV=1
2. ESFU2 Secre	2 ECO57 Mass: 37169 Score: 602 Matches: 83(26) Sequences: 13(6) emPAI: 2.03 eted effector protein EspF(U) OS=Escherichia coli 0157:H7 GW=espF(U) PE=3 SV=1

Os espectros de massas foram analisados por MASCOT e os dois principais hits são mostrados.

Em seguida, foi iniciado o protocolo de imunização dos animais com a proteína recombinante EspFU_{BA320}-His, os quais desenvolveram uma resposta frente ao antígeno, resultando na produção de um soro hiperimune com o título aproximado de 1:6400 (**Figura 16A**). O soro policional anti-EspFU obtido foi capaz de reconhecer tanto a proteína recombinante purificada quanto aquela presente no extrato total de uma cultura induzida de *E. coli* BL21(pET*espFU*), conforme verificado por *immunoblot*. No entanto, o reconhecimento de proteínas no extrato total de *E. coli* BL21(DE3) indicou a presença de anticorpos inespecíficos, possivelmente devido ao fato que a proteína recombinante não se apresentava totalmente pura (**Figura 16B**). Para reduzir esta inespecificidade, foram realizadas adsorções sucessivas do soro policional contra extratos de *E. coli* BL21. Por fim, o soro hiperimune obtido também foi capaz de reconhecer a proteína recombinante

EspFU_{EDL933}-His, que foi produzida e purificada de forma similar à EspFU_{BA320}-His (**Figura 16C e D**).



Figura 16 - Análise do soro policional anti-EspFU.

(A) Titulação do soro hiperimune anti-EspFU por ELISA indireto. (B) Imunodetecção de EspFU_{BA320}-His empregando-se o soro policional anti-EspFU na diluição 1:100. (C) Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) 12% corado com *Coomassie Blue* e (D) o correspondente *immunoblot* com soro anti-EspFU para detecção da proteína recombinante EspFU_{EDL933}-His. As setas indicam as bandas correspondentes às proteínas EspFU_{BA320}-His e EspFU_{EDL933}-His. M: padrão de massa molecular *PageRuler Prestained Protein ladder* (Thermo Fisher Scientific).

4.3 Produção de EspFU por cepas de aEPEC

O soro hiperimune obtido foi então utilizado em ensaios de imunodetecção da produção de EspFU (TccP/TccP2) por cepas de aEPEC. Inicialmente, testamos diferentes meios de cultura (LB, caldo EC, DMEM e DMEM pré-condicionado) para verificar em qual condição a produção de EspFU era favorecida. Para tal, foram selecionadas oito cepas de aEPEC que apresentavam o alelo *tccP*, as quais foram cultivadas nos diferentes meios. Os sobrenadantes dos cultivos bacterianos foram

então utilizados para a análise da produção (secreção) de EspFU por ELISA. De um modo geral, o cultivo em DMEM resultou em uma maior produção média de EspFU, sendo que para algumas cepas só foi possível a detecção quando cultivadas neste meio (**Figura 17A**), embora também tenha sido observada uma alta produção por uma cepa tanto em LB quanto caldo EC. Diante disso, o cultivo em DMEM foi adotado como a condição adequada para a análise da produção de EspFU em todas as cepas de aEPEC.

De um modo geral, a produção desta proteína ocorreu de maneira diferencial entre as cepas, com algumas produzindo EspFU em altos níveis, enquanto que outras produzem ineficientemente (**Figura 17B**). Como esperado, os valores médios de produção das cepas *espFU*-positivas foram significativamente maiores do que aqueles obtidos quando os sobrenadantes das 39 aEPEC negativas foram testados (**Figura 17B**), indicando a especificidade do soro hiperimune. Embora duas cepas *espFU*-negativas tenham apresentado valores de densidade óptica (DO) próximos a 0,2, nenhuma reatividade foi observada quando seus sobrenadantes concentrados foram testados por *immunoblot*, indicando a ausência de EspFU (**Figura 16C**). Por outro lado, a análise de três cepas positivas revelou a detecção de proteínas com massas distintas, correspondente ao diferente número de PRRs presentes.

Nenhuma correlação foi observada entre a produção de EspFU e os genótipos *tccP/tccP2* (Figura 18A), tamanho dos genes (Figura 18B) ou filogenia (Figura 18C), sugerindo que esta variação seja predominantemente cepadependente.

Estes dados foram compilados e recentemente publicados (MARTINS et al., 2017).



Figura 17 - Produção de EspFU (TccP/TccP2) por cepas de aEPEC.

(A) Ensaio preliminar para análise da produção de TccP e TccP2 nos meios LB, caldo EC, DMEM e DMEM pré-condicionado. (B) Produção de TccP e TccP2 pelas 72 cepas de aEPEC após cultivo em DMEM. A detecção das proteínas TccP e TccP2 foi realizada por ELISA indireto empregando-se os sobrenadantes dos cultivos bacterianos. Os dados apresentados são os valores médios de densidade óptica (DO) a 450 ou 492 nm das replicatas biológicas (n=3) de um experimento representativo. (C) *Immunoblot* para detecção de TccP e TccP2 nos sobrenadantes concentrados dos cultivos bacterianos em DMEM. As setas indicam as bandas correspondentes a TccP e TccP2 com diferentes massas. Todos os ensaios de imunodetecção foram realizados com soro policlonal anti-EspFU na diluição 1:100. M: padrão de massa molecular *PageRuler Prestained Protein ladder* (Thermo Fisher Scientific).



Figura 18 - Correlação entre produção de EspFU (TccP/TccP2), genótipos, tamanho dos genes e filogenia.

As cepas foram cultivadas em DMEM e os sobrenadantes analisados por ELISA indireto para a detecção da produção de TccP e TccP2 utilizando soro policional anti-EspFU (1:100). Os níveis de produção de proteína entre as cepas foram comparados com relação: (**A**) aos genótipos de *tccP/tccP2*, (**B**) tamanho dos genes e (**C**) grupos filogenéticos. Os dados apresentados são as médias \pm desvio padrão dos valores de absorbância (DO) a 492 nm de cada uma das cepas.

4.4 Papel de EspFU na patogênese de aEPEC

4.4.1 Análise dos genes espFU e tir da cepa BA320

Tendo em vista que todas cepas O55:H7 da coleção analisada foram positivas para *espFU*, uma cepa representativa deste grupo (BA320) foi selecionada para um estudo mais detalhado do papel de EspFU na patogênese de aEPEC. O sequenciamento do gene *espFU* de BA320 resultou em uma sequência com 873 pb (**Figura 19A**), que foi depositada no banco de dados GenBank (número de acesso KY070367). A análise da sequência predita de EspFU_{BA320} revelou tratar-se de uma

proteína com 290 aminoácidos e massa molecular de aproximadamente 31,9 kDa, demonstrando quatro domínios da superfamília EspF ricos em resíduos de prolina (Figura 19B).





(**A**) Sequência de nucleotídeos do gene *espFU* da cepa aEPEC O55:H7 BA320. (**B**) Representação dos quatro domínios da superfamília EspF presentes na proteína EspFU_{BA320}.

Além de *espFU*, BA320 também apresenta o gene *tir* do tipo não-fosforilado, conforme determinado previamente por PCR (**Tabela 1**), indicando que a via de sinalização mediada por EspFU seja o único mecanismo molecular disponível para indução de lesões A/E por esta cepa. Para confirmar estes dados, o gene *tir* foi amplificado (**Figura 20A**) e, posteriormente, sequenciado. A análise das sequências obtidas demonstrou que *tir_{BA320}* possui 1.671 pb (**Figura 20B**), codificando uma proteína com 99% e 70% de similaridade ao Tir das cepas protótipos EHEC EDL933 e tEPEC E2348/69, respectivamente (**Figura 20C**). A maior similaridade com Tir_{EDL933} confirma tratar-se do tipo não-fosforilado.
Figura 20 - Análise da sequência de Tir da cepa BA320.





4.4.2. Construção e caracterização do mutante isogênico em espFU

Em seguida, foi realizada a mutação do gene *espFU* na cepa BA320 utilizando o sistema de recombinases codificadas pelo fago λ *Red* (DATSENKO; WANNER, 2000). Para tal, foi amplificado o fragmento espFU:cat a partir do plasmídeo pKD3, resultando em um fragmento com cerca de 1,1 kb (**Figura 21A**), o qual foi purificado, tratado com a endonuclease *DpnI* (**Figura 21B**) e transformado em BA320 expressando as recombinases codificadas pelo plasmídeo pKD46. Dez candidatos a mutantes (colônias resistentes a cloranfenicol) foram obtidos, os quais foram curados do plasmídeo pKD46 após três repiques sucessivos a 42 °C. Os candidatos a mutantes foram submetidos à PCR com os oligonucleotídeos tccP-F1/tccP-R1, gerando fragmentos maiores que 873 pb (**Figura 21C**), indicando a incorporação do cassete de recombinação.



Figura 21 - Mutação do gene espFU da cepa BA320.

Eletroforese em gel de agarose (0,8%) corado com GelRed: (**A**) da amplificação do cassete de recombinação espFU:cat; (**B**) do fragmento purificado pós-tratamento com *DpnI*; (**C**) dos produtos de amplificação dos fragmentos de recombinação para confirmação da mutação. M: marcador de peso molecular *GeneRuler 1 Kb DNA ladder* (Thermo Fisher Scientific). LM: *Low Mass DNA ladder* (Thermo Fisher Scientific). Δ1-10: candidatos a mutantes.

Curiosamente, produtos de PCR com tamanhos distintos foram observados, três dos quais ($\Delta 1$, $\Delta 2 e \Delta 6$) foram purificados, clonados em pGEM-T Easy e sequenciados com os primers M13/pUC. A análise das sequências por BLAST revelou a presença do cassete de resistência a cloranfenicol (*cat*) nos três fragmentos (**Figura 22**). No entanto, dois destes ($\Delta 1 e \Delta 6$) conservaram uma porção maior que o esperado do gene *espFU*, o que explica o maior tamanho destes produtos de PCR. Já o fragmento menor ($\Delta 2$) correspondia exatamente ao cassete de recombinação amplificado a partir de pKD3, com 60 nucleotídeos homólogos a *espFU*_{BA320} em cada uma das extremidades. Uma possível explicação para estas diferenças é a presença de regiões repetidas praticamente idênticas na porção carboxi-terminal de *espFU*, possibilitando a incorporação do cassete de recombinação em mais do que uma posição dentro do gene.

Figura 22 - Confirmação da mutação do gene espFU por sequenciamento.

Amplicon Al (1557 pb)

ATGATTAACAATGTTTCTTCACTTTTTCCAACCGTCAACCGCAATATTACAGCTGTATATGTGTAGGCTGGAGC TGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTTCATTTAAATGGCGCGCCTTACGCC CCGCCCTGCCACTCATCGCAGTACTGTTGTATTCATTAAGCATCTGCCGACATGGAAGCCATCACAAACGGCATGAT GAACCTGAATCGCCAGCGGCATCAGCACCTTGTCGCCTTGCGTATAATATTTGCCCATGGTGAAAACGGGGGGCGAA GAAGTTGTCCATATTGGCCACGTTTAAATCAAAACTGGTGAAAACTCACCCAGGGATTGGCTGAGACGACGAAAAACATA TTCTCAATAAACCCTTTAGGGAAATAGGCCAGGTTTTCACCGTAACACGCCACATCTTGCGAATATATGTGTAGAAA CTGCCGGAAATCGTCGTGGTATTCACTCCAGAGCGATGAAAACGTTTCAGTTTGCTCATGGAAAACGGTGTAACAA GGGTGAACACTATCCCATATCACCAGCTCACCGTCTTTCATTGCCATACGTAATTCCGGATGAGCATTCATCAGGCG GGCAAGAATGTGAA TAAAGGCCGGATAAAACTTGTGCTTATTTTTCTTTACGGTCTTTAAAAAGGCCGTAATATCCA ATATCAACGGTGGTATATCCAGTGATTTTTTTTCTCCCATTTTAGCTTCCTTAGCTCCTGAAAATCTCGACAACTCAAAA AATACGCCCGGTAGTGA TCTTA TTTCA TTA TGGTGA A AG TTGG AACCTCTTAC GTGCC GA TCA ACGTCTC ATTTTCGC AGGTAGGCGCCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTAAGGAGGATATTCATAT GGCTCAGCGTCTGGTGCAGCATCTTGCAGAGCATGGCATTCAACCAGCCCGGAATATGGCTGAACATATTCC TCCGGCACCTAACTGGCCTGCGCCACCACCGCCAGTACAAAATGAACAATCAAGACCTCTGCCTGATGTGGC TCAGCGTCTGGTGCAGCATCTTGCAGAGCATGGCATTCAACCAGCCCGGAGTATGGCTGAACATATTCCTCC <u>GGCACCTAACTGGCCTGCGCCACCACCGCCAGTACAAAATGAACAATCAAGACCTCTGCCTGATGTGGCTCA</u> <u>GCGTCTGGTGCAGCATCTTGCAGAGCATGGCATTCAACCAGCCCGGAATATGGCTGAACATATTCCTCCGGC</u> ACCTAACTGGCCTGCGCCACCACCGCCAGTACAAAATGAACAATCAAGACCTCTGCCTGATGTGGCTCAGCG TCTGGTGCAGCATCTTGCAGAGCATGGCATTAATACATCTAAGCGCTCGTGA

Amplicon $\Delta 2$ (1134 pb)

Amplicon A6 (1698 pb)

ATGATTAACAATGTTTCTTCACTTTTTCCAACCGTCAACCGCAATATTACAGCTGTATATGTGTAGGCTGGAGC TGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTTCATTTAAATGGCGCGCCTTACGCC CCGCCCTGCCACTCATCGCAGTACTGTTGTATTCATTAAGCATCTGCCGACATGGAAGCCATCACAAACGGCATGAT GAACCTGAATCGCCAGCGGCATCAGCACCTTGTCGCCTTGCGTATAATATTTGCCCATGGTGAAAACGGGGGGCGAA GAAGTTGTCCATATTGGCCACGTTTAAATCAAAACTGGTGAAACTCACCCAGGGATTGGCTGAGACGAAAAACATA TTCTCAATAAACCCTTTAGGGAAATAGGCCAGGTTTTCACCGTAACACGCCACATCTTGCGAATATATGTGTAGAAA CTGCCGGAAATCGTCGTGGTATTCACTCCAGAGCGATGAAAACGTTTCAGTTTGCTCATGGAAAACGGTGTAACAA GGGTGAACACTATCCCATATCACCAGCTCACCGTCTTTCATTGCCATACGTAATTCCGGATGAGCATTCATCAGGCG GGCAAGAATGTGAATAAAAGGCCGGATAAAACTTGTGCTTATTTTTCTTTACGGTCTTTAAAAAGGCCGTAATATCCA ATATCAACGGTGGTATATCCAGTGATTTTTTTTCTCCATTTTAGCTTCCTTAGCTCCTGAAAATCTCGACAACTCAAAA AATACGCCCGGTAGTGATCTTATTTCATTATGGTGAAAGTTGGAACCTCTTACGTGCCGATCAACGTCTCATTTTCGC AGGTAGGCGCCGCAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTAAGGAGGATATTCATAT G<u>GCTCAGCGTCTGGTGCAGCATCTTGCAGAGCATGGCATTCAACCAGCCCGGAATATGGCTGAACATATTCC</u> TCCGGCACCTAACTGGCCTGCGCCACCACTGCCAGTACAAAATGAACAATCAAGACCTCTGCCTGATGTGGC <u>TCAGCGTCTGGTGCAGCATCTTGCAGAGCATGGCATTCAACCAGCCCGGAGTATGGCTGAACATATTCCTCC</u> <u>GGCACCTAACTGGCCTGCGCCACCACCGCCAGTACAAAATGAACAATCAAGACCTCTGCCTGATGTGGCTCA</u> <u>GCGTCTGGTGCAGCATCTTGCAGAGCATGGCATTCAACCAGCCCGGAATATGGCTGAACATATTCCTCCGGC</u> ACCTAACTGGCCTGCGCCACCACCGCCAGTACAAAATGAACAATCAAGACCTCTGCCTGATGTGGCTCAGCG TCTGGTGCAGCATCTTGCAGAGCATGGCATTCAACCAGCCCGGAATATGGCTGAACATATTCCTCCGGCACC TAACTGGCCTGCGCCACCACCGCCAGTACAAAATGAACAATCAAGACCTCTGCCTGATGTGGCTCAGCGTCT GGTGCAGCATCTTGCAGAGCATGGCATTAATACATCTAAGCGCTCGTGA

Sequências de nucleotídeos dos fragmentos de recombinação de três candidatos a mutantes ($\Delta 1$, $\Delta 2$ e $\Delta 6$). As regiões flanqueadoras (sublinhadas) representam porções conservadas do gene *espFU*, enquanto que a região central (não sublinhada) correspondente ao cassete de cloranfenicol.

Confirmada a deleção do gene *espFU* em BA320 por sequenciamento, foi selecionado o candidato $\Delta 2$ para a continuidade dos experimentos, que consistiu na complementação da mutação com o plasmídeo pEspFU, construído a partir da clonagem de *espFU_{BA320}* no vetor p-myc contendo o promotor nativo deste gene (**Figura 23A**). Dez clones resultantes da transformação em *E. coli* DH5 α foram investigados por PCR, dos quais sete foram positivos para *espFU_{BA320}* (**Figura 23B**). A confirmação da construção de pEspFU foi realizada por análise de restrição, após a digestão da extração plasmidial de um destes clones recombinantes com as enzimas *Ndel* e *BamHI* (**Figura 23C**). Quando comparado ao perfil de restrição do plasmídeo pKC471, que contém o gene *espFU* da cepa EDL933, é possível verificar a liberação de um fragmento de menor tamanho de pEspFU, correspondente ao gene *espFU_{BA320}*.



Figura 23 - Complementação da mutação do gene espFU.

Eletroforese em gel de agarose (0,8%) corado com GelRed: (**A**) do inserto e vetor digeridos; (**B**) dos produtos de amplificação para o gene *espFU* nos clones transformantes; (**C**) da análise de restrição do plasmídeos pKC471 e pEspFU. LM: *Low Mass DNA ladder* (Thermo Fisher Scientific); HM: *High Mass DNA ladder* (Thermo Fisher Scientific); M: marcador de peso molecular *1 Kb DNA ladder* (Thermo Fisher Scientific).

As cepas BA320, Δ*espFU*, Δ*espFU*+pEspFU e Δ*espFU*+vetor (transformada com o vetor vazio p-myc) foram então caracterizadas quanto à expressão e produção de EspFU para a confirmação da mutação e respectiva complementação.

Os ensaios de RT-PCR revelaram que, como esperado, *espFU* foi expresso por BA320 e $\Delta espFU$ +pEspFU, mas não por $\Delta espFU$ e $\Delta espFU$ +vetor (**Figura 24A**). Corroborando estes dados, foi verificado por *immunoblot* a presença da proteína EspFU-Myc no sobrenadante da cepa $\Delta espFU$ +pEspFU (**Figura 24B**). Por fim, a proteína EspFU foi detectada por ELISA nos sobrenadantes das cepas selvagem e complementada, embora muito mais evidentemente nesta última (**Figura 24C**). Estes resultados confirmaram o sucesso da mutação e da complementação, além de demonstrar que a produção de EspFU em BA320 é relativamente baixa.





(A) Eletroforese em gel de agarose (0,8%) corado com GelRed dos produtos de amplificação para o gene *espFU* por RT-PCR. (B) *Immunoblot* com anti-Myc (1:100) para detecção da proteína EspFU-Myc nos sobrenadantes concentrados após cultivo em DMEM. (C) ELISA indireto para detecção da produção de EspFU nos sobrenadantes de cultivos bacterianos em DMEM, utilizando-se soro policional anti-EspFU (1:100). M: marcador de peso molecular *1 Kb DNA Plus ladder* (Sinapse Inc) e padrão de massa molecular *PageRuler Prestained Protein ladder* (Thermo Fisher Scientific).

Posteriormente, foi observado que as cepas geneticamente modificadas ($\Delta espFU$, $\Delta espFU$ +pEspFU e $\Delta espFU$ +vetor) apresentaram o mesmo perfil de crescimento que BA320 (**Figura 25A**). Já nos ensaios de motilidade, todas as cepas apresentaram-se móveis (**Figura 25B**). Estes resultados indicam que EspFU e/ou a manipulação genética (deleção ou complementação) não afetaram significativamente o crescimento e motilidade de BA320, aspectos que poderiam influenciar no estudo da patogênese desta cepa.



Figura 25 - Curvas de crescimento e motilidade das cepas BA320, $\Delta espFU$, $\Delta espFU$ +pEspFU e $\Delta espFU$ +vetor.

(A) Os valores de densidade óptica (DO) a 600 nm foram regularmente registrados durante o cultivo das cepas em meio LB a 37 °C sob agitação de 200 rpm. Os dados representam a média ± desvio padrão das replicatas biológicas (n=3) de um experimento representativo. (B) Motilidade das cepas em meio LB semi-sólido.

4.4.3 Análise da interação com células epiteliais in vitro

Em seguida, foram realizados ensaios de interação com células HeLa, os quais mostraram que todas as cepas foram aderentes (**Figura 26A**). No entanto, a quantificação deste fenótipo revelou que a deleção de *espFU* reduziu significativamente a adesão de BA320 (*P*<0,0001), sendo esta propriedade restabelecida com o plasmídeo pEspFU, mas não com o vetor p-myc. (**Figura 26B**).

Figura 26 - Perfis de adesão das cepas BA320, ΔespFU, ΔespFU+pEspFU e ΔespFU+vetor.



