PAULO CESAR GOMES VIEIRA

Sat (*Secreted autotransporter toxin*): ação citotóxica da toxina bacteriana em diferentes linhagens celulares e na infecção *in vitro* por uma cepa de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) sorotipo O125ab:H21

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/BUTANTAN/IPT
para obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia

São Paulo

2018

PAULO CESAR GOMES VIEIRA

Sat (*Secreted autotransporter toxin*): ação citotóxica da toxina bacteriana em diferentes linhagens celulares e na infecção *in vitro* por uma cepa de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) sorotipo O125ab:H21

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/BUTANTAN/IPT para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Rita de Cássia Ruiz

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo

2018

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)

Gomes Vieira, Paulo Cesar

Sat (Secreted autotransporter toxin): Ação
citotóxica da toxina bacteriana em diferentes
linhagens celulares e na infecção in vitro por uma
cepa de Escherichia coli enteroagregativa (EAEC)
Sorotipo O125ab:H21 / Paulo Cesar Gomes Vieira;
orientadora Rita de Cássia Ruiz. -- São Paulo, 2018.
115 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Toxina Sat. 2. Serino Protease
autotransportadora de Enterobacteriaceae (SPATE).
3. Citotoxicidade. 4. Escherichia coli
Enteroagregativa (EAEC). 5. Infecção. I. Ruiz, Rita
de Cássia, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Paulo Cesar Gomes Vieira

Título da Dissertação: Sat (*Secreted autotransporter toxin*): ação citotóxica da toxina bacteriana em diferentes linhagens celulares e na infecção *in vitro* por uma cepa de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) sorotipo O125ab:H21

Orientador(a): Prof.(a) Dr(a) Rita de Cassia Ruiz

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação, em sessão pública realizada a ____/____/____, considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Caracterização da toxina Sat (secreted autotransporter toxin) em *Escherichia coli* enteropatogênica", **protocolo nº 1362/15**, sob a responsabilidade de Rita de Cássia Ruiz – 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 19/2/2015.

This is to certify that the proposal "Characterization of Sat toxin (secreted autotransporter toxin) in enteropathogenic *Escherichia coli*", **protocol nº 1362/15**, under the responsibility of Rita de Cássia Ruiz – 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 2/19/2015. 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:	Nº de animais/espécie
03/2015 - 03/2017	
Laboratório de Bacteriologia	1 Coelho 2000g (F)

São Paulo, 23 de fevereiro de 2015

Dra. Wafa H. K. Cabrera
Coordenadora da CEUAIB

A Deus, por nunca ter me desamparado.

Aos meus pais, Rubens e Dirce.

Aos meus irmãos, Marcelo e Claudia.

E a todos os familiares.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Rita de Cássia Ruiz, pela orientação e pelo grande aprendizado durante estes cinco anos juntos no laboratório;

Às amigas Helen Alberta dos Santos e Marina Ramos Alves, pelo auxílio nos ensaios de citotoxicidade, pela amizade e bom convívio;

Aos Amigos Laís Ferreira, Vagner Fabiano da Silva e Giovanna de Almeida Bicudo pela amizade e bom convívio;

Ao Dr. Waldir Pereira Elias Junior por ter aceitado no laboratório e colaborado neste trabalho;

À Dra. Keyde Cristina Martins de Melo, pela amizade e pelos ensinamentos no momento em que ingressei no laboratório da Dra. Rita;

Ao Dr. Roberto Nepomuceno de Souza Lima pelas orientações técnicas de biologia molecular e purificação, no início deste trabalho;

Ao MSc Abraham Omar Espinoza-Culupú pela grande amizade e ensinamentos nas técnicas de biologia molecular e bioinformática;

À Dra. Marta Harumi Sonobe pelas orientações técnicas sobre purificação;

Ao Dr. Renato Mancini Astray, pelo fornecimento da linhagem celular HEK-293;

Departamento de Nefrologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), pelo fornecimento das células de linhagem LLC-PK1;

Ao Alex Araújo Simões, Ana Claudia Takahashi e Fabiana Belasco Guilhen da Central de Purificação de Produtos Bacterianos do Instituto Butantan, por terem cedido a coluna de gel filtração e o equipamento de filtração tangencial;

À Dra Mickie Takagi do Laboratório de Bioprocessos do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan, por ter cedido o equipamento de filtração tangencial;

Ao Dr. Ivo Lebrun do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan pelas orientações técnicas sobre purificação e por ter cedido a coluna de afinidade e o equipamento de filtração tangencial;

À Dra. Solange Maria de Toledo Serrano e sua aluna de doutorado Débora Andrade Silva do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantan pela identificação da proteína por espectrometria de massa;

À Dra Fernanda Calheta Vieira Portaro e a doutoranda Cristiane Castilho Fernandes da Silva, pelo apoio nos ensaios de atividade enzimática da toxina;

Aos alunos do laboratório do Dr. Waldir pelas orientações técnicas e dicas no trabalho;

À Dra. Monamaris Marques Borges pela disponibilização de equipamentos, reagentes e o orientações técnicas nos experimentos;

À Dra. Roxane Piazza e alunos pela disponibilização de equipamentos e orientações técnicas sempre que solicitada;

Ao MSc Bruno Yamamoto pelas orientações técnicas de ELISA e auxílio na imunização do coelho;

À Dra. Denize Monaris pelo orientações técnicas de adsorção do soro;

À Dra. Sandra Fernanda Bilbao Orozco, pela revisão final desta dissertação;

A todos pesquisadores, funcionários e alunos do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

VIEIRA PCG Sat (*Secreted autotransporter toxin*): ação citotóxica da toxina bacteriana em diferentes linhagens celulares e na infecção *in vitro* por uma cepa de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) sorotipo O125ab:H21. 2018. 113 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

As serino-proteases autotransportadoras de *Enterobacteriaceae* (SPATE) constituem uma família de proteases secretadas pelo sistema de secreção do tipo V, cujos genes foram estudados em *Escherichia coli* intestinal e extra-intestinal. Sat é uma SPATE citotóxica de 107 kDa, cujo gene foi identificado pela primeira vez em UPEC isolada da urina de um paciente com pielonefrite. A maioria dos estudos envolvendo Sat foram realizados em células renais e da bexiga, embora seu gene seja encontrado em DAEC, EAEC e, mais recentemente, em amostras bacterianas isoladas de septicemia neonatal e meningite. Os objetivos deste trabalho foram: i) purificar Sat; ii) determinar a ação da Sat purificada em diferentes tipos celulares e iii) caracterizar o papel de Sat na infecção *in vitro* por EAEC. Desta forma, a presença de Sat nos sobrenadantes do cultivo das cepas EAEC CV323 e DEC/Sat, isoladas de diarreia, foi confirmada por LC-MS/MS. Sat foi purificada da cultura de DEC/Sat+ e utilizada para a obtenção de anticorpos anti-Sat em coelho. O efeito citotóxico de Sat purificada foi investigado em células derivadas do endotélio (HUVEC) e do sistema urinário (Y1, LLC-PK1 e HEK-293) e gastrointestinal (Caco-2). Os parâmetros citotóxicos analisados foram: o descolamento celular e alterações na morfologia, permeabilidade e metabolismo mitocondrial das células. Para investigar o papel de Sat na infecção por EAEC, células Y-1 foram infectadas com EAEC CV323 e DEC/Sat+ na presença ou ausência de PMSF (inibidor de serino-protease) e anticorpos anti-Sat. Os parâmetros de citotoxicidade analisados nas culturas infectadas foram descolamento celular e alteração na morfologia. Os resultados demonstraram que: i) Sat é secretada por EAEC CV323 e DEC/Sat+ e, em ambas as cepas, há duas mutações em resíduos de aminoácidos que não interferiram na atividade enzimática; ii) as células do endotélio são mais sensíveis à Sat do que as células derivadas do trato urinário, sendo a linhagem gastrointestinal a mais resistente; iii) Sat secretada por EAEC CV323 durante a infecção induziu intenso dano celular, o qual, em presença de anticorpos anti-Sat e PMSF foi reduzido em cerca de 80 a 90%, respectivamente. Este é o primeiro trabalho que demonstra a expressão de Sat pela EAEC e a ação da toxina em células endoteliais sugerindo que o papel de Sat possa ser mais amplo na patogenia do que o proposto até o momento.

Palavras-chave: Toxina Sat. Serino-protease autotransportadora de *Enterobacteriaceae* (SPATE). *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC). Citotoxicidade. Infecção.

ABSTRACT

VIEIRA PCG Sat (Secreted autotransporter toxin): cytotoxic action of the bacterial toxin in different cellular lineages and in an *in vitro* infection with an enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) serotype O125ab:H21 2018. 113 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

The serine protease autotransporters of *Enterobacteriaceae* (SPATEs) constitute a family of proteases secreted by the type V secretion system whose genes have been studied in intestinal and extra intestinal *Escherichia coli*. Sat is a 107 kDa cytotoxic SPATE and its gene was first identified in UPEC isolated from the urine of a patient with pyelonephritis. Most studies involving Sat were performed in renal and bladder cells, although the gene encoding Sat is encountered in other strains of *E. coli* such as DAEC, EAEC and more recently, in bacterial samples isolated from neonatal septicemia and meningitis. The objectives of this work were: i) purify Sat; ii) to determine the action of Sat in different types of cells and iii) to characterize *in vitro* the role of Sat in EAEC infection. Accordingly, the presence of Sat in the culture supernatant of EAEC CV323 and DEC/Sat+ derived from diarrhea was confirmed by LC-MS/MS. Sat was purified from the culture of DEC/Sat+ and utilized to produce rabbit antibodies anti-Sat. The cytotoxic effect of Sat was investigated in cells derived from the endothelium (HUVEC) and the urinary (Y1, LLC-PK1, HEK-293) and gastrointestinal (Caco-2) systems. The cytotoxic parameters analyzed were cellular detachment and alterations in the morphology, permeability and mitochondrial metabolism of the cells. To investigate the role of Sat in EAEC infection, Y-1 cells were incubated with EAEC CV323 and DEC/Sat+ in the presence or absence of PMSF (a serine protease inhibitor) and rabbit antibodies anti-Sat. The parameters analyzed were cellular detachment and alteration in the morphology of the cells. The results demonstrated that: i) Sat is secreted by EAEC CV323 and DEC/Sat + and in both strains there are two mutations in amino acid residues that did not interfere with enzymatic activity; ii) endothelium cells are more sensitive to the Sat effect than the cells derived from urinary tract system, being the gastrointestinal cell lineage the most resistant one; iii) Sat secreted by EAEC CV323 during infection induced intense cellular damage which in the presence of anti-Sat antibodies and PMSF was reduced in about 80 to 90%, respectively. This is the first work demonstrating the expression of Sat by EAEC and the action of the toxin on endothelial cells suggesting that the role of Sat may be broader in pathogenesis than has been proposed so far.

Keywords: Toxin Sat. Serino protease autotransporter of *Enterobacteriaceae* (SPATE). Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC). Cytotoxicity. Infection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Padrão de adesão agregativa (AA) em células HEp-2	20
Figura 2 - Esquema dos principais fatores de virulência de EAEC	21
Figura 3 – Esquema da estrutura das proteínas autotransportadoras	23
Figura 4 – Sistema de secreção tipo V em bactérias Gram-negativas	23
Figura 5 – Amplificação do fragmento do gene <i>sat</i>	53
Figura 6 - Ensaio de adesão bacteriana às células HEp-2	56
Figura 7 - Alinhamento múltiplo das sequências nucleotídicas do fragmento correspondente ao gene parcial de <i>sat</i>	57
Figura 8 – Análise da sequência parcial do gene <i>sat</i> pelo programa BLAST	59
Figura 9 – Alinhamento múltiplo de aminoácidos do fragmento parcial de Sat das cepas EC233/93 e EAEC CV323/77	60
Figura 10 – Proteína obtida do sobrenadante do cultivo da cepa DEC/Sat+ submetida à espectrometria de massa	63
Figura 11 - Identificação da proteína Sat por espectrometria de massa	64
Figura 12 – Obtenção de Sat por gel filtração	67
Figura 13 - Obtenção de Sat por coluna de afinidade à serino-protease	68
Figura 14 - Atividade enzimática de Sat	70
Figura 15 – Titulação do soro do coelho imunizado com Sat purificada	71
Figura 16 - Reconhecimento de Sat pelo anticorpo policlonal anti-Sat	72
Figura 17 – Cinética da ação de Sat sobre as células da linhagem Y1	74
Figura 18 – Avaliação da citotoxicidade de Sat em células da linhagem Y1	75
Figura 19 – Neutralização do efeito citotóxico de Sat em células Y1	77
Figura 20 – Avaliação da Citotoxicidade de Sat em células LLC-PK1	79

Figura 21 – Avaliação da citotoxicidade de Sat em células HEK-293	82
Figura 22 - Avaliação da citotoxicidade de Sat em células Caco-2	85
Figura 23 – Avaliação da citotoxicidade de Sat em células HUVEC	86
Figura 24 – Análise comparativa do efeito citotóxico observado nas diferentes linhagens celulares, no menor tempo de incubação necessário no dano celular	87
Figura 25 - Cinética de secreção de Sat em meios de cultura distintos	89
Figura 26 - Cinética de crescimento das diferentes cepas bacterianas	89
Figura 27 - Análise do perfil de transcrição do gene <i>sat</i> em bactérias durante a infecção	90
Figura 28 – Sat secretada durante a infecção de células Y1	91
Figura 29 – Avaliação da citotoxicidade de Sat durante a infecção em células Y1	92
Figura 30 – Neutralização de Sat durante a infecção de células Y1	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Cepas da bacterioteca do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan isoladas de diarreia infantil	30
Tabela 2 - Cepas bacterianas utilizadas como controle	30
Tabela 3 – Linhagens celulares utilizadas	31
Tabela 4 – Marcadores de virulência bacteriana específicos dos patótipos EPEC e EAEC	34
Tabela 5 – Condições de amplificação dos diferentes genes de autotransportadoras	35
Tabela 6 - Genes <i>icd</i> e <i>sat</i> com os respectivos iniciadores	51
Tabela 7 – Marcadores de virulência de EPEC e EAEC investigados	54
Tabela 8 – Genes de proteínas autotransportadoras investigados nas cepas EAEC CV323 e DEC/Sat+	61
Tabela 9 – Condições de cultivo bacteriano para obtenção de Sat	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg -	microgramas
µL -	microlitro
µM -	micromolar
AA -	adesão agregativa
AAFs -	fímbrias de aderência agregativa
Abz -	ácido <i>orto</i> -aminobenzóico
actina-F –	Filamento de actina
AT -	autotransportadora
cDNA –	DNA complementar
cm ² –	centímetros quadrados
CO ₂ –	dióxido de carbono
Da -	Daltons
DAB -	diaminobenzidina
DAEC -	<i>Escherichia coli</i> de adesão difusa
DECs -	<i>Escherichia coli</i> diarreiogênicas
DMEM –	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA -	Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs -	deoxyribonucleotide triphosphate
DTT –	Ditiotreitol
EAEC -	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EAST1 -	toxina termoestável de EAEC
EDDnp –	etilenodiamina
EDTA –	ácido etilenodiamino tetra-acético
EIEC -	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasora
ELISA -	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPEC -	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ETEC -	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
eV –	elétron-Volt
ExPEC -	<i>E. coli</i> extraintestinais
FRETs -	<i>Fluorescence resonance energy transfer</i>
g –	Força gravitacional

IFN- γ –	Interferon gama
IL-1 β –	Interleucina 1 beta
IL-6 –	Interleucina 6
iNOS –	Óxido nítrico sintases
KCl –	cloreto de potássio
kDa –	kilo Dalton
KH ₂ PO ₄ –	fosfato de potássio dibásico
kV –	kilo Volt
L –	Litro
LB –	Caldo Luria Bertani
LBA –	Agar Luria Bertani
LC-MS/MS –	Cromatografia líquida - espectrometria de massa/espectrometria de massa
LFA 1 –	Antígeno associado à função linfocitária 1
<i>m/z</i> -	Relação massa/carga
mg -	miligrama
MgCl ₂ –	Cloreto de magnésio
min. -	minutos
mL -	mililitros
mm –	milímetros
mM -	milimolar
MM –	Padrão de massa molecular de proteínas
MOI –	Multiplicidade de infecção
MS ¹ -	primeiro estágio da espectrometria de massa
Na ₂ HPO ₄ –	Fosfato de sódico dibásico
NaCl –	cloreto de sódio
OPD -	o-fenilenodiamina
PMSF -	fenilmetanosulfonilfluoreto
ppm –	partículas por milhão
rpm –	rotações por minuto
RT-PCR –	Reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase
SCCE -	Suplemento de crescimento de células endoteliais de tecido neural bovino

SDS-PAGE –	dodecil-sulfato de sódio- eletroforese em gel de poliacrilamida
SFB –	soro fetal bovino
SPATEs -	serino-proteases autotransportadoras de <i>Enterobacteriaceae</i>
STEC -	<i>Escherichia coli</i> produtora da toxina de Shiga
TAE -	tampão tris-acetato-EDTA
TNF- α –	fator de necrose tumoral alfa
TSB –	caldo tripticaseína de soja
UF/min/ μ g –	unidade de fluorescência por minuto por micrograma
UFC -	Unidades formadoras de colônias
UPEC –	<i>Escherichia coli</i> uropatogênica
V -	Volts
X –	vezes
λ_{EM} -	<i>Fluorescence excitation wave lengths</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Classificação das <i>Escherichia coli</i> patogênicas	18
1.2 <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC)	18
1.3 Proteínas autotransportadoras	22
1.3.1 <i>Serino-Proteases Autotransportadoras de Enterobacteriaceae (SPATEs)</i>	24
1.3.1.1 Estrutura das SPATEs	24
1.3.1.2 Classificação das SPATEs	25
1.3.1.3 Toxina Sat	25
2 OBJETIVOS	29
2.1 Objetivos específicos	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 Cepas bacterianas	30
3.2 Células de linhagem	31
3.3 Ensaio de adesão bacteriana às células da linhagem HEp-2	32
3.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	32
3.5 Eletroforese em gel de agarose	37
3.6 Sequenciamento do gene <i>sat</i>	37
3.7 Obtenção da proteína Sat	38
3.7.1 Condições do cultivo da cepa EC233/93	38
3.7.2 Análise da proteína por SDS-PAGE	38
3.7.3 Identificação de Sat no sobrenadante do cultivo bacteriano por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS)	39
3.7.3.1 Cromatografia líquida LC-MS/MS	40
3.7.3.2 Busca no banco de dados	41
3.7.4 Purificação de Sat	41
3.7.4.1 Gel filtração	41
3.7.4.2 Afinidade à serino-protease	42
3.8 Quantificação de proteínas	42
3.9 Avaliação da atividade da toxina	42
3.10 Produção de anticorpos policlonais monoespecíficos anti-Sat	43
3.10.1 Imunização do coelho	43
3.10.2 Determinação do título de anticorpos	43