∆espFU+pEspFU

∆espFU+vetor

(continua)

(continuação)

в



(A) Células HeLa foram infectadas por 6 h com as cepas bacterianas (MOI = 10), fixadas, coradas com solução de May-Grunwald/Giemsa e visualizadas por microscopia óptica sob aumento de 1.000 X. (B) Quantificação da adesão após lise com Triton-X-100 (1%) das células infectadas, plaqueamento dos lisados e contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) em ágar LB. A significância estatística foi determinada por análise de variância (ANOVA) em comparação à BA320 (****, *P*<0,0001).</p>

Também foi verificado que BA320, similarmente à E2348/69, induziu a polimerização de actina sob os sítios de adesão bacteriana, enquanto que o mutante $\Delta espFU$ perdeu essa capacidade (**Figura 27**). Novamente, a complementação com pEspFU foi capaz de restaurar o fenótipo.



Figura 27 - Ensaio de FAS com as cepas BA320, $\Delta espFU$, $\Delta espFU$ +pEspFU e $\Delta espFU$ +vetor.

(continua)

(continuação)



Células HeLa foram infectadas por 6 h com as cepas bacterianas (MOI = 10), fixadas, tratadas com faloidina conjugada à rodamina (vermelho) e DAPI (azul), e visualizadas por microscopia de fluorescência sob aumento de 1.000 X. As setas brancas indicam sítios de polimerização de actina. A cepa tEPEC E2348/69 foi utilizada como controle positivo.

Consistente com o acúmulo de actina, foi observado em MEV a formação de pequenos pedestais na superfície das células HeLa após a interação com BA320 e $\Delta espFU$ +pEspFU e a ausência destas estruturas nos sítios de adesão de $\Delta espFU$ e $\Delta espFU$ +vetor (**Figura 28**). Conforme demonstrado nas micrografias, os pedestais produzidos por BA320 e $\Delta espFU$ +pEspFU foram menos evidentes que aqueles formados por E2348/69.



Figura 28 - Fotomicrografia da superfície de células HeLa após interação com as cepas BA320, $\Delta espFU$, $\Delta espFU$ +pEspFU e $\Delta espFU$ +vetor.

Células HeLa foram infectadas por 6 h com as cepas bacterianas (MOI = 10) e processadas para visualização por microscopia eletrônica de varredura (MEV) sob aumento de 20.000 a 35.000 X. As setas brancas indicam a formação de pedestais de actina. A cepa tEPEC E2348/69 foi utilizada como controle positivo.

4.4.4 Modelo animal de colonização intestinal

Em conjunto, os dados de interação *in vitro* com células HeLa demonstraram uma grande importância de EspFU na adesão, indução da polimerização de actina e formação de pedestais por BA320, levando-nos a considerar se esta proteína também poderia desempenhar algum papel na colonização intestinal.

Para avaliar este aspecto *in vivo*, foi utilizado um modelo de camundongos tratados com estreptomicina, no qual os animais foram infectados via oral com aproximadamente 10^9 UFC de BA320 ou $\Delta espFU$, seguido pela enumeração diária de bactérias resistentes a este antibiótico em suas fezes. Como controle de infecção, alguns animais receberam PBS e, conforme esperado, não foram observadas bactérias Gram-negativas resistentes à estreptomicina em suas fezes durante todo o experimento. Já os camundongos infectados foram consistentemente colonizados tanto pela cepa selvagem quanto pelo mutante isogênico em *espFU* (**Figura 29A**), sem no entanto apresentar sinais clínicos de doença. Os animais eliminaram ambas as cepas em suas fezes durante todo o experimento, conforme verificação por PCR para amplificação de *eae* e aglutinação com soro anti-O55 (dados não mostrados).

No entanto, quando os níveis de colonização foram comparados, pôde-se verificar que os animais infectados com BA320 apresentaram uma carga bacteriana cumulativa significativamente maior em suas fezes do que aqueles que receberam a cepa $\Delta espFU$ (**Figura 29B**). Estes dados sugerem que a expressão de EspFU, embora não essencial, pode aumentar a eficiência da colonização intestinal.



Figura 29 - Colonização intestinal de camundongos tratados com estreptomicina.

(A) Camundongos fêmea BALB/c (n=6 animais/grupo) foram infectados via oral com aproximadamente 10^9 UFC da cepa selvagem BA320 ou do mutante isogênico em *espFU*. As fezes foram coletadas diariamente, homogeneizadas e plaqueadas em ágar MacConkey suplementado com estreptomicina (100 µg/mL) para enumeração de células viáveis (UFC). Os dados representam média ± erro padrão do número de UFC/grama de fezes. (B) Carga bacteriana cumulativa (área sob a curva) nas fezes dos animais após 11 dias de infecção. A significância estatística foi determinada por teste t não-pareado (**, *P*<0,05).

4.5 Dinâmica da formação de pedestais por cepas de aEPEC

4.5.1 Construção e caracterização das cepas de aEPEC com diferentes fenótipos A/E

Posteriormente, foi analisada a dinâmica da formação de lesão A/E em BA320, que forma pedestais de uma maneira EspFU-dependente, comparando com cepas de aEPEC que induzem polimerização de actina por meio da fosforilação de Tir, ou que utilizam ambas as vias de sinalização (EspFU e TirY-P). Para tal, uma série de construções a partir da manipulação genética de BA320 foi realizada, de modo a manter o mesmo repertório de virulência e evitar alterações fenotípicas relacionadas a cepas com diferentes arcabouços genéticos (**Figura 30**).



Figura 30 – Construção das cepas de aEPEC com diferentes mecanismos de polimerização de actina.

Especificamente, para a obtenção de cepas com Tir_{Y-P}, foi deletado o gene *tir* não-fosforilado nas cepas BA320 e $\Delta espFU$ por recombinação homóloga, empregando um cassete de kanamicina amplificado a partir do vetor pKD4 (**Figura 31A**). A deleção de *tir* por meio da incorporação do cassete de kanamicina foi confirmada por PCR (**Figura 31B, C e D**) e posterior sequenciamento dos fragmentos amplificados.





(continua)

(continuação)

Eletroforese em gel de agarose (0,8%) corado com GelRed: (**A**) da amplificação do cassete de recombinação tir:kan; (**B**) dos produtos de PCR gerados com os oligoiniciadores kan-F e kan-R; (**C**) tir-F e kan-R; (**D**) kan-F e tir-R. As setas indicam os tamanhos (pb) esperados para cada fragmento. M: marcador de peso molecular *1 Kb DNA Plus* (**A**) e *1 Kb DNA ladder* (**B**, **C** e **D**) (Thermo Fisher Scientific).

As construções Δtir e $\Delta \Delta espFU:tir$ foram então transformadas com o plasmídeo pEP23 (convencionalmente denominado pTir_{Y-P} neste trabalho), obtido após a clonagem do gene *tir* de E2348/69 no vetor pACYC184 (**Figura 32A e B**). Deste modo, as cepas resultantes $\Delta \Delta espFU:tir+pTir_{Y-P}$ e $\Delta tir+pTir_{Y-P}$ poderiam induzir lesões A/E pelas vias TirY-P e EspFU/TirY-P, respectivamente. Como comparação, complementações com o plasmídeo pTir contendo o gene *tir* de BA320 também foram realizadas (**Figura 32C**), além de transformações com o vetor vazio pACYC184.





Eletroforese em gel de agarose (0,8%) corado com GelRed: (**A**) dos insertos e vetor digeridos; (**B**) dos produtos de amplificação para o gene *tir* dos clones transformantes pTir_{Y-P}; (**C**) dos produtos de PCR para o gene *tir* e análise plasmidial dos clones transformantes pTir. M: marcador de peso molecular 1 Kb DNA (**A**) e 1 Kb DNA Plus ladder (**B** e **C**) (Thermo Fisher Scientific).

A amplificação dos genes *espFU* (Figura 33A) e *tir* (Figura 33B) por PCR revelou que todas as construções apresentaram os genótipos esperados. Para confirmar a deleção e complementação de Tir, extratos totais (lisados) foram preparados após cultivo até a fase tardia do crescimento exponencial em DMEM,

sendo então testados por *immunoblot*. Como controle de expressão constitutiva, foi verificado que todas as cepas produziram a proteína RpoA (**Figura 33C**). Além disso, todas as cepas produziram EspA e EspB, indicando a funcionalidade de LEE. Já a proteína Tir foi produzida pelas cepas BA320, $\Delta espFU$, $\Delta espFU$ +pEspFU e $\Delta espFU$ +vetor, mas não por Δtir e $\Delta \Delta espFU$:tir, conforme esperado. Com relação às complementações, apenas aquelas realizadas com pTir restauraram a produção desta proteína. O fato dos plasmídeos pTir_{Y-P} e pTir terem sido derivados do mesmo vetor (pACYC184) e, portanto, apresentarem o mesmo promotor de expressão, sugere que a proteína Tir de tEPEC E2348/69 tenha sido expressa, porém não foi reconhecida pelo soro policional utilizado, que foi produzido contra Tir de EHEC O157:H7.



Figura 33 - Confirmação da mutação e complementação de Tir.

Eletroforese em gel de agarose (0,8%) corado com GelRed dos produtos de amplificação para os genes (**A**) *espFU* e (**B**) *tir*. Os fragmentos de menor tamanho correspondem a porções remanescentes dos genes *espFU* e *tir* após deleção por recombinação homóloga. (**C**) *Immunoblot* para detecção da produção de Tir, EspB, EspA e RpoA nos extratos totais preparados a partir de cultivos bacterianos em DMEM. M: marcador de peso molecular *1 Kb DNA Plus ladder* (Thermo Fisher Scientific).

Mesmo não tendo confirmado a expressão de Tir por $\Delta tir+pTir_{Y-P}$ e $\Delta\Delta espFU:tir+pTir_{Y-P}$, os experimentos por meio da caracterização destas cepas com relação às taxas de crescimento e produção de proteínas codificadas por LEE, em condições normalmente utilizadas para a infecção de células epiteliais (DMEM, 37 ^oC e 5% CO₂), tiveram prosseguimento. Foi observado, então, que todas as cepas apresentaram praticamente o mesmo perfil de crescimento, conforme determinado pela enumeração regular de células viáveis durante o cultivo (Figura 34A). A análise por immunoblot dos extratos totais (Figura 34B) e sobrenadantes concentrados (Figura 34C) revelou que EspA e EspB foram produzidas por todas as cepas (Figura 34D). No entanto, EspB foi preferencialmente secretada, enquanto que EspA foi similarmente detectada tanto nos extratos totais quanto sobrenadantes. Com relação à Tir, foi observada uma fraca detecção nos extratos totais de $\Delta tir+pTir_{Y-P} \in \Delta \Delta espFU:tir+pTir_{Y-P}$, mas não nos sobrenadantes, enquanto que as demais cepas produziram e secretaram esta proteína. Em conjunto, estes dados sugerem que estas cepas de aEPEC exibiram a mesma taxa de crescimento e produziram proteínas codificadas por LEE sob condições de infecção.

Figura 34 - Análise do crescimento e produção de proteínas codificadas por LEE em condições de infecção.



(continua)

(continuação)

(A) As cepas de aEPEC foram cultivadas em DMEM a 37 °C sob atmosfera com 5% de CO₂ por 6 h. A enumeração de células viáveis (UFC) foi realizada por plaqueamento em ágar LB. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão das replicatas biológicas (n=6) de dois experimentos independentes. Eletroforese em gel de poliacrilamida *Mini-PROTEAN TGX Stain-free* (Bio-Rad) dos (B) extratos totais e (C) sobrenadantes concentrados. (D) *Immunoblot* para detecção da produção de Tir, EspA e EspB. A quantidade relativa de proteínas aplicadas por canaleta foi verificada por *immunoblot* para detecção de RpoA (extratos totais) ou pela intensidade da banda de BSA (sobrenadantes concentrados). M: padrão de massa molecular *Precision Plus Protein Dual Color ladder* (Bio-Rad).

Posteriormente, foi avaliada a capacidade de induzir polimerização de actina *in vitro* após a infecção de células HeLa por 6 h. Conforme esperado, as deleções em *espFU* e ou *tir* resultaram na perda da habilidade em formar pedestais em células HeLa, sendo que estas propriedades não foram restabelecidas após transformações com os vetores vazios (**Figura 35**). Já a complementação com o Tir de E2348/69 (fosforilado) resultou na formação de pedestais por todas as cepas, enquanto que o Tir de BA320 (não-fosforilado) foi capaz de restaurar a polimerização de actina apenas no mutante Δtir . Por outro lado, o plasmídeo pEspFU restaurou a formação de pedestais apenas em $\Delta espFU$, mas não em $\Delta \Delta espFU:tir$. Estes dados indicam que a produção de Tir_{Y-P} é suficiente para induzir polimerização de actina, enquanto que EspFU requer a presença de Tir para desencadear a formação de pedestais.



Figura 35 - Confirmação dos fenótipos de polimerização de actina.

87

(continua)

(continuação)



Células HeLa foram infectadas por 6 h com as cepas bacterianas (MOI = 10), fixadas, tratadas com faloidina conjugada à isotiocianato de fluoresceína (verde) e iodeto de propídio (vermelho), e então visualizadas por microscopia de fluorescência sob aumento de 630 X.

Para complementar os dados de polimerização de actina, foram realizados ensaios de imunofluorescência, onde foi possível observar que Tir foi produzido, translocado para as células HeLa e co-localizado com os pedestais formados por BA320, $\Delta tir+pTir_{Y-P}$ e $\Delta \Delta espFU:tir+pTir_{Y-P}$ (**Figura 36A**). Também foi observado que o Tir destas últimas duas cepas foi fosforilado similarmente àquele de E2348/69, enquanto que nenhuma marcação com anti-fosfotirosina (PY) foi detectada nas preparações com BA320 (**Figura 36B**). Para confirmar estes achados, as frações solúveis obtidas após o tratamento com Triton-X-100 de células HeLa infectadas por 6 h foram analisadas. Os ensaios de *immunoblot* com anticorpos anti-Tir_{Y-P} revelaram então que Tir de $\Delta tir+pTir_{Y-P}$ e $\Delta \Delta espFU:tir+pTir_{Y-P}$ foi translocado e fosforilado, como evidenciado pela presença de duas bandas correspondentes às formas modificadas (~90 kDa) e não-modificadas (~72 kDa) desta proteína (**Figura 36C**). Coletivamente, estes dados confirmam os fenótipos esperados das cepas em estudo.



Figura 36 - Imunodetecção da translocação e fosforilação de Tir após infecção por cepas de aEPEC.

Imunofluorescência para detecção da translocação e fosforilação de Tir. Células HeLa foram infectadas por 6 h com as cepas bacterianas (MOI = 10), fixadas e tratadas com (**A**) faloidina conjugada a FITC (verde), anticorpos anti-Tir (violeta) e DAPI (azul) para a detecção da translocação, ou (**B**) anticorpos anti-fosfotirosina conjugados a FITC (verde) e iodeto de propídio (vermelho) para detecção da fosforilação de Tir. As preparações foram analisadas por microscopia de fluorescência confocal sob aumento de 630 X. (**C**) *Immunoblot* para detecção da fosforilação de Tir. As frações solúveis de células infectadas, obtidas após tratamento com Triton-X-100, foram analisadas com anticorpos anti-Tir_{Y-P}. As setas indicam as formas fosforilada (~90 kDa) e não-fosforilada (~72 kDa) de Tir.

4.5.2 Cinética da formação de pedestais de actina

Após a confirmação dos fenótipos esperados, foram realizados ensaios preliminares de cinética com a cepa BA320, testando a capacidade de induzir polimerização de actina após 1,5, 3, 4,5 e 6 h de interação com células HeLa. Sítios de acúmulo de actina foram observados somente a partir de 3 h de infecção (**Figura 37**), indicando que este seria o tempo inicial ideal para os ensaios de cinética da formação de pedestais.



Figura 37 - Ensaio piloto da cinética de formação de pedestais por BA320.

Células HeLa foram infectadas por 1,5, 3, 4,5 e 6 h com BA320 (MOI = 10), fixadas, tratadas com faloidina conjugada a FITC (verde) e iodeto de propídio (vermelho) e então visualizadas por microscopia de fluorescência sob aumento de 630 X.

Em seguida, a cinética da formação de pedestais das cepas BA320, $\Delta tir+pTir_{Y-P} e \Delta \Delta espFU:tir+pTir_{Y-P}$ foi comparada, quantificando ambos o número de bactérias aderidas e os sítios de acúmulo de actina após a infecção de células HeLa por 3, 4,5 e 6 h. O mutante $\Delta espFU$ foi incluído como um controle negativo de indução de polimerização de actina. De um modo geral, foi verificado que a cepa selvagem BA320 foi a mais aderente em todos os tempos de infecção testados, enquanto que $\Delta\Delta espFU:tir+pTir_{Y-P}$ apresentou níveis de adesão similares àqueles do mutante $\Delta espFU$, que não forma pedestais (**Figuras 38B, 39B e 40B**). Interessantemente, as cepas *espFU*-positivas (BA320 e $\Delta tir+pTir_{Y-P}$) foram mais aderentes quando comparadas a seus mutantes isogênicos ($\Delta espFU$ e $\Delta\Delta espFU:tir+pTir_{Y-P}$), reforçando o papel de EspFU na adesão de aEPEC.

Com relação à polimerização de actina, apenas alguns pedestais formados após 3 h de interação bactéria-célula (Figura 38A e C) foram observados, sendo que o número destas estruturas aumentou exponencialmente entre 4,5 (Figura 39A **e** C) e 6 h de infecção (Figura 40A e C). Os pedestais formados por $\Delta tir+pTir_{Y-P}$ e $\Delta\Delta espFU:tir+pTir_{Y-P}$ foram aparentemente maiores e mais evidentes que aqueles produzidos por BA320, embora nenhuma ferramenta para mensurar este aspecto tenha sido empregada. Quando enumerados, os pedestais foram mais eficientemente formados por BA320 e Δtir +pTir_{Y-P} em relação à $\Delta \Delta espFU:tir$ +pTir_{Y-P} após 3 (Figura 38C) e 4,5 h de infecção (Figura 39C). No entanto, nenhuma diferença significativa foi observada com respeito ao número de pedestais nos ensaios de 6 h (**Figura 40C**), mesmo visto que $\Delta tir+pTir_{Y-P}$ e $\Delta \Delta espFU:tir+pTir_{Y-P}$ foram menos aderentes que BA320, indicando que o nível de adesão bacteriana pode estar associado à taxa de polimerização de actina apenas nos estágios iniciais do processo de infecção. Além disso, a via de sinalização dependente da fosforilação de Tir (TirY-P) poderia ser uma maneira mais eficiente para induzir a polimerização de actina, uma vez que um menor número de bactérias aderidas resultou na mesma quantidade de pedestais formados quando comparado a uma cepa que utiliza exclusivamente EspFU para promover este fenótipo.

Figura 38 - Adesão bacteriana e formação de pedestais por cepas de aEPEC após 3 h de infecção.



(A) Células HeLa foram infectadas por 3 h com as cepas bacterianas (MOI = 10), fixadas, tratadas com faloidina conjugada a FITC (verde) e iodeto de propídio (vermelho) e então visualizadas por microscopia de fluorescência confocal sob aumento de 630 X. (B) Quantificação do número de bactérias aderidas após tratamento das células com Triton-X-100 e plaqueamento dos lisados em ágar LB para contagem de células viáveis (UFC). (C) Quantificação do número de pedestais formados após enumeração dos sítios de acúmulo de actina em 100 células HeLa. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão das replicatas biológicas de três experimentos independentes. A significância estatística foi determinada por análise de variância (ANOVA) em relação à BA320 (****P*<0,001; *****P*<0,0001).

3 h

Figura 39 - Adesão bacteriana e formação de pedestais por cepas de aEPEC após 4,5 h de infecção.



(A) Células HeLa foram infectadas por 4,5 h com as cepas bacterianas (MOI = 10), fixadas, tratadas com faloidina conjugada a FITC (verde) e iodeto de propídio (vermelho) e então visualizadas por microscopia de fluorescência confocal sob aumento de 630 X. (B) Quantificação do número de bactérias aderidas após tratamento das células com Triton-X-100 e plaqueamento dos lisados em ágar LB para contagem de células viáveis (UFC). (C) Quantificação do número de pedestais formados após enumeração dos sítios de acúmulo de actina em 100 células HeLa. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão das replicatas biológicas de três experimentos independentes. A significância estatística foi determinada por análise de variância (ANOVA) em relação à BA320 (****P*<0,001; *****P*<0,0001).



Figura 40 - Adesão bacteriana e formação de pedestais por cepas de aEPEC após 6 h de infecção.

(A) Células HeLa foram infectadas por 6 h com as cepas bacterianas (MOI = 10), fixadas, tratadas com faloidina conjugada a FITC (verde) e iodeto de propídio (vermelho) e então visualizadas por microscopia de fluorescência confocal sob aumento de 630 X. (B) Quantificação do número de bactérias aderidas após tratamento das células com Triton-X-100 e plaqueamento dos lisados em ágar LB para contagem de células viáveis (UFC). (C) Quantificação do número de pedestais formados após enumeração dos sítios de acúmulo de actina em 100 células HeLa. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão das replicatas biológicas de três experimentos independentes. A significância estatística foi determinada por análise de variância (ANOVA) em relação à BA320 (****P*<0,001; *****P*<0,0001).

A visualização em tempo real das células durante a infecção revelou que BA320 e Δtir +pTir_{Y-P} formaram pedestais mais eficiente e rapidamente do que $\Delta \Delta espFU:tir$ +pTir_{Y-P} (**Figura 41**), muito provavelmente devido aos maiores níveis de adesão destas cepas, o que corrobora os achados dos ensaios de cinética. Interessantemente, também foi possível observar que os pedestais são constantemente formados e desfeitos durante o curso da infecção, reforçando que a formação de lesões A/E trata-se de um processo bastante dinâmico.



Figura 41 - Análise em tempo real da formação de pedestais por cepas de aEPEC.

Células HeLa marcadas com actina fluorescente (LifeAct:GFP) foram infectadas por 2 h com as cepas de aEPEC expressando mCherry (MOI = 100) e então visualizadas durante mais 2 h por microscopia confocal *time-lapse* sob aumento de 630 X. As setas indicam os sítios de acúmulo de actina.

4.5.3 Cinética da expressão de LEE e espFU

Os níveis de expressão de LEE também foram avaliados durante o curso da infecção com o intuito de correlacioná-los com as diferentes cinéticas da formação de pedestais observadas. Para tal, ensaios quantitativos de PCR em tempo real (qRT-PCR) foram realizados, analisando a expressão dos *operons* de LEE nas bactérias aderidas após 3, 4,5 e 6 h de interação com as células HeLa.

Os dados de qRT-PCR demonstraram uma redução significativa nos níveis de transcrição de *ler* (LEE1) em todas as cepas (**Figura 42**), especialmente após 6 h, indicando que a expressão do ativador transcricional Ler seja requerida apenas nos

estágios iniciais da infecção. Diferentemente de *ler*, os níveis transcricionais de *escC* (LEE2), *escV* (LEE3), *espA* (LEE4) e *eae* (LEE5) permaneceram inalterados na cepa BA320 durante a infecção (**Figura 42A**). O mesmo foi observado para $\Delta tir+pTir_{Y-P}$, com exceção de LEE4, que foi significativamente mais expresso após 6 h (**Figura 42B**). Já $\Delta \Delta espFU:tir+pTir_{Y-P}$ e $\Delta espFU$ apresentaram um aumento significativo na expressão de todos os *operons*, especialmente após 6 h de infecção, com exceção de LEE5 na cepa que não forma pedestais (**Figura 42C e D**). Dentre as cepas que induzem polimerização de actina, apenas $\Delta \Delta espFU:tir+pTir_{Y-P}$ apresentou uma correlação entre aumento de adesão, formação de pedestais e os níveis de expressão de LEE durante a infecção. Além disso, Ler parece não ser o responsável direto pelas alterações de expressão observadas, uma vez que houve uma redução significativa nos níveis transcricionais de LEE1 durante o curso da infecção.



Figura 42 - Expressão temporal de LEE durante a infecção por cepas de aEPEC.

Os perfis de transcrição de genes representativos dos *operons* LEE1 (*ler*), LEE2 (*escC*), LEE3 (*escV*), LEE4 (*espA*) e LEE5 (*eae*) foram avaliados nas bactérias aderidas após 3, 4,5 e 6 h de infecção das células HeLa (MOI=10) com as cepas: (**A**) BA320, (**B**) $\Delta tir+pTir_{Y-P}$, (**C**) $\Delta \Delta espFU:tir+pTir_{Y-P}$ e (**D**) $\Delta espFU$. Os níveis transcricionais de cada gene foram normalizados à transcrição de *rpoA*. Os dados demonstram a média ± desvio padrão das replicatas biológicas (n=3) de um experimento representativo. A significância estatística foi determinada por análise de variância (ANOVA) entre as condições (*, *P*<0,05; **, *P*<0,01; ****, *P*<0,0001).

Quando considerada a expressão de LEE em todas as cepas, comparando-as à BA320, verifica-se que $\Delta espFU$ apresentou os maiores níveis transcricionais em todos os tempos de infecção, seguido por $\Delta \Delta espFU:tir+pTir_{Y-P}$ (**Figuras 43, 44 e 45**). Surpreendentemente, estas cepas apresentaram os menores níveis de adesão, além de $\Delta espFU$ não ser capaz de formar pedestais robustamente. Com relação à $\Delta tir+pTir_{Y-P}$, foi observada maior expressão de LEE2 comparado à BA320 apenas nos estágios iniciais de infecção (**Figura 43**); LEE3 foi significativamente mais transcrito em 3 e 4,5 h (**Figura 43 e 44**), e maiores níveis transcricionais de LEE4 foram observados em todos os tempos (**Figuras 43, 44 e 45**). No entanto, diferenças significativas de expressão para LEE1 e LEE5 entre BA320 e $\Delta tir+pTir_{Y-P}$ não foram detectadas. De um modo geral, os dados de qRT-PCR demonstram uma associação inversamente proporcional entre adesão e expressão de LEE, onde as cepas mais aderentes apresentaram níveis transcricionais mais baixos em relação àquelas menos aderentes ou que não formam pedestais.





Os perfis de transcrição de genes representativos dos *operons* LEE1 (*ler*), LEE2 (*escC*), LEE3 (*escV*), LEE4 (*espA*) e LEE5 (*eae*) foram analisados nas bactérias aderidas após 3 h de interação com células HeLa. Os níveis transcricionais foram normalizados a *rpoA* e calculados em relação à transcrição em BA320. Os dados demonstram a média ± desvio padrão das replicatas biológicas (n=3) de um experimento representativo. A significância estatística foi em foi determinada por análise de variância (ANOVA) em relação à BA320 (*, *P*<0,05; **, *P*<0,01; ***, *P*<0,001; ****, *P*<0,0001).



Figura 44 - Expressão relativa de LEE em cepas de aEPEC após 4,5 h de infecção.

Os perfis de transcrição de genes representativos dos operons LEE1 (ler), LEE2 (escC), LEE3 (escV), LEE4 (espA) e LEE5 (eae) foram analisados nas bactérias aderidas após 4,5 h de interação com células HeLa. Os níveis transcricionais foram normalizados a rpoA e calculados em relação à transcrição em BA320. Os dados demonstram a média ± desvio padrão das replicatas biológicas (n=3) de um experimento representativo. A significância estatística foi em foi determinada por análise de variância (ANOVA) em relação à BA320 (*, *P*<0,05; **, *P*<0,01; ***, *P*<0,001; ****, *P*<0,001).



Figura 45 - Expressão relativa de LEE em cepas de aEPEC após 6 h de infecção.

Os perfis de transcrição de genes representativos dos *operons* LEE1 (*ler*), LEE2 (*escC*), LEE3 (*escV*), LEE4 (*espA*) e LEE5 (*eae*) foram analisados nas bactérias aderidas após 6 h de interação com células HeLa. Os níveis transcricionais foram normalizados a *rpoA* e calculados em relação à transcrição em BA320. Os dados demonstram a média ± desvio padrão das replicatas biológicas (n=3) de um experimento representativo. A significância estatística foi em foi determinada por análise de variância (ANOVA) em relação à BA320 (*, *P*<0,05; **, *P*<0,01; ***, *P*<0,001; ****, *P*<0,0001).

Com relação à transcrição de *espFU*, os ensaios de RT-PCR revelaram que BA320 e Δtir +pTir_{Y-P} expressaram este gene em todos os tempos de infecção (**Figura 46**), enquanto que nenhuma expressão foi observada para as cepas $\Delta espFU$ e $\Delta \Delta espFU$:*tir*+pTir_{Y-P}, conforme esperado.



Figura 46 - Transcrição do gene espFU durante a infecção por cepas de aEPEC.

Eletroforese em gel de agarose (0,8%) corado com GelRed dos produtos de amplificação para o gene *espFU*. Os RNAs foram purificados das bactérias aderidas após 3, 4,5 e 6 h de interação com células HeLa. Os cDNAs gerados foram então utilizados em reações de PCR. Os gDNAs de BA320 e DH5α foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente. M: marcador de peso molecular *1 Kb DNA Plus ladder* (Thermo Fisher Scientific).

4.5.4 Cinética da produção de EspA e EspB

Para monitorar a produção de proteínas codificadas por LEE (EspA e EspB), células HeLa infectadas por 3, 4,5 e 6 h foram tratadas com Triton-X-100, sendo as frações solúvel (citoplasma e membrana) e insolúvel (bactérias aderidas) analisadas por *immunoblot*. Foi observado aumento de EspA e EspB em ambas frações de 3 a 6 h, o que foi correlacionado com uma maior adesão bacteriana nos estágios mais tardios de infecção (**Figura 47A**). Corroborando estes achados, a produção de EspA foi observada por imunofluorescência em todas as cepas após a infecção de células HeLa por 6 h (**Figura 47B**). A inesperada presença de EspA na fração solúvel possivelmente deve-se a uma dissociação desta proteína do envelope bacteriano durante o processo de fracionamento, podendo também representar alguma fração

associada à membrana. Já o fato de EspB não ter sido detectada na fração solúvel após 3 h indica que esta proteína é preferencialmente translocada para a célula hospedeira nos estágios mais tardios (4,5 e 6 h) de infecção. Interessantemente, não houve qualquer correlação entre produção proteica e os níveis de expressão de LEE. Especificamente, BA320 apresentou a menor transcrição de LEE4, no entanto produziu EspA e EspB em altos níveis, indicando que outros mecanismos póstranscricionais poderiam estar regulando a produção de proteínas codificadas por LEE.



Figura 47 - Análise da produção de EspA e EspB durante a infecção por cepas de aEPEC.

(continua)

(continuação)

(A) *Immunoblots* para detecção da produção de EspA e EspB após 3, 4,5 e 6 h de interação bactériacélula. As frações solúvel e insolúvel de células HeLa infectadas, obtidas após tratamento com Triton-X-100, foram analisadas com anticorpos anti-EspA e anti-EspB. (B) Imunofluorescência para detecção da produção de EspA após 6 h de infecção. As células HeLa foram infectadas com as cepas bacterianas (MOI = 10), fixadas, tratadas com faloidina conjugada a FITC (verde), anticorpos anti-EspA (violeta) e DAPI (azul), sendo então visualizadas por microscopia de fluorescência confocal sob aumento de 630 X.

4.6 Resposta transcricional de células epiteliais aos diferentes mecanismos de formação de pedestais empregados por aEPEC

Com o intuito de melhor compreender a resposta do hospedeiro a cepas de aEPEC que induzem lesões A/E por diferentes vias de sinalização, o sequenciamento dos RNAs mensageiros (mRNA-seq) de células HeLa após infecção por 6 h foi realizado. Este período de incubação foi selecionado uma vez que após 6 h as proteínas efetoras são translocadas para a célula hospedeira e os pedestais de actina já estão devidamente formados. Células não-infectadas foram utilizadas como controle da resposta basal de HeLa. A análise das amostras de RNA revelou que todas apresentaram uma ótima qualidade, conforme verificado pelo alto índice de integridade RIN (*RNA integrity number* \geq 9,7) e por eletroforese capilar, onde foi possível observar uma intensidade cerca de duas vezes maior da banda correspondente ao RNA ribossômico (rRNA) 28S em relação ao 18S (**Figura 48A**). Posteriormente, foram preparadas as bibliotecas de cDNA, resultando em fragmentos com aproximadamente 300 pb (**Figura 48B**).



Figura 48 - Análise da qualidade dos RNAs e bibliotecas de cDNA utilizados nos ensaios de RNA-seq.

Eletroforese capilar no sistema Bioanalyzer para (**A**) análise da integridade dos RNAs purificados após infecção de células HeLa e (**B**) análise da integridade dos fragmentos de cDNA obtidos após construção das bibliotecas. Todas as amostras de RNA apresentaram um valor de RIN \ge 8,0. As setas indicam as bandas correspondentes aos fragmentos de rRNA 28S e 18S. M: marcador de peso molecular.

A partir do sequenciamento das bibliotecas de cDNA foram geradas em média 48 milhões de sequências para cada amostra, das quais 95% foram mapeadas/alinhadas ao genoma humano (Homo sapiens - hg19) para a identificação dos perfis globais de expressão gênica, após processamento e normalização dos dados. A análise dos transcriptomas por clusterização hierárquica revelou que, conforme esperado, houve um agrupamento bem próximo das replicatas biológicas devido à alta similaridade gênica, demonstrando a reprodutibilidade dos dados. Além disso, foi possível observar que existem diferenças significativas nos perfis de expressão gênica entre os grupos analisados (Figura 49). Interessantemente, foi observado um agrupamento das amostras de células infectadas, com exceção de $\Delta\Delta espFU:tir+pTir_{Y-P}$, que apresentou um perfil de expressão mais próximo ao do controle (HeLa). Também foi possível observar que a infecção de células HeLa com cepas espFU-positivas (BA320 e $\Delta tir+pTir_{Y-P}$) resultou em uma resposta global bastante similar, conforme demonstrado pela maior proximidade no agrupamento.

Visando identificar genes diferencialmente expressos (GDEs, FDR<0,01) em resposta à infecção por aEPEC que poderiam estar especificamente associados com a formação de pedestais, os transcriptomas das células infectadas por BA320, $\Delta tir+pTir_{Y-P}$ e $\Delta\Delta espFU:tir+pTir_{Y-P}$ foram comparados com o perfil de expressão de HeLa após interação com $\Delta espFU$. As análises comparativas demonstraram que o número de genes induzidos (*upregulated*) foi consistentemente maior que o número de genes cuja expressão foi reprimida (*downregulated*) em todas as comparações (**Figura 50**). Notavelmente, a infecção por $\Delta\Delta espFU:tir+pTir_{Y-P}$ resultou na expressão diferencial de um maior número de genes em relação a células HeLa



Figura 49 - Clusterização hierárquica dos transcriptomas de células HeLa infectadas por aEPEC e do controle não-infectado.

Os dendogramas representam a similaridade das replicatas biológicas e dos padrões de expressão gênica entre os grupos.



Figura 50 - Genes diferencialmente expressos em resposta à formação de pedestais de actina por cepas de aEPEC.

Número de genes induzidos (vermelho) e reprimidos (azul) identificados na comparação entre os grupos que induzem a formação de pedestais e o mutante $\Delta espFU$. Genes diferencialmente expressos foram identificados com base nos valores de *False Discovery Rate* (FDR) < 0,01.

Para uma caracterização mais detalhada dos perfis de expressão, selecionamos os 100 GDEs mais significativos em cada comparação, com base nos valores de *P*. O *heat map* gerado a partir dos níveis de expressão destes genes demonstrou uma maior proximidade na resposta transcricional de células infectadas por cepas *espFU*-positivas em relação às demais condições de infecção (**Figura 51**), corroborando os dados da clusterização hierárquica. Especificamente, a maioria dos 100 GDEs mais significativos em resposta à infecção por BA320 e $\Delta tir+pTir_{Y-P}$ foram induzidos, enquanto que em células infectadas por $\Delta \Delta espFU$:tir+pTir_{Y-P} foi detectada a predominância de genes reprimidos. De interesse, é possível notar um agrupamento de genes cuja expressão foi fortemente reprimida em células infectadas por $\Delta \Delta espFU$

A categorização funcional (ontologia gênica) dos 100 GDEs reportados em cada uma das comparações (BA320 x $\Delta espFU$, $\Delta tir+pTir_{Y-P}$ x $\Delta espFU$ e $\Delta \Delta espFU:tir+pTir_{Y-P}$ x $\Delta espFU$) indicou o enriquecimento de genes envolvidos com regulação biológica, processos celulares e metabólicos, desenvolvimento e resposta a estímulos (**Figura 52A**). Além disso, a maioria destes genes codificava proteínas

relacionadas com sinalização, fatores de transcrição, ligação a ácidos nucléicos, citoesqueleto e diversos tipos de enzimas (**Figura 52B**).



Figura 51 - Padrões de expressão dos genes mais significativamente modulados em resposta à infecção por aEPEC.

Heat map com os 100 genes diferencialmente expressos mais significativos em cada grupo. As colunas e linhas representam as amostras e os genes, respectivamente. A coloração em vermelho indica expressão induzida, enquanto que os genes reprimidos estão destacados em azul. A intensidade colorimétrica corresponde a diferentes níveis de expressão gênica.

Figura 52 - Categorização funcional dos genes diferencialmente expressos em resposta à formação de pedestais de actina por cepas de aEPEC.



Classificação dos genes diferencialmente expressos mais significativos em (A) processos biológicos e (B) classes de proteínas de acordo com o servidor PANTHER.

Conforme demonstrado no diagrama de Venn (**Figura 53**), a expressão diferencial de muitos genes foi comum a mais de uma via de polimerização de actina, enquanto que a modulação de outros foi cepa-específica.


Figura 53 - Comparação dos principais genes diferencialmente expressos em resposta à formação de pedestais.

Diagrama de Venn ilustrando o número de genes diferencialmente expressos que foram compartilhados ou exclusivos entre as diferentes vias de polimerização de actina.

A **Tabela 3** mostra a identificação de todos os 177 GDEs comuns ou específicos aos diferentes mecanismos de formação de pedestais. Considerando os 33 genes comumente modulados em infecções por cepas formadoras de pedestais, apenas BIRC3, CXCL1 e IL8 foram induzidos em todos os grupos, indicando que possam ser ativados em resposta a lesões A/E. Dentre os genes especificamente modulados por cepas *espFU*-positivas, 33 foram induzidos e apenas quatro reprimidos. Já as cepas que expressaram TirY-P modularam especificamente nove genes, dos quais GABRE, HNRNPU-AS1, MALAT1 e NEAT1 foram reprimidos em ambos os grupos. Por fim, outros 87 genes foram especificamente induzidos ou reprimidos em resposta à infecção por BA320 (19), $\Delta tir+pTir_{Y-P}$ (21) ou $\Delta\Delta$ espFU:tir+pTir_{Y-P} (47) quando comparados a células infectadas por Δ espFU.

Grupos	GDEs	Identificação dos GDEs			
(fenótipos A/E)	(n)				
EspFU, EspFU+TirY-P, TirY-P	33	IGFBP3, P4HA1, PFKFB4, CXCR4, BNIP3, SLC2A3, IER3, ERRFI1 FAM162A, HK2, INSIG2, VEGFA, PDK1, KCTD11, EFNA1, KDM3A CNOT8, IL8, BNIP3L, CCNG2, EGLN1, CXCL1, NFIL3, ZNF292, ADM, HILPDA, INSIG1, SLC2A1, NDRG1, MXI1, STC2, BIRC3, ARRDC3			
EspFU, EspFU+TirY-P	37	NFKBIA, SERPINE1, NFKB2, C8orf4, LINC00673, HOXD11, IL1A, ICAM1, THBS1, CDKN1A, NFKBIE, BIRC2, SDC4, SNAI2, PLOD2 NAMPT, ITPRIP, ETS1, JHDM1D, IRAK2, MAFF, TNFAIP3, TXNIP, IL6, PTGS2, CTGF, DUSP1, CYP1B1, GFPT2, EGR1, NFKB1, GPRC5A, TNIP1, BTG1, FAM13A, PIK3IP1, MAP2K6			
EspFU, TirY-P	11	WSB1, LOX, FUT11, SH3BP2, CA9, BHLHE40, ENO2, PER1, HEY1 ANKZF1, CLK1			
EspFU+TirY-P, TirY-P	9	IPMK, ANGPTL4, NEAT1, HNRNPU-AS1, MALAT1, PPP1R3C, GABRE, GADD45B, ANKRD37			
EspFU	19	EMP1, GREM2, CSF1, ANKRD1, HIST1H1C, AKR1C1, KRT80, LIF, FBXO2, TNFRSF10B, CCL20, WNT5A, SNHG1, TMEM45A, PPP2R5B, CXCL2, HIST1H2BK, CD83, GABARAPL1			
EspFU+TirY-P	21	MIR22HG, SNHG3, PPP1R10, AHSA2, KLF10, NCOA7, ZNF692 FAM110C, SOD2, SNHG4, SEMA4B, ACTC1, SHB, DHRS3, PMAIP1 SRF, ADAMTS1, DRAM1, FAM210A, SSTR1, GOLGA8B			
TirY-P	47	MAPK7, PPL, EDN1, RCOR2, SAP30, LENG8, FOSL2, MNT, RAB3A MYLIP, ALKBH5, GYS1, RARA, GPI, FAM115C, MKNK2, ATG9A VLDLR, TSC22D3, SNX33, DDX41, PRSS53, GOLGA8A, ZNF395 DDIT4, PPP1R3G, NAB2, BHLHE41, FGF11, ALDOA, RAB20, HSPA8 HES1, EFNA3, EGLN3, SPRY1, EDN2, AK4, LOC143666, CHAC1, MIR210HG, UBC, DKK1, LOC154761, VAMP1, KDM6B, FOXD1			
Total	177				

Tabela 5 - Identificação dos genes mais significativamente modulados entre os diferentes mecanismos de formação de pedestais.

Os dados demonstram a distribuição dos genes entre os grupos de acordo com os fenótipos A/E. Genes com expressão significativamente induzida ou reprimida são indicados em vermelho ou azul, respectivamente. Genes com expressão significativamente induzida em cepas *espFU*-positivas e reprimida em $\Delta\Delta$ *espFU*-tir+pTir_{Y-P} estão indicados em preto.

É importante notar que, dentre os GDEs identificados em resposta à formação de pedestais, muitos estão envolvidos em processos imunes, como apoptose e inflamação. Interessantemente, quando comparada ao controle de células (HeLa), a expressão da maioria destes genes foi fortemente reprimida na infecção por $\Delta espFU$, porém não foi significativamente afetada em células infectadas por cepas formadoras de pedestais (**Tabela 4**). Isto leva a especular que a lesão A/E,

especialmente mediada por EspFU, poderia ativar a expressão de genes próinflamatórios, contrabalanceando a supressão da resposta inflamatória ocasionada por aEPEC.