3.10.3 Sangria total do coelho	44
3.10.4 Preparo do soro para uso	44
3.10.4.1 Preparo das bactérias para adsorção	44
3.10.4.2 Adsorção do soro	45
3.10.5 Reconhecimento de Sat pelo anticorpo policlonal	45
3.10.5.1 Preparo das cepas	45
3.10.5.2 Precipitação das proteínas da cultura bacteriana	45
3.10.5.3 Western blotting	45
3.11 Ensaios de citotoxicidade	46
3.11.1 Avaliação da morfologia celular	46
3.11.2 Avaliação de destacamento celular	47
3.11.3 Permeabilidade celular	47
3.11.4 Avaliação do metabolismo celular	47
3.12 Ensaio de neutralização do efeito citotóxico	48
3.13 Avaliação da interferência de Sat durante a infecção <i>in vitro</i>	48
3.13.1 Estabelecimento da cinética de secreção de Sat pela bactéria	48
3.13.2 Padronização das condições de infecção	49
3.13.2.1 Curva de Crescimento	49
3.13.2.2 Determinação do número de bactérias	49
3.13.3 Ensaios de infecção	49
3.13.4 Avaliação de destacamento celular	50
3.14. RT-PCR gene <i>sat</i>	50
3.14.1 Extração de RNA total	50
3.14.2 Transcrição Reversa RT	50
3.14.3 RT-PCR	51
3.14.4 Eletroforese em gel de agarose e quantificação	51
3.15 Investigação da presença de Sat	52
3.16 Ensaios de neutralização de Sat durante a infecção <i>in vitro</i>	52
3.17 Análises estatísticas	52
4 RESULTADOS	53
4.1 Caracterização das cepas bacterianas	53
4.1.1 Pesquisa de genes	53
4.1.2 Identificação do padrão de adesão	54
4.1.3 Sequenciamento do fragmento do gene <i>sat</i>	55

4.1.4 Pesquisa de genes de autotransportadoras	60
4.2 Obtenção da toxina Sat	62
4.2.1 Cultivo bacteriano	62
4.2.2 Identificação da proteína	63
4.2.3 Purificação de Sat	66
4.2.3.1 Gel filtração	66
4.2.3.2 Coluna de afinidade à serino-protease	66
4.2.4 Avaliação da atividade enzimática da toxina	69
4.3 Obtenção do anticorpo anti-Sat	71
4.4 Avaliação da atividade citotóxica de Sat	72
4.4.1 Células de linhagem Y1	73
4.4.1.1 Neutralização da toxina	76
4.4.2 Células da linhagem LLC-PK1	78
4.4.3 Células da linhagem HEK-293	81
4.4.4 Células da linhagem Caco-2	84
4.4.5 Células HUVEC	84
4.5 Avaliação da ação citotóxica de Sat durante infecção <i>in vitro</i>	87
4.5.1 Estabelecimento das condições ideais do cultivo bacteriano para os ensaios de infecção celular	87
4.5.2 Infecção das células Y1 por cepas bacterianas secretoras de Sat	90
4.5.3 Neutralização do efeito de Sat durante a infecção	94
5 DISCUSSÃO	96
6 CONCLUSÕES	103
7 REFERÊNCIAS	104

1 INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas estão entre as maiores causas de morte infantil mundial em crianças menores de cinco anos. Dos 5,6 milhões dos óbitos ocorridos em 2016, pneumonia (13 %), diarreia (8 %) e sepse/meningite neonatal (7 %) são as principais causas (LIU et al., 2016; UNITED; MORTALITY, 2017).

A diarreia pode ser ocasionada por vírus, parasitas, fungos e bactérias. Entre as bactérias, *Escherichia coli* é a espécie mais prevalente. Trata-se de bacilo Gram-negativo pertencente à família *Enterobacteriaceae* (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; CROXEN et al., 2013).

1.1 Classificação das *Escherichia coli* patogênicas

Sabe-se que *E. coli* inicia a colonização do trato digestivo logo nas primeiras horas após o nascimento, estabelecendo uma relação de simbiose com o hospedeiro, fundamental para a formação da microbiota intestinal (PALMER et al., 2007; ROGER; MCCARTNEY, 2010). No entanto, sabe-se que *E. coli* comensal pode adquirir genes relacionados a fatores de virulência e, a partir disso, tornar-se patogênica.

E. coli patogênicas subdividem-se em *E. coli* intestinal e extraintestinal, isto porque *Escherichia coli* diarreiogênicas (DECs) podem ascender para outros nichos diferentes da mucosa intestinal, tornando-se *E. coli* extraintestinal (ExPEC). As ExPECs são *E. coli* uropatogênicas (UPEC), principais agentes etiológicos da infecção do trato urinário, mas também aquelas que ganham a corrente sanguínea, podendo causar meningite ou sepse (NATARO; KAPER, 1998; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; WEINTRAUB, 2007).

As DECs são subdivididas em seis patótipos, a saber: *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC); *Escherichia coli* produtora da toxina de Shiga (STEC); *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC); *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC); *Escherichia coli* de adesão difusa (DAEC) e *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; CROXEN et al., 2013).

1.2 *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC)

E. coli enteroagregativa (EAEC) é a categoria mais prevalente no Brasil e a sua infecção acarreta elevado impacto na saúde pública mundial, afetando tanto países em desenvolvimento quanto países desenvolvidos. (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; CROXEN et al., 2013; ELIAS; NAVARRO-GARCIA, 2016).

EAEC, considerada patógeno emergente, acomete tanto crianças como adultos e é conhecida como agente etiológico da diarreia do viajante, visto que é ocasionada pela ingestão de alimentos e água contaminados (WEINTRAUB, 2007). Em indivíduos imunocomprometidos pode acarretar a diarreia persistente (CÁRCAMO et al., 2005). Em 1997, no Japão, a EAEC foi causadora de um importante surto, afetando aproximadamente 2.600 crianças de uma escola (GRAD et al., 2012). Em um vilarejo da Índia, um surto de diarreia causado pela EAEC acometeu 15 % da população (PAI et al., 1997). Em 2011, na Alemanha, outra ocorrência de surto acometeu 4.321 indivíduos e ocasionou mais de 50 mortes, tendo sido causado por uma cepa híbrida sorogrupo O104:H4 e que se tratava de uma EAEC expressando o gene da toxina de Shiga, característica de STEC (GRAD et al., 2012; TIETZE et al., 2015).

Há estudos que demonstraram a presença de EAEC em indivíduos assintomáticos. No entanto, a infecção por EAEC pode levar à colonização persistente, podendo ocasionar déficit no desenvolvimento físico e cognitivo de crianças (JENSEN et al., 2014).

Estudos de etiologia de diarreia conduzidos entre 2013 e 2016 em alguns países das Américas mostraram que a EAEC continua sendo a categoria de DEC mais prevalente (GÓMEZ-DUARTE et al., 2013; GONZALES et al., 2013; ASSIS et al., 2014; BECKER-DREPS et al., 2014; GUTIÉRREZ et al., 2014; PATZI-VARGAS et al., 2015; PLATTS-MILLS et al., 2015; VARELA et al., 2015). No Brasil, a maior prevalência de EAEC também foi comprovada por Dias et al. (2016).

Os avanços obtidos no estudo da EAEC foram, na maioria, realizados com a cepa protótipo 042 (sorotipo O44:H18), isolada de um caso de diarreia infantil no Peru (NATARO et al., 1995). Classicamente, este patótipo apresenta um padrão de adesão à célula hospedeira característico, denominada adesão agregativa (AA). Neste padrão, as bactérias são observadas no ensaio de adesão clássico como “tijolos em pilhas” aderindo-se as células e à lamínula igualmente. (Figura 1) (NATARO; KAPER, 1998; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Figura 1 - Padrão de adesão agregativa (AA) em células HEp-2.

Padrão de adesão agregativa (AA) em células HEp-2 infectadas com a EAEC cepa protótipo 042. As bactérias agregam-se à semelhança de “tijolos em pilhas”, tanto nas células como na lamínula. O padrão de adesão AA é característico do patótipo EAEC. As setas indicam as bactérias agregadas.

Fonte: Estrada-Garcia; Navarro-Garcia (2012).

Atualmente, EAEC pode ser classificada como típica ou atípica com base na presença ou ausência, respectivamente, do gene regulador *aggR*. Esse gene é responsável pela regulação de vários fatores de virulência durante a patogênese, tais como adesinas, toxinas e formação de biofilme (MORIN et al., 2013). EAEC típica, portadora do gene *aggR*, é considerada mais virulenta do que a atípica, porém esta última também pode carregar vários outros fatores de virulência, inclusive de outras categorias de DEC. Devido à esta característica de obter fatores de virulências diversos, EAEC é conhecida como um grupo altamente heterogêneo (ESTRADA-GARCIA; NAVARRO-GARCIA, 2012).

Vários fatores de virulência relacionados com a capacidade de produção de toxinas e adesinas já foram descritos em EAEC, porém a presença destes fatores pode variar de acordo com a cepa bacteriana. Consequentemente, a heterogeneidade observada entre as cepas tem dificultado a definição de apenas um marcador genético como sendo característico de EAEC. Em função disto, a identificação do padrão AA de adesão ainda é utilizado na classificação dessa categoria (ELIAS; NAVARRO-GARCIA, 2016).

Figura 2 - Esquema dos principais fatores de virulência de EAEC.

Principais fatores de virulência descritos em EAEC: adesinas (AAFs), dispersinas e toxinas (EAST1, ShET1, HlyE, Pic e Pet), sendo o gene *aggR* o regulador central. A inflamação e secreção de muco, principais mecanismos de resposta celular dos enterócitos na infecção por EAEC também estão demonstrados.

FONTE: Estrada-Garcia; Navarro-Garcia (2012).

Os fatores de virulência melhor caracterizados em EAEC (Figura 2) são as fímbrias de aderência agregativa (AAF) I, II, III e IV e a toxina termoestável de EAEC (EAST-1) (NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011; CROXEN et al., 2013). Além dessas, a *Shigella enterotoxin 1* (ShET1), relacionada com acúmulo de fluidos em modelo animal de alça ligada, a dispersina, responsável pela disseminação da infecção em diferentes nichos da mucosa intestinal e a proteína codificada pelo gene *shf* (FUJIYAMA et al., 2008), relacionada à formação de biofilme, têm sido relacionadas como importantes fatores no estabelecimento da infecção por EAEC (NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011).

Têm sido descritos importantes fatores de virulência em membros da família das serino-proteases autotransportadoras de *Enterobacteriaceae* (SPATEs) e estas proteínas têm apresentado papel significativo no processo patogênico. Em EAEC, as proteínas Pet (citotóxica) e Pic (mucinolítica) foram as mais estudadas até o momento, principalmente por terem sido descritas na cepa protótipo EAEC 042. No entanto, a presença de Pet não é

frequente em todos os estudos investigativos de EAEC. Por outro lado, genes de outras SPATEs têm sido descritos, cada vez mais, em EAEC isoladas de diarreia (GUYER et al., 2000; TADDEI et al., 2003; BOISEN et al., 2009; ANDRADE et al., 2017).

1.3 Proteínas autotransportadoras

Atualmente, vários estudos têm buscado investigar o papel das proteínas autotransportadoras na patogênese de diferentes bactérias Gram-negativas (BRUNDER; SCHMIDT; KARCH, 1997; GUYER et al., 2002; BETANCOURT-SANCHEZ; NAVARRO-GARCIA, 2009; RUIZ et al., 2014; VIJAYAKUMAR et al., 2014; ABREU et al., 2016). Estas proteínas são assim denominadas por apresentarem, na sua sequência de aminoácidos, informações suficientes para promover o seu deslocamento para o meio extracelular, com a possibilidade de permanecer ancorada à membrana externa ou ser liberada ao meio externo (NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011; RUIZ-PEREZ; NATARO, 2014).

Conforme mostrado na figura 3, estas proteínas apresentam três domínios: no primeiro, N-terminal, está contido o peptídeo-sinal que varia de 48 a 59 aminoácidos e corresponde ao core hidrofóbico da proteína onde há o sítio de clivagem sec-dependente; o segundo corresponde ao domínio passageiro (proteína madura) e o terceiro, diz respeito à região C-terminal, onde há as informações para a formação do poro, através do qual a proteína madura é transportada (HENDERSON; NAVARRO-GARCIA; NATARO, 1998; RUIZ-PEREZ; NATARO, 2014).

O peptídeo sinal da proteína formada no citoplasma liga-se ao sistema de transporte Sec da membrana interna da bactéria, por onde o domínio passageiro e translocador (também chamado de β -barril) são translocados para o espaço periplasmático. Nesse local, chaperonas como SurA, Skp e/ou DegP e/ou FkpA se ligam a esses dois domínios, estabilizando-os para evitar o “dobramento prematuro” ou agregação. O complexo Bam de proteínas catalisa a integração do domínio translocador na membrana externa e também a translocação do domínio passageiro, através da membrana externa, na direção C- para N terminal, seguido pela clivagem intramolecular do β -barril. O transporte dessa classe de proteínas é dependente do sistema de secreção tipo V, presente nas bactérias Gram-negativas (Figura 4).

Figura 3 – Esquema da estrutura das proteínas autotransportadoras.

Esquema da estrutura das proteínas autotransportadoras. Peptídeo sinal (amarelo), domínio passageiro (laranja) e domínio translocador (cinza).

Fonte: (Ruiz-Perez; Nataro, 2014).

Figura 4 – Sistema de secreção tipo V em bactérias Gram-negativas.

Sistema de secreção tipo V em bactérias Gram-negativas. A proteína formada no citoplasma liga-se ao sistema Sec na membrana interna pelo peptídeo sinal. A proteína é translocada para o periplasma e chaperonas, como SurA, Skp, DegP e FkpA, ligam-se à proteína para estabilizá-la. O domínio translocador insere-se na membrana externa, catalisada pelas proteínas do complexo Bam, formando um poro, por onde o domínio passageiro é transferido para o meio externo.

Fonte: (Ruiz-Perez; Nataro, 2014).

Além da importância das proteínas autotransportadoras na patogênese, as características destas proteínas estão sendo exploradas como ferramenta biotecnológica (VAN ULSEN et al., 2014). A principal característica deste grupo de proteínas é apresentar todas as informações para a sua própria exportação ao meio externo. A capacidade de transpor o periplasma e a membrana externa tem sido explorada como um modelo de entrega (liberação ou exposição na superfície) de proteínas de interesse.

A manutenção da estrutura das proteínas autotransportadoras, com a substituição do domínio passageiro por uma proteína de interesse, tem sido muito explorada e vem possibilitando a exposição ou secreção na superfície bacteriana de moléculas com diferentes funções biotecnológicas (SAMUELSON et al., 2002; JOSE; MEYER, 2007). Em função disso, o estudo de proteínas autotransportadoras tem caminhado junto a diversos avanços na área de biotecnologia (JOSE; MEYER, 2007).

1.3.1 Serino-Proteases Autotransportadoras de Enterobacteriaceae (SPATEs)

Uma família de proteínas autotransportadoras que tem se destacado é a das serino-proteases autotransportadoras de *Enterobacteriaceae* (SPATEs) (HENDERSON; NAVARRO-GARCIA; NATARO, 1998). Nesta família há um grande grupo de proteases tripsina-like secretadas, as quais estão envolvidas em diferentes processos biológicos, tais como aderência bacteriana, citotoxicidade, imunomodulação, formação de biofilme e atividade mucinolítica, eventos estes diretamente associados à patogênese de bactérias Gram-negativas (PALLEN; CHAUDHURI; HENDERSON, 2003; HENDERSON et al., 2004; WELLS et al., 2008; EASTON et al., 2011).

As SPATEs já foram descritas em diversos microrganismos intestinais como *E. coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *Edwardsiella* e *Citrobacter*, bem como em *E. coli* extraintestinais (ExPEC) associadas à infecção urinária (GUYER et al., 2000), septicemia (TAPADER et al., 2014), meningite (IQBAL et al., 2016) e até em uma cepa de probiótico (TOLOZA et al., 2015).

1.3.1.1 Estrutura das SPATEs

Esta família de proteínas autotransportadoras é caracterizada pela presença, no seu domínio passageiro, pela tríade catalítica composta pelos aminoácidos histidina (H), ácido aspártico (D) e serina (S), sendo esta última, a serina (S) catalítica que se encontra na

sequência de aminoácidos que identifica esta família (**GDSGS**) (Figura 3). Na ligação entre o domínio passageiro e o domínio translocador há dois resíduos de asparagina (N) consecutivas (Figura 3).

1.3.1.2 Classificação das SPATEs

Com base nas características estruturais de sequências de aminoácidos do domínio passageiro e na filogenia, as SPATEs foram subdivididas em classe I e II. As de classe 1 incluem as toxinas que induzem efeito citotóxico, enquanto as de classe 2 atuam como imunomoduladoras ou mucinases, as quais degradam o muco intestinal, sem apresentar qualquer indício de citotoxicidade (DUTTA et al., 2002; RUIZ-PEREZ; NATARO, 2014).

Vijayakumar et al. (2014) descreveu um suposto papel imunomodulatório atribuído à SPATE de classe I, denominada Crc1, presente em *Citrobacter rodentium*. Em um modelo de infecção *in vivo*, a produção de TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , iNOS, IL-6 e um aumento da infiltração de leucócitos foram observados em camundongos infectados com a bactéria recombinante para este gene. Tais resultados sugerem, pela primeira vez, que uma SPATE da classe I pode exercer um papel imunomodulatório, o que levanta novos questionamentos sobre os critérios utilizados nesta classificação.