Genes	Expressão relativa (x HeLa)				Expressão relativa (x Δ <i>espFU</i>)		
	BA320	∆ <i>tir</i> +pTir _{Y-P}	ΔΔ+pTir _{Y-P}	∆espFU	BA320	∆ <i>tir</i> +pTir _{Y-P}	ΔΔ+pTir _{Y-P}
BIRC3	0,95	0,98	0,97	0,35	2,69	2,77	2,14
CCL20	5,58	3,18	1,99	0,62	8,94	5,10	3,18
CSF1	0,85	0,74	0,69	0,57	1,48	1,29	1,21
CXCL1	0,51	0,44	0,47	0,13	4,00	3,36	3,68
CXCL2	0,43	0,23	0,30	0,12	3,48	1,89	2,43
CXCR4	2,38	2,19	0,96	1,52	1,57	1,44	0,63
ICAM1	1,10	1,09	0,74	0,68	1,61	1,60	1,08
IL1A	1,99	2,19	0,86	0,69	2,87	3,16	1,24
IL6	0,77	0,46	0,47	0,19	4,00	2,38	2,43
IL8	1,38	1,42	0,61	0,21	6,45	6,68	2,83
IRAK2	0,93	0,99	0,47	0,47	1,97	2,08	1,72
LIF	1,17	0,98	0,81	0,69	1,69	1,41	1,17
NAMPT	1,43	1,48	1,07	1,04	1,38	1,42	1,03
NFKB1	0,98	0,95	0,84	0,66	1,47	1,43	1,27
NFKB2	0,95	0,80	0,60	0,48	1,97	1,67	1,27
NFKBIA	1,09	0,90	0,48	0,37	2,99	2,43	1,31
NFKBIE	0,82	0,91	0,61	0,36	2,30	2,55	1,71
PTGS2	2,38	1,91	0,86	0,91	2,62	2,10	0,95
TNFAIP3	1,29	0,91	0,57	0,55	2,33	1,64	1,02
TNFRSF10B	1,18	1,09	0,93	0,86	1,37	1,26	1,07
TXNIP	1,07	1,18	0,43	0,35	3,10	3,43	1,23

 Tabela 6 - Níveis de expressão de genes relacionados a processos imunes que foram diferencialmente modulados em resposta à formação de pedestais por aEPEC.

Para complementar os dados de RNA-seq, especialmente com relação aos genes pró-inflamatórios, a secreção de IL-8 no sobrenadante de células HeLa após infecção por 6 h foi avaliada, uma vez que a expressão desta citocina foi induzida em resposta a cepas formadoras de pedestais. Foi observado então que BA320 induziu a maior produção de IL-8 quando comparado às outras cepas, como também ao controle de células. No entanto, não houve diferenças significativas entre os níveis de IL-8 nos sobrenadantes de células HeLa infectadas por $\Delta tir+pTir_{Y-P}$ e

 $\Delta\Delta espFU:tir+pTir_{Y-P}$ em relação ao mutante $\Delta espFU$ (**Figura 54**). Estes dados indicam que, nas condições testadas, a produção de IL-8 não foi dependente da formação de pedestais, mas provavelmente relacionada aos níveis de adesão bacteriana que proporcionou uma maior exposição a outros possíveis indutores, tais como lipopolissacarídeo (LPS) e flagelina.





Células HeLa foram infectadas com as cepas bacterianas (MOI=10) por 6 h. Após a infecção, os sobrenadantes dos cultivos celulares foram coletados para quantificação da secreção de IL-8 por ELISA de captura. Os dados representam a média ± desvio padrão das replicatas biológicas (n=6) de dois experimentos independentes. A significância estatística foi determinada por análise de variância (ANOVA) em relação à BA320 (**, *P*<0,01; ***, *P*<0,001; ****, *P*<0,0001).

4.6.1 Análise das interações biológicas entre os genes diferencialmente expressos

A ferramenta IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*) foi utilizada para investigar possíveis interações biológicas entre os GDEs e identificar redes funcionais (vias de sinalização canônicas e genes reguladores) associadas com a formação de lesões A/E por aEPEC. Inicialmente, foram detectadas 175, 166 e 127 vias canônicas significativamente afetadas (*P*<0,05) após a infecção por BA320, Δtir +pTir_{Y-P} e $\Delta \Delta espFU:tir$ +pTir_{Y-P} em relação ao mutante $\Delta espFU$, respectivamente. A **Figura 55** mostra as 10 vias mais significativamente moduladas em cada comparação, ranqueadas de acordo com o valor de *P*, bem como o status de ativação com base no *Z*-score. Notavelmente, muitas destas vias foram relacionadas com processos infecciosos, resposta inflamatória e doenças imunológicas, algumas das quais foram comumente reguladas por todas as cepas formadoras de pedestais, destacando-se Sinalização via TNFR2. Por outro lado, algumas vias foram mais significativamente afetadas por cepas EspFU-positivas, como Sinalização via IL-6, Sinalização via CD-40 e Papel de IL-17A na artrite reumatoide, enquanto que Sinalização via HMGB1 e Regulação mediada por MIF da imunidade inata foram preferencialmente moduladas por cepas expressando TirY-P. Interessantemente, não foram observadas vias de sinalização para remodelamento de actina entre aquelas mais significativamente moduladas.

Por meio da ferramenta IPA também foi realizada a predição de reguladores potencialmente relacionados com as mudanças de expressão gênica reportadas em nossos dados. A **Tabela 5** demonstra os 10 reguladores mais significativamente ativados ou inibidos em cada comparação com base nos valores de *P* e *Z*-score. Estes reguladores incluíam especialmente fatores de transcrição e citocinas, muitos dos quais relacionados a processos imunes, o que de certa forma condiz com as vias canônicas mais significativamente afetadas na infecção por cepas formadoras de pedestais. O fator transcricional HIF1A foi o regulador mais significativamente afetado em todas as infecções, enquanto que outros foram compartilhados por apenas algumas cepas, como IL1A, TNF e NFkB, que foram preferencialmente ativados em células infectadas por BA320 e $\Delta tir+pTir_{Y-P}$. Notavelmente, muitos dos reguladores modulados na infecção por cepas espFU-positivas foram ativados, enquanto que células infectadas por $\Delta\Delta espFUtir+pTir_{Y-P}$ apresentaram uma inibição na expressão da maioria destes fatores de regulação.

Em conjunto, estes dados demonstram a modulação de genes e vias associadas com inflamação em resposta à formação de pedestais por aEPEC, especialmente mediada por EspFU.

Figura 55 - As dez vias canônicas mais significativamente moduladas em resposta aos diferentes mecanismos de formação de pedestais.







As vias de sinalização foram rangueadas em ordem de significância de acordo com os valores de P. O Z-score infere o status de ativação com base na expressão dos genes envolvidos em uma determinada via. Deste modo, valores de Z-score \geq 2 indicam vias ativadas, enquanto que Z-score \leq 2 prediz inibição. NaN indica que, embora significativamente modulada, não é possível predizer o status de ativação de uma via com base nos dados de expressão gênica.

Comparação	Regulador	Тіро	Z-score ^a	Р
BA320 x ΔespFU	HIF1A	Fator transcricional	5,146	1,72E-45
	IL1B	Citocina	5,191	4,16E-41
	TNF Citocina		6,251	5,20E-40
	NFkB Complexo		6,027	9,73E-40
	NFKBIA Fator transcricional		2,387	3,89E-36
	LPS Químico (droga)		6,252	7,74E-35
	TGFB1	Fator de crescimento	3,761	1,39E-33
	U0126 Químico (inibidor de quin		-4,072	1,77E-31
	EPAS1	Fator transcricional	3,033	2,02E-31
	PD98059	Químico (inibidor de quinase)	-4,537	3.26E-31
	HIF1A	Fator transcricional	4.669	6.78E-43
	TNF	Citocina	7.182	3.16E-42
	IL1B Citocina		6.321	1.10E-37
	NFkB Complexo		6.255	2.19E-36
∆ <i>tir</i> +pTir _{Y-P}	RELA Fator transcricional		4.679	1.85E-31
^ ∆espFU	LPS Químico (droga)		6,937	2,92E-31
	CD40LG Citocina		3,919	9,98E-31
	NFKBIA	Fator transcricional	2,545	2,40E-30
	PDGF BB	Complexo	4,689	1,13E-29
	poly rl:rC-RNA	Biológico (droga)	5,312	1,34E-27
	HIF1A	Fator transcricional	-4.340	8.13E-41
	EPAS1	Fator transcricional	-3.953	3.72E-29
	TGFB1	Fator de crescimento	-2.428	4.49E-26
	Deferoxamina	Químico (droga)	-3.658	4.92E-24
ΔΔ+pTir _{Y-P} x Δ <i>espFU</i>	NEDD9	Outro	-4,359	5,76E-20
	salirasib	Químico (droga)	3,883	1,70E-19
	EGFR	Quinase	-2,561	1,88E-16
	TGF-β	Grupo	-2,068	5,50E-16
	CREM	Fator transcricional	-2,001	1,95E-15
	NUPR1	Fator transcricional	-4,745	2,89E-15

Tabela 7 - Os dez reguladores mais significativamente ativados ou reprimidos em resposta aos diferentes mecanismos de formação de pedestais.

^a O valor de *Z*-score infere no status de ativação dos reguladores com base na expressão dos genes associados a determinada via. *Z*-score ≥ 2 indica ativação, enquanto que *Z*-score ≤ 2 prediz inibição destes reguladores.

5 DISCUSSÃO

aEPEC é um dos agentes bacterianos mais comuns em nosso meio, tendo substituído em frequência vários patógenos causadores de diarreia, principalmente em crianças (HERNANDES et al., 2009; HU; TORRES, 2015). Apesar da importância epidemiológica de aEPEC, alguns aspectos de sua patogênese ainda necessitam ser melhor explorados.

Neste estudo, investigamos a distribuição, produção e aspectos funcionais da proteína EspFU, de modo a avaliar mais detalhadamente seu papel na patogenicidade de aEPEC. Embora seja especialmente associado com grupos patogênicos de EHEC, incluindo cepas O157 e não-O157 (DE BOER et al. 2015), o gene espFU (tccP/tccP2) também tem sido detectado em EPEC típicas e atípicas isoladas de casos severos de doença (HAZEN et al., 2016). Nossos dados demonstraram uma alta prevalência (45,8%) de espFU em uma coleção de aEPEC isoladas de fezes diarreicas, com uma predominância do alelo tccP2 em relação a tccP. Frequências similares foram reportadas em cepas de AEEC isoladas de casos de diarreia (KOZUB-WITKOVSKI et al., 2008), animais (HORCAJO et al., 2012) e ambiente (MADIC et al., 2011). Interessantemente, um número considerável (33%) das aEPEC positivas neste estudo pertenciam aos sorogrupos O26, O55 e O111, que têm sido frequentemente reportados entre cepas de AEEC que apresentam os genes tccP e/ou tccP2 (GARMENDIA et al. 2005; HORCAJO et al., 2012; KOZUB-WITKOVSKI et al. 2007; MADIC et al. 2011; OGURA et al. 2007; OOKA et al. 2007). Além disso, a presença de espFU foi significativamente associada aos sorotipos O55:H7 e ONT:H19, que têm sido reportados em casos esporádicos e surtos de diarreia no Brasil (ABE et al., 2009; NUNES et al., 2003; PITONDO-SILVA et al., 2014; VIEIRA et al., 2016).

Os genes *tccP* e *tccP2* apresentam polimorfismos de tamanho, podendo variar de 600 a 1.800 pb, o que reflete no número de PRRs presentes nas proteínas codificadas (GARMENDIA et al., 2005). Tem sido demonstrado que a presença de ao menos dois PRRs é suficiente para a funcionalidade de EspFU (GARMENDIA et al., 2006). Levando isso em condireção, todas as cepas deste estudo poderiam codificar proteínas potencialmente funcionais, uma vez que portavam genes com três (750 pb) a nove (1.800 pb) PRRs.

Apesar da diversidade genética entre as cepas de aEPEC, determinadas linhagens podem compartilhar um repertório de virulência comum que inclui efetores codificados fora de LEE (HAZEN et al. 2013; INGLE et al. 2016b). De acordo com isso, observamos uma distribuição filogenética dos alelos *tccP* e *tccP2*, que foram significativamente associados aos filogrupos E e B1, respectivamente. Nossos achados indicam que estas cepas possivelmente apresentam um arcabouço genético que permite a aquisição e manutenção destes genes, conforme descrito para outros fatores de virulência (BANDO et al., 2009). No entanto, análises filogenômicas mais aprofundadas seriam necessárias para esclarecer esta hipótese.

Neste estudo, também avaliamos a produção de EspFU por diferentes cepas de aEPEC, aspecto ainda pouco abordado na literatura. Inicialmente, testamos diferentes meios de cultura e verificamos que a produção e secreção de TccP/TccP2 foi favorecida em DMEM, similar ao reportado para outras proteínas secretadas de EPEC como EspA e EspB (KENNY et al., 1997b; ROCHA et al., 2014). Estes achados também corroboram o fato que a expressão de *espFU* é ativada em cultivos realizados neste meio (GARMENDIA; FRANKEL, 2005; VISWANATHAN et al., 2004). Adotando o cultivo em DMEM como a condição mais favorável, observamos uma variação cepa-a-cepa na produção de TccP e TccP2, independente dos genótipos ou filogrupos. Estes resultados são de certa forma esperados, uma vez que cepas de EPEC geneticamente distintas, como as deste estudo, geralmente apresentam uma grande diversidade na expressão de uma série de fatores de virulência, inclusive proteínas efetoras (HAZEN et al., 2015; HAZEN et al., 2017b).

A ausência de produção de EspFU por algumas aEPEC nas condições testadas pode ser devido à presença de pseudogenes não-funcionais, especialmente entre as cepas *tccP2*-positivas, uma vez que nem todos os fragmentos de PCR foram sequenciados. No entanto, mesmo cepas contendo genes *espFU* intactos podem apresentar uma produção proteica ineficiente, conforme já demonstrado em EHEC (OGURA et al., 2007). Além disso, é importante ressaltar que mecanismos pós-transcricionais controlam a produção de EspFU (GRUBER; SPERANDIO, 2014). Deste modo, seria também de interesse avaliar a expressão de *tccP* e *tccP2* em cepas com diferentes níveis de produção de EspFU, além de analisar se a regulação destes genes ocorre de maneira similar em EHEC e aEPEC.

O gene *espFU* foi inicialmente descrito na cepa protótipo EDL933 e, consequentemente, a grande maioria das funções atribuídas a esta proteína foram

reportadas no contexto de EHEC O157:H7 (CAMPELLONE; ROBBINS; LEONG, 2004; GARMENDIA et al., 2004; VISWANATHAN et al., 2004), enquanto que os demais estudos funcionais foram conduzidos com cepas de tEPEC (WHALE et al., 2006; WHALE et al., 2007), aEPEC expressando a proteína EspFU de EHEC (BAI et al., 2008; ROCHA et al., 2011; VELLE; CAMPELLONE, 2017) ou até mesmo Citrobacter rodentium (GIRARD et al., 2009). Deste modo, para nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a analisar funcionalmente EspFU em uma cepa de aEPEC naturalmente positiva para este gene. Com esta finalidade foi selecionada a cepa BA320 (*E. coli* O55:H7) devido a alta prevalência do gene *espFU* entre aEPEC pertencentes a este sorotipo (GARMENDIA et al., 2005; KYLE et al., 2012). É postulado que uma cepa de *E. coli* O55:H7 tenha sido o ancestral comum de todos os clones de EHEC O157:H7 observados atualmente (ZHOU et al., 2010). Apesar desta alta similaridade, cepas de E. coli O55:H7 e O157:H7 ainda apresentam diferenças significativas em seus genomas, especialmente com relação ao repertório de proteínas efetoras (KYLE et al., 2012), o que possibilita a distinção entre os arcabouços genéticos de EHEC e aEPEC. Diante disso, o estudo de uma cepa de *E. coli* O55:H7 poderia ser representativo do papel de EspFU no âmbito de aEPEC.

Diferentemente de EspFU da cepa EDL933, que contém seis resíduos repetidos completos e o início de um sétimo (GARMENDIA et al., 2004), o gene de BA320 apresentou 873 pb, codificando uma proteína com 4 resíduos repetidos completos e o início de um quinto, que curiosamente tem sido o tamanho mais comumente observado entre cepas de aEPEC (GARMENDIA et al., 2005).

Para uma análise mais aprofundada do papel desta proteína, foi realizada a deleção do gene *espFU* em BA320, que resultou na diminuição significativa do número de bactérias aderidas e afetou a capacidade desta cepa em induzir a polimerização de actina e formação de pedestais em células HeLa após 6 h de infecção, sendo estas propriedades restabelecidas após a complementação com um plasmídeo expressando EspFU_{BA320}-Myc. Corroborando estes dados, cepas de tEPEC O111:H- (WHALE et al., 2007) e EHEC O157:H7 (BATTLE et al., 2014) mutadas em *espFU* foram menos aderentes e não induziram eficientemente o acúmulo de actina em células epiteliais. Do mesmo modo, a introdução de um plasmídeo expressando EspFU em uma cepa não aderente de aEPEC resultou na aderência e formação de pedestais em células HeLa (ROCHA et al., 2011). Muito

possivelmente, a maior adesão da cepa BA320 seja um efeito decorrente da formação de pedestais mediada por EspFU, uma vez que a polimerização de actina poderia levar a alterações estruturais que promoveriam um contato mais estável entre a bactéria e a célula hospedeira, conforme demonstrado em outros estudos (BATTLE et al., 2014; CHEN et al., 2014). Além disso, os pedestais formados via EspFU permitem que a bactéria aderida mova-se através do epitélio em um mecanismo de motilidade mediado por actina, possibilitando a transmissão para células vizinhas e aumentando a área de adesão (VELLE; CAMPELLONE, 2017).

Apesar da importância de EspFU na interação com células epiteliais, não há um consenso na literatura sobre a contribuição deste efetor na colonização intestinal, conforme demonstrado por meio de diversos modelos de infecção *in vivo* e *ex vivo*. Especificamente, EspFU foi demonstrada ser importante na colonização intestinal por EHEC em coelhos recém-nascidos e leitões axênicos (RITCHIE et al., 2008), além de aumentar a aderência de aEPEC O125:H6 a biópsias de intestino humano *in vitro* (BAI et al., 2008). Em contraste, nenhum papel foi atribuído a EspFU na colonização intestinal de bezerros e cordeiros por EHEC O157:H7 (VLISIDOU et al., 2006) ou de camundongos com *C. rodentium* produzindo esta proteína (GIRARD et al., 2009). A disparidade entre estes resultados pode ser atribuída à utilização de diferentes cepas como também à variabilidade dos modelos animais testados.

O tratamento com antibióticos tem sido empregado com sucesso no estudo *in vivo* da interação de *E. coli* patogênicas com a mucosa intestinal por eliminar ou reduzir a microbiota competitiva e deste modo facilitar a colonização (HARRINGTON et al., 2009; MOHAWK; O'BRIEN, 2011; ROYAN et al., 2010). Este procedimento é particularmente importante na medida em que camundongos adultos podem ser resistentes à colonização por EPEC (DUPONT et al., 2016), embora certamente traga limitações a este modelo, já que a composição da microbiota pode impactar a homeostasia do trato intestinal e, consequentemente, a susceptibilidade e progressão da doença (CURTIS et al., 2014).

Neste estudo, utilizamos o modelo de camundongos tratados com estreptomicina para avaliar o papel de EspFU na colonização intestinal, observando que tanto a cepa selvagem quanto o mutante em *espFU* colonizaram eficientemente o trato intestinal destes animais, sem no entanto promover sinais clínicos, o que indica diferenças na patofisiologia do desenvolvimento de diarreia entre humanos e murinos. O fato de aEPEC estabelecer colonização independentemente da

polimerização de actina corrobora outros achados em que cepas negativas nos ensaios de FAS foram capazes de aderir eficientemente à mucosa intestinal e até mesmo formar lesões A/E *ex vivo* e *in vivo*, reforçando que resultados obtidos em culturas de células devem ser considerados com cautela como estimativa de patogenicidade (BAI et al., 2008; KNUTTON et al., 2001; SCHULLER et al., 2007; VLISIDOU et al., 2006). Nestes casos, a interação intimina-Tir poderia mediar o estabelecimento da colonização intestinal independentemente de uma potente polimerização de actina.

No entanto, é importante notar que em nosso modelo a infecção pelo mutante em espFU resultou em uma menor carga bacteriana quando comparado à cepa selvagem, especialmente nos estágios tardios de colonização. Estes dados estão de acordo com aqueles obtidos por Ritchie et al. (2008), que demonstraram um aumento na colonização do cólon de coelhos recém-nascidos por EHEC O157:H7 a partir do 7º dia pós-infecção frente ao mutante isogênico em espFU. Em conjunto, estes achados sugerem que EspFU não é essencial para o estabelecimento da colonização, mas pode aumentar sua eficiência por meio da formação de pedestais e expansão da bactéria no trato intestinal, embora estudos futuros sejam necessários para comprovar esta hipótese, já que não determinamos experimentalmente a presença de lesões A/E no epitélio murino. Outro ponto a ressaltar é que não foi possível confirmar os dados de colonização com a cepa complementada (AespFU+pEspFU), possivelmente devido à instabilidade ou perda do plasmídeo in vivo, conforme reportado previamente para complementações de tir e espFU (GIRARD et al., 2009; MALLICK et al., 2014). De fato, o cultivo da cepa complementada deste estudo (Δ espFU+pEspFU) em ágar MacConkey sumplementado com estreptomicina resultou em um número maior de colônias comparado ao crescimento em meio com estreptomicina e kanamicina, indicando a perda do plasmídeo por parte das bactérias.