O estudo da expressão e ação das SPATEs tem contribuído para o entendimento da patogênese de muitas bactérias Gram-negativas (HENDERSON et al., 2004; WELLS et al., 2008; EASTON et al., 2011; RUIZ et al., 2014). Genes de SPATEs, tanto de classe I (*pet*, *sat*, *espP* e *sigA*) como de classe II (*pic* e *sepA*), já foram descritos em EAEC, sendo as toxinas Pet e Pic as melhor estudadas (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; TORRES; ZHOU; KAPER, 2005; BOISEN et al., 2009; NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011; ANDRADE et al., 2017).

Dentre as SPATEs, uma toxina que vem se destacando com aumento da prevalência em cepas patogênicas é a Sat (*Secreted autotransporter toxin*), cuja expressão foi relacionada ao aumento da virulência de cepas de UPEC (GUYER et al., 2002).

1.3.1.3 Toxina Sat

Sat é uma SPATE de classe I, cujo domínio passageiro gera uma proteína de 107 kDa. O gene *sat* está localizado em uma ilha de patogenicidade contendo uma quantidade

significativamente menor de G/C, quando comparado ao restante do conteúdo cromossômico da bactéria *E. coli* K12, sugerindo ter havido uma transferência lateral (GUYER et al., 2000).

A expressão de Sat foi descrita primeiramente em UPEC isolada do sangue e urina de uma mulher com quadro de pielonefrite aguda (GUYER et al., 2000). Pouco tempo depois, a expressão foi demonstrada também em DAEC por Taddei et al. (2005). No entanto, a maioria dos estudos foi direcionada à investigação de Sat no contexto da infecção urinária (GUYER et al., 2000, 2002; MARONCLE et al., 2006).

Com o objetivo de verificar a importância de Sat na colonização e ascensão da bactéria aos rins, camundongos CBA foram infectados transuretralmente com a cepa HB101 e selvagem, expressando Sat. Os animais infectados com a cepa recombinante apresentaram alta produção de anticorpos anti-Sat, mas nenhuma diferença na colonização entre as cepas foi observada. No entanto, a análise de cortes histológicos revelou lesão na membrana glomerular, perda celular dos túbulos proximais e vacuolização citoplasmática nas células renais infectadas somente com a cepa recombinante (GUYER et al., 2002). Maroncle et al. (2006) observaram que as alterações morfológicas em células de bexiga e rim eram decorrentes da associação da toxina à foldrina, a qual está ligada à actina-F. Além desse alvo, a degradação de proteínas da membrana/citoesqueleto como LFA 1 e de proteínas nucleares, como proteínas associadas aos microtúbulos, também foram identificadas como alvo de Sat.

Em trabalho sobre a importância de Sat no contexto intestinal, Taddei et al., (2005) realizaram estudo *in vivo* com coelhos e observaram acúmulo de fluidos no intestino. Os cortes histológicos apresentaram dano celular, presença de vacuolização e perda das vilosidades dos enterócitos. No entanto, a melhor caracterização de Sat, até o momento, foi obtida em linhagens celulares originárias de rim e bexiga (GUYER et al., 2000, 2002; MARONCLE et al., 2006). Em células intestinais da linhagem Caco-2, Sat parece associar-se às proteínas ZO-1, ZO-3 e ocludina, proteínas estas ligadas às *tigh junctions*, acarretando um aumento na permeabilidade intercelular (GUIGNOT et al., 2007). Além destes, efeitos relacionados à indução da autofagia (LIÉVIN-LE MOAL et al., 2011) e degradação do fator V de coagulação também foram atribuídos à Sat como importante fator de virulência na patogenia por UPEC (DUTTA et al., 2002).

A expressão de Sat, até o momento, só foi vista em UPEC (GUYER et al., 2002; MARONCLE et al., 2006), DAEC (TADDEI et al., 2005) e em uma cepa de probiótico EcN

(TOLOZA et al., 2015), mas a presença do gene tem sido descrita em várias outras bactérias diarreio gênicas como EAEC (GUYER et al., 2000; NIYOGI; VARGAS; VILLA, 2004; BOISEN et al., 2009; ANDRADE et al., 2017), *Shigella* (GUYER et al., 2000; NIYOGI; VARGAS; VILLA, 2004), EPEC (GUYER et al., 2000), EHEC (GUYER et al., 2000), ETEC (TADDEI et al., 2003). No entanto, além da descrição do gene, há poucos trabalhos que correlacionaram a importância de Sat nas cepas intestinais (TADDEI et al., 2005; LIÉVIN-LE MOAL et al., 2011; TOLOZA et al., 2015). Exceto no estudo com DAEC, em nenhum outro patótipo intestinal a expressão de *sat* foi confirmada.

Mais recentemente, diferentes estudos têm encontrado o gene *sat* em cepas bacterianas originárias de outros sítios de infecção. O nosso grupo tem encontrado *sat* como o gene mais frequente (34,2 %) da família SPATE na coleção de cepas de *E. coli* isoladas de casos de bacteremia. Tapader et al. (2014), investigando a presença de diferentes SPATEs em cepas bacterianas isoladas de septicemia, fezes e meio ambiente, mostraram que a prevalência desses genes era significativamente maior em isolados de septicemia (89 %), do que os encontrados nas cepas fecais (7,5 %) ou nas provenientes do ambiente (3 %). Neste estudo, o gene *vat* (*vacuolating autotransporter toxin*) foi o mais frequente (51 %), seguido pelo gene *sat* (39 %). Além disso, Iqbal et al. (2016), ao estudar os marcadores moleculares de uma cepa isolada de um caso fatal de meningite neonatal, também identificou o gene *sat*.

Estes achados suscitam que Sat possa ter alguma relevância na patogenia de bactérias que colonizam outros nichos diferentes do sistema urinário e gastrointestinal. Em decorrência dos estudos relacionados à ação de Sat terem sido conduzidos por diferentes grupos, não houve uma sistematização com relação aos parâmetros investigados. A indução de vacuolização (GUYER et al., 2000) o destacamento celular (TADDEI et al., 2005) e a alteração da morfologia celular (MARONCLE et al., 2006) são alguns exemplos de efeitos que têm sido atribuídos à toxina. Entretanto, a maioria dos trabalhos foi realizada em células de rim e bexiga e os resultados gerados, por vezes, podem não ser representativos, por exemplo, em outro tipo celular ou espécie bacteriana.

O presente trabalho tem como objetivo contribuir para a melhor caracterização de Sat através de um estudo comparativo sobre a ação da toxina em linhagens celulares originárias dos supostos nichos de infecção de bactérias *sat*⁺. As linhagens utilizadas são originárias do trato urinário (células Y1, HEK-293 e LLC-PK1), do trato gastrointestinal (Caco-2) e do sistema circulatório (mais especificamente, células endoteliais do cordão umbilical humano -

HUVEC). Além disso, dada a relevância de EAEC como patógeno emergente, a alta prevalência do gene *sat* nesse patótipo e o desconhecimento de Sat como um fator de virulência na infecção por EAEC, foi realizado um estudo da expressão de Sat na infecção *in vitro* por EAEC.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi colaborar na caracterização da ação citotóxica da toxina Sat em modelos *in vitro*.

2.1 Objetivos específicos

- Obter Sat purificada.
- Produzir anticorpo anti-Sat.
- Traçar um perfil citotóxico de Sat em células de linhagens Y1, HEK-293, LLC-PK1 (trato urinário), Caco-2 (trato gastrointestinal) e HUVEC (células endoteliais).
- Avaliar a ação citotóxica de Sat em modelo de infecção por EAEC.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cepas bacterianas

As amostras bacterianas foram mantidas a -80 °C em caldo tripticaseína de soja (TSB) (BD, Maryland, NY, EUA), acrescido de glicerol a 40% e cultivadas em caldo LB (Luria Bertani) (BD, Maryland, NY, EUA) a 37 °C, por 18 h. Após esse período, para a confirmação de bactérias Gram-negativas, as culturas foram semeadas em ágar MacConkey (BD, Maryland, NY, EUA). As colônias isoladas a partir do ágar MacConkey foram semeadas em caldo LB para a utilização em todos os ensaios. Cepas bacterianas positivas para o gene *sat*, identificadas por Correa (2013), estão listadas na Tabela 1 e as cepas utilizadas como controles, nas Tabelas 2 e 5.

Tabela 1 – Cepas da bacterioteca do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan isoladas de diarreia infantil.

Identificação	Sorotipo	Localidade	Referência
CV323/77	O125ab:H21	SP/ Brasil	Freitas do Valle et al. (1997)
EC288/93	O126:H2	SP/ Brasil	Freitas do Valle (1998)
EC233/93	O126:H2	SP/ Brasil	Freitas do Valle (1998)

Tabela 2 - Cepas bacterianas utilizadas como controle.

Patótipo	Identificação	Sorotipo	Controle	Referência
DAEC	FBC114	ONT:H-	Sat +	Taddei et al. (2005)
<i>E. coli</i>	DH5 α	Competente	Negativo	Sambrook; Fritsch; Maniatis, 1989
<i>E. coli</i>	HB101	Comensal	Negativo	Sambrook; Fritsch; Maniatis, 1989
EAEC *	042	O44:H18	**	Nataro e Kaper (1998)
EPECt *	E2348/69	O127:H6	***	Nataro e Kaper (1998)

* Cepas protótipos; ** Marcadores de virulência e adesão AA de EAEC; *** Marcadores de virulência de EPEC típica.

3.2 Células de linhagem

As linhagens celulares foram mantidas em garrafa de cultura de 25 cm² (TPP, Suécia), incubadas em estufa a 37°C e em atmosfera úmida com 5 % de CO₂ (Forma Scientific, Marietta, Ohio, EUA), até atingirem aproximadamente 70 % de confluência. As referidas linhagens foram cultivadas em meio DMEM ou RPMI (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), sempre suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), conforme mostra a Tabela 3. Para os ensaios celulares (citotoxicidade ou adesão bacteriana), após a formação da monocamada, as culturas foram inicialmente lavadas com 5 mL de PBS (NaCl 8 g/L, KCl 0,2 g/L, Na₂HPO₄ 1,15 g/L e KH₂PO₄ 0,2 g/L, pH 7,2) (Merck, KGaA, Darmstadt, Germany) e, em seguida, incubadas por 1 minuto em 1 mL de solução de tripsina EDTA (250 mg/L) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil). O descolamento celular foi monitorado pela microscopia de luz (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) e, tão logo o desprendimento celular foi observado, a tripsina foi rapidamente neutralizada pela adição de 1 mL do meio de cultura (DMEM ou RPMI), suplementado com SFB. As células foram centrifugadas a 259 x g (Centrífuga 5804R, Eppendorf, EUA), por 5 min. a 4 °C e distribuídas na concentração de 2 x 10⁵ ou 5 x 10⁴ células/poço em placas de cultura contendo 24 poços (Biofil, China) com lamínula de vidro de 13 mm de diâmetro (Perfecta, São Paulo, SP, Brasil) ou placas de 96 poços (Biofil), respectivamente. As culturas foram mantidas em atmosfera úmida de 5 % de CO₂ a 37 °C e utilizadas sempre após 24 h de distribuição. As linhagens celulares utilizadas neste trabalho estão relacionadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Linhagens celulares utilizadas.

Linhagem	Tipo celular	Tecido	Espécie	ATCC	Meio + % SFB
HUVEC	Endotelial	Veia umbilical	Humana	CRL-1730	RPMI + 10% SFB + (SCCE)*
Caco-2	Epitelial	Colorretal	Humana	HTB-37	DMEM + 15%
Y1	Epitelial	Córtex adrenal	Camundongo	CCL-79	DMEM + 10%
LLC PK1	Epitelial	Rim	Porco	CL-101	DMEM + 10%
HEK 293	Epitelial	Rim	Humana	CRL-1573	DMEM + 10%
HEp-2	Epitelial	Laringe	Humana	CCL-23	DMEM + 5%

* Suplemento de crescimento de células endoteliais de tecido neural bovino 100 µg/mL (ECGS) Catálogo nº E2759 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA).

3.3 Ensaio de adesão bacteriana às células da linhagem HEp-2

Os ensaios de adesão bacteriana foram realizados em culturas de células HEp-2, conforme descrito por Cravioto et al. (1979), com modificações. Para isso, as células foram distribuídas em placa de 24 poços, conforme descrito no item 3.2. No dia seguinte, as células foram infectadas com as cepas EC288/93, EC233/93 e CV323/77, em fase logarítmica de crescimento, na diluição final 1:50 em meio DMEM + 2 % SFB + 1 % de Manose (InLab, São Paulo, SP, Brasil). Após 3 h de incubação a 37 °C e 5 % de CO₂, as células foram lavadas três vezes com PBS para a retirada das bactérias não aderidas. Em seguida, as culturas permaneceram incubadas por mais 3 h, quando foram lavadas novamente três vezes com PBS. As células presentes nas lamínulas de vidro foram fixadas com metanol (Synth, Diadema, SP, Brasil) por 30 min. e coradas com May-Grunwald (Merck, Darmstadt, HE Germany), diluído 1:2 em tampão Sorensen (80,4 mL de Na₂HPO₄ (133mM) + 19,6 mL de KH₂PO₄ (133 mM)) (Merck), durante 15 min. e com Giemsa (Merck, Darmstadt, HE Germany) 1:2 no mesmo tampão, por 25 min. As lamínulas foram montadas sobre lâminas de vidro com o auxílio do Entellan® (Merck, Darmstadt, Alemanha) e, em seguida, analisadas por microscopia de luz no aumento de 1.000X (Carl Zeiss). O registro fotográfico digital foi realizado pela câmera acoplada ao microscópio com auxílio do programa ZEN 2 Blue edition.

3.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi empregada nos seguintes procedimentos: i) detecção do gene *sat*, ii) investigação de marcadores de virulência característicos dos patótipos EAEC e EPEC (Tabela 4) e iii) investigação da presença de genes de autotransportadoras (Tabela 5). A sequência de todos os seus iniciadores utilizados e os respectivos ciclos de amplificação estão mostrados nas Tabelas 4 e 5.

Para cada reação foram utilizadas 0,2 µM de cada um dos iniciadores específicos F (*forward*) e R (*reverse*), 2,5 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 1,5 mM de MgCl₂, tampão de PCR 1X (Invitrogen), 0,2 mM da mistura de dNTPs (Invitrogen) e água Milli-Q estéril para o volume final de 25 µL ou 50 µL.

Os DNAs moldes utilizados foram originários de lisados bacterianos obtidos a partir de 1 mL da cultura, incubados a 37 °C, por 18 h, em caldo LB. A cultura foi transferida para um microtubo de polipropileno estéril de 1,5 mL e centrifugado a 4.200 x g, por 5 min. a 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, o precipitado ressuspensão em 100 µL de água Milli-Q estéril e submetido à fervura por 5 min. em banho seco (SPLabor,

São Paulo, SP, Brasil). Imediatamente após a fervura, o tubo foi resfriado em banho de gelo e centrifugado a $4.200 \times g$, por 5 min. a 4°C . O sobrenadante, contendo o DNA molde, foi transferido para um microtubo estéril, com capacidade de $0,6 \mu\text{L}$ e estocado a -20°C até o momento do uso.

Tabela 4 – Marcadores de virulência bacteriana específicos dos patótipos EPEC e EAEC.

Patótipo	Marcadores de virulência	Sequência dos <i>iniciadores</i> 5' → 3'	Ciclo de amplificação	Produto (pb)	Temperatura de Anelamento	Cepa	Referência
EPEC	<i>bfpA</i>	GGTCTGTCTTTGATTGAATC TTTACATGCAGTTGCCGCTT	5' 94°C; 30 x(1' 94°C, 1' 55°C, 1' 72°C) e 7' 72°C	485	55 °C	E2348/69	Elias et al. (2002)
	<i>per A</i>	AACAAGAGGAGAATTTAGCG CTTGTGTAATAGAATAATCGC	5' 94°C; 30 x(1' 94°C, 1' 55°C, 1' 72°C) e 7' 72°C	770	55 °C	E2348/69	Andrade et al. (2017)
	<i>per B</i>	ATGGATGTATGAATG TATTG CTATGGTGCTCTTTTGATT	5' 94°C; 30 x(1' 94°C, 1' 55°C, 1' 72°C) e 7' 72°C	350	55 °C	E2348/69	Andrade et al. (2017)
	<i>per C</i>	ATGGAAATAAGAGATAAAAAG TTAATTTTCCTTGTAGTTTCT	5' 94°C; 30 x(1' 94°C, 1' 55°C, 1' 72°C) e 7' 72°C	270	55 °C	E2348/69	Andrade et al. (2017)
	<i>eae</i>	CATTGATCAGGATTTTCTGGT TCCAGAATAATATTGTTATTACG	5' 94°C; 35 x(1' 94°C, 40" 55°C, 1' 72°C) e 7' 72°C	510	55 °C	E2348/69	Andrade et al. (2017)
EAEC	<i>aatA</i>	CTGGCGAAAGACTGTATCAT CAATGTATAGAAATCCGCTGTT	5' 94°C; 30 x(30" 94°C, 40" 50°C, 1' 72°C) e 7' 72°C	630	50 °C	042	Schmidt et al. (1995)
	<i>aggR</i>	CGATACATTAAGACGCCTAAAG TCTGATACATTAAATTCATCTGC	5' 94°C; 30 x(1' 94°C, 1' 56°C, 1' 72°C) e 7' 72°C	343	56 °C	042	Andrade et al. (2017)

Tabela 5 – Condições de amplificação dos diferentes genes de autotransportadoras.

Genes	Sequência dos <i>iniciadores</i> 5' → 3'	Ciclo de amplificação	Produto (pb)	Temperatura de Anelamento	Cepa Controle (+)	Referência
<i>aida-I</i>	GTTCTCTCTGATGGTTATGC AACATTGACCATAACCGCCG	5' 94°C; 30 x(1' 94°C, 1' 60°C, 1' 72°C) e 7' 72°C	342	60 °C	DAEC 2787	Abreu et al. (2013)
<i>cah</i>	CGTATCGCTGTGCCCCGATAAC CCGTATACGAGTTGTCAGAATCA	5' 94°C; 30 x(1' 94°C, 1' 58°C, 1' 72°C) e 7' 72°C	707	58 °C	EHEC EDL933	Restieri et al. (2007)
<i>eatA</i>	TTGGCGTTCTGTCATCAGGA CCTTACCAGAGAGTGGATG	5' 94°C; 30 x(1' 94°C, 1' 57°C, 1' 72°C) e 7' 72°C	1068	57 °C	ETEC H10407	Andrade et al. (2017)
<i>ehaA</i>	CACAGATGACAGAAGGGAC GTTTACCCCACTCGTCAG	5' 94°C; 30 x(1' 94°C, 1' 59°C, 1' 72°C) e 7' 72°C	326	59 °C	EHEC EDL933	Abreu et al. (2013)
<i>ehaB</i>	CAG GGTTATGAGTGGGAAG CCACTTGCTGCCGTTGTT	5' 94°C; 30 x(1' 94°C, 1' 59°C, 1' 72°C) e 7' 72°C	423	59 °C	EHEC EDL933	Abreu et al. (2013)
<i>ehaC</i>	TAATGACGGCAAAGGTGGT CATTTCATCAGGGAGTTGCT	5' 94°C; 30 x(1' 94°C, 1' 59°C, 1' 72°C) e 7' 72°C	599	59 °C	EHEC EDL933	Abreu et al. (2013)
<i>ehaD</i>	GGCAGTTGACACGATTATTA CTGTGCTTTGCCATTATC	5' 94°C; 30 x(1' 94°C, 1' 59°C, 1' 72°C) e 7' 72°C	821	59 °C	EHEC EDL933	Abreu et al. (2013)
<i>ehaJ</i>	ACGGGCTGCTGAGTATTTT GTAGTTTGCCACATCACCG	5' 94°C; 30 x(1' 94°C, 1' 60°C, 1' 72°C) e 7' 72°C	455	60 °C	EPEC E2348/69	Abreu et al. (2013)
<i>epeA</i>	GGGAGAGTTCAGGCATTTA CAGCGTTACCTTACTTGAG	5' 94°C; 30 x(1' 94°C, 1' 57°C, 1' 72°C) e 7' 72°C	783	57 °C	EHEC EH41	Abreu et al. (2013)
<i>espC</i>	GACAGTTTTACGTTAGCTGG TCCTGCCGAAAACCGAAGC	5' 94°C; 30 x(1' 94°C, 1' 55°C, 1' 72°C) e 7' 72°C	1099	55 °C	EPEC E2348/69	Andrade et al. (2017)
<i>espI</i>	ATGGACAGAGTGGAGACAG GCCACCTTTATTCTCACCA	5' 94°C; 30 x(1' 94°C, 1' 52°C, 1' 72°C) e 7' 72°C	560	52 °C	STEC O113:H21	Schmidt et al. (2001a)
<i>espP</i>	GTCCATGCAGGGACATGCCA TCACATCAGCACCGTTCTCTAT	5' 94°C; 30 x(1' 94°C, 1' 55°C, 1' 72°C) e 7' 72°C	547	55 °C	EHEC EDL933	Restieri et al. (2007)
<i>pet</i>	GGCACAGAATAAAGGGGTGTTT CCTCTTGTTCCACGACATAC	5' 94°C; 30 x(1' 94°C, 1' 58°C, 1' 72°C) e 7' 72°C	302	58 °C	EAEC 042	Restieri et al. (2007)

Continuação da Tabela 5 – Condições de amplificação dos diferentes genes de autotransportadoras.

Gene	Sequência dos iniciadores 5' → 3'	Ciclo de amplificação	Produto (pb)	Temperatura de Anelamento	Controle (+)	Referência
<i>pic</i>	CCGGTGACAACTTGCATAA CATAATTTCTGTTCCGTCA	5' 94°C; 30 x(1' 94°C, 1' 60°C, 1' 72°C) e 7' 72°C	978	60 °C	EAEC 042	Abreu et al. (2016)
<i>sab</i>	GGTGGATACAGCAGGTAATG TATCTCACCACCTGCTATCG	5' 94°C; 30 x(1' 94°C, 1' 59°C, 1' 72°C) e 7' 72°C	163	59 °C	EHEC EH41	Herold, Paton e Paton (2009)
<i>sat</i>	TCAGAAGCTCAGCGAATCATTG CCATTATCACCAGTAAAACGCACC	5' 94°C; 30 x(1' 94°C, 1' 59°C, 1' 72°C) e 7' 72°C	930	59 °C	DAEC FBC114	Boisen et al. (2009)
<i>tibA</i>	ATGGTTGGCAGTGACGGTA GGTTGTTGACGGACGGA	5' 94°C; 30 x(1' 94°C, 1' 58°C, 1' 72°C) e 7' 72°C	480	58 °C	ETEC H10407	Abreu et al. (2013)
<i>vat</i>	AACGGTTGGTGGCAACAATCC AGCCCTGTAGAATGGCGAGTA	5' 94°C; 30 x(1' 94°C, 1' 59°C, 1' 72°C) e 7' 72°C	420	59 °C	RS218	Restieri et al. (2007)
<i>tsh</i>	CCGTACACAAATACGACGG GGATGCCCCCTGCAGCGT	5' 94°C; 30 x(1' 94°C, 1' 59°C, 1' 72°C) e 7' 72°C	304	59 °C	APEC 01	Restieri et al. (2007)
<i>sigA</i>	CCGACTTCTCACTTTCTCCCG CCATCCAGCTGCATAGTGTTTG	5' 94°C; 30 x(1' 94°C, 1' 58°C, 1' 72°C) e 7' 72°C	430	58 °C	<i>S. flexneri</i> 2A	Andrade et al. (2017)

3.5 Eletroforese em gel de agarose

Os géis foram preparados por aquecimento, fundindo-se a agarose (Invitrogen) em tampão TAE (Tris – base 40 mM; ácido acético 40 mM; EDTA 1 mM) (Merk), na concentração final de 1,0 %. Antes da solidificação, adicionou-se o *gel red* 10.000X (Biotium, Fremont, CA, EUA) na proporção de 1:10000 para coloração pré-eletroforese. O gel líquido foi vertido em suporte próprio para preparo de géis (Biorad, Carlsbad, CA, USA). Os fragmentos de DNA resultantes do PCR foram acrescidos de tampão de amostra 1X (azul de bromofenol 0,25 %; xilenocianol 0,25 %; glicerol 30 %) (Merck). Como marcador de massa molecular foi utilizado o *1kb DNA ladder plus* (Sinapse Inc, Hollywood, FL, EUA). A corrida de eletroforese foi realizada sob corrente constante de 70 V (BioRad), em tampão TAE. Após a corrida, os géis foram observados no transiluminador de luz ultravioleta. Os produtos foram visualizados usando o sistema de foto-documentador eletrônico (UVITEC, Cambridge, Reino Unido).

3.6 Sequenciamento do gene *sat*

Para a obtenção do fragmento de 930 pb, que corresponde ao fragmento do gene *sat* das cepas EC233/93 (DEC/Sat+) e CV323/77 (EAEC CV323), a PCR foi realizada em um volume total de 100 µL, nas condições especificadas na Tabela 5. O material amplificado foi submetido à eletroforese de agarose, conforme descrito no item 3.4. A banda correspondente à *sat* foi retirada do gel e uma amostra do DNA purificado com o *kit* GFX PCR DNA (GE, Reino Unido) foi submetida à eletroforese. Para a determinação da massa/µL de DNA amplificado, foi realizada uma corrida eletroforética em gel com 2 % de agarose. Os produtos de PCR visualizados no gel foram quantificados utilizando o marcador de massa molecular *Low DNA Mass Ladder*, Cat. Nº 10068-013 (Invitrogen), também submetido à eletroforese, conforme orientações do fabricante.

O fragmento de 930 pb purificado de ambas as cepas, na concentração de 20 ng/5 µL + 2,5 µL, contendo 5 µM dos iniciadores F (*forward*) e R (*reverse*), foi armazenado a -20 °C e encaminhado para sequenciamento no Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco, no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. O equipamento utilizado no sequenciamento foi o MegaBACE 1000 (Amersham Pharmacia Biotec). As reações foram realizadas de acordo com o protocolo do fabricante, utilizando o *kit* APBiotech DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing, empregando a Thermo SequenaseTM II DNA Polimerase. Para edição das sequências de nucleotídeos foi utilizado o programa MEGA

(Molecular Evolutionary Genetics Analysis), versão 7.0.26. Após a edição, as sequências consenso foram comparadas à do gene *sat* de UPEC CFT073 (número de acesso no GenBank: AF289092.1).

3.7 Obtenção da proteína Sat

Para a obtenção da proteína Sat, diferentes condições de cultivo foram testadas. O volume inicial do cultivo bacteriano, tempo de cultivo, pH do tampão e condições de concentração (volume, resina, tampão) e vol/mL foram as variáveis ensaiadas.

3.7.1 Condições do cultivo da cepa EC233/93

Para obtenção da proteína Sat, a cepa bacteriana foi cultivada em diferentes volumes (200 mL, 500 mL e 1000 mL) em meio LB (BD) em pH 7,2 ou 8,0, sob agitação de 200 rpm, a 37 °C em agitador rotatório (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, EUA), por 18 h. Em seguida, a cultura foi centrifugada a 8000 x g por 10 min., a 4 °C. O sobrenadante do cultivo contendo a proteína Sat foi esterilizado por filtração na membrana Durapore, 0,22 µm de poro, número de catálogo GVWP04700 (Millipore, Brasil).

O sobrenadante da cultura bacteriana foi concentrado segundo as seguintes técnicas: i) filtração tangencial, utilizando-se o Labscale modelo TFF System (Millipore) com o filtro Pellicon XL e membrana Biomax 50, número de catálogo PXB050A50 (Millipore), *cut-off* de 50 kDa; ii) VivaSpin 20 (GE Healthcare), com membrana de corte (*cut-off*) de 50 kDa ou iii) ambos os processos anteriores.

O material concentrado foi submetido ao SDS-PAGE.

3.7.2 Análise da proteína por SDS-PAGE

O sobrenadante do cultivo bacteriano concentrado (item 3.7.1) foi submetido ao SDS-PAGE 8 %, em condições desnaturantes, seguindo o protocolo descrito por Laemmli (1970). As proteínas foram misturadas ao tampão de corrida (tris-(hidroximetil) aminometano hidrocloreto 0,25 M; dodecil sulfato de sódio 8 %; glicerol 80 %; azul de bromofenol 0,04 %; pH 6,8) acrescido de β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) na proporção de 1:20. Em seguida, a eletroforese foi realizada a 100 V utilizando cuba de eletroforese vertical e fonte (Bio-Rad, EUA) contendo tampão Tris-Glicina (tris (hidroximetil) aminometano 3 %, glicina 14 %, dodecil sulfato de sódio 1 %) (Merck Darmstadt, Germany). Os padrões de massa molecular utilizados foram os seguintes: *PageRuler™ Prestained Protein Ladder*, com

bandas de 10 a 180 kDa (Cat. nº 26616) (ThermoFisher Scientific) ou *Precision Plus Protein™ Standards*, com bandas de 10 a 250 kDa (Cat. nº 161-0375) (BioRad, EUA). O gel foi corado com *Comassie Brilliant Blue* (Bio-Rad, EUA) ou solução de nitrato de prata.

Na coloração por *Comassie*, o gel foi submerso no corante por 1 h, com agitação leve, e descorado por metanol 45 % (Merck):ácido acético glacial 10% (Merck), com agitação de 25 rpm no agitador orbital (Lab-Line, modelo 4631, EUA), até que as bandas fossem visualizadas.

Na coloração por nitrato de prata, o gel foi fixado *overnight* com solução contendo 40 % de etanol:10 % de ácido acético (Merck). Em seguida, o gel foi lavado 2 vezes com etanol a 30 % (Merck) e 1 vez com água Milli-Q por cerca de 20 min. cada lavagem. Após a lavagem, o gel foi tratado com solução de tiosulfato de sódio a 0,02% (Merck) por 1 min., seguido de 3 lavagens com água Milli-Q, 1 min. cada. Em seguida, o gel foi submerso em solução (nitrato de prata 0,2 %; formaldeído 0,02 %) por 20 min. Após 3 lavagens em água Milli-Q de 1 min cada, o gel foi submerso na solução de revelação (3 % carbonato de sódio, 0,0005 % tiossulfato de sódio, 0,05 % formaldeído) (Merck). No momento em que bandas de proteínas foram visualizadas, o gel foi submerso na solução de bloqueio (50% etanol:12% ácido acético) (Merck), por no mínimo 15 min. A solução de preservação (ácido acético a 1%) (Merck) foi utilizada para o armazenamento do gel.

3.7.3 Identificação de Sat no sobrenadante do cultivo bacteriano por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS)

A banda correspondente a aproximadamente 107 kDa, obtida do sobrenadante do cultivo bacteriano concentrado (item 3.7.1), foi enviada ao Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada (LETA) do Instituto Butantan para identificação por LC-MS/MS. Os procedimentos de identificação foram utilizados conforme Shevchenko (1996).

Resumidamente, as bandas foram fracionadas em pedaços de 1 mm e descoradas, adicionando-se 0,5 mL da solução descorante (metanol 50% /ácido acético 5% em água Milli-Q), por 2 h, à temperatura ambiente. Após a incubação, o descorante foi trocado e os fragmentos foram incubados por mais 1 h à temperatura ambiente. Após a remoção do descorante, o gel foi desidratado adicionando-se 200 µL de acetonitrila (100%), por 5 min. A acetonitrila foi trocada, seguindo-se mais 5 min. de incubação. Em seguida, a acetonitrila foi retirada e o residual foi evaporado no *Speed Vac* por 2-3 min.

Para a redução da proteína, 30 μ L de DTT 10 mM foi adicionado e seguiu-se incubação por 30 min. à temperatura ambiente. Após a remoção do DTT para alquilação, 30 μ L da solução de IAA 50 mM (iodoacetamida: 9 mg de IAA em 1 mL de bicarbonato de amônio 100 mM) foi adicionada, seguindo-se a incubação por 30 min. à temperatura ambiente. Após a remoção do IAA, o gel foi lavado com 100 μ L de bicarbonato de amônio 100 mM, por 10 min. Após a lavagem, o gel foi desidratado com 200 μ L de acetonitrila (100 %) por 5 min. à temperatura ambiente e reidratado com 200 μ L de bicarbonato de amônio 100 mM, por 10 min. Após a remoção da solução, o gel foi desidratado com 200 μ L de acetonitrila (100 %) por 5 min. à temperatura ambiente. A solução de acetonitrila foi trocada, seguindo-se a incubação por mais 5 min. à temperatura ambiente. A solução foi removida e o residual foi evaporado no *Speed Vac* por 2-3 min.

Ao gel foram adicionados 30-50 μ L de solução de tripsina gelada (20 μ g de tripsina em 1000 μ L de solução de bicarbonato de amônio 50 mM) e incubado por 30 min. em banho de gelo para reidratação. O excesso de solução de tripsina foi removido e 20 μ L de bicarbonato de amônio 50 mM foram adicionados, seguindo-se incubação *overnight* a 37 °C. No dia seguinte, sem remover a solução de bicarbonato de amônio, foram adicionados 10 μ L da solução de ácido fórmico 5% (em água Milli-Q), seguindo-se a incubação de 10 min. à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um microtubo com capacidade para 500 μ L, estéril. Em seguida, foram adicionados 12 μ L da solução de ácido fórmico a 5% (em acetonitrila 50%) e a solução foi incubada por 10 min. à temperatura ambiente. A solução de ácido fórmico foi trocada, seguindo-se a incubação por mais 10 min. A amostra foi concentrada no *Speed Vac* por aproximadamente 40 min. até cerca de 1 μ L.

Após a concentração, 15 μ L de ácido fórmico 0,1% foram adicionados à amostra, que posteriormente foi armazenada a -20°C até análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas LC-MS/MS.

3.7.3.1 Cromatografia líquida LC-MS/MS

Os peptídeos foram secos por centrifugação a vácuo (Christ) e dissolvidos em 15 μ L de ácido fórmico 0,1 %. Deste volume, 5 μ L foram submetidos à análise por espectrometria de massas utilizando o espectrômetro *LTQ-Orbitrap Velos* (Thermo Scientific) acoplado ao sistema de *nanoLC Easy II* (Proxeon). O volume de 5 μ L foi injetado em uma pré-coluna de C18 (100 μ m x 50 mm x 10 μ m). Os peptídeos foram separados em uma coluna analítica contendo *beads* de resina *C18 Aqua®* (Phenomenex) (75 μ m x 100 mm x 5 μ m).

A separação foi feita utilizando um gradiente linear com duração de 20 min. composto por água (A) e acetonitrila (B) contendo 0,1% de ácido fórmico a uma vazão de 200 mL/min. O sistema partiu de uma concentração de 5 % da solução B a 95 % de B em 20 min. Os espectros de MS¹ foram obtidos pelo analisador FTMS com uma resolução de 60.000 (para íon de m/z 400) na faixa de valores m/z de 200 - 2000 (*mass range*). O método de fragmentação escolhido foi CID e apenas os 5 íons mais intensos de cada MS¹ foram selecionados para fragmentação (íons com duas cargas ou mais). A energia de colisão usada para a obtenção dos fragmentos (espectros de MS/MS) foi de 35 eV, e os fragmentos foram analisados no *ion trap*. A voltagem da fonte foi fixada em 2,5 kV e o tempo de exclusão dinâmica foi ajustado para 15 seg., com uma lista contendo 500 íons, para diminuir a aquisição repetida de um mesmo valor de m/z .

3.7.3.2 Busca no banco de dados

O arquivo proveniente da análise por LC-MS/MS foi convertido para o formato MGF por meio do programa *MS convert* (Proteowizard, versão 3.0.3535), o qual foi submetido à busca no banco de dados *SwissProt* (taxonomia *Escherichia coli*; 22940 sequências), utilizando o programa *Mascot* (versão 2.4.1). Como modificações variáveis foram consideradas a oxidação de resíduos de metionina, ao passo que a carbamidometilação de resíduos de cisteína foi estabelecida como modificação fixa. Os valores de tolerância para as massas observadas foram de 10 ppm para os precursores selecionados no MS¹ e de 0,5 Da para os fragmentos analisados no *ion trap*. A enzima selecionada foi a tripsina, com a tolerância máxima de 3 sítios de clivagem perdidos.