A formação de lesões A/E, tido como o mecanismo central da patogênese de aEPEC, é um processo dinâmico que requer uma expressão coordenada da maquinaria de virulência bacteriana (GRUBER; SPERANDIO, 2014). Neste estudo, comparamos a dinâmica da formação de pedestais por cepas de aEPEC que utilizam diferentes mecanismos moleculares para induzir o rearranjo do citoesqueleto. Visando manter o mesmo repertório de virulência, construímos as diferentes cepas de aEPEC utilizando o arcabouço genético de BA320, cujo Tir não

é fosforilado e, portanto, utiliza a via de EspFU como o único mecanismo molecular para induzir polimerização de actina (ROCHA et al., 2011). Mutações não-polares em *espFU* e *tir* gerarem construções com o repertório genético necessário para empregar a via de fosforilação de Tir de maneira exclusiva (ΔΔespFU:tir+pTir_{Y-P}) ou em conjunto com EspFU (Δtir+pTir_{Y-P}), além de uma cepa deficiente em ambos os mecanismos moleculares (ΔespFU). Estas cepas foram então comparadas com relação à capacidade de aderir e formar pedestais durante o curso da infecção, utilizando um tempo de incubação mínimo de 3 h, visto que a indução de lesões A/E é atrasada em aEPEC quando comparado a tEPEC (BUERIS et al., 2015).

Interessantemente, as cepas que expressaram TirY-P apresentaram níveis menores de aderência em relação a BA320, mesmo visto que tinham um arcabouço genético similar, possivelmente devido a uma menor afinidade no reconhecimento da intimina gama de BA320 pelo Tir de E2348/69, cepa que apresenta intimina do subtipo alfa. Para reduzir esta incompatibilidade alélica, tentamos construir uma quimera, substituindo uma região da porção C-terminal do Tir de BA320 por uma sequência com 18 aminoácidos oriunda do Tir de E2348/69 que continha o resíduo Y474 (CAMPELLONE et al., 2002; DE VINNEY et al., 2001). Infelizmente, não obtivemos sucesso nestas tentativas devido à complexidade experimental envolvida.

Os ensaios quantitativos indicaram que a menor aderência pode ter comprometido a habilidade em induzir polimerização de actina, já que a cepa que utiliza exclusivamente a via dependente de TirY-P formou o menor número de pedestais após 3 e 4,5 h de infecção. Visando complementar estes achados, utilizamos uma linhagem de células HeLa transfectadas com o peptídeo Lifeact fusionado a GFP (RIEDL et al., 2008) de modo a visualizar em tempo real o citoesqueleto de actina durante a infecção por meio da marcação fluorescente (GRUBER; SPERANDIO, 2014). De fato, foi possível observar um atraso na formação de pedestais por esta cepa. Considerando que existe uma correlação entre os níveis de adesão bacteriana e translocação de efetores pelo SST3 codificado por LEE (BATTLE et al., 2014), é possível especular que a cepa menos aderente tenha translocado um nível menor de efetores para a célula hospedeira, levando a um atraso na indução de polimerização de actina. Já as outras duas cepas, que apresentaram uma maior adesão mediada por EspFU, muito provavelmente translocaram mais efetores e, deste modo, aceleraram a formação de pedestais. Resultados similares foram reportados por Bueris et al. (2015), onde a introdução de um plasmídeo expressando o regulador Per em aEPEC levou a uma expressão mais rápida e acentuada de LEE, culminando em níveis maiores de proteínas produzidas durante a infecção e, desta forma, acelerando a formação de pedestais.

Curiosamente, não foram observadas diferenças significativas com relação ao número de pedestais formados por nossas cepas nos estágios tardios de infecção (após 6 h). Uma possível explicação para este fato é o fenômeno de autoinibição da translocação e formação de pedestais (MILLS et al., 2008), de acordo com o qual todas as células receberiam quantidades semelhantes de efetores, evitando uma atividade citotóxica devido à possível sobredosagem destas proteínas. Considerando este processo, as cepas que expressam EspFU, por ser mais aderentes, translocariam mais efetores e atingiriam o estado de autoinibição mais cedo que a aEPEC com menor adesão, possibilitando a equiparação do número de pedestais formados nos estágios mais tardios. No entanto, seria necessário quantificar o nível de translocação de efetores por estas cepas para comprovar esta hipótese.

Também é notável que os pedestais formados pelas cepas que expressaram TirY-P foram aparentemente maiores que aqueles produzidos via EspFU, o que pode indicar diferenças na composição ou dinâmica da formação destas estruturas ricas em actina em resposta aos mecanismos empregados, conforme previamente demonstrado (GOOSNEY et al., 2001; LAW et al., 2015; SHANER et al., 2005).

Patógenos A/E têm desenvolvido mecanismos complexos para induzir a polimerização de actina nas células hospedeiras, todos os quais dependem das características do receptor Tir destas cepas (LAI et al., 2013). Embora diferentes, tanto o Tir de EPEC (E2348/69) quanto o de EHEC (EDL933) podem desencadear uma via canônica comum, porém menos eficiente de polimerização de actina, a qual dependente da fosforilação dos resíduos Y454 e Y458, respectivamente (BRADY et al., 2007). Isto explica o fato da mutação do gene *espFU* em BA320 não abolir completamente a formação de pedestais, embora tenha reduzido consideravelmente esta atividade.

Diferentemente do mutante em *espFU*, as demais cepas apresentaram mecanismos robustos de polimerização de actina, cada qual com características peculiares. Enquanto que a fosforilação de Y474 poderia ser uma maneira mais eficiente de induzir polimerização de actina, uma vez que as cepas expressando

TirY-P apresentaram menor adesão mas produziram pedestais similarmente a BA320, a formação de pedestais mediada por EspFU poderia promover uma maior adesão bacteriana às células epiteliais. Desta forma, pode-se especular que a combinação de ambos mecanismos moleculares de indução de polimerização de actina na mesma cepa poderia ser de particular interesse, especialmente em um modelo de infecção *in vivo*. Este achado é consistente com a predominância do TirY-P em cepas de aEPEC positivas para *espFU*, conforme reportado neste e em outros estudos (KOZUB-WITKOVSKI et al., 2008; MARTINS et al., 2017; OOKA et al, 2007).

Adesão à célula do hospedeiro pode regular consideravelmente a transcrição de genes de virulência em patógenos A/E (ALSHARIF et al., 2015; KATSOWICH et al., 2017), em especial da região LEE, cuja expressão obedece uma ordem coordenada e hierárquica de modo a promover a produção das proteínas envolvidas nas diferentes etapas da infecção, como adesão inicial, a montagem do SST3 e a translocação dos efetores (BUERIS et al., 2015; DAHAN et al., 2004; LEVERTON; KAPER, 2005; ROCHA et al., 2011; SHAULOV et al., 2017; YERUSHALMI et al., 2014).

A expressão temporal de LEE durante o curso da infecção também foi avaliada a fim de correlacionar com a dinâmica de formação de lesões A/E por cepas de aEPEC que empregam mecanismos moleculares distintos para esta atividade. Curiosamente, verificamos que a transcrição de LEE1 (*ler*) foi consistentemente diminuída ao longo do curso da infecção em todas as cepas, sugerindo que o regulador Ler poderia ser necessário apenas nos estágios iniciais. De fato, o contato inicial com a célula hospedeira induz a expressão de Ler, ativando a transcrição dos demais *operons* de LEE (ALSHARIF et al., 2015), após o qual os níveis transcricionais de *ler* diminuem drasticamente em virtude do estabelecimento do processo de infecção (LEVERTON; KAPER, 2005).

A transcrição dos demais *operons* de LEE variaram de acordo com os níveis de adesão e formação de pedestais. Especificamente, nas aEPEC que expressaram EspFU (mais aderentes) a expressão dos demais *operons* foi praticamente constante, com exceção de LEE4 na cepa que também produzia TirY-P, cuja transcrição foi aumentada nos estágios tardios de infecção. Já as cepas que não expressaram EspFU (menos aderentes) mostraram um aumento contínuo na transcrição dos demais operons de LEE. Nossas análises indicam que mecanismos

independentes de Ler também poderiam estar regulando LEE (BHATT et al., 2016; FRANZIN; SIRCILI, 2015), conforme evidenciado pelo aumento nos níveis transcricionais de LEE2 a LEE5 mesmo diante da repressão da expressão de *ler* durante o curso da infecção.

A comparação entre as cepas mostrou que o mutante em espFU, que não induz polimerização de actina, apresentou consistentemente os maiores níveis de expressão, enquanto que a maioria dos operons foram menos transcritos na cepa selvagem. Visto que LEE codifica proteínas envolvidas nos estágios iniciais de adesão, pode-se especular que o acúmulo de actina levaria a uma modulação da expressão desta ilha de patogenicidade por meio de uma alça de retroalimentação (feedback) negativa (KATSOWICH et al., 2017). Novamente, o fenômeno da autoinibição poderia explicar esta hipótese, onde a expressão de LEE não seria mais necessária uma vez que os pedestais já estivessem estabelecidos. Um mecanismo similar tem sido descrito para a ilha de patogenicidade de Salmonella (SP-1), cujos genes são fortemente reprimidos após a invasão celular (ERIKSSON et al., 2003). Adicionalmente, tem sido demonstrado que o SST3 pode detectar o contato com a célula hospedeira, disparando um circuito regulatório que reprime a produção de translocadores necessários para a montagem do sistema e ativa a secreção de proteínas efetoras. Considerando esta hipótese, quanto mais aderente a cepa, maior seria esta resposta regulatória, o que poderia explicar a repressão mais significativa da expressão de LEE em aEPEC que produziram EspFU.

A infecção das células hospedeiras por microrganismos patogênicos é frequentemente acompanhada por mudanças marcantes na expressão gênica (HUMPHRYS et al., 2013; JENNER; YOUNG, 2005). Deste modo, análises transcriptômicas podem fornecer informações valiosas sobre as interações entre bactérias e o hospedeiro, como também a respeito dos processos que culminam em doença, incluindo as infecções por *E. coli* patogênicas (HE et al., 2013; KARVE et al., 2017; KIECKENS et al., 2016; KIM et al., 2009; YANG et al., 2016).

Neste estudo, aplicamos a tecnologia do RNA-seq para avaliar a resposta transcricional epitelial às infecções por cepas de aEPEC que utilizam diferentes mecanismos moleculares para formar lesões A/E. A análise dos genes diferencialmente expressos demonstrou que muitos destes estavam relacionados com resposta a estímulos externos (estresse), consistindo em mecanismos protetores e de sobrevivência do hospedeiro frente à infecção. Um exemplo disso é

a expressão diferencial do gene ADM, que codifica a adrenomedulina, um peptídeo antimicrobiano expresso por macrófagos durante a inflamação e sepse (WONG; CHEUNG, 2015), e também produzido por células epiteliais intestinais em resposta a enteropatógenos (ALLAKER; KAPAS, 2003). Interessantemente, ADM foi significativamente induzido durante a infecção sintomática por ETEC (YANG et al., 2016) e também tem sido expresso em células epiteliais infectadas com EHEC (KIM et al., 2009). Deste modo, ADM pode ser considerado um marcador global da resposta antimicrobiana do hospedeiro, inclusive frente à aEPEC.

Nossos dados também mostram que a transcrição de muitos genes envolvidos com processos imunes foi significativamente alterada. Estes genes constituíam citocinas pró-inflamatórias (ILIA, IL6, IL8 e CSF1), quimiocinas (CXCL1, CXCL2 e CCL20), pró (TNFRSF10B) e anti-apoptóticos (BIRC2 e BIRC3), prostaglandinas (PTGS2), fatores de transcrição (NFKB1 e NFKB2), quinases (IRAK2 e MAP2K6), fosfatases (DUSP1), moléculas relacionadas com ativação de linfócitos (CD83) e adesão celular (ICAM1), além de genes que limitam a resposta imune (NFKBIA, NFKBIE, TNFAIP3 e TNIP1), entre outros. Interessantemente, tem sido demonstrado que a expressão da maioria destes genes é modulada em diversos tipos de células expostas a uma variedade de patógenos e compõe parte da assinatura designada "resposta comum do hospedeiro" a processos infecciosos (JENNER; YOUNG, 2005).

Os genes BIRC3, CXCL1 e IL8 foram comumente induzidos pelas três diferentes vias de polimerização, indicando que podem ser ativados em resposta à formação de pedestais, independentemente do mecanismo molecular empregado. IL-8 e a CXCL1 são quimioatraentes para neutrófilos e monócitos, desempenhando um importante papel na iniciação de respostas inflamatórias frente à infecção por patógenos A/E (CREPIN et al., 2015; SABHARWAL et al., 2016), o que corrobora nossos achados. A dosagem de IL-8 no sobrenadante das células HeLa após infecção por aEPEC revelou que, embora BA320 tenha induzido os maiores níveis de secreção de IL-8, não foram observadas diferenças significativas entre as células infectadas pelas outras duas cepas formadoras de pedestais quando comparado ao mutante *espFU*, indicando que a formação de pedestais não foi o principal mecanismo indutor nas condições testadas. Sabe-se que a flagelina de EPEC induz a secreção de IL-8 por meio da ativação de receptor *Toll-like* 5 (TLR5) (SAMPAIO et al., 2009; ZHOU et al., 2003). Deste modo, pode-se especular que nossos dados de

secreção de IL-8 possam estar mais associados aos níveis de adesão das cepas (infecção aguda), uma vez que bactérias mais aderentes poderiam levar a uma maior exposição a antígenos microbianos, como a flagelina, que poderiam ativar TLR5. Para avaliar o impacto dos pedestais na produção desta citocina, talvez fosse necessário um delineamento experimental diferente de modo a minimizar os efeitos pró-inflamatório de antígenos do envoltório bacteriano, especialmente a flagelina (KHAN et al., 2008).

Muitos genes relacionados com processos imunes foram especificamente modulados em resposta às vias de polimerização mediada por EspFU, dentre os quais NFKB1, NFKB2 e ERG1. Os fatores de transcrição NF-κB e Erg-1 são ativados em resposta à estimulação epitelial promovida por patógenos A/E e podem controlar a expressão de moléculas importantes para a progressão da doença (DE GRADO et al., 2001; SAVKOVIC et al., 1997). Possivelmente a formação de pedestais mediada por EspFU, ou a maior adesão decorrente desta, seja um mecanismo ativador mais potente que a via de polimerização de actina disparada pela fosforilação de Tir.

A identificação de interações gênicas pela ferramenta IPA revelou uma modulação significativa de vias canônicas associadas à resposta imune inata, o que corrobora o enriquecimento de genes pró-inflamatórios em nossos dados de transcriptoma. A via de sinalização mediada pelos receptores TNF (TNFR1 e TNFR2), que constitui o principal mecanismo extrínseco de indução de apoptose (IGNEY; KRAMER, 2002), foi comumente regulada em resposta aos diferentes mecanismos de polimerização de actina, sugerindo que possa ocorrer uma modulação das respostas que levam à morte celular em decorrência da formação de pedestais por aEPEC. Por outro lado, algumas vias foram especificamente moduladas em resposta aos pedestais formados mediante EspFU, como por exemplo a sinalização de IL-6. Corroborando este achado, o gene IL6 foi significativamente induzido em células infectadas por cepas EspFU-positivas.

Embora o mecanismo central da patogenicidade de aEPEC seja a formação de lesões A/E, surpreendentemente nenhuma via de sinalização do citoesqueleto de actina foi significativamente alterada em nossos dados. Possivelmente, a formação de pedestais não induza alterações relevantes em termos de expressão gênica dos fatores envolvidos com a dinâmica do citoesqueleto de actina. Em contraste, muitas proteínas ligadoras de actina foram identificadas na análise do proteoma de células epiteliais infectadas por EPEC (HARDWIDGE et al., 2004). A ferramenta IPA também possibilitou a predição dos reguladores transcricionais que poderiam ser responsáveis pelas alterações de expressão gênica observadas durante a infecção por aEPEC. O fator indutor de hipóxia (HIF1A) foi o regulador mais significativamente alterado em resposta à formação de pedestais. De fato, tem sido demonstrado que HIF pode desempenhar um papel imunomodulatório em resposta à infecção por patógenos bacterianos, inclusive *E. coli* patogênicas (LIN et al., 2015). No entanto, cabe ressaltar que o fenômeno de hipóxia é um importante regulador da resposta transcricional de células tumorais, inclusive HeLa (LANDRY et al., 2013). Portanto, não se pode descartar a possibilidade que parte da regulação de HIF1A observada em nossos dados seja devido à resposta basal da linhagem celular HeLa.

Outros reguladores transcricionais significamente modulados foram as citocinas pró-inflamatórias TNFA e IL1B, principalmente ativados em resposta à infecção por cepas EspFU-positivas. A forte ativação de TNFA pode correlacionar com a modulação significativa da via dos receptores de morte TNFR1 e TNFR2. Estas citocinas podem ativar a expressão de outros fatores pró-inflamatórios, como IL-6, por exemplo, o que poderia explicar a ativação da via de sinalização de IL-6 em resposta à infecção por cepas EspFU-positivas.

Em conjunto, as análises transcriptômicas revelam que a formação de pedestais por aEPEC, especialmente na presença de EspFU, pode induzir uma resposta inflamatória. Corroborando nossos achados, uma série de modelos de infecção *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado a capacidade de patógenos A/E em ativar NF- κ B e induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias, especialmente IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α (ALIPOUR et al., 2013; DANN et al., 2008; GIRARD et al., 2005; GONÇALVES et al., 2001; SALAZAR-GONZALEZ; NAVARRO-GARCIA, 2010; SANCHEZ-VILLAMIL; NAVARRO-GARCIA, 2015).

No entanto, EPEC, EHEC e *C. rodentium* também podem atenuar a resposta inflamatória ativada pelo dano ao epitélio ou exposição a antígenos bacterianos, estabelecendo um nicho propício para colonização do hospedeiro. Esta atividade anti-inflamatória é mediada pelo SST3 e está associada com a aquisição de efetores codificados fora da região LEE, cujo papel principal é interferir com as vias de ativação de NF-κB e do inflamassoma (HAUF; CHAKRABORTY, 2003; LITVAK et al., 2017; PALLETT et al., 2017; POLLOCK et al., 2017; YEN; SUGIMOTO; TOBE, 2015; YEN, KARINO, TOBE, 2016).

Interessantemente, nossas análises sugerem que este perfil de resposta também possa ocorrer durante a infecção por aEPEC, evidenciado pela forte repressão da maioria dos genes pró-inflamatórios em células infectadas pelo mutante em *espFU* quando comparado ao controle (HeLa não-infectada). Desta forma, a somatória das respostas supressoras e indutoras sugere que o nível de inflamação decorrente da infecção por aEPEC seria algo bem próximo ao estado de homeostasia do hospedeiro, visto que a expressão dos genes pró-inflamatórios foi praticamente igual em HeLa e nas células infectadas por cepas formadoras de pedestal (SHARMA et al., 2008; ZHUANG et al., 2017). A capacidade de aEPEC em poder modular a resposta inflamatória do hospedeiro pode explicar, em parte, a ocorrência de infecções assintomáticas ou mesmo casos de diarreia persistente em humanos (AFSET et al., 2004; FERNANDES et al., 2014; NUNES et al., 2012). De fato, mutantes de *C. rodentium* que não suprimem a resposta inflamatória apresentaram uma menor eficiência de colonização em relação à cepa selvagem em um modelo murino (ROYAN et al., 2010).

Coletivamente, os dados de caracterização fenotípica e análises transcriptômicas sugerem que a interação aEPEC-célula hospedeira resulta em uma rede complexa de mecanismos regulatórios, modulada pela adesão bacteriana e capacidade em formar pedestais (**Figura 56**). Especificamente, a interação bacteriana com o epitélio resulta na adesão íntima e formação de pedestais, que leva a uma repressão da região LEE e ativa a expressão de genes pró-inflamatórios e vias de sinalização da resposta imune inata. Por outro lado, na ausência de pedestais, LEE é continuamente expresso devido à ausência do *feedback* negativo, enquanto os genes pró-inflamatórios são reprimidos, havendo um predomínio da resposta anti-inflamatória. Neste contexto, EspFU promoveria uma maior adesão bacteriana, resultando em uma maior ativação da resposta inflamatória.



Figura 56 - Modelo proposto de comunicação patógeno-hospedeiro durante a infecção de células epiteliais por aEPEC.

6 CONCLUSÕES

Em conjunto, os resultados obtidos neste estudo permite-nos concluir que:

- Os genes que codificam EspFU (*tccP* e *tccP2*) são ampla e filogeneticamente distribuídos entre cepas de aEPEC;
- II. Ocorre uma produção in vitro diferencial de EspFU (TccP/TccP2) em aEPEC;
- III. EspFU contribui para a patogenicidade de aEPEC, uma vez que desempenha um importante papel na adesão bacteriana, formação de pedestais e colonização intestinal;
- IV. A dinâmica da formação de lesões A/E depende dos mecanismos moleculares empregados para polimerização de actina, podendo afetar tanto a resposta transcricional do patógeno quanto do hospedeiro;
- V. A adesão bacteriana e capacidade de formar pedestais induz a expressão de genes pró-inflamatórios, em especial quando mediada por EspFU.
- VI. EspFU pode estar direta ou indiretamente relacionada com a ativação da resposta inflamatória decorrente da infecção por aEPEC, uma atividade até então desconhecida.

REFERENCIAS*

ABE, C. M; BLANCO, M; DHABI, G; BLANCO, J. E; BLANCO, J; FRANZOLIN, M. R; TADDEI; C. R.; PIAZZA; R. M. F.; MARTINEZ, M. B.; ELIAS, W. P. Virulence features of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* identified by the *eae*(+) EAF-negative *stx*(-) genetic profile **Diagn. 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.; ABE, C. M.; NUNES, K. O.; MORAES, C. T.; CHAVEZ-DUENAS, L.; NAVARRO-GARCIA, F.; BARBOSA, A. S.; PIAZZA, R. M.; ELIAS, W. P. The serine protease Pic as a virulence factor of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Gut Microbes.**, v. 7, p. 115-125, 2016.

AFSET, J. E.; BEVANGER, L.; ROMUNDSTAD, P.; BERGH, K. Association of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with prolonged diarrhoea. J. Med. Microbiol., v. 53, p. 1137-1144, 2004.

AFSET, J. E.; BRUANT, G. BROUSSEAU, R.; HAREL, J.; ANDERSSEN, 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.

AITIO, O.; HELLMAN, M.; SKEHAN, B.; KESTI, T.; LEONG, J. M.; SAKSELA, K.; PERMI, P. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* exploits a tryptophan switch to hijack host f-actin assembly. **Structure.**, v. 20, p. 1692-1703. 2012.

ALIPOUR, M.; LOU, Y.; ZIMMERMAN, D.; BORDING-JORGENSEN, M. W.; SERGI, C.; LIU, J. J.; WINE, E. A balanced IL-1beta activity is required for host response to Citrobacter rodentium infection. **PLoS One.**, v. 8, p. e80656, 2013.

ALLAKER, R.P; KAPAS, S. Adrenomedullin expression by gastric epithelial cells in response to infection. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 10, p. 546-551, 2003.

ALSHARIF, G; AHMAD, S; ISLAM, M. S; SHAH, R; BUSBY, S. J; KRACHLER, A. M. Host attachment and fluid shear are integrated into a mechanical signal regulating virulence in Escherichia coli O157:H7. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 112, p. 5503-5508, 2015.

ALLEN-VERCOE, E.; WADDELL, B.; TOH, M. C.; DEVINNEY, R. Amino acid residues within enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Tir involved in phosphorylation, alpha-actinin recruitment, and Nck-independent pedestal formation. **Infect. Immun.** v. 74, p. 6196-205, 2006.

ALONSO, M. Z.; SANZ, M. E.; IRINO, K.; KRUGER, A.; LUCCHESI, P. M.; PADOLA, N. L. Isolation of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* from chicken and chicken-derived products. **Br Poult Sci.**, v. 57, p. 161-164, 2016.

ALVAREZ-SUAREZ, M. E.; OTERO, A.; GARCIA-LOPEZ, M. L.; DAHBI, G.; BLANCO, M.; MORA, A.; BLANCO, J.; SANTOS, J. A. Genetic characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolates from goat's milk and goat farm environment. **Int J Food Microbiol.**, v. 236, p. 148-154, 2016.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Current Protocols in Molecular Biology**, New York: Wiley Interscience, 1987.

BAI, L.; SCHÜLLER, S.; WHALE, N. A; MOUSNIER, A.; MARCHES, O.; WANG, L.; OOKA, T.; HEUSCHKEL, R.; TORRENTE, F.; KAPER, J. B.; GOMES, T. A. T.; XU, J.; PHILLIPS, A. D.; FRANKEL, G. Enteropathogenic *Escherichia coli* O125:H6 triggers attaching and effacing lesions on human intestinal biopsy specimens independently of Nck and TccP/TccP2. **Infect. Immun.**, v. 76, p. 361-368, 2008.

^{*}De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14724**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2011.

BANDO, S. Y.; ANDRADE, F. B.; GUTH, B. E. C.; 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.

BARUCH, K.; GUR-ARIE, L.; NADLER, C.; KOBY, S.; YERUSHALMI, G.; BEN-NERIAH, Y.; YOGEV, O.; SHAULIAN, E.; GUTTMAN, C.; ZARIVACH, R.; ROSENSHINE, I. Metalloprotease type III effectors that specifically cleave JNK and NF-kappaB. **Embo J.**, v. 30, p. 221-231, 2011.

BATTLE, S. E.; BRADY, M. J.; VANAJA, S. K.; LEONG, J. M.; HECHT, G. A. Actin pedestal formation by enterohemorrhagic *Escherichia coli* enhances bacterial host cell attachment and concomitant type III translocation. **Infect. Immun.**, v. 82, p. 3713-3722, 2014.

BERALDO, L. G.; BORGES, C. A.; MALUTA, R. P.; CARDOZO, M. V.; RIGOBELO, E. C.; DE AVILA, F. A. Detection of Shiga toxigenic (STEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* in dairy buffalo. **Vet. Microbiol.**, v. 170, p. 162-6, 2014.

BHATT, S.; EGAN, M.; JENKINS, V.; MUCHE, S.; EL-FENEJ, J. The Tip of the Iceberg: On the Roles of Regulatory Small RNAs in the Virulence of Enterohemorrhagic and Enteropathogenic *Escherichia coli*. Front. Cell. Infect. Microbiol., v. 6, p. 105, 2016.

BIELASZEWSKA, M.; PRAGER, R.; KÖCK, R.; MELLMANN, A.; ZHANG, W.; TSCHÄPE, H.; TARR, P. I.; KARCH, H. Shiga toxin gene loss and transfer in vitro and in vivo during enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 infection in humans. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 73, p. 3144-3150, 2007.

BOLTON, D. J.; ENNIS, C.; MCDOWELL, D. Occurrence, virulence genes and antibiotic resistance of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from twelve bovine farms in the north-east of Ireland. **Zoonoses Public Health.,** v. 61, p. 149-156, 2014.

BRADY, M. J.; CAMPELLONE, K. G.; GHILDIYAL, M.; LEONG, J. M. Enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* Tir proteins trigger a common Nck-independent actin assembly pathway. **Cell. Microbiol.**, v. 9, p. 2242-2253, 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.

CAMPELLONE, K. G. Cytoskeleton-modulating effectors of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: Tir, EspFU and actin pedestal assembly. **Febs J.**, v. 277, p. 2390-2402, 2010.

CAMPELLONE, K. G.; GIESE, A.; TIPPER, D. J.; LEONG, J. M. A tyrosine-phosphorylated 12amino-acid sequence of enteropathogenic *Escherichia coli* Tir binds the host adaptor protein Nck and is required for Nck localization to actin pedestals. **Mol. Microbiol**., v. 43, p. 1227-1241, 2002.

CAMPELLONE, K. G.; ROBBINS. R.; LEONG, J. M. EspFu is a translocated EHEC effector that interacts with Tir and N/WASP and promotes Nck-independent actin assembly. **Dev**. **Cell.**, v.7, p. 217-228, 2004.

CAMPELLONE, K. G.; LEONG, J. M. Nck-independent actin assembly is mediated by two phosphorylated tyrosines within enteropathogenic *Escherichia coli* Tir. **Mol. Microbiol.**, v. 56, n. 2, p. 416-432, 2005.

CAMPELLONE, K. G.; CHENG, H. C.; ROBBINS, D.; SIRIPALA, A. D.; MCGHIE, E. J.; HAYWARD, R. D.; WELCH, M. D.; ROSEN, M. K.; KORONAKIS, V.; LEONG, J. M. Repetitive N-WASP-binding elements of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* effector EspF(U) synergistically activate actin assembly. **PLoS Pathog.**, v. 4, p. e1000191, 2008.

CHANG, A. C.; COHEN, S. N. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. **J. Bacteriol.**, v. 134, p. 1141-1156, 1978.

CHEN, Y. Q.; SU, P. T.; CHEN, Y. H.; WEI, M. T.; HUANG, C. H.; OSTERDAY, K.; DEL ALAMO, J. C.; SYU, W. J.; CHIOU, A. The effect of enterohemorrhagic *E. coli* infection on the cell mechanics of host cells. **PLoS One.**, v. 9, p. e112137, 2014

CHENG, H. C.; SKEHAN, B. M.; CAMPELLONE, K. G.; LEONG, J. M.; ROSEN, M. K. Structural mechanism of WASP activation by the enterohaemorrhagic *E. coli* effector EspF(U). **Nature**, v. 454, p. 1009-1113. 2008.

CLARKE, S. C.; HAIGH, R. D.; FREESTONE, P., P.; WILLIAMS, P. H. Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. **Clin. Microbiol. Rev**., v. 16, p. 365-378, 2003.

CLERMONT, O.; CHRISTENSON, J. K.; DENAMUR, E.; GORDON, D. M. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environ. Microbiol. Rep.**, v. 5, p. 58-65, 2013.

COMERY, R.; THANABALASURIAR, A.; GARNEAU, P.; PORTT, A.; BOERLIN, P.; REID-SMITH, R. J.; HAREL, J.; MANGES, A. R.; GRUENHEID, S. Identification of potentially diarrheagenic atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains present in Canadian food animals at slaughter and in retail meats. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 79, p. 3892-3896, 2013.

CRAVIOTO, A.; GROSS, R. J.; SCOTLAND, S.; ROWE, B. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional enteropathogenic serotypes. **Curr. Microbiol.**, v. 3, p. 95-99, 1979.

CREPIN, V. F.; HABIBZAY, M.; GLEGOLA-MADEJSKA, I.; GUENOT, M.; COLLINS, J. W.; FRANKEL, G. Tir Triggers Expression of CXCL1 in Enterocytes and Neutrophil Recruitment during *Citrobacter rodentium* Infection. **Infect. Immun.**, v. 83, p. 3342-3354, 2015.

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 of cultured epithelial cells. **Biomed. Res. Int.**, v. 2014, 845147, 2014.

CURTIS, M. M.; HU, Z.; KLIMKO, C.; NARAYANAN, S.; DEBERARDINIS, R.; SPERANDIO, V. The gut commensal *Bacteroides thetaiotaomicron* exacerbates enteric infection through modification of the metabolic landscape. **Cell Host Microbe**, v. 16, p. 759-769, 2014.

DAHAN, S.; KNUTTON, S.; SHAW, R. K.; CREPIN, V. F.; DOUGAN, G.; FRANKEL, G. Transcriptome of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 adhering to eukaryotic plasma membranes. **Infect. Immun.,** v. 72, p. 5452-5459, 2004.

DANN, S. M.; SPEHLMANN, M. E.; HAMMOND, D. C.; IIMURA, M.; HASE, K.; CHOI, L. J.; HANSON, E.; ECKMANN, L. IL-6-dependent mucosal protection prevents establishment of a microbial niche for attaching/effacing lesion-forming enteric bacterial pathogens. J. Immunol., v. 180, p. 6816-6826, 2008.

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.

DE BOER, R. F.; FERDOUS, M.; OTT, A.; SCHEPER, H. R.; WISSELINK, G. J.; HECK, M. E.; ROSSEN, J. W.; KOOISTRA-SMID, A. M. Assessing the public health risk of Shiga toxin-producing Escherichia coli by use of a rapid diagnostic screening algorithm. **J. Clin. Microbiol.**, v. 53, p. 1588-1598, 2015.

DE GRADO, M.; ROSENBERGER, C. M.; GAUTHIER, A.; VALLANCE, B. A.; FINLAY, B. B. Enteropathogenic *Escherichia coli* infection induces expression of the early growth response factor by activating mitogen-activated protein kinase cascades in epithelial cells. **Infect. Immun.,** v. 69, p. 6217-6224, 2001.

DE VINNEY, R.; STEIN, M.; REINSCHEID, D.; ABE, A.; RUSCHOWSKI, S.; FINLAY, B. B. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 produces Tir, which is translocated to the host cell membrane but is not tyrosine phosphorylated. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 2389-2398, 1999.

DE VINNEY, R.; PUENTE, J. L.; GAUTHIER, A.; GOOSNEY, D.; FINALY, B. B. Enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* use a different Tir-based mechanism for pedestal formation. **Mol. Microbiol.**, v. 41, p. 1445-1458, 2001.

DEAN, P.; KENNY, B. The effector repertoire of enteropathogenic *E. coli*: ganging up on the host cell. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 12, p. 101-109, 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.

DONNENBERG, M. S.; YU, J.; KAPER, J. B. A second chromosomal gene necessary for intimate attachment of enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells. **J. Bacteriol.**, v. 175, p. 4670-4680, 1993.

DULGUER, M. V.; FABBRICOTTI, S. H.; BANDO S. Y.; MOREIRA-FILHO, C. A.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I. C. A. 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.

DUPONT, A.; SOMMER, F.; ZHANG, K.; REPNIK, U.; BASIC, M.; BLEICH, A.; KUHNEL, M.; BACKHED, F.; LITVAK, Y.; FULDE, M.; ROSENSHINE, I.; HORNEF, M. W. Age-Dependent Susceptibility to Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Infection in Mice. **PLoS Pathog.**, v. 12, p. e1005616, 2016.

DUTTA, S.; PAZHANI, G. P.; NATARO, J. P.; RAMAMURTHY, T. Heterogenic virulence in a diarrheagenic *Escherichia coli*: evidence for an EPEC expressing heat-labile toxin of ETEC. **Int J Med. Microbiol.**, v. 305, p. 47-54, 2015.

ELLIOTT, S. J.; WAINWRIGHT, L.; McDANIEL, T. K.; McNAMARA, B. P.; DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B. The complete sequence of locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. **Mol. Microbiol.,** v. 28, p. 1-4, 1998.

ELLIOTT, S. J.; YU, J.; KAPER, J. B. The cloned locus of enterocyte effacement from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is unable to confer the attaching and effacing phenotype upon E. coli K-12. **Infect. Immun.,** v. 67, p. 4260-4263, 1999.

ELLIOTT, S. J.; SPERANDIO, V.; GIRÓN, J. A.; SHIN, S.; MELLIES, J. L.; WAINWRIGHT, L.; HUTCHESON, S. W.; McDANIEL, T. K.; KAPER, J. B. The locus of enterocyte effacement (LEE) – encoded regulator controls expression of both LEE- and- non LEE- encoded virulence factor in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Infect. Immun., v. 68, p. 6115-6126, 2000.

ENGVALL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, v. 8, p. 871-874, 1971.

ERIKSSON, S.; LUCCHINI, S.; THOMPSON, A.; RHEN, M.; HINTON, J. C. Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. **Mol Microbiol.**, v. 47, p. 103-118. 2003.

FERNANDES, M. R.; IGNACIO, A.; MARTINS, F. H.; ROCHA, L. B.; PIAZZA, R. M. F.; VAZ, T. M. I.; AVILA-CAMPOS, M. J.; NAKANO, V. Presence of Shiga toxin 2e-producing *Escherichia coli* and atypical enteropathogenic *E. coli* in an asymptomatic child. **JMM Case Rep.**, v. 1, p. e000001, 2014.

FINN, R. D.; COGGILL, P.; EBERHARDT, R. Y.; EDDY, S. R.; MISTRY, J.; MITCHELL, A. L.; POTTER, S. C.; PUNTA, M.; QURESHI, M.; SANGRADOR-VEGAS, A.; SALAZAR, G. A.; TATE, J.; BATEMAN, A. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. **Nucleic Acids Res.**, v. 44, p. D279-285, 2016.

FRANCO, R. T.; ARAUJO, L. D.; PENNA, F. J.; MAGALHAES, P. P.; MENDES, E. N. Intimin subtyping of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from children with and without diarrhea: a possible temporal shift in the distribution of intimin alleles. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 74, p. 81-83, 2012.

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.

FRANZIN, F. M.; SIRCILI, M. P. Locus of enterocyte effacement: a pathogenicity island involved in the virulence of enteropathogenic and enterohemorragic *Escherichia coli* subjected to a complex network of gene regulation. **Biomed. Res. Int.**, v. 2015:534738, 2015.

GARMENDIA, J.; PHILLIPS, A. D.; CARLIER, M. F.; CHONG, Y.; SCHULLER, S.; MARCHES, O.; DAHAN, S.; OSWALD, E.; SHAW, R. K.; KNUTTON, S.; FRANKEL, G. TccP is an enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 type III effector protein that couples Tir to the actin-

cytoskeleton. Cell. Microbiol., v. 6, p. 1167-1183., 2004.

GARMENDIA, J.; FRANKEL, G. Operon structure and gene expression of the espJ--tccP locus of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **FEMS Microbiol. Lett.,** v. 247, p. 137-145., 2005.

GARMENDIA, J.; FRANKEL, G.; CREPIN, V. F. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. **Infect. Immun.,** v. 73, p. 2573-2585, 2005.

GARMENDIA, J.; REN, Z.; TENNANT, S.; MIDOLLI VIERA, M. A.; CHONG, Y.; WHALE, A.; AZZOPARDI, K.; DAHAN, S.; SIRCILI, M. P.; FRANZOLIN, M. R.; TRABULSI, L. R.; PHILLIPS, A.; GOMES, T. A.; XU, J.; ROBINS-BROWNE, R.; FRANKEL, G. Distribution of tccP in clinical enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* isolates. J. Clin. Microbiol., v. 43, p. 5715-5720, 2005.

GARMENDIA, J.; CARLIER, M. F.; EGILE, C.; DIDRY, D.; FRANKEL, G. Characterization of TccPmediated N-WASP activation during enterohaemorrhagic *Escherichia coli* infection. **Cell. Microbiol.**, v. 8, p. 1444-1455, 2006.

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S.; WILKINS, M. R.; APPEL, R. D.; BAIROCH, A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: WALKER, J. M. **The Proteomics Protocols Handbook**, Humana Press. p. 571-607, 2005.

GAYTÁN, M. O.; MARTINEZ-SANTOS, V. I.; SOTO, E.; GONZALEZ-PEDRAJO, B. Type Three Secretion System in Attaching and Effacing Pathogens. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, v. 6, p. 129, 2016.

GIOGHA, C.; LUNG, T. W.; PEARSON, J. S.; HARTLAND, E. L. Inhibition of death receptor signaling by bacterial gut pathogens. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 25, p. 235-243, 2014.

GIRARD, F.; OSWALD, I. P.; TARANU, I.; HELIE, P.; APPLEYARD, G. D.; HAREL, J.; FAIRBROTHER, J. M. Host immune status influences the development of attaching and effacing lesions in weaned pigs. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 5514-5523, 2005.

GIRARD, F.; CREPIN, V., F.; FRANKEL, G. Modelling of infection by enteropathogenic *Escherichia coli* strains in lineages 2 and 4 ex vivo and in vivo by using *Citrobacter rodentium* expressing TccP. **Infect. Immun.**, v. 77, p. 1304-1314, 2009.

GIRÓN, J. A.; HO, A. S.; SCHOOLNIK, G. K. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Science**, v. 254, p. 710-713, 1991.

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.

GOMES, T. A.; HERNANDES, R. T.; TORRES, A. G.; SALVADOR, F. A.; GUTH, B. E.; VAZ, T. M.; IRINO, K.; SILVA, R. M.; VIEIRA, M. A. Adhesin-encoding genes from shiga toxin-producing Escherichia coli are more prevalent in atypical than in typical enteropathogenic *E. coli.* **J. Clin. Microbiol.**, v. 49, p. 3334-3337, 2011.

GOMES, T. A.; ELIAS, W. P.; SCALETSKY, I. C.; GUTH, B. E.; RODRIGUES, J. F.; PIAZZA, R. M.; FERREIRA, L. C.; MARTINEZ, M. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Braz. J. Microbiol.**, v. 47, n. Suppl 1, p. 3-30, 2016a.

GOMES, T. A. T.; YAMAMOTO, D.; VIEIRA, M. A. M.; HERNANDES, R. T. Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. In: TORRES, A. G. *Escherichia coli* in the Americas. Cham: Springer International Publishing, p.77-96, 2016b.

GONCALVES, N. S.; GHAEM-MAGHAMI, M.; MONTELEONE, G.; FRANKEL, G.; DOUGAN, G.; LEWIS, D. J.; SIMMONS, C. P.; MACDONALD, T. T. Critical role for tumor necrosis factor alpha in controlling the number of lumenal pathogenic bacteria and immunopathology in infectious colitis. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 6651-6659, 2001.

GONZALEZ, J.; CADONA, J. S.; SANZ, M.; BUSTAMANTE, A. V.; SANSO, A. M. Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from vegetables in Argentina. **Int. J. Food. Microbiol.**, v. 261, p. 57-61, 2017.

GOOSNEY, D. L.; DEVINNEY, R.; FINLAY, B. B. Recruitment of cytoskeletal and signaling

proteins to enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* pedestals. **Infect. Immun.,** v. 69, p. 3315-3322, 2001.

GRUBER, C. C.; SPERANDIO, V. Posttranscriptional control of microbe-induced rearrangement of host cell actin. **MBio**, v. 5, p. e01025-13, 2014.

HARDWIDGE, P. R.; RODRIGUEZ-ESCUDERO, I.; GOODE, D.; DONOHOE, S.; ENG, J.; GOODLETT, D. R.; AEBERSOLD, R.; FINLAY, B. B. Proteomic analysis of the intestinal epithelial cell response to enteropathogenic *Escherichia coli*. **J Biol Chem.**, v. 279, p. 20127-20136, 2004.

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.

HAUF, N.; CHAKRABORTY, T. Suppression of NF-kappa B activation and proinflammatory cytokine expression by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. J. Immunol., v. 170, p. 2074-2082, 2003.

HAZEN, T. H.; SAHL, J. W.; FRASER, C. M.; DONNENBERG, M. S.; SCHEUTZ, F.; RASKO, D. A. Refining the pathovar paradigm via phylogenomics of the attaching and effacing *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 110, p. 12810-12815, 2013.

HAZEN, T. H.; DAUGHERTY, S. C.; SHETTY, A.; MAHURKAR, A. A.; WHITE, O.; KAPER, J. B.; RASKO, D. A. RNA-Seq analysis of isolate- and growth phase-specific differences in the global transcriptomes of enteropathogenic Escherichia coli prototype isolates. **Front. Microbiol.**, v. 6, p. 569, 2015.