3.7.4 Purificação de Sat

A purificação da toxina Sat foi inicialmente realizada por gel filtração, através da qual as proteínas são separadas por tamanho. Porém, com o intuito de obter uma maior pureza e concentração da proteína, posteriormente foi utilizada uma coluna de afinidade à serino-protease.

3.7.4.1 Gel filtração

Para a purificação da proteína por gel filtração foi utilizada a coluna XK 16/70 resina *Sephacryl S-200 High Resolution* de 5 a 250 kDa, acoplada ao equipamento AKTA prime Plus (GE Healthcare, Suécia). Para tanto, a coluna, previamente equilibrada com

220 mL do tampão de eluição (NaCl 0,15M:Na₂HPO₄ 0,05M, pH 7,2) (Merck) recebeu 2 mL do sobrenadante do cultivo bacteriano concentrado, conforme descrito no item 3.7.1, diluído no tampão de eluição (proporção 1:1). Em seguida, alíquotas de 1 mL, eluídas da coluna, foram coletadas em microtubos estéreis. Foi gerado um gráfico correspondente à absorbância (UV 280 nm) das alíquotas coletadas. Em seguida, as frações correspondentes ao(s) pico(s) observado(s) no gráfico foram analisadas por SDS-PAGE (item 3.7.2).

3.7.4.2 Afinidade à serino-protease

O sobrenadante do cultivo bacteriano concentrado (item 3.7.1) foi aplicado a uma coluna C 10/10 com resina Benzamidine SepharoseTM 4 Fast Flow-high sub (GE), acoplada ao equipamento AKTA prime Plus (GE), previamente equilibrada com 50 mL de tampão de ligação (Tris-HCl 0,05M + NaCl 0,5M pH 7,4) (Merck). Em seguida, mais 50 mL do tampão de ligação foram aplicados à coluna. A serino-protease (Sat) foi obtida utilizando-se o tampão de eluição (glicina-HCl 0,05 M, pH 3,0). Alíquotas de 1 mL foram coletadas em microtubos estéreis, contendo 30 µL de tampão de neutralização (Tris-HCl 1 M, pH 9,0), obtendo-se, ao final, amostras com pH de 7,4. Foi gerado um gráfico correspondente à absorbância (UV 280 nm) de todas as alíquotas coletadas. Em seguida, as frações correspondentes ao(s) pico(s) observado(s) no gráfico foram analisadas por SDS-PAGE (item 3.7.2).

3.8 Quantificação de proteínas

A quantificação das proteínas (Sat purificada, soro total de coelho imunizado e sobrenadante do cultivo bacteriano concentrado) foi determinada utilizando-se o *kit Pierce® BCA Protein Assay*, Cat. nº 23225 (Thermo Scientific, USA).

3.9 Avaliação da atividade da toxina

A atividade hidrolítica da toxina autotransportadora Sat foi previamente avaliada pela clivagem dos substratos peptídicos fluorescentes FRETs (*Fluorescence resonance energy transfer* ou substrato com supressão intramolecular de fluorescência) Abz- FRSSR-EDDnp e Abz-FLRRV-EDDnp, cedidos pelo Prof. Dr. Luiz Juliano Neto, do Departamento de Biofísica da UNIFESP/EPM e Abz-AGLA-EDDnp, cedido pela Profa. Dra. Ana Maria Moura, do Laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan. Foi realizada a incubação de 1,5 µg - 2 µg da fração de Sat com 5 µM de cada substrato FRET em tampão Tris 100 mM, NaCl 20 mM, pH 7,4, por 45 min., 6 e 18 horas a 37°C. Para o teste de inibição da atividade

hidrolítica, a fração foi pré-incubada com 3 mM de PMSF (fenilmetanosulfonilfluoreto) por 30 min. à temperatura ambiente antes da adição do substrato. Após o período de incubação, as amostras foram analisadas em fluorímetro Victor 3™ (Perkin-Elmer, Boston, MA, USA) nos comprimentos de onda de excitação λ_{EX} 320 nm e emissão λ_{EM} 420 nm. A atividade específica foi expressa como unidade de fluorescência livre de substrato clivado por minuto por μ g de protease (UF/min/ μ g). Como controle negativo, o substrato foi incubado apenas em tampão. Os testes foram realizados em duplicata e os valores foram expressos como média e desvio-padrão.

3.10 Produção de anticorpos policlonais monoespecíficos anti-Sat

3.10.1 Imunização do coelho

Um coelho *New Zeland* fêmea de 2 kg foi imunizado, seguindo os procedimentos previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan, protocolo nº 1362/15 (23/02/2015). Antes da imunização o animal foi submetido a uma punção da veia marginal auricular com retirada de 1 mL de sangue para a obtenção do soro pré-imune. O sangue foi transferido para um tubo com tampa com capacidade de 1,5 mL, estéril, e incubado a 37 °C por 1 h. Após incubação, o tubo foi mantido *overnight* a 4 °C para separação do plasma das hemácias. O tubo foi centrifugado a 100 x g por 5 min. e o plasma coletado foi armazenado a -20 °C.

O coelho foi imunizado com três doses de 100 μ g de proteína purificada, acrescida de 2,5 mg do adjuvante hidróxido de alumínio. A segunda dose foi administrada no 15º dia pós a primeira imunização e a terceira dose, no 30º dia após a primeira imunização. Passados 45 dias da primeira imunização, a sangria de prova foi realizada retirando-se cerca de 1 mL de sangue da veia marginal auricular.

3.10.2 Determinação do título de anticorpos

A titulação dos anticorpos foi realizada por ELISA. Para adsorção de antígenos (proteína Sat purificada) foi utilizada uma placa de poliestireno com 96 poços (Corning, NY, USA), contendo 1 μ g de proteína por poço em 200 μ L de tampão carbonato/bicarbonato 0,1 M, pH 9,6 (Merck). A placa foi incubada a 37 °C por 2 h e, em seguida, foi incubada a 4 °C, por 16 h. Após a incubação, para bloqueio dos sítios inespecíficos, uma solução de PBS com 1% de BSA (Sigma) foi adicionado à placa, a qual foi incubada por 1 h a 37 °C. Para retirar a solução de bloqueio, a placa foi lavada 4 vezes com PBS Tween (PBS com 0,05%

Tween-20) (Sigma). Em seguida foram adicionados 200 μ L dos soros (pré-imune e o de prova), nas diluições de 1:100 até 1: 6.400 em PBS 1% de BSA. Após 2 h de incubação a 37 °C e 4 lavagens com PBS Tween, foi adicionado o anticorpo anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase (Sigma) na diluição 1:10.000. A placa foi incubada por 1 h a 37 °C, lavada 4 vezes com PBS Tween e, em seguida, incubada por 15 min. com a solução reveladora de OPD (1 mg de OPD-o-Phenylenediamine + 2 mL de tampão citrato/fosfato (citrato de sódio dihidratado 29,40 g/L - fosfato de sódio dibásico 53,60 g/L, pH 5,0) + 1 μ L de H₂O₂) (Merck). A reação foi bloqueada adicionando-se 50 μ L de HCl 1N (Synth) por poço.

A densidade ótica (DO) foi obtida a 492 nm no leitor de ELISA (Labsystems Multiskan EX, EUA). A titulação foi determinada considerando a diluição na qual a DO do soro resultante da sangria de prova foi 3 vezes maior em relação à DO do soro pré-imune.

3.10.3 Sangria total do coelho

O coelho foi anestesiado com 35 mg/kg de quetamina + 5 mg/kg de xilazina e, por punção cardíaca, foram retirados aproximadamente 50 mL de sangue. O sangue coletado foi transferido para um tubo estéril com capacidade para 50 mL e incubado a 37 °C por 1 h. Após incubação, o tubo foi mantido a 4 °C por 18 h, para retração do coágulo. O tubo foi centrifugado a 100 x g por 5 min. e o soro coletado foi armazenado a -20 °C.

3.10.4 Preparo do soro para uso

Os anticorpos inespecíficos presentes no soro foram eliminados pela adsorção.

3.10.4.1 Preparo das bactérias para adsorção

Foram cultivados 50 μ L de bactéria competente *E. coli* DH5 α em 100 mL de meio LB, a 37 °C, com agitação de 200 rpm, por 18 h. Após este período, a cultura foi dividida em duas frações de 50 mL. Uma destas frações foi autoclavada a 121 °C por 20 min., ao passo que a outra fração recebeu formaldeído (concentração final de 0,5%) (Anidrol, Diadema, SP, Brasil) e foi incubada no agitador rotatório a 37 °C, por 2 h, com agitação de 200 rpm (New Brunswick Scientific). Na etapa seguinte, as duas frações foram reunidas e centrifugadas a 2.180 x g por 15 min., a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes com 50 mL de PBS. A solução foi alíquotada em tubos com capacidade para 1,5 mL, centrifugada a 16.900 x g por 1 min. e o sobrenadante foi descartado. Os tubos contendo os precipitados de DH5 α foram armazenados a -20 °C até o momento do uso.

3.10.4.2 Adsorção do soro

Para adsorção, o precipitado de DH5 α foi ressuscitado em 300 μ L do soro e mantido refrigerado (sob gelo), por 30 min. Após este período, o material foi centrifugado a 300 x g por 10 min., a 4 °C, e coletado o sobrenadante. O processo de adsorção foi repetido por mais 4 vezes, utilizando-se, a cada processo, um precipitado novo.

A quantificação de proteína total do soro anti-Sat foi determinada conforme descrito no item 3.8. O soro anti-Sat adsorvido foi aliquoteado e armazenado a -20°C, até o momento do uso.

3.10.5 Reconhecimento de Sat pelo anticorpo policlonal

3.10.5.1 Preparo das cepas

As cepas EAEC CV323 e DEC/Sat+, a cepa EAEC 042 que secreta Pic e Pet e as cepas FBC114 e HB101, utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente, foram cultivadas em 10 mL de caldo LB e DMEM + 1% de triptona (Oxoid, Reino Unido) a 37 °C com agitação de 200 rpm por 18 h. Em seguida, as culturas foram centrifugadas a 5500 x g, a 4°C, por 10 min. e aliquoteadas em frações de 1 mL.

3.10.5.2 Precipitação das proteínas da cultura bacteriana

Às alíquotas de 1 mL do sobrenadante do cultivo foram adicionados 200 μ L de ácido tricloroacético (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) concentração final de 20%, seguindo-se uma incubação de 1h em banho de gelo. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 16.900 x g, a 4 °C, por 25 min..

Os sobrenadantes foram descartados e aos precipitados foram adicionados 500 μ L/tubo de acetona fria (Synth, Diadema, SP, Brasil). Em seguida, as soluções foram centrifugadas a 16.900 x g, 4 °C, por 10 min., e os sobrenadantes foram descartados. Este processo foi repetido mais uma vez e, após o descarte do sobrenadante, os precipitados, secos à temperatura ambiente, foram ressuscitados em 15 μ L de Tris-HCl, 1M, pH 8,0 (Merck). Os precipitados de proteínas foram submetidos ao SDS-PAGE 8%, conforme item 3.7.2.

3.10.5.3 Western blotting

Após a separação das proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida, o gel foi colocado sobre uma membrana de nitrocelulose, Cat. N° 10600018 (GE, Alemanha) e o sistema úmido foi montado dispondo o gel entre duas camadas de papel de filtro, Cat. N°.

1003-917 (GE, Reino Unido) em um suporte para transferência (Bio-Rad, EUA). Este conjunto foi umedecido com tampão de transferência (48 mM Tris-base, 39 mM glicina, 20% metanol e 0,037% SDS pH 8,3) (Merck). A transferência foi realizada a 300 mA, por 60 min.

A membrana de nitrocelulose foi bloqueada com a solução PBS + 1 % de BSA, por 18 h, e lavada 3 vezes com PBS Tween 0,05%. O anticorpo primário anti-Sat na diluição 1:500 (250 µg/mL) em PBS + 1 % BSA foi adicionado à membrana e, após 2 h de incubação à temperatura ambiente, a membrana foi novamente lavada 3 vezes com PBS Tween 0,05 %. Em seguida, adicionou-se o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase (Sigma-Aldrich) na diluição 1:10.000 em PBS + 1 % BSA, incubando-se por 1 h.

A membrana foi novamente lavada 3 vezes com PBS + Tween 0,05% e revelada com solução de DAB-Diaminobenzidina (10 mg DAB + 15 mL tris 0,05 M pH 7,6 + 12 µL H₂O₂) (Sigma). Logo após a visualização de bandas, a reação foi bloqueada adicionando-se água purificada.

3.11 Ensaios de citotoxicidade

Os parâmetros de citotoxicidade avaliados foram: *i)* alteração da morfologia, *ii)* destacamento celular, *iii)* permeabilidade celular e *iv)* metabolismo celular. As linhagens celulares utilizadas nesta avaliação foram Y1, LLC PK1, HEK-293, Caco-2 e HUVEC.

As células foram distribuídas na concentração de 2×10^5 células/poço em placas de 24 poços, com ou sem lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro, ou na concentração de 5×10^4 células/poço em placas de poliestireno de 96 poços, conforme descrito no item 3.2. As células foram mantidas por 24 h a 37 °C com 5 % de CO₂. No dia seguinte, as culturas foram incubadas com Sat nas concentrações de 50 ou 100 µg/mL por 2, 5, 8, 12 ou 24 h, dependendo do ensaio. Após este período, as culturas foram lavadas 2 vezes com PBS.

Todos os experimentos a seguir foram realizados em triplicatas.

3.11.1 Avaliação da morfologia celular

As células presentes nas lamínulas de vidro foram fixadas com metanol (Synth) por 30 min e coradas com May-Grunwald (Merck, Darmstadt, HE Germany), diluído 1:2 em tampão Sorensen, durante 15 min. e com Giemsa (Merck, Darmstadt, HE Germany) 1:2 no mesmo tampão, por 25 min. As lamínulas foram montadas sobre lâminas de vidro com o auxílio do Entellan® (Merck, Darmstadt, Alemanha) e, em seguida, analisadas por microscopia de luz no aumento de 100X e/ou 400X (Carl Zeiss). O registro fotográfico digital

foi realizado pela câmera acoplada ao microscópio com auxílio do programa ZEN 2 Blue edition.

A morfologia celular foi avaliada segundo os parâmetros definidos por Saidi; Sears (1996) e Navarro-García et al. (1999). Foram atribuídas as seguintes pontuações: 1+ indica a presença de células alongadas ou arredondadas em quantidade superior à observada no controle (menos de 50 % das células afetadas); 2+ indica que mais de 50 % das células estavam arredondadas, mas com desprendimento inferior a 50 %; 3+ indica que mais de 50 % das células foram removidas e o restante das células apresentavam-se arredondadas e 4+ indica que todas as células (ou quase todas) foram destacadas da lamínula.

3.11.2 Avaliação de destacamento celular

O destacamento celular foi determinado quantificando as células tanto em ensaios realizados em placas com 96 poços, como nos ensaios realizados em placas com 24 poços. Em ambos os casos, células em seis campos escolhidos randomicamente foram quantificadas por microscopia de luz, no aumento de 400X. As culturas celulares não tratadas com a toxina, controle negativo, foram consideradas com 0 % de destacamento.

3.11.3 Permeabilidade celular

A permeabilidade celular foi determinada pelo método de incorporação do azul de *Trypan* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Para isso, após as culturas celulares (mantidas em placas contendo 96 poços), serem incubadas com a toxina por diferentes tempos, o sobrenadante do cultivo foi retirado e 100 µL do azul *Trypan* (1:2) foram adicionados. Após cerca de 20 min. de incubação, a porcentagem de células viáveis foi determinada contando-se 300 células, no aumento de 400X, por microscopia de luz.

3.11.4 – Avaliação do metabolismo celular

Para a avaliação do metabolismo celular foi medida a capacidade da célula reduzir o brometo de MTT - brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio à formazan, por meio da avaliação da atividade mitocondrial.

Para a realização do ensaio MTT, as culturas celulares, cultivadas em placas de 96 poços, foram incubadas com a toxina purificada (50 µg/mL). Quatro horas antes do término da incubação, 20 µL/poço de uma solução de MTT estéril foi adicionada a cada poço (5 mg de MTT - + 1 mL de PBS) (Sigma). Após o término da incubação, o sobrenadante foi removido e

os cristais de formazan, que indicam a atividade da succinato desidrogenase mitocondrial, foram solubilizados com 200 μ L de DMSO. A DO foi determinada a 595 nm (Labsystems, Multiskan EX). A viabilidade celular foi determinada conforme a equação a seguir:

$$\text{Viabilidade (\%)} = \{\text{Absorbância da amostra/Absorbância do controle negativo}\} \times 100$$

3.12 Ensaio de neutralização do efeito citotóxico

Para o ensaio de neutralização do efeito citotóxico induzido pela toxina purificada Sat, a referida proteína foi previamente incubada com o anticorpo policlonal IgG anti-Sat na concentração de 75 μ g/mL, durante 30 min, a 37 °C ou com inibidor de protease PMSF (fenilmetanosulfonilfluoreto) nas concentrações de 0,3 mM e 0,6 mM por 15 min., a 37 °C. Em seguida, 100 μ g/mL da toxina tratada com anticorpo ou com PMSF foram adicionadas às células da linhagem Y1, cultivadas em placas com 24 poços contendo lamínulas de vidro. As células incubadas com a toxina purificada foram utilizadas como controle positivo. Após 8 horas de incubação, as culturas foram lavadas, fixadas e coradas conforme descrito nos itens 3.11.1 e 3.11.2. A morfologia e o destacamento celular foram avaliados conforme descrito nos itens 3.11.1 e 3.11.2.

3.13. Avaliação da interferência de Sat durante a infecção *in vitro*

Para avaliar a interferência de Sat na infecção foram necessários: i) estabelecer a cinética de secreção e ii) padronizar e as condições de infecção.

3.13.1 Estabelecimento da cinética de secreção de Sat pela bactéria

Para a determinação da cinética de secreção de Sat, 300 μ L de um pré-cultivo (item 3.1) da cepa EAEC CV323 foram inoculados em 10 mL de meio DMEM + 1% de triptona e em 10 mL do meio LB. A cepa inoculada em ambos meios de cultura foi cultivada por 2 h, 5 h, 8 h, 12 h e 24 h a 37°C com agitação de 200 rpm. Após cada período de incubação as culturas foram precipitadas, conforme o item 3.10.5.2. Em seguida, as proteínas precipitadas foram submetidas a gel SDS-PAGE 8%, conforme o item 3.7.2, e realizado o *western blotting*, conforme descrito no item 3.10.5.3.

3.13.2 Padronização das condições de infecção

3.13.2.1 Curva de Crescimento

Após o crescimento das cepas bacterianas (EAEC CV323, DEC/Sat+ FBC114 e HB101) a 37 °C por 18 h, em meio LB (item 3.1), 100 µL de cada cultura foram inoculados em 3 mL de meio DMEM com 1% de triptona, sendo, em seguida, incubados a 37 °C com agitação de 200 rpm, por cerca de 8 h. A DO das culturas foi determinada a cada 30 min. no comprimento de onda de 600 nm (Spectronic® 20 Genesys™, USA).

3.13.2.2 Determinação do número de bactérias

Para determinação do número de bactérias, a fim de obter a multiplicidade de infecção (MOI 10), foi utilizado o método *Drop Plate* (BARON et al., 2006; BECK et al., 2009; NAGHILI et al., 2013). Resumidamente, cada cepa foi cultivada em meio DMEM + 1% de Triptona com agitação de 200 rpm, até atingir a metade da fase logarítmica. A DO foi medida a 600 nm e, em seguida, ajustada para 0,3. Em seguida, a diluição seriada de cada cepa foi feita, em triplicata, na placa de 96 poços (NUNC™, Dinamarca) com solução salina estéril (NaCl 8,5 g/L) (Merck). Foram semeados em triplicata, 10 µL de cada diluição em placas de Petri com ágar LB, no total de 4 diluições por placa. As placas de Petri semeadas foram incubadas a 37 °C por 24 h. Para determinação do número de bactérias foram consideradas as diluições com número de unidades formadoras de colônias (UFC) de 3 a 30. Para a determinação das UFC/mL, o número de colônias obtido foi multiplicado pelo fator de correção 100 e pela diluição.

3.13.3 – Ensaios de infecção

As células Y1 foram cultivadas em placas de cultura com 24 poços contendo lamínulas de vidro, conforme descrito no item 3.11. As culturas bacterianas EAEC CV323/77, DEC/Sat+, FBC114 (C+) e HB 101 (C-) foram cultivadas em DMEM com 1% de triptona por 2,5 h, o que corresponde à metade da fase logarítmica. A DO (600 nm) foi ajustada para 0,3. As culturas de células Y1 foram infectadas com as cepas no MOI 10.

O tempo de infecção foi de 5 h e 24 h, sendo que após cada período, os sobrenadantes foram coletados e utilizados para avaliar a transcrição do gene (5 h de infecção) e a secreção de Sat durante a infecção celular (5 h e 24 h de infecção). As lamínulas contendo as células, correspondentes aos dois tempos de infecção, foram lavadas 3 vezes com

PBS. Em seguida, as células foram fixadas com metanol, coradas e as lamínulas montadas em lâmina, conforme descrito no item 3.11.1.

A morfologia celular foi avaliada segundo os parâmetros definidos por Saidi; Sears (1996) e Navarro-García et al. (1999) descritos no item 3.11.1.

3.13.4 Avaliação de destacamento celular

O destacamento celular foi determinado quantificando as células em seis campos escolhidos randomicamente por microscopia de luz, no aumento de 400X. As culturas celulares infectadas com HB101 (controle negativo) foram consideradas com 0% de destacamento.

3.14. RT-PCR gene *sat*

3.14.1 Extração de RNA total

Os sobrenadantes das culturas celulares infectadas durante 5 h, conforme descrito no item 3.13.3, foram centrifugados a 4200 x g, por 10 min., a 4 °C. Os sobrenadantes foram coletados em microtubos estéreis com capacidade para 1,5 mL, para investigação da presença da proteína Sat, conforme descrito no item 3.15. Os precipitados foram lavados com PBS e centrifugados a 4200 x g, por 10 min. a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foram adicionados aos precipitados 300 µL do reagente de lise QiAzol (Qiagen®, EUA) para lise das bactérias, seguida da centrifugação a 16.900 x g por 1 min. A purificação do RNA foi realizada utilizando-se o *kit* Direct-Zol (ZYMO RESEARCH, CA, EUA), conforme as instruções do fabricante. Os RNAs foram quantificados a 260 nm usando GE *NanoVue Plus™ Spectrophotometer* (GE Life Sciences) e a integridade do material foi confirmada no gel de agarose 1,2% de *loading buffer* contendo gelRed™ 13X (Biotium).

3.14.2 Transcrição Reversa RT

Foram convertidos 200 ng de RNA total para cDNA usando o *kit High Capacity RNA-to-cDNA* (Applied Biosystems™, CA, EUA), empregando-se 10 µL de Tampão RT (2X), 1 µL de Enzima Mix, 4 µL de água livre de nucleases (DNase/RNase-free) e 5 µL de RNA, totalizando um volume final de reação de 20 µL. As reações foram incubadas por 60 min. no termociclador Veriti® (Applied Biosystems™) a 37 °C, por 5 min. e a 95 °C, por 5 min. para

inativação da enzima e, em seguida, resfriadas a 4 °C. As reações foram armazenadas a -20 °C.

3.14.3 RT-PCR

Os DNAs complementares (cDNAs) foram usados como molde para a amplificação do gene de interesse *sat* e o gene constitutivo (*house-keeping*) *icd* (isocitrato desidrogenase) descritos na Tabela 6:

Tabela 6 - Genes *icd* e *sat* com os respectivos iniciadores.

Gene	Sequência dos iniciadores	Ciclo de amplificação	Produto (pb)
	5' → 3'		
<i>icd</i>	ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA	5' 94°C; 30 x(1' 94°C, 1' 60°C, 1' 72°C) e 7' 72°C	878
	GGACGCAGCAGGATCTGTT		
<i>sat</i>	TCAGAAGCTCAGCGAATCATTG	5' 94°C; 30 x(1' 94°C, 1' 59°C, 1' 72°C) e 7' 72°C	930
	CCATTATCACCGTAAAACGCACC		

Foram amplificados 5 µL dos produtos de cDNA (10 ng) com *Platinum® Taq* DNA Polimerase (Invitrogen, USA): 2,5 µL de 10X *Buffer*, 0,75 µL de 50 mM MgCl₂, 0,5 µL de 10 mM dNTPs, 0,5 µL de 10 µM *Primer F*, 0,5 µL de 10 µM *Primer R*, 0,1 µL de 5 U/µL de Taq Enzima, 15,15 µL de água livre de nucleases (DNase/RNase-free), resultando em um volume final de reação de 25 µL. As reações foram aquecidas no termociclador Veriti® 96-Well (Applied Biosystems™) conforme as condições de ciclagem descritas na tabela 6, sendo mantidas resfriadas a 4°C após o término, com posterior armazenamento a -20°C até o momento do uso. Todas as reações de PCR incluíam os RTs positivos e negativos.

3.14.4 Eletroforese em gel de agarose e quantificação

Todos os produtos de RT-PCR (10 µL) foram misturados com tampão de corrida contendo corante GelRed™ 13X (Biotium). Os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,2% a 80 V em tampão TAE (1X) e foram visualizados usando o sistema de fotodocumentador eletrônico (UVITEC).

A quantificação da densidade equivalente aos produtos de PCR foi obtida utilizando-se o *Image J software* (<http://imagej.nih.gov/ij/>). A densidade do gene avaliado foi normalizada com a expressão do gene *icd* (isocitrate/isopropylmalate dehydrogenase).

3.15 Investigação da presença de Sat

Para confirmação da presença de Sat nos sobrenadantes obtidos das culturas de células Y1 infectadas por 5 h e 24 h, os mesmos foram precipitados com TCA, conforme descrito no item 3.10.5.2, e realizado o *western blotting*, conforme item 3.10.5.3.

3.16 Ensaios de neutralização de Sat durante a infecção *in vitro*

Para o ensaio de neutralização de Sat, as células Y1, cultivadas em placa contendo 24 poços, foram infectadas com as cepas FBC114 (C+), EAEC CV323, DEC/Sat+ e HB101 (C-), todas com MOI 10. Para neutralização de Sat, as cepas foram previamente incubadas por 30 min. com anticorpo policlonal IgG anti-Sat (250 µg/mL) ou por 15 min. com PMSF (0,6 mM). Após 5 h de infecção, as células aderidas à lamínula foram lavadas, fixadas e coradas, conforme descrito no item 3.11.1.

3.17 Análises estatísticas

Para os ensaios de citotoxicidade, três experimentos foram realizados independentemente, em triplicata. Como ferramenta para elaboração dos gráficos e as análises estatísticas foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 6.01, aplicando o teste ANOVA. Os resultados foram significativos quando: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ e **** $P < 0,0001$.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização das cepas bacterianas

4.1.1 Pesquisa de genes

Correa (2013) identificou cepas bacterianas isoladas de diarreia *sat* + na bacterioteca do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan. No intuito de confirmar a presença do gene, as amostras CV323/77, EC288/93 e EC233/93 foram submetidas à PCR utilizando os iniciadores descritos por Boisen et al. (2009). Conforme mostra a Figura 5, as três cepas investigadas amplificaram um fragmento de 930 pb, que corresponde ao peso molecular esperado do referido gene.

Figura 5 – Amplificação do fragmento do gene *sat*.

Fragmento do gene *sat* das cepas CV323/77, EC288/93 e EC233/93 amplificado por PCR. Gel de agarose a 1%, controle positivo cepa FBC114 (*sat* +), controle negativo cepa HB101(não patogênica) e padrão 1kb DNA Ladder Plus M1191 (Sinapse Inc).

Para confirmar qual era o patótipo das cepas de *E. coli* isoladas de quadro diarreico, Freitas do Valle (1998) investigou a presença de marcadores dos patótipos EPEC e EAEC. Conforme descrito na Tabela 7, nenhuma das cepas amplificou tais marcadores de

virulência de EPEC. Apenas a cepa CV323/77 amplificou o gene *aatA*, mas não o *aggR*, o que a caracterizou como uma EAEC atípica (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006).

Tabela 7 – Marcadores de virulência de EPEC e EAEC investigados.

Categoria	Genes	Cepas		
		CV323/77	EC288/93	EC233/93
EPEC	<i>bfpA</i>	-	-	-
	<i>per A</i>	-	-	-
	<i>per B</i>	-	-	-
	<i>per C</i>	-	-	-
	<i>eae</i>	-	-	-
EAEC	<i>aatA</i>	+	-	-
	<i>aggR</i>	-	-	-

4.1.2 Identificação do padrão de adesão

Além da presença dos marcadores de virulência, a definição do padrão de adesão da bactéria à célula hospedeira é também um parâmetro utilizado na classificação de alguns patótipos de *E. coli* diarreiogênica. O padrão de adesão agregativo (AA), que consiste na observação de bactérias empilhadas como se fossem tijolos, aderidas às células ou à lamínula, foi definido como o padrão de EAEC (ESTRADA-GARCIA; NAVARRO-GARCIA, 2012; CROXEN et al., 2013). Desta forma, as cepas CV323/77, EC288/93 e EC233/93 foram submetidas ao ensaio clássico de adesão bacteriana *in vitro*. As três cepas bacterianas, incubadas com células HEp-2 durante 3 h, foram lavadas e incubadas por mais 3 h, exceto a cepa protótipo de EAEC 042, cujo padrão de adesão AA é sabidamente observado com somente 3 h de incubação. Após a incubação, as células foram lavadas, fixadas e coradas. Conforme mostra a Figura 6, a cepa CV323/77 aderiu-se às células com o padrão de adesão AA, semelhante ao observado na interação da cepa protótipo de EAEC. Por outro lado, as cepas EC288/93 e EC233/93, cujos marcadores de virulência de EPEC e EAEC não foram amplificados (Tabela 7), tampouco aderiram às células (Figura 6).

Para o prosseguimento deste estudo, foram escolhidas as cepas EAEC CV323/77 e EC233/93.

4.1.3 Sequenciamento do fragmento do gene *sat*

Com o intuito de confirmar a identidade do gene *sat* amplificado (Figura 5), foram sequenciados os fragmentos de 930 pb das cepas EAEC CV323/77 e EC233/93.

O gene *sat*, descrito por Guyer et al. (2000), possui um total de 3.900 pares de bases e o alinhamento do sequenciamento das amostras EAEC CV323/77 e EC233/93, utilizando o programa MEGA 7, foi realizado entre as posições 1771 a 2613, com uma sequência consenso de 843 pares de base (Figura 7). A sequência alinhada obteve 99% de identidade com o gene *sat* (Figura 8). Em ambas as sequências foi possível identificar 4 mutações, sendo a primeira na posição 1821 (adenina por guanina), a segunda na posição 2006 (timina por citosina), a terceira na posição 2311 (adenina por guanina) e a quarta na posição 2526 (timina por citosina), conforme mostra a Figura 7.

As mutações observadas foram identificadas a partir da comparação com a UPEC CFT073 (código de acesso do GenBank AF289092.1). A mutação na posição 2006 (Figura 7) resultou na troca do aminoácido valina por alanina (posição 669) (Figura 9). A mutação na posição 2311 (Figura 7) resultou na troca do aminoácido treonina por alanina (posição 771), conforme a Figura 9. Já as mutações nas posições 1821 e 2526 foram silenciosas, já que não resultaram na troca de aminoácidos (Figura 9). As sequências parciais do gene *sat* das cepas CV323/77 e EC233/93 foram depositadas no GenBank (código de acesso LT855558 e LT855559, respectivamente).

Figura 6 - Ensaio de adesão bacteriana às células HEp-2.

Padrão de adesão das cepas de *E. coli* em células HEp-2: as células foram infectadas por 6 h com as amostras CV323/77, EC288/93, EC233/93 e HB101 (controle negativo do padrão agregativo AA). A infecção da EAEC 042 (controle positivo do padrão agregativo AA) foi de 3 h. CV323/77 padrão AA. EC288/93 e EC233/93 não aderentes. A observação do padrão de adesão foi realizada por microscopia de luz, aumento de 1.000X. As setas indicam o empilhamento das bactérias, característico do padrão AA.

Figura 7 - Alinhamento múltiplo das sequências nucleotídicas do fragmento correspondente ao gene parcial de *sat*.

EC233/93	1	-----ACGGACTGGGTCAACGTTTGGAAAGAAACA
EAEC_CV323/77	1	-----ACGGACTGGGTCAACGTTTGGAAAGAAACA
AF289092.1	1741	AATCATTTGCTCCCTGGTATTTCTTTGTGGAACGGACTGGGTCAACGTTTGGAAAGAAACA
Consensus	1741	*****
EC233/93	31	GAGAGTTCATATAATAAAGTTCAATTCGTATTACAAAAGTAATAATCAGCAGACCTCA
EAEC_CV323/77	31	GAGAGTTCATATAATAAAGTTCAATTCGTATTACAAAAGTAATAATCAGCAGACCTCA
AF289092.1	1801	GAGAGTTCATATAATAAAGTTCAATTCGTATTACAAAAGTAATAATCAGCAGACCTCA
Consensus	1801	*****
		1821
EC233/93	91	TTTGATCAGCCTGACTGGAAAACCGGGGTGTTTAAATTTGATACATTACACCTGAACAAAT
EAEC_CV323/77	91	TTTGATCAGCCTGACTGGAAAACCGGGGTGTTTAAATTTGATACATTACACCTGAACAAAT
AF289092.1	1861	TTTGATCAGCCTGACTGGAAAACCGGGGTGTTTAAATTTGATACATTACACCTGAACAAAT
Consensus	1861	*****
EC233/93	151	GCTGACTTTTCAATATCAGCAATGCCAATGTTGAAGGAAATATATCAGCAAAATAATCA
EAEC_CV323/77	151	GCTGACTTTTCAATATCAGCAATGCCAATGTTGAAGGAAATATATCAGCAAAATAATCA
AF289092.1	1921	GCTGACTTTTCAATATCAGCAATGCCAATGTTGAAGGAAATATATCAGCAAAATAATCA
Consensus	1921	*****
EC233/93	211	GCTATCACAATCGGCGATAAAAAATGCTTACATTGATAATCTTGAGGGAAAAATATTACT
EAEC_CV323/77	211	GCTATCACAATCGGCGATAAAAAATGCTTACATTGATAATCTTGAGGGAAAAATATTACT
AF289092.1	1981	GCTATCACAATCGGCGATAAAAAATGCTTACATTGATAATCTTGAGGGAAAAATATTACT
Consensus	1981	*****
		2006
EC233/93	271	AATAATGGTTTGGACTTCAAACAAATATCAGTACTAATCTATCCATAGGAGAACTAAA
EAEC_CV323/77	271	AATAATGGTTTGGACTTCAAACAAATATCAGTACTAATCTATCCATAGGAGAACTAAA
AF289092.1	2041	AATAATGGTTTGGACTTCAAACAAATATCAGTACTAATCTATCCATAGGAGAACTAAA
Consensus	2041	*****
EC233/93	331	TTTACAGGTGGCATCACTGCACATAACAGCCAAATAGCCATAGGTGATCAAGCTGTAGTT
EAEC_CV323/77	331	TTTACAGGTGGCATCACTGCACATAACAGCCAAATAGCCATAGGTGATCAAGCTGTAGTT
AF289092.1	2101	TTTACAGGTGGCATCACTGCACATAACAGCCAAATAGCCATAGGTGATCAAGCTGTAGTT
Consensus	2101	*****
EC233/93	391	ACACTTAATGGTGGCAACCTTTCTGGATAAATACCTATAAGTATAGATAAAGGAGCAAAA
EAEC_CV323/77	391	ACACTTAATGGTGGCAACCTTTCTGGATAAATACCTATAAGTATAGATAAAGGAGCAAAA
AF289092.1	2161	ACACTTAATGGTGGCAACCTTTCTGGATAAATACCTATAAGTATAGATAAAGGAGCAAAA
Consensus	2161	*****
EC233/93	451	GTTATAGCACAAAATTCATGTTTACAAACAAAAGGTATTGATATCTCCGGTGAACCTGACT
EAEC_CV323/77	451	GTTATAGCACAAAATTCATGTTTACAAACAAAAGGTATTGATATCTCCGGTGAACCTGACT
AF289092.1	2221	GTTATAGCACAAAATTCATGTTTACAAACAAAAGGTATTGATATCTCCGGTGAACCTGACT
Consensus	2221	*****