HAZEN, T. H.; DONNENBERG, M. S.; PANCHALINGAM, S.; ANTONIO, M.; HOSSAIN, A.; MANDOMANDO, I.; OCHIENG, J. B.; RAMAMURTHY, T.; TAMBOURA, B.; QURESHI, S.; QUADRI, F.; ZAIDI, A.; KOTLOFF, K. L.; LEVINE, M. M.; BARRY, E. M.; KAPER, J. B.; RASKO, D. A.; NATARO, J. P. Genomic diversity of EPEC associated with clinical presentations of differing severity. **Nat. Microbiol.**, v. 1, p. 15014, 2016.

HAZEN, T. H.; MICHALSKI, J.; LUO, Q.; SHETTY, A. C.; DAUGHERTY, S. C.; FLECKENSTEIN, J. M.; RASKO, D. A. Comparative genomics and transcriptomics of *Escherichia coli* isolates carrying virulence factors of both enteropathogenic and enterotoxigenic *E. coli*. **Sci. Rep.**, v. 7, p. 3513, 2017a.

HAZEN, T. H.; DAUGHERTY, S. C.; SHETTY, A. C.; NATARO, J. P.; RASKO, D. A. Transcriptional variation of diverse enteropathogenic *Escherichia coli* isolates under virulence-inducing conditions. **mSystems**, v. 2:e00024-17, 2017b.

HE, X.; MISHCHUK, D. O.; SHAH, J.; WEIMER, B. C.; SLUPSKY, C. M. Cross-talk between E. coli strains and a human colorectal adenocarcinoma-derived cell line. **Sci. Rep.**, v. 3:3416, 2013.

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

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

HICKS, S. W.; GALÁN, J. E. Exploitation of eukaryotic subcellular targeting mechanisms by bacterial effectors. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 11, p. 316-326, 2013.

HORCAJO, P.; DOMINGUEZ-BERNAL, G.; DE LA FUENTE, R.; RUIZ-SANTA-QUITERIA, J. A.; BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; MORA, A.; DAHBI, G.; LOPEZ, C.; PUENTES, B.; ALONSO, M. P.; BLANCO, J.; ORDEN, J. A. Comparison of ruminant and human attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC) strains. **Vet. Microbiol.**, v. 155, p. 341-348, 2012.

HU, J.; TORRES, A. G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: foe or innocent bystander? **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 21, p. 729-734, 2015.

HUMPHRYS, M. S.; CREASY, T.; SUN, Y.; SHETTY, A. C.; CHIBUCOS, M. C.; DRABEK, E. F.; FRASER, C. M.; FAROOQ, U.; SENGAMALAY, N.; OTT, S.; SHOU, H.; BAVOIL, P. M.; MAHURKAR, A.; MYERS, G. S. Simultaneous transcriptional profiling of bacteria and their host cells. **PLoS One.**, v. 8, p. e80597, 2013.

IFEANYI, C. I.; IKENECHE, N. F.; BASSEY, B. E.; AL-GALLAS, N.; BEN AISSA, R.;

BOUDABOUS, A. Diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes isolated from children with diarrhea in the Federal Capital Territory Abuja, Nigeria. **J. Infect. Dev. Ctries.**, v. 9, p. 165-174, 2015.

IGNEY, F. H.; KRAMMER, P. H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 2, p. 277-288, 2002.

INGLE, D. J.; VALCANIS, M.; KUZEVSKI, A.; TAUSCHEK, M.; INOUYE, M.; STINEAR, T.; LEVINE, M. M.; ROBINS-BROWNE, R. M.; HOLT, K. E. In silico serotyping of *E. coli* from short read data identifies limited novel O-loci but extensive diversity of O:H serotype combinations within and between pathogenic lineages. **Microb. Genom.**, v. 2, p. e000064, 2016a.

INGLE, D. J.; TAUSCHEK, M.; EDWARDS, D. J.; HOCKING, D. M.; PICKARD, D. J.; AZZOPARDI, K. I.; AMARASENA, T.; BENNETT-WOOD, V.; PEARSON, J. S.; TAMBOURA, B.; ANTONIO, M.; OCHIENG, J. B.; OUNDO, J.; MANDOMANDO, I.; QURESHI, S.; RAMAMURTHY, T.; HOSSAIN, A.; KOTLOFF, K. L.; NATARO, J. P.; DOUGAN, G.; LEVINE, M. M.; ROBINS-BROWNE, R. M.; HOLT, K. E. Evolution of atypical enteropathogenic *E. coli* by repeated acquisition of LEE pathogenicity island variants. **Nat. Microbiol.**, v. 1:15010, 2016b.

IYODA, S.; KOIZUMI, N.; SATOU, H.; LU, Y.; SAITOH, T.; OHNISHI, M.; WATANABE, H. The GrIR-GrIA regulatory system coordinately controls the expression of flagellar and LEE-encoded type III protein secretion systems in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. J. Bacteriol., v. 188, p. 5682-5692, 2006.

JENNER, R. G.; YOUNG, R. A. Insights into host responses against pathogens from transcriptional profiling. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 3, p. 281-294, 2005.

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. 4302-4309, 1991.

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

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat. Rev. Microbiol., v. 2, p. 123-140, 2004.

KARVE, S. S.; PRADHAN, S.; WARD, D. V.; WEISS, A. A. Intestinal organoids model human responses to infection by commensal and Shiga toxin producing *Escherichia coli*. **PLoS One.**, v. 12, p. e0178966, 2017.

KATSOWICH, N.; ELBAZ, N.; PAL, R. R.; MILLS, E.; KOBI, S.; KAHAN, T.; ROSENSHINE, I. Host cell attachment elicits posttranscriptional regulation in infecting enteropathogenic bacteria. **Science**, v. 355, p. 735-739, 2017.

KENNY, B.; DEVINNEY, R.; STEIN, M.; REINSCHEID, D. J.; FREY, E. A.; FINLAY, B. B. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) transfer its receptor for intimate adherence into mammalian cells. **Cell**, v. 91, p. 511-520, 1997a.

KENNY, B.; ABE, A.; STEIN, M,; FINLAY, B. B. Enteropathogenic *Escherichia coli* protein secretion is induced in response to conditions similar to those in the gastrointestinal tract. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 2606-2612, 1997b.

KENNY, B. Phosphorylation of tyrosine 474 of the enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule is essential for actin nucleating activity and is preceded by additional host modifications. **Mol. Microbiol.**, v. 31, p. 1229-1241, 1999.

KHAN, M. A.; BOUZARI, S.; MA, C.; ROSENBERGER, C. M.; BERGSTROM, K. S.; GIBSON, D. L.; STEINER, T. S.; VALLANCE, B. A. Flagellin-dependent and -independent inflammatory responses following infection by enteropathogenic *Escherichia coli* and *Citrobacter rodentium*. **Infect. Immun.**, v. 76, p. 1410-1422, 2008.

KIECKENS, E.; RYBARCZYK, J.; LI, R. W.; VANROMPAY, D.; COX, E. Potential immunosuppressive effects of *Escherichia coli* O157:H7 experimental infection on the bovine host. **BMC Genomics.**, v. 17, p. 1049, 2016.

KIM, Y.; OH, S.; PARK, S.; KIM, S. H. Interactive transcriptome analysis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 and intestinal epithelial HT-29 cells after bacterial attachment. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 131, p. 224-232, 2009.

KNUTTON, S.; BALDWIN, T.; WILLIAMS, P. H.; MCNEISH, A. S. Actin accumulation at sites of

bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a 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 in Enzimol.**, v.253, p.145-158, 1995.

KNUTTON, S.; SHAW, R.; PHILLIPS, A. D.; SMITH, H. R.; WILLSHAW, G. A.; WATSON, P.; PRICE, E. Phenotypic and genetic analysis of diarrhea-associated *Escherichia coli* isolated from children in the United Kingdom. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr., v. 33, p. 32-40, 2001.

KOZUB-WITKOVSKI, E.; KRAUSE, G.; FRANKEL, G.; KRAMER, D.; APPEL, B.; BEUTIN, L. Serotypes and virutypes of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains from stool samples of children with diarrhoea in Germany. **J. Appl. Microbiol.**, v. 104, p. 403-410, 2008.

KYLE, J. L.; CUMMINGS, C. A.; PARKER, C. T.; QUINONES, B.; VATTA, P.; NEWTON, E.; HUYNH, S.; SWIMLEY, M.; DEGORICIJA, L.; BARKER, M.; FONTANOZ, S.; NGUYEN, K.; PATEL, R.; FANG, R.; TEBBS, R.; PETRAUSKENE, O.; FURTADO, M.; MANDRELL, R. E. *Escherichia coli* serotype O55:H7 diversity supports parallel acquisition of bacteriophage at Shiga toxin phage insertion sites during evolution of the O157:H7 lineage. **J. Bacteriol.**, v. 194, p. 1885-1896, 2012.

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

LAI, Y.; ROSENSHINE, I.; LEONG, J. M.; FRANKEL, G. Intimate host attachment: enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. **Cell. Microbiol.**, v. 15, p. 1796-1808, 2013.

LANATA, C. F.; FISCHER-WALKER, C. L.; OLASCOAGA, A. C.; TORRES, C. X.; ARYEE, M. J.; BLACK, R. E. Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: a systematic review. **PLoS One.,** v. 8, p. e72788, 2013.

LANDRY, J. J.; PYL, P. T.; RAUSCH, T.; ZICHNER, T.; TEKKEDIL, M. M.; STUTZ, A. M.; JAUCH, A.; AIYAR, R. S.; PAU, G.; DELHOMME, N.; GAGNEUR, J.; KORBEL, J. O.; HUBER, W.; STEINMETZ, L. M. The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line. **G3 (Bethesda).** v. 3, p. 1213-1224, 2013.

LAW, H. T.; CHUA, M.; MOON, K. M.; FOSTER, L. J.; GUTTMAN, J. A. Mass Spectrometry-Based Proteomics Identification of Enteropathogenic *Escherichia coli* Pedestal Constituents. **J. Proteome Res.**, v. 14, p. 2520-2527, 2015.

LEVERTON, L. Q.; KAPER, J. B. Temporal expression of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence genes in an *in vitro* model of infection. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 1034-1043, 2005.

LEVINE, M. M.; BERQUIST, E. J.; NALIN, D. R.; WATERMAN, D. H.; HORNICK, R. B.; YOUNG, C. R.; ROWE, B. *Escherichia coli* that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. **Lancet**, v.1, p. 1119–1122, 1978.

LIN, A. E.; BEASLEY, F. C.; OLSON, J.; KELLER, N,; SHALWITZ, R. A.; HANNAN, T. J.; HULTGREN, S. J.; NIZET, V. Role of hypoxia inducible factor-1α in innate defense against uropathogenic *Escherichia coli* infection. **PLoS Pathog.**, v. 11:e1004818, 2015.

LITVAK, Y.; SHARON, S.; HYAMS, M.; ZHANG, L.; KOBI, S.; KATSOWICH, N.; DISHON, S.; NUSSBAUM, G.; DONG, N.; SHAO, F.; ROSENSHINE, I. Epithelial cells detect functional type III secretion system of enteropathogenic *Escherichia coli* through a novel NF-kappaB signaling pathway. **PLoS Pathog.**, v. 13, p. e1006472, 2017.

MADIC, J.; DE GARAM, C. P.; BRUGERE, H.; LOUKIADIS, E.; FACH, P.; JAMET, E.; AUVRAY, F. Duplex real-time PCR detection of type III effector tccP and tccP2 genes in pathogenic *Escherichia coli* and prevalence in raw milk cheeses. Lett. Appl. Microbiol., v. 52, p. 538-545, 2011.

MAGALHAES, C. A.; ROSSATO, S. S.; BARBOSA, A. S.; SANTOS, T. O.; ELIAS, W. P.; SIRCILI, M. P.; PIAZZA, R. M. The ability of haemolysins expressed by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* to bind to extracellular matrix components. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.,** v. 106, p. 146-152, 2011.

MALLICK, E. M.; GARBER, J. J.; VANGURI, V. K.; BALASUBRAMANIAN, S.; BLOOD, T.; CLARK,

S.; VINGADASSALOM, D.; LOUISSAINT, C.; MCCORMICK, B.; SNAPPER, S. B.; LEONG, J. M. The ability of an attaching and effacing pathogen to trigger localized actin assembly contributes to virulence by promoting mucosal attachment. **Cell. Microbiol.**, v. 16, p. 1405-1424, 2014.

MARTINS, R. P.; DA SILVA, M. C.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; LEITE DDA, S. Preliminary virulence genotyping and phylogeny of *Escherichia coli* from the gut of pigs at slaughtering stage in Brazil. **Meat Sci.**, v. 93, p. 437-440, 2013.

MARTINS, F. H.; GUTH, B. E.; PIAZZA, R. M.; ELIAS, W. P.; LEAO, S. C.; MARZOA, J.; DAHBI, G.; MORA, A.; BLANCO, M.; BLANCO, J.; PELAYO, J. S. Lambs are an important source of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* in southern Brazil. **Vet Microbiol.**, v. 196, p. 72-77, 2016.

MARTINS, F. H.; NEPOMUCENO, R.; PIAZZA, R. M. F.; ELIAS, W. P. Phylogenetic distribution of tir-cytoskeleton coupling protein (tccP and tccP2) genes in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 364, p. 10.1093/femsle/fnx101, 2017.

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.

MELLIES, J. L.; ELLIOT, S. J.; SPERANDIO, V.; DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B. The per regulan of enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler). **Mol. Microbiol.**, v. 33, p. 296-306, 1999.

MILLS, E.; BARUCH, K.; CHARPENTIER, X.; KOBI, S.; ROSENSHINE, I. Real-time analysis of effector translocation by the type III secretion system of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Cell Host Microbe,** v. 3, p. 104-113, 2008.

MILLS, E.; BARUCH, K.; AVIV, G.; NITZAN, M.; ROSENSHINE, I. Dynamics of the type III secretion system activity of enteropathogenic *Escherichia coli*. **MBio**, v. 4, p. e00303-13, 2013.

MOHAWK, K. L.; O'BRIEN, A. D. Mouse models of *Escherichia coli* O157:H7 infection and Shiga toxin injection. **J. Biomed. Biotechnol**., v. 2011:258185, 2011.

MONAGHAN, A.; BYRNE, B.; FANNING, S.; SWEENEY, T.; MCDOWELL, D.; BOLTON, D. J. Serotypes and virulence profiles of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from bovine farms and abattoirs. **J. Appl. Microbiol.**, v. 114, p. 595-603, 2013.

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

MORA, A.; HERRERA, A.; LÓPEZ, C.; DAHBI, G.; MAMANI, R.; PITA, J. M.; ALONSO, M. P.; LLOVO, J.; BERNÁRDEZ, M. I.; BLANCO, J. E.; BALNCO, M.; BALNCO, J. Characteristics of the Shiga-toxin-producing enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4 German outbreak strain and of STEC strains isolated in Spain. **Int. Microbiol**., v. 14, p. 121-141, 2011.

MOURA, R. A.; SIRCILI, M. P.; LEOMIL, L.; MATTÉ, M. H.; TRABULSI, L. R.; ELIAS, W. P.; IRINO, K.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Clonal relationship among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from different animal species and humans. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, p. 7399-7408, 2009.

MUHLEN, S.; RUCHAUD-SPARAGANO, M. H.; KENNY, B. Proteasome-independent degradation of canonical NFkappaB complex components by the NIeC protein of pathogenic *Escherichia coli*. J. Biol. Chem., v. 286, p. 5100-5107, 2011.

MURASE, K.; OOKA, T.; IGUCHI, A.; OGURA, Y.; NAKAYAMA, K.; ASADULGHANI, M.; ISLAM, M. R.; HIYOSHI, H.; KODAMA, T.; BEUTIN, L.; HAYASHI, T. Haemolysin E- and enterohaemolysin-derived haemolytic activity of O55/O157 strains and other *Escherichia coli* lineages. **Microbiology**, v. 158, p. 746-758, 2012.

NADLER, C.; BARUCH, K.; KOBI, S.; MILLS, E.; HAVIV, G.; FARAGO, M.; ALKALAY, I.; BARTFELD, S.; MEYER, T. F.; BEN-NERIAH, Y.; ROSENSHINE, I. The type III secretion effector NIeE inhibits NF-kappaB activation. **PLoS Pathog.**, v. 6, p. e1000743, 2010.

NARA, J. M.; CIANCIARULLO, A. M.; CULLER, H. F.; BUERIS, V.; HORTON, D. S.; MENEZES,

M. A.; FRANZOLIN, M. R.; ELIAS, W. P.; PIAZZA, R. M. Differentiation of typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* using colony immunoblot for detection of bundle-forming pilus expression. **J. Appl. Microbiol.**, v. 109, n. 1, p. 35-43, 2010.

NASCIMENTO, H. H.; SILVA, L. E.; SOUZA, R. T.; SILVA, N. P.; SCALETSKY, I. C. Phenotypic and genotypic characteristics associated with biofilm formation in clinical isolates of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) strains. **BMC Microbiol.**, v. 14, p. 10.1186/1471-2180-14-184, 2014.

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

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.

NEURATH, M. F.; BECKER, C.; BARBULESCU, K. Role of NF-kappaB in immune and inflammatory responses in the gut. **Gut**, v. 43, p. 856-860, 1998.

NEWTON, H. J.; PEARSON, J. S.; BADEA, L.; KELLY, M.; LUCAS, M.; HOLLOWAY, G.; WAGSTAFF, K. M.; DUNSTONE, M. A.; SLOAN, J.; WHISSTOCK, J. C.; KAPER, J. B.; ROBINS-BROWNE, R. M.; JANS, D. A.; FRANKEL, G.; PHILLIPS, A. D.; COULSON, B. S.; HARTLAND, E. L. The type III effectors NIeE and NIeB from enteropathogenic *E. coli* and OspZ from *Shigella* block nuclear translocation of NF-kappaB p65. **PLoS Pathog.**, v. 6, p. e1000898, 2010.

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.

NOBE, R.; NOUGAYREDE, J. P.; TAIEB, F.; BARDIAU, M.; CASSART, D.; NAVARRO-GARCIA, F.; MAINIL, J.; HAYASHI, T.; OSWALD, E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* serogroup O111 inhibits NF-(kappa)B-dependent innate responses in a manner independent of a type III secreted OspG orthologue. **Microbiology**, v. 155, p. 3214-3125, 2009.

NUNES, E. B.; SARIDAKIS, H. O.; IRINO, K.; PELAYO, J. S. Genotypic and phenotypic characterization of attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC) isolated from children with and without diarrhoea in Londrina, Brazil. **J. Med. Microbiol.**, v. 52, p. 499-504, 2003.

NUNES MDO, R.; MAGALHAES, P. P.; MACEDO ADA, S.; FRANCO, R. T.; PENNA, F. J.; MENDES, E. N. Attaching and effacing *Escherichia coli* and Shiga toxin-producing *E. coli* in children with acute diarrhoea and controls in Teresina/PI, Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 106, p. 43-47, 2012.

OCHOA, T. J.; BARLETTA, F.; CONTRERAS, C.; MERCADO, E. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 102, n. 9, p. 852-856, 2008.

OGURA, Y.; OOKA, T.; WHALE, A.; GARMENDIA, J.; BEUTIN, L.; TENNANT, S.; KRAUSE, G.; MORABITO, S.; CHINEN, I.; TOBE, T.; ABE, H.; TOZZOLI, R.; CAPRIOLI, A.; RIVAS, M.; ROBINS-BROWNE, R.; HAYASHI, T.; FRANKEL, G. TccP2 of O157:H7 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC): challenging the dogma of EHEC-induced actin polymerization. **Infect. Immun.**, v. 75, p. 604-612, 2007.

OOKA, T.; VIEIRA, M. A.; OGURA, Y.; BEUTIN, L.; LA RAGIONE, R.; VAN DIEMEN, P. M.; STEVENS, M. P.; AKTAN, I.; CAWTHRAW, S.; BEST, A.; HERNANDES, R. T.; KRAUSE, G.; GOMES, T. A.; HAYASHI, T.; FRANKEL, G. Characterization of tccP2 carried by atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 271, p. 126-135, 2007.

OTERO, V.; RODRIGUEZ-CALLEJA, J. M.; OTERO, A.; GARCIA-LOPEZ, M. L.; SANTOS, J. A. Genetic characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* isolates from ewes' milk, sheep farm environments, and humans by multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 79, p. 5864-5869, 2013.

PACHECO, V. C.; YAMAMOTO, D.; ABE, C. M.; HERNANDES, R. T.; MORA, A.; BLANCO, J.; GOMES, T. A. Invasion of differentiated intestinal Caco-2 cells is a sporadic property among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains carrying common intimin subtypes. **Pathog. Dis.**, v. 70, p. 167-175, 2014.

PALLETT, M. A.; CREPIN, V. F.; SERAFINI, N.; HABIBZAY, M.; KOTIK, O.; SANCHEZ-GARRIDO, J.; DI SANTO, J. P.; SHENOY, A. R.; BERGER, C. N.; FRANKEL, G. Bacterial virulence factor inhibits caspase-4/11 activation in intestinal epithelial cells. **Mucosal Immunol.**, v. 10, p. 602-612, 2017.

PARK, J. H.; OH, S. S.; OH, K. H.; SHIN, J.; JANG, E. J.; JUN, B. Y.; YOUN, S. K.; CHO, S. H. Diarrheal outbreak caused by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* O157:H45 in South Korea. **Foodborne Pathogen Dis.**, v. 11, p. 775-781, 2014.