Continuação da figura 7

EC233/93	511	ATGATGGGAATCCCTGAACAGAAATAGTAAAGCTGTAACGCCGGGTCTCCACTACGCTGCT
EAEC_CV323/77	511	ATGATGGGAATCCCTGAACAGAAATAGTAAAGCTGTAACGCCGGGTCTCCACTACGCTGCT
AF289092.1	2281	ATGATGGGAATCCCTGAACAGAAATAGTAAAGCTGTAACGCCGGGTCTCCACTACGCTGCT
Consensus	2281	*****
		2311
EC233/93	571	GATGGATTTCAGGCTGAGTGGTGGAAATGCAAATTTTCATTGCCAGAAATATGGCATCTGTC
EAEC_CV323/77	571	GATGGATTTCAGGCTGAGTGGTGGAAATGCAAATTTTCATTGCCAGAAATATGGCATCTGTC
AF289092.1	2341	GATGGATTTCAGGCTGAGTGGTGGAAATGCAAATTTTCATTGCCAGAAATATGGCATCTGTC
Consensus	2341	*****
EC233/93	631	ACCGGAAATATTTATGCTGATGATGCAGCAACCATTA CTCTGGGACAGCCTGAAACTGAA
EAEC_CV323/77	631	ACCGGAAATATTTATGCTGATGATGCAGCAACCATTA CTCTGGGACAGCCTGAAACTGAA
AF289092.1	2401	ACCGGAAATATTTATGCTGATGATGCAGCAACCATTA CTCTGGGACAGCCTGAAACTGAA
Consensus	2401	*****
EC233/93	691	ACACCGACTATATCGTCTGCTTATCAGGCATGGGCAGAGACTCTTTTGTATGGCTTTGAT
EAEC_CV323/77	691	ACACCGACTATATCGTCTGCTTATCAGGCATGGGCAGAGACTCTTTTGTATGGCTTTGAT
AF289092.1	2461	ACACCGACTATATCGTCTGCTTATCAGGCATGGGCAGAGACTCTTTTGTATGGCTTTGAT
Consensus	2461	*****
EC233/93	751	ACCGCTATTCGAGGCGCAATAACAGCCCCAAAGCTACAGTTAGCATGAATAATGCGATC
EAEC_CV323/77	751	ACCGCTATTCGAGGCGCAATAACAGCCCCAAAGCTACAGTTAGCATGAATAATGCGATC
AF289092.1	2521	ACCGCTATTCGAGGCGCAATAACAGCCCCAAAGCTACAGTTAGCATGAATAATGCGATC
Consensus	2521	*****
		2526
EC233/93	811	TGGCATCTAAATAGCCAGTCATCAATTAATCGT-----
EAEC_CV323/77	811	TGGCATCTAAATAGCCAGTCATCAATTAATCGT-----
AF289092.1	2581	TGGCATCTAAATAGCCAGTCATCAATTAATCGTCTAGAAACAAAAGACAGTATGGTGCCT
Consensus	2581	*****

Alinhamento múltiplo das sequências nucleotídicas de *sat* das cepas EAEC, CV323/77 e EC233/93 comparadas à *sat* de *E. coli* CFT073 (código de acesso do GenBank AF289092.1) por meio do programa MEGA 7.

Figura 8 – Análise da sequência parcial do gene *sat* pelo programa BLAST.

☐ Shigella flexneri 1a strain 0228, complete genome	1546	1546	100%	0.0	99%	CP012735.1
☐ Shigella flexneri genome assembly NCTC1, chromosome : 1	1546	1546	100%	0.0	99%	LM651928.1
☐ Shigella flexneri Shi06HN006, complete genome	1546	1546	100%	0.0	99%	CP004057.1
☐ Shigella flexneri 2003036, complete genome	1546	1546	100%	0.0	99%	CP004056.1
☐ Shigella flexneri 2a str. 301, complete genome	1546	1546	100%	0.0	99%	AE005674.2
☐ Shigella flexneri 2002017, complete genome	1546	1546	100%	0.0	99%	CP001383.1
☐ Shigella flexneri 2a str. 2457T, complete genome	1546	1546	100%	0.0	99%	AE014073.1
☐ Escherichia coli strain Ecol. 316, complete genome	1541	1541	100%	0.0	99%	CP018957.1
☐ Shigella flexneri G1663, complete genome	1541	1541	100%	0.0	99%	CP007037.1
☐ Escherichia coli UMN026 chromosome, complete genome	1541	1541	100%	0.0	99%	CU928163.2
☐ Escherichia coli genome assembly FHI99, scaffold scaffold-32, contig-0.1, 276634, 895274, forqanism:Escherichia	1535	1535	100%	0.0	99%	LM997281.1
☐ Escherichia coli ATCC 25922, complete genome	1535	1535	100%	0.0	99%	CP009072.1
☐ Escherichia coli CFT073, complete genome	1535	1535	100%	0.0	99%	AE014075.1
☐ Escherichia coli secreted autotransporter toxin (sat) gene, complete cds	1535	1535	100%	0.0	99%	AF289092.1
☐ Escherichia coli isolate NQ3 chromosome, complete genome	1530	1530	100%	0.0	99%	CP024720.1
☐ Escherichia coli strain LS4 chromosome, complete genome	1530	1530	100%	0.0	99%	CP024717.1
☐ Escherichia coli strain FDAARGOS_448 chromosome, complete genome	1530	1530	100%	0.0	99%	CP023960.1
☐ Escherichia coli strain AR_0055, complete genome	1530	1530	100%	0.0	99%	CP021935.1
☐ Escherichia coli strain H105, complete genome	1530	1530	100%	0.0	99%	CP021454.1
☐ Escherichia coli strain AR_0058, complete genome	1530	1530	100%	0.0	99%	CP021689.1
☐ Escherichia coli strain 81009, complete genome	1530	1530	100%	0.0	99%	CP021179.1
☐ Escherichia coli strain AR_0104, complete genome	1530	1530	100%	0.0	99%	CP020116.1

Análise da sequência-consenso das cepas EC233/93 e EAEC 323/77 pelo programa BLAST NCBI. O resultado destacado no quadro em vermelho mostra que o fragmento tem 99% de identidade quando comparado ao genoma completo da cepa de UPEC CFT073, assim como ao gene completo de *sat*.

Figura 9 – Alinhamento múltiplo de aminoácidos do fragmento parcial de Sat das cepas EC233/93 e EAEC CV323/77.

```

EC233/93      -----TDWTVLKET 10
EAEC_CV323/77 -----TDWTVLKET 10
AF289092.1    TNAKLILDGVSNTKNDVEVSNASLTMQGHATEHAIFRSSANHCSLVFLCGTDWTVLKET 600
                *****

EC233/93      ESSYNKKFNSDYKSNQQTSDQPDWKTGVFKFDLHLNNADFSISRANVEGNISANKS 70
EAEC_CV323/77 ESSYNKKFNSDYKSNQQTSDQPDWKTGVFKFDLHLNNADFSISRANVEGNISANKS 70
AF289092.1    ESSYNKKFNSDYKSNQQTSDQPDWKTGVFKFDLHLNNADFSISRANVEGNISANKS 660
                *****

EC233/93      AITIGDKNAYIDNLAGKNITNNGFDFKQTIISTNLSIGETKFTGGITAHNSQIAIGDQAVV 130
EAEC_CV323/77 AITIGDKNAYIDNLAGKNITNNGFDFKQTIISTNLSIGETKFTGGITAHNSQIAIGDQAVV 130
AF289092.1    AITIGDKNAYIDNLAGKNITNNGFDFKQTIISTNLSIGETKFTGGITAHNSQIAIGDQAVV 720
                *****
                669

EC233/93      TLNGATFLDNTPISIDKGAKVIAQNSMFTTKGIDISGELTMMGIPEQNSKAVTPGLHYAA 190
EAEC_CV323/77 TLNGATFLDNTPISIDKGAKVIAQNSMFTTKGIDISGELTMMGIPEQNSKAVTPGLHYAA 190
AF289092.1    TLNGATFLDNTPISIDKGAKVIAQNSMFTTKGIDISGELTMMGIPEQNSKVTVPGLHYAA 780
                *****
                771

EC233/93      DGFRLSGGNANFIARNMASVTGNIYADDAATITLGQPETETPTISSAYQAWAETLLYGF 250
EAEC_CV323/77 DGFRLSGGNANFIARNMASVTGNIYADDAATITLGQPETETPTISSAYQAWAETLLYGF 250
AF289092.1    DGFRLSGGNANFIARNMASVTGNIYADDAATITLGQPETETPTISSAYQAWAETLLYGF 840
                *****

EC233/93      TAYRGAITAPKATVSMNNAIHLNSQSSINR----- 281
EAEC_CV323/77 TAYRGAITAPKATVSMNNAIHLNSQSSINR----- 281
AF289092.1    TAYRGAITAPKATVSMNNAIHLNSQSSINRLETKDSMVRFTGDNGKFTTLTVNMLTIDD 900
                *****

```

Alinhamento múltiplo de aminoácidos dos fragmentos parciais de Sat das cepas EC233/93 e EAEC CV323/77 comparadas à sequência-consenso de aminoácidos gerados pelo gene *sat* (código de acesso do GenBank AF289092.1). Troca de aminoácido na posição 669 (valina por alanina) e na posição 771 (treonina por alanina). Alinhamento realizados pelo programa Clustalw2, disponível em <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>.

4.1.4 Pesquisa de genes de autotransportadoras

Como o intuito era purificar Sat, foi importante investigar a presença de outras proteínas autotransportadoras, entre estas, membros da família SPATE que poderiam, devido à semelhança na massa molecular ou função, dificultar a purificação e análise da citotoxicidade. Para isso, a PCR de 20 genes de proteínas autotransportadoras foi realizado nas cepas EAEC CV323 e DEC/Sat+ (Tabela 8).

Na Tabela 8 constam todos os genes investigados, bem como a principal função de cada produto. Na cepa EAEC CV323/77, além de *sat*, os genes *cah*, *ehaA*, *eha J*, *espl* e *pic* também foram amplificados, mas nenhum destes apresentam função citotóxica. Por outro lado, a cepa EC233/93 não amplificou nenhum dos genes pesquisados, exceto *sat*. O encontro

de uma amostra que não apresentava nenhum dos outros genes, além de *sat*, fez dela a amostra adequada para a utilização na obtenção da Sat purificada.

A caracterização das cepas CV323/77 e EC233/93 foi obtida pela pesquisa de marcadores característicos de EAEC e EPEC (Tabela 7), por meio do ensaio de adesão (Figura 6) e considerando os resultados obtidos por Do Valle (1998), os quais comprovaram que ambas as cepas não apresentavam marcadores de virulência dos patótipos ETEC, EIEC, EHEC e DAEC. Estes resultados possibilitaram concluir que a cepa CV323/77 é uma EAEC, ao passo que a cepa EC233/93, para a qual nenhum marcador dos patótipos de *E. coli* diarreiogênica foi amplificado, pode ser considerada uma DEC que apresenta o gene *sat*. Desta forma, para facilitar a identificação e citação destas cepas, ambas foram renomeadas, passando a ser denominadas como EAEC CV323 (CV323/77) e DEC/Sat+ (EC233/93).

Tabela 8 – Genes de proteínas autotransportadoras investigados nas cepas EAEC CV323 e DEC/Sat+.

Tipo	Genes	Cepas		Função	Referência
		EAEC CV323	DEC/Sat+		
SPATE Classe-1	<i>espC</i>	-	-	Enterotóxica	Kenny e Finlay (1995)
	<i>espP</i>	-	-	Citotóxica	Brunder, Schmidt e Karch (1997)
	<i>pet</i>	-	-	Citotóxica	Eslava et al. (1998)
	<i>sat</i>	+	+	Citotóxica	Guyer et al. (2000)
	<i>sigA</i>	-	-	Citotóxica	Al-Hasani et al. (2000)
SPATE Classe-2	<i>eataA</i>	-	-	Enterotóxica	Patel et al. (2004)
	<i>epeA</i>	-	-	Mucinolítica	Leyton et al. (2003)
	<i>espI</i>	+	-	Mucinolítica	Schmidt et al. (2001)
	<i>pic</i>	+	-	Mucinolítica	Henderson et al. (1999)
	<i>tsh</i>	-	-	Mucinolítica	Provence e Curtiss (1994)
	<i>vat</i>	-	-	Vacuolização	Parreira e Gyles (2003)
AT	<i>aida-I</i>	-	-	Biofilme	Suhr, Benz e Schmidt (1996)
	<i>cah</i>	+	-	Biofilme	Torres et al. (2002)
	<i>ehaA</i>	+	-	Biofilme	Wells et al. (2008)
	<i>ehaB</i>	-	-	Biofilme	Wells et al. (2008)
	<i>ehaC</i>	-	-	Desconhecida	Wells et al. (2008)
	<i>ehaD</i>	-	-	Biofilme	Wells et al. (2008)
	<i>ehaJ</i>	+	-	Biofilme	Easton et al. (2011)
	<i>sab</i>	-	-	Biofilme	Herold, Paton e Paton (2009)
	<i>tibA</i>	-	-	Biofilme	Elsinghorst e Weitz (1994)

AT: autotransportadoras.

4.2 Obtenção da toxina Sat

A cepa DEC/Sat+, não sendo capaz de amplificar nenhum dos demais genes investigados, foi escolhida para a obtenção da toxina purificada.

4.2.1 Cultivo bacteriano

Visando à obtenção de um cultivo bacteriano que proporcionasse um maior rendimento da toxina, diferentes condições de cultivo da cepa DEC/Sat+ foram testadas. As bactérias originárias de um pré-cultivo foram inoculadas em 1L de meio LB pH 7,2 e incubadas por 18h. O sobrenadante do cultivo foi centrifugado, esterilizado e concentrado inicialmente até um volume de 50 mL no Labscale e, em seguida, concentrado até 10 mL no Vivaspín 20 (corte 50 kDa). A Tabela 9 mostra as diversas condições de cultivo testadas.

O sobrenadante do cultivo da cepa DEC/Sat+, concentrado e submetido ao gel SDS-PAGE a 8%, apresentou uma banda de aproximadamente 107 kDa, sugerindo a presença de Sat (Figura 10).

Para confirmar se essa banda correspondia à Sat secretada, as bandas do gel foram cortadas e enviadas para o Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantan para serem submetidas à espectrometria de massa (LC-MS/MS).

Tabela 9 – Condições de cultivo bacteriano para obtenção de Sat.

Volume	Inóculo	pH	Concentração da proteína
200 mL	Diretamente do congelado	7,2*	Vivaspín 20 com corte de 50 kDa
500 mL	Pré-cultivo <i>overnight</i> *	8,0	Filtração tangencial de escala laboratorial com filtro de corte de 50 kDa
1000 mL			Vivaspín 20 + Filtração tangencial*
1000 mL em 2 frascos *			

*Melhores condições.

Figura 10 – Proteína obtida do sobrenadante do cultivo da cepa DEC/Sat+ e submetida à espectrometria de massa.

O sobrenadante do cultivo bacteriano da cepa DEC/Sat+ foi concentrado e submetido ao SDS-PAGE 8%. Coluna 1 MM PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa; colunas 2 e 3: sobrenadante do cultivo da cepa DEC/Sat+ concentrado.

4.2.2 Identificação da proteína

A banda obtida no SDS-PAGE correspondente à massa molecular de 107 kDa (Figura 10), a qual foi sequenciada por espectrometria de massa (LC-MS/MS) e analisada pelo programa Mascot, versão 2.4.1. As sequências de peptídeos obtidas, destacadas em vermelho, foram comparadas com a sequência da cepa de *Escherichia coli* O6:H1 (CFT073/ATCC 700928/UPEC) (Figura 11). A pontuação da análise foi de 1934, lembrando que a porção da proteína sequenciada foi somente a que equivale ao domínio passageiro (posição de aa de 50 a 1018), por tratar-se da porção secretada. O resultado mostra que os peptídeos analisados correspondem à proteína Sat (Figura 11).

Confirmada a identidade de Sat no sobrenadante do cultivo da cepa DEC/Sat+, o próximo passo foi realizar a purificação da toxina.

Figura 11 - Identificação da proteína Sat por espectrometria de massa.

Continuação da Figura 11.