PEARSON, J. S.; RIEDMAIER, P.; MARCHES, O.; FRANKEL, G.; HARTLAND, E. L. A type III effector protease NIeC from enteropathogenic *Escherichia coli* targets NF-kappaB for degradation. **Mol. Microbiol.**, v. 80, p. 219-230, 2011.

PEARSON, J. S.; HARTLAND, E. L. The Inflammatory Response during Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infection. **Microbiol. Spectr.,** v. 2, p. EHEC-0012-2013, 2014.

PEARSON, J. S.; GIOGHA, C.; LUNG, T. W. F.; HARTLAND, E. L. The genetics of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence. **Annu. Rev. Genet.**, v. 50, p. 493-513, 2016.

PERNA, N. T.; PLUNKETT, G., 3RD; BURLAND, V.; MAU, B.; GLASNER, J. D.; ROSE, D. J.; MAYHEW, G. F.; EVANS, P. S.; GREGOR, J.; KIRKPATRICK, H. A.; POSFAI, G.; HACKETT, J.; KLINK, S.; BOUTIN, A.; SHAO, Y.; MILLER, L.; GROTBECK, E. J.; DAVIS, N. W.; LIM, A.; DIMALANTA, E. T.; POTAMOUSIS, K. D.; APODACA, J.; ANANTHARAMAN, T. S.; LIN, J.; YEN, G.; SCHWARTZ, D. C.; WELCH, R. A.; BLATTNER, F. R. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Nature**, v. 409, p. 529-533, 2001.

PIAZZA, R. M.; DELANNOY, S.; FACH, P.; SARIDAKIS, H. O.; PEDROSO, M. Z.; ROCHA, L. B.; GOMES, T. A.; VIEIRA, M. A.; BEUTIN, L.; GUTH, B. E. Molecular and phenotypic characterization of *Escherichia coli* O26:H8 among diarrheagenic *E. coli* O26 strains isolated in Brazil. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 79, p. 6847-6854, 2013.

PITONDO-SILVA, A.; NAKAZATO, G.; FALCAO, J. P.; IRINO, K.; MARTINEZ, R.; DARINI, A. L.; HERNANDES, R. T. Phenotypic and genetic features of enteropathogenic *Escherichia coli* isolates from diarrheal children in the Ribeirao Preto metropolitan area, Sao Paulo State, Brazil. **Apmis.**, v. 123, p. 128-135, 2015.

POLLOCK, G. L.; OATES, C. V.; GIOGHA, C.; WONG FOK LUNG, T.; ONG, S. Y.; PEARSON, J. S.; HARTLAND, E. L. Distinct Roles of the Antiapoptotic Effectors NIeB and NIeF from Enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect. Immun., v. 85, p. e01071-16, 2017.

READING, N. C.; TORRES, A. G.; KENDALL, M. M.; HUGHES, D. T.; YAMAMOTO, K.; SPERANDIO, V. A novel two-component signaling system that activates transcription of an enterohemorrhagic *Escherichia coli* effector involved in remodeling of host actin. **J Bacteriol.**, v. 189, p. 2468-2476, 2007.

RIEDL, J.; CREVENNA, A. H.; KESSENBROCK, K.; YU, J. H.; NEUKIRCHEN, D.; BISTA, M.; BRADKE, F.; JENNE, D.; HOLAK, T. A.; WERB, Z.; SIXT, M.; WEDLICH-SOLDNER, R. Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. **Nat. Methods**, v. 5, p. 605-607, 2008.

RITCHIE, J. M.; BRADY, M. J.; RILEY, K. N.; HO, T. D.; CAMPELLONE, K. G.; HERMAN, I.M.; DONOHUE-ROLFE, A.; TZIPORI, S.; WALDOR, M.K.; LEONG, J. M. EspFu, a type III-translocated effector of actin assembly, fosters epithelial association and late-stage intestinal colonization by *E. coli* O157:H7. **Cell. Microbiol.**, v.10, p. 836-847, 2008.

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.

ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v. 26, p. 139-140, 2010.

ROCHA, L. B.; SANTOS, A. R.; MUNHOZ, D. D.; CARDOSO, L. T.; LUZ, D. E.; ANDRADE, F. B.; HORTON, D. S.; ELIAS, W. P.; PIAZZA, R. M. Development of a rapid agglutination latex test for diagnosis of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* infection in developing world: defining the biomarker, antibody and method. **Plos Negl. Trop. Dis.**, v. 8, p. e3150, 2014.

ROCHA, S. P. D.; ABE, C. M.; SPERANDIO, V.; BANDO, S. Y.; ELIAS, W. P. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* that contains functional locus of enterocyte effacement genes can be attaching-and-effacing negative in cultured epithelial cells. **Infect. Immun.** v. 79, p. 1833-1841, 2011.

ROYAN, S. V.; JONES, R. M.; KOUTSOURIS, A.; ROXAS, J. L.; FALZARI, K.; WEFLEN, A. W.; KIM, A.; BELLMEYER, A.; TURNER, J. R.;NEISH, A. S.; RHEE, K. J.; VISWANATHAN, V. K.; HECHT, G. A. Enteropathogenic *E. coli* non-LEE encoded effectors NIeH1 and NIeH2 attenuate NF-κB activation. **Mol. Microbiol.**, v. 78, p. 1232-1245, 2010.

RUCHAUD-SPARAGANO, M. H.; MARESCA, M.; KENNY, B. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) inactivate innate immune responses prior to compromising epithelial barrier function. **Cell. Microbiol.**, v. 9, p. 1909-1921, 2007.

RUIZ, R. C.; MELO, K. C.; ROSSATO, S. S.; BARBOSA, C. M.; CORRÊA, L. M.; ELIAS, W. P.; PIAZZA, R. M. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* secretes plasmid encoded toxin. **Biomed. Res. Int.** v. 2014, p. 1-8, 2014.

SABHARWAL, H.; CICHON, C.; OLSCHLAGER, T. A.; SONNENBORN, U.; SCHMIDT, M. A. Interleukin-8, CXCL1, and MicroRNA miR-146a Responses to Probiotic Escherichia coli Nissle 1917 and Enteropathogenic *E. coli* in Human Intestinal Epithelial T84 and Monocytic THP-1 Cells after Apical or Basolateral Infection. **Infect. Immun.**, v. 84, p. 2482-2892, 2016.

SAKKEJHA, H.; BYRNE, L.; LAWSON, A. J.; JENKINS, C. An update on the microbiology and epidemiology of enteropathogenic Escherichia coli in England 2010-2012. J. Med. Microbiol., v. 62, p. 1531-1534, 2013.

SALAZAR-GONZALEZ, H.; NAVARRO-GARCIA, F. Intimate adherence by enteropathogenic Escherichia coli modulates TLR5 localization and proinflammatory host response in intestinal epithelial cells. **Scand. J. Immunol.,** v. 73, p. 268-283, 2011.

SALLEE, N. A.; RIVERA, G. M.; DUEBER, J. E.; VASILESCU, D.; MULLINS, R. D.; MAYER, B. J.; LIM, W. A. The pathogen protein EspF(U) hijacks actin polymerization using mimicry and multivalency. **Nature**, v. 454, p. 1005-1008, 2008.

SALVADOR, F. A.; HERNANDES, R. T.; VIEIRA, M. A.; ROCKSTROH, A. C.; GOMES, T. A. Distribution of non-LEE-encoded type 3 secretion system dependent effectors in enteropathogenic *Escherichia coli.* **Braz. J. Microbiol.**, v. 45, p. 851-855, 2014.

SAMBROCK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor, 1989.

SAMBROCK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2nd edition. New York: Cold Spring Harbor, 2001.

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.

SANCHES, L. A.; GOMES, M. D. S.; TEIXEIRA, R. H. F.; CUNHA, M. P. V.; OLIVEIRA, M. G. X.; VIEIRA, M. A. M.; GOMES, T. A. T.; KNOBL, T. Captive wild birds as reservoirs of enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC). **Braz. J. Microbiol.,** v. 48, p. 760-763, 2017.

SÁNCHEZ-SANMARTÍN, C.; BUSTAMANTE, V. H.; CALVA, E.; PUENTE, J. L. Transcriptional regulation of the orf19 gene and the *tir-cesT-eae* operon of enteropathogenic *Escherichia coli*. J. **Bacteriol.**, v. 183, p. 2823-2833, 2001.

SANCHEZ-VILLAMIL, J.; NAVARRO-GARCIA, F. Role of virulence factors on host inflammatory response induced by diarrheagenic Escherichia coli pathotypes. **Future Microbiol.**, v. 10, p. 1009-1033, 2015.

SANTONA, S.; DIAZ, N.; FIORI, P. L.; FRANCISCO, M.; SIDAT, M.; CAPPUCCINELLI, P.; RAPPELLI, P. Genotypic and phenotypic features of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated in industrialized and developing countries. **J. Infect. Dev. Ctries.**, v. 7, p. 214-219, 2013.

SANTOS, A. S.; FINLAY, B. B. Bringing down the host: enteropathogenic and enterohaemorrhagic

Escherichia coli effector-mediated subversion of host innate immune pathways. **Cell. Microbiol.,** v. 17, p. 318-332, 2015.

SAVKOVIC, S. D.; KOUTSOURIS, A.; HECHT, G. Activation of NF-kappaB in intestinal epithelial cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. **Am. J. Physiol.**, v. 273, p. C1160-7, 1997.

SCALETSKY, I. C. A.; SILVA, M. L.; TRABULSI, L. R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infect. Immun.,** v. 45, p. 534-536, 1984.

SCALETSKY, I. C.; PEDROSO, M. Z.; 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.

SCALETSKY, I. C.; ARANDA, K. R.; SOUZA, T. B.; SILVA, N. P.; MORAIS, M. B. Evidence of pathogenic subgroups among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. J. Clin. Microbiol., v. 47, p. 3756-3759, 2009.

SCALETSKY, 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.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nat. Methods.**, v. 9, p. 671-675, 2012.

SCHÜLLER, S.; CHONG, Y.; LEWIN, J.; KENNY, B.; FRANKEL, G.; PHILLIPS, A. D. Tir phosphorylation and Nck/N-WASP recruitment by enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* during ex vivo colonization of human intestinal mucosa is different to cell culture models. **Cell. Microbiol.**, v. 9, p. 1352-1364, 2007.

SCHULLER, S.; LUCAS, M.; KAPER, J. B.; GIRON, J. A.; PHILLIPS, A. D. The ex vivo response of human intestinal mucosa to enteropathogenic *Escherichia coli* infection. **Cell. Microbiol.**, v. 11, p. 521-530, 2009.

SHANER, N. C.; SANGER, J. W.; SANGER, J. M. Actin and alpha-actinin dynamics in the adhesion and motility of EPEC and EHEC on host cells. **Cell. Motil. Cytoskeleton.,** v. 60, p. 104-120, 2005.

SHARMA, R.; TESFAY, S.; TOMSON, F. L.; KANTETI, R. P.; VISWANATHAN, V. K.; HECHT, G. Balance of bacterial pro- and anti-inflammatory mediators dictates net effect of enteropathogenic *Escherichia coli* on intestinal epithelial cells. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 290, p. G685-694, 2006.

SHAULOV, L.; GERSHBERG, J.; DENG, W.; FINLAY, B. B.; SAL-MAN, N. The Ruler Protein EscP of the Enteropathogenic *Escherichia coli* Type III Secretion System Is Involved in Calcium Sensing and Secretion Hierarchy Regulation by Interacting with the Gatekeeper Protein SepL. **MBio**, v. 8, p. e01733-16, 2017.

SIEVERS, F.; WILM, A.; DINEEN, D.; GIBSON, T. J.; KARPLUS, K.; LI, W.; LOPEZ, R.; MCWILLIAM, H.; REMMERT, M.; SODING, J.; THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Mol. Syst. Biol.**, v. 7, p. 10.1038/msb.2011.75, 2011.

SILVA, L. E.; SOUZA, T. B.; SILVA, N. P.; SCALETSKY, I. C. Detection and genetic analysis of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin (EAST1) gene in clinical isolates of enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) strains. **BMC Microbiol.**, v. 14, p. 10.1186/1471-2180-14-135, 2014.

SINGH, T.; DAS, S.; RAMACHANDRAN, V. G.; DAR, S. A.; SNEHAA, K.; SAHA, R.; SHAH, D. Spectrum of diarrhoeagenic *Escherichia coli* in paediatric population suffering from diarrhoea and as commensals in healthy children. **Indian J. Med. Microbiol.**, v. 35, p. 204-210, 2017.

STEKEL, D. J.; SARTI, D.; TREVINO, V.; ZHANG, L.; SALMON, M.; BUCKLEY, C. D.; STEVENS, M.; PALLEN, M. J.; PENN, C.; FALCIANI, F. Analysis of host response to bacterial infection using error model based gene expression microarray experiments. **Nucleic Acids Res.**, v. 33, p. e53, 2005.

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from

polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

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

TRAPNELL, C.; ROBERTS, A.; GOFF, L.; PERTEA, G.; KIM, D.; KELLEY, D. R.; PIMENTEL, H.; SALZBERG, S. L.; RINN, J. L.; PACHTER, L. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. **Nat. Protoc.**, v. 7, p. 562-578, 2012.

VELLE, K. B.; CAMPELLONE, K. G. Extracellular motility and cell-to-cell transmission of enterohemorrhagic *E. coli* is driven by EspFU-mediated actin assembly. **PLoS Pathog.**, v. 13, p. e1006501, 2017.

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

VIEIRA, M. A.; DOS SANTOS, L. F.; DIAS, R. C.; CAMARGO, C. H.; PINHEIRO, S. R.; GOMES, T. A.; HERNANDES, R. T. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* as aetiologic agents of sporadic and outbreak-associated diarrhoea in Brazil. **J. Med. Microbiol.**, v. 65, p. 998-1006, 2016.

VINGADASSALOM, D.; KAZLAUSKAS, A.; SKEHAN, B.; CHENG, H.C.; MAGOUN, L.; ROBBINS, D.; ROSEN, M. K.; SAKSELA, K.; LEONG, J. M. Insulin receptor tyrosine kinase substrate links the *E. coli* O157:H7 actin assembly effectors Tir and EspF(U) during pedestal formation. **Proc. Natl.** Acad. Sci. U. S. A., v. 21, p. 6754-6759, 2009.

VINGADASSALOM, D.; CAMPELLONE, K. G.; BRADY, M. J.; SKEHAN, B.; BATTLE, S. E.; ROBBINS, D.; KAPOOR, A.; HECHT, G.; SNAPPER, S. B.; LEONG, J. M. Enterohemorrhagic *E. coli* requires N-WASP for efficient type III translocation but not for EspFU-mediated actin pedestal formation. **PLoS Pathog.**, v. 6, p. e1001056, 2010.

VISWANATHAN, V. K.; KOUTSOURIS, A.; LUKIC, S.; PILKINTON, M.; SIMONOVIC, I.; SIMONOVIC, M.; HECHT, G. Comparative analysis of EspF from enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* in alteration of epithelial barrier function. **Infect. Immun.**, v. 72, 3218-3227, 2004.

VLISIDOU, I.; DZIVA, F.; LA RAGIONE, R. M.; BEST, A.; GARMENDIA, J.; HAWES, P.; MONAGHAN, P.; CAWTHRAW, S. A.; FRANKEL, G.; WOODWARD, M. J.; STEVENS, M. P. Role of intimin-Tir interactions and the Tir-cytoskeleton coupling protein in the colonization of calves and lambs by *Escherichia coli* O157:H7. Infect. Immun., v. 74, p. 758-764, 2006.

VOSSENKAMPER, A.; MARCHES, O.; FAIRCLOUGH, P. D.; WARNES, G.; STAGG, A. J.; LINDSAY, J. O.; EVANS, P. C.; LUONG LE, A.; CROFT, N. M.; NAIK, S.; FRANKEL, G.; MACDONALD, T. T. Inhibition of NF-kappaB signaling in human dendritic cells by the enteropathogenic *Escherichia coli* effector protein NIeE. J. Immunol., v. 185, p. 4118-4127, 2010.

WEISS, S. M.; LADWEIN, M.; SCHMIDT, D.; EHINGER, J.; LOMMEL, S.; STÄDING, K.; BEUTLING, U.; DISANZA, A.; FRANK, R.; JÄNSCH, L.; SCITA, G.; GUNZER, F.; ROTTNER, K.; STRADAL, T. E. IRSp53 links the enterohemorrhagic *E. coli* effectors Tir and EspFU for actin pedestal formation. **Cell Host Microbe**, v. 19, p. 244-258, 2009.

WELLS, J. G.; DAVIS, B. R.; WACHSMUTH, I. K.; RILEY, L. W.; REMIS, R. S.; SOKOLOW, R.; MORRIS, G. K. Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare Escherichia coli serotype. **J. Clin. Microbiol.**, v. 18, p. 512-520, 1983.

WHALE, A. D.; GARMENDIA, J.; GOMES, T. A.; FRANKEL, G. A novel category of enteropathogenic *E. coli* simultaneously utilizes the Nck and TccP pathways to induce actin remodeling. **Cell. Microbiol.**, v. 8, p. 999-1008, 2006.

WHALE, A. D.; HERNANDES, R. T.; OOKA, T.; BEUTIN, L.; SCHULLER, S.; GARMENDIA, J.; CROWTHER, L.; VIEIRA, M. A. M.; OGURA, Y.; KRAUSE, G.; PHILLIPS, A. D.; GOMES, T. A. T.; HAYASHI, T.; FRANKEL, G. TccP2-mediated subversion of actin dynamics by EPEC 2 – a distinct evolutionary lineage of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Microbiol.**, v. 153, p. 1743-1755, 2007.

WONG, A. R.; PEARSON, J. S.; BRIGHT, M. D.; MUNERA, D.; ROBINSON, K. S.; LEE, S. F.;
FRANKEL, G.; HARTLAND, E. L. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: even more subversive elements. **Mol. Microbiol.**, v. 80, p.1420-1438, 2011.

WONG, L. Y.; CHEUNG, B. M. Modulation of cytokine responses by adrenomedullin and adrenomedullin binding protein-1 in macrophages: a novel pathway in sepsis. **Hong Kong Med. J.**, v. 21, p. 39-44, 2015.

XU, Y.; BAI, X.; ZHAO, A.; ZHANG, W.; BA, P.; LIU, K.; JIN, Y.; WANG, H.; GUO, Q.; SUN, H.; XU, J.; XIONG, Y. Genetic Diversity of Intimin Gene of Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Isolated from Human, Animals and Raw Meats in China. **PLoS One.,** v. 11, p. e0152571, 2016.

XU, Y.; BAI, X.; JIN, Y.; HU, B.; WANG, H.; SUN, H.; FAN, R.; FU, S.; XIONG, Y. High Prevalence of Virulence Genes in Specific Genotypes of Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. Front. Cell. Infect. Microbiol., v. 7, p. 10.3389/fcimb.2017.00109, 2017.

YANG, W. E.; SUCHINDRAN, S.; NICHOLSON, B. P.; MCCLAIN, M. T.; BURKE, T.; GINSBURG, G. S.; HARRO, C. D.; CHAKRABORTY, S.; SACK, D. A.; WOODS, C. W.; TSALIK, E. L. Transcriptomic Analysis of the Host Response and Innate Resilience to Enterotoxigenic Escherichia coli Infection in Humans. J. Infect. Dis., v. 213, p. 1495-1504, 2016.

YEN, H.; SUGIMOTO, N.; TOBE, T. Enteropathogenic *Escherichia coli* Uses NIeA to Inhibit NLRP3 Inflammasome Activation. **PLoS Pathog.**, v. 11, p. e1005121, 2015.

YEN, H.; KARINO, M.; TOBE, T. Modulation of the Inflammasome Signaling Pathway by Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Front. Cell. Infect. Microbiol., v. 6, p. 10.3389/fcimb.2016.00089, 2016.

YERUSHALMI, G.; LITVAK, Y.; GUR-ARIE, L.; ROSENSHINE, I. Dynamics of expression and maturation of the type III secretion system of enteropathogenic *Escherichia coli*. J. Bacteriol., v. 196, p. 2798-2806, 2014.

YIN, X.; ZHU, J.; FENG, Y.; CHAMBERS, J. R.; GONG, J.; GYLES, C. L. Differential gene expression and adherence of *Escherichia coli* O157:H7 in vitro and in ligated pig intestines. **Plos One**, v. 6, e17424, 2011.

ZHANG, S.; WU, Q.; ZHANG, J.; ZHU, X. Occurrence and Characterization of Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Retail Ready-to-Eat Foods in China. **Foodborne Pathog. Dis.**, v. 13, p. 49-55, 2016.

ZHOU, X.; GIRON, J. A.; TORRES, A. G.; CRAWFORD, J. A.; NEGRETE, E.; VOGEL, S. N.; KAPER, J. B. Flagellin of enteropathogenic *Escherichia coli* stimulates interleukin-8 production in T84 cells. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 2120-2129, 2003.

ZHOU, Z.; LI, X.; LIU, B.; BEUTIN, L.; XU, J.; REN, Y.; FENG, L.; LAN, R.; REEVES, P. R.; WANG, L. Derivation of *Escherichia coli* O157:H7 from its O55:H7 precursor. **PLoS One.**, v. 5, p. e8700, 2010.

ZHOU, M.; GUO, Z.; DUAN, Q.; HARDWIDGE, P. R.; ZHU, G. *Escherichia coli* type III secretion system 2: a new kind of T3SS? **Vet. Res.**, v. 45, p. 32, 2014.

ZHUANG, X.; CHEN, Z.; HE, C.; WANG, L.; ZHOU, R.; YAN, D.; GE, B. Modulation of host signaling in the inflammatory response by enteropathogenic *Escherichia coli* virulence proteins. **Cell. Mol. Immunol.**, v. 14, p. 237- 244, 2017.