11/03/2016 Mascot Search Results: SAT_EC0L6

1920	182 - 192	385.5399	1153.5978	1153.5979	-0.061	1	36	0.00096	1	U R.YGIVTSDGSKK.I
1921	182 - 192	385.5399	1153.5978	1153.5979	-0.061	1	55	1.3e-005	1	U R.YGIVTSDGSKK.I
1922	182 - 192	577.8063	1153.5980	1153.5979	0.083	1	63	2.1e-006	1	U R.YGIVTSDGSKK.I
1925	192 - 197	367.2397	732.4648	732.4646	0.17	1	32	0.0025	1	U K.KIIGFR.A
1926	192 - 197	245.1623	732.4651	732.4646	0.70	1	24	0.014	1	U K.KIIGFR.A
193	193 - 197	303.1923	604.3700	604.3697	-0.49	0	16	0.025	1	U K.KIIGFR.A
1340	198 - 211	656.3124	1310.6102	1310.6103	-0.043	0	57	5e-006	1	U R.ASGGTSFINGESK.I
1093	309 - 319	600.3402	1198.6659	1198.6670	-0.91	0	49	6.2e-005	1	U K.INLNGNMVTK.N
4723	320 - 338	1050.9918	2099.9691	2099.9720	-1.36	0	75	5e-008	1	U K.NTDITLBQNNADTTGQSK.I
4724	320 - 338	700.9984	2099.9734	2099.9720	0.69	0	45	2.8e-005	1	U K.NTDITLBQNNADTTGQSK.I
4591	339 - 356	670.7020	2009.0842	2009.0834	0.44	2	31	0.0047	1	U K.ITKDKDIVTNGSDVLFK.D
3244	342 - 356	834.4359	1666.8572	1666.8567	0.30	1	59	1e-005	1	U K.DKDIVTNGSDVLFK.D
3245	342 - 356	556.6268	1666.8585	1666.8567	1.09	1	33	0.0046	1	U K.DKDIVTNGSDVLFK.D
101	385 - 392	365.7084	729.4023	729.4021	0.30	0	36	0.0025	1	U K.GAGIDIKK.E
684	411 - 420	513.8011	1025.5877	1025.5869	0.78	0	62	1.2e-006	1	U K.IGPGTLNVQK.K
993	411 - 421	577.8481	1153.6816	1153.6819	-0.25	1	55	3.8e-006	1	U K.IGPGTLNVQK.Q
4780	453 - 473	786.4097	2356.2072	2356.2063	0.37	1	44	0.00024	1	U K.VILNKDGLNDQVAGIFFTK.R
3868	458 - 473	895.4223	1788.8301	1788.8319	-1.02	0	66	1e-006	1	U K.DNSGLNDQVAGIFFTK.R
3864	474 - 489	596.3032	1785.8877	1785.8871	0.34	1	34	0.0023	1	U K.RGGTLNLNGNQTTTR.I
3034	475 - 489	815.8992	1629.7838	1629.7860	-1.33	0	67	9e-007	1	U R.GGTLNLNGNQTTTR.I
3035	475 - 489	544.2697	1629.7871	1629.7860	0.72	0	20	0.047	1	U R.GGTLNLNGNQTTTR.I
3610	490 - 506	862.9131	1723.8117	1723.8112	0.30	0	121	4.7e-012	1	U R.IAATDGGTTTWSOTTK.E
3611	490 - 506	575.6112	1723.8118	1723.8112	0.33	0	28	0.01	1	U R.IAATDGGTTTWSOTTK.E
1280	530 - 540	433.2329	1296.6768	1296.6786	-1.37	1	22	0.042	1	U K.LTNNSNQDK.T
789	545 - 554	530.3044	1058.5942	1058.5972	-2.79	0	28	0.019	1	U K.LILDGQVNTK.N
790	545 - 554	530.3060	1058.5974	1058.5972	0.21	0	35	0.0041	1	U K.LILDGQVNTK.N
791	545 - 554	530.3062	1058.5978	1058.5972	0.55	0	48	0.0002	1	U K.LILDGQVNTK.N
4797	555 - 577	636.5540	2542.1867	2542.1870	-0.13	0	20	0.031	1	U K.NDVEVSNAGLTMQSHATEAIFR.S
+ Oxidation (H)										
3389	614 - 627	847.8740	1693.7334	1693.7332	0.083	0	65	2.9e-007	1	U K.SNNQQTSTQPDQWK.T
3734	633 - 647	875.4311	1748.8476	1748.8482	-0.32	0	79	6.5e-008	1	U K.FDTLNLNADFSISR.N
3735	633 - 647	583.9565	1748.8478	1748.8482	-0.22	0	45	0.00014	1	U K.FDTLNLNADFSISR.N
1553	648 - 659	615.8072	1229.5998	1229.6000	-0.13	0	53	4.5e-005	1	U R.NANVEGNISANK.S
181	660 - 667	402.7266	803.4386	803.4389	-0.30	0	43	0.00046	1	U K.SAITIGK.Q
1022	678 - 687	585.2828	1168.5511	1168.5513	-0.14	0	42	0.0003	1	U K.NITNNGTDFK.N
1612	688 - 700	696.3712	1390.7279	1390.7304	-1.78	0	60	4.2e-006	1	U K.QTISTNLSIGETK.F
1613	688 - 700	696.3725	1390.7304	1390.7304	0.059	0	69	5.9e-007	1	U K.QTISTNLSIGETK.F
1168	741 - 751	620.3253	1238.6360	1238.6329	2.47	0	43	0.00027	1	U K.VIAQNSHTTK.G
1188	741 - 751	628.3211	1254.6277	1254.6278	-0.13	0	39	0.00087	1	U K.VIAQNSHTTK.G + Oxidation (H)
1189	741 - 751	628.3220	1254.6295	1254.6278	1.33	0	56	1.8e-005	1	U K.VIAQNSHTTK.G + Oxidation (H)
912	785 - 795	560.2986	1118.5826	1118.5832	-0.56	0	71	6.5e-007	1	U R.LSGGNANFIAR.N
4765	852 - 871	748.3709	2242.0909	2242.0913	-0.16	0	38	0.0011	1	U K.ATVSHNNAIWELNSQSSINR.L
4766	852 - 871	753.7029	2258.0868	2258.0862	0.28	0	33	0.0036	1	U K.ATVSHNNAIWELNSQSSINR.L + Oxidation (H)
1597	907 - 919	692.3826	1382.7506	1382.7518	-0.85	0	78	6e-008	1	U R.ANLAQADQLVVK.S
1598	907 - 919	461.9246	1382.7519	1382.7518	0.072	0	51	2.8e-005	1	U R.ANLAQADQLVVK.S
1349	925 - 935	659.3735	1316.7324	1316.7340	-1.20	0	59	1e-005	1	U K.NELLVDFIEK.N
231	952 - 959	418.7283	835.4421	835.4440	-2.24	0	42	0.00019	1	U K.GTAVDTK.A
232	952 - 959	418.7293	835.4440	835.4440	0.025	0	43	0.00013	1	U K.GTAVDTK.A
2958	978 - 991	813.4111	1624.8077	1624.8097	-1.21	1	85	1.8e-008	1	U K.NDTKATWTLIGYK.S
2959	978 - 991	542.6107	1624.8101	1624.8097	0.29	1	33	0.0031	1	U K.NDTKATWTLIGYK.S
778	983 - 991	526.7919	1051.5692	1051.5702	-0.98	0	51	5.9e-005	1	U K.ATWTLIGYK.S
1019	1001 - 1011	390.2181	1167.6324	1167.6322	0.22	1	26	0.0064	1	U K.KATLLMSGGYK.A
1052	1001 - 1011	592.8201	1183.6256	1183.6271	-1.26	1	55	1.7e-005	1	U K.KATLLMSGGYK.A + Oxidation (H)
1061	1001 - 1011	395.5499	1183.6278	1183.6271	0.59	1	32	0.0039	1	U K.KATLLMSGGYK.A + Oxidation (H)
756	1002 - 1011	520.7755	1039.5365	1039.5372	-0.70	0	68	6.4e-007	1	U K.ATLLMSGGYK.A
784	1002 - 1011	528.7733	1055.5320	1055.5321	-0.16	0	43	0.00025	1	U K.ATLLMSGGYK.A + Oxidation (H)
785	1002 - 1011	528.7738	1055.5331	1055.5321	0.89	0	38	0.00088	1	U K.ATLLMSGGYK.A + Oxidation (H)

http://172.25.1.211/mascot/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20150824%2F2F019000.dat&hit=SAT_EC0L6&ob_idx=1&px=1&ave_thresh=17&ignoreionssc... 2/3

Peptídeos obtidos na espectrometria de massa (em vermelho) e comparados com a sequência dos peptídeos de Sat descrita em UPEC, a partir do programa Mascot. Peptídeos obtidos correspondentes ao domínio passageiro, confirmando a identidade de Sat no sobrenadante do cultivo da cepa DEC/Sat+. Pontuação de 1934.

4.2.3 Purificação de Sat

A toxina Sat foi obtida por dois métodos distintos de purificação. Em uma primeira abordagem, Sat foi obtida por gel filtração e, posteriormente, a partir de uma coluna de afinidade à serino-protease.

4.2.3.1 Gel filtração

Para este procedimento, o sobrenadante do cultivo da cepa DEC/Sat+, concentrado no Vivaspín 20 até o volume de 1 mL, foi submetido à gel filtração para separação das proteínas por tamanho. Na figura 12A está indicada a faixa de frações (30 a 80) em que Sat foi identificada. Porém, nas frações 51 a 80, algumas proteínas de massa molecular menor do que Sat também foram visualizadas (Figura 12B). Por fim, a *pool* das frações de 30 a 66 foi concentrado até 1 mL e submetido ao SDS-PAGE (Figura 12C). O rendimento de Sat por este método foi de 144 µg/L de cultivo bacteriano.

4.2.3.2 Coluna de afinidade à serino-protease

Com o intuito de obter rendimento e pureza maiores, o sobrenadante do cultivo da DEC/Sat+ foi submetido à coluna de afinidade à serino-protease. Para isso, 10 mL do sobrenadante do cultivo, concentrado 100 vezes, foram aplicados à coluna. Durante a eluição, 55 frações de 1 mL foram coletadas. As frações de 13 a 19, correspondentes ao pico assinalado (Figura 13A), foram analisadas por SDS-PAGE 8%. Como mostra a Figura 13B, esta preparação ficou mais pura do que aquela obtida por gel filtração, já que apenas uma banda de aproximadamente 107 kDa foi observada.

As frações que apresentaram a banda com massa molecular correspondente à Sat foram concentradas a partir da ultrafiltração, corte de 50 kDa, até o volume de 1 mL. O produto concentrado foi submetido ao SDS-PAGE e uma banda de 107 kDa foi novamente visualizada (Figura 13C). O rendimento da proteína através deste método foi de 370 µg/L de cultivo bacteriano. A purificação a partir da coluna de afinidade à serino-protease foi mais adequada do que a purificação por gel filtração, uma vez que tanto o rendimento como o grau de pureza foram maiores. Com a toxina purificada, o próximo passo foi verificar a sua atividade enzimática.

Figura 12 – Obtenção de Sat por gel filtração.

Purificação da toxina Sat a partir do sobrenadante do cultivo bacteriano da cepa DEC/Sat⁺. O sobrenadante concentrado foi submetido à gel filtração. **A** - Cromatograma. **B** - Gel de SDS-PAGE 8% corado por nitrato de prata. Coluna 1 - PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa - Thermo; colunas de 2 a 8 - Pool de frações coletadas. **C** - Gel SDS-PAGE 8% corado por Coomassie Blue. Coluna 1 MM - Padrão de massa molecular Precision Plus Protein™ Padrão 1, 10-250 kDa, Coluna 2 - proteína purificada (frações 30 a 66 concentradas).

Figura 13 - Obtenção de Sat por coluna de afinidade à serino-protease.

A - Cromatograma da obtenção de Sat a partir da purificação por coluna de afinidade à serino-protease. Pico correspondente às frações 13 a 19. **B** Visualização da banda com massa molecular correspondente à Sat nas frações de 13 a 19 em SDS-PAGE a 8% corado com nitrato de prata. Coluna 1 - MM (Precision Plus Protein™ Standards - BioRad); Colunas 2 a 8 - Frações de 13 a 19, respectivamente. **C** Pool das frações 13 a 19 concentradas por ultrafiltração. Visualização da banda com massa molecular correspondente à Sat (107 kDa) em gel de SDS-PAGE a 8%, corado com nitrato de prata. Coluna 1 - Massa molecular (Precision Plus Protein™ Standards - BioRad).

4.2.4 Avaliação da atividade enzimática da toxina

Nos ensaios para a avaliação da atividade enzimática da toxina, os substratos utilizados apresentavam na região amino o radical fluorescente ácido *orto*-aminobenzóico (Abz), e na região carboxila o grupo apagador da fluorescência N-(2,4-dinitrofenil)-etilenodiamina (EDDnp). Os substratos avaliados foram: fenilalanina, arginina, serina, serina, arginina (FRSSR); alanina, glicina, leucina, alanina (AGLA) e fenilalanina, leucina, arginina, arginina, valina (FLRRV).

Dentre os substratos avaliados, o Abz-FRSSR-EDDnp foi o melhor hidrolisado com $18,04 \pm 3,15$ UF/min em 6 h de incubação, seguido de Abz-FLRRV-EDDnp, com $6,19 \pm 0,21$ UF/min e Abz-AGLA-EDDnp, com $4,87 \pm 2,39$ UF/min (Figura 14A). Assim, o substrato selecionado para a análise da atividade específica de Sat foi o Abz-FRSSR-EDDnp. A atividade de Sat também foi investigada nos tempos de 45 min e 18 h (dados não mostrados). No entanto, o resultado mais representativo foi o obtido com 6 h de incubação.

A atividade específica para a hidrólise do Abz-FRSSR-EDDnp pela Sat foi de $7,03 \pm 1,57$ UF/min/ μ g, sendo inibida em aproximadamente 80% por 3 mM de PMSF ($1,32 \pm 0,66$ UF/min/ μ g) (Figura 14B).

Figura 14 - Atividade enzimática de Sat.

A. Atividade hidrolítica de Sat nos substratos FRSSR, AGLA e FLRRV. **B.** Atividade específica de Sat sobre Abz-FRSSR-EDDnp, em presença e ausência de PMSF.

4.3 Obtenção do anticorpo anti-Sat

Para obtenção do anticorpo policlonal anti-Sat foi imunizado um coelho com 100 µg de Sat purificada. Após três imunizações, o título considerado do soro foi de 1:3.200, correspondente a uma DO três vezes superior em relação à DO obtida na titulação do soro pré-imune (Figura 15).

Figura 15 – Titulação do soro do coelho imunizado com Sat purificada.

ELISA realizado com o soro do coelho que recebeu 3 doses de 100 µg/mL de Sat e o controle (soro pré-imune). O título de anticorpos policlonais monoespecíficos IgG considerado foi de 1/3.200.

O reconhecimento de Sat foi comprovado pelo *Western blotting* realizado com os sobrenadantes obtidos a partir do cultivo das cepas DEC/Sat+, EAEC CV323 e FB114 (Figura 16). Considerando a homologia existente entre membros da família SPATE, o anticorpo anti-Sat foi testado quanto ao reconhecimento das proteínas Pet e Pic, secretadas pela cepa EAEC 042 (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006). Conforme mostra a Figura 16, o anticorpo reconheceu Sat purificada e Sat presente no sobrenadante do cultivo das cepas DEC/Sat+, EAEC CV323 e FB114. O anticorpo anti-Sat não reconheceu Pic e tampouco Pet, as quais apresentam identidade/similaridade de 53,8 % e 71,1%, respectivamente, com Sat (GUYER et al., 2000).

Figura 16 - Reconhecimento de Sat pelo anticorpo policlonal anti-Sat.

Western Blotting do sobrenadante do cultivo bacteriano de cepas produtoras de Sat (EAEC CV323; DEC/Sat+; DAEC FBC114) e secretora de Pet e Pic (EAEC 042), concentrados com TCA 20% e revelado com anticorpo policlonal anti-Sat. Coluna 1 - padrão de MM (Precision Plus Protein™, Standards (Bio-Rad)); Coluna 2 - Sat purificada; Colunas 3, 4 e 5 - sobrenadante do cultivo das cepas produtoras de Sat; Coluna 6 - Controle negativo (HB101); Coluna 8 - EAEC 042 produtora das SPATEs Pet e Pic.

4.4 Avaliação da atividade citotóxica de Sat

Os efeitos citotóxicos induzidos por Sat não estão totalmente elucidados. Indução de vacuolização (GUYER et al., 2002), destacamento celular (TADDEI et al., 2005) e alteração da morfologia celular (MARONCLE et al., 2006) são alguns exemplos de efeitos atribuídos à toxina. No entanto, como Sat foi inicialmente descrita em UPEC, a maioria dos estudos foram realizados com células originárias de rim e de bexiga (GUYER et al., 2000, 2002; MARONCLE et al., 2006).

Desta forma, considerando a prevalência do encontro do gene *sat* em bactérias oriundas de diferentes sítios de infecção e na tentativa de ampliar os estudos utilizando Sat purificada, a citotoxicidade foi avaliada em linhagens celulares derivadas do trato urinário (Y1, HEK-293, LLC-PK1), trato gastrointestinal (Caco-2) e em células endoteliais do cordão umbilical humano (HUVEC). Os parâmetros de citotoxicidade avaliados foram: morfologia, destacamento celular e viabilidade celular (permeabilidade e metabolismo celulares).

4.4.1 Células de linhagem Y1

As células Y1 foram descritas como uma linhagem sensível à Sat, razão pela qual foram escolhidas para estabelecer a cinética de ação da toxina. Para isso, culturas de células Y1 foram incubadas com 50 ou 100 µg/mL de Sat, durante 2 h, 5 h, 8 h e 24 h.

O primeiro parâmetro de citotoxicidade avaliado foi o destacamento celular. Neste experimento, após os diferentes tempos de incubação, lamínulas contendo as células foram lavadas, fixadas e coradas por Giemsa. A verificação da porcentagem de destacamento celular foi obtida determinando-se o número de células no aumento de 400X, em 6 campos escolhidos randomicamente. Conforme mostrado na Figura 17, Sat induziu o destacamento celular de maneira tempo-dependente, sendo o destacamento praticamente de 100%, após 24 h de incubação.

O destacamento observado ao longo da cinética foi semelhante em ambas as concentrações (50 e 100 µg/mL), exceto para o tempo de 2 h, no qual o destacamento não foi observado (Figuras 17) para a concentração de 50 µg/mL. Na análise por microscopia de luz foi possível observar que o efeito citotóxico é crescente a partir de 5 h de incubação (Figura 18A).

Outro parâmetro avaliado foi o efeito citotóxico, que correlaciona o destacamento celular às alterações morfológicas, conforme descrito por BETANCOURT-SANCHEZ; NAVARRO-GARCIA (2009). Foi atribuída a seguinte classificação: **1+** corresponde às células alongadas ou arredondadas > controle e < 50% das células afetadas; **2+** corresponde a > 50% das células arredondadas com destacamento < 50%; **3+** corresponde a > 50% das células removidas e restante de células arredondadas e **4+** corresponde a todas ou quase todas as células destacadas. Conforme mostra a Figura 18B, o efeito citotóxico foi detectado a partir de 2 h de incubação.

Uma vez observada a cinética do dano induzido por Sat, seguimos o estudo de citotoxicidade investigando a viabilidade celular pelo método de exclusão por *Trypan Blue*, o qual possibilita analisar se há interferência na permeabilidade da membrana celular. Para isso, as culturas celulares incubadas com a toxina na concentração de 100 µg/mL, durante 2 h, 5 h e 8 h foram tratadas com *Trypan Blue*. Após os diferentes períodos de incubação, 100 % das células encontravam-se viáveis (Figura 18B).

Uma vez detectado que a permeabilidade celular não era alterada por Sat e considerando que na avaliação da citotoxicidade diferentes parâmetros celulares devem ser avaliados, a alteração no metabolismo celular também foi investigada. Para isso, a capacidade

de reduzir o brometo de tetrazólio MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]} a formazan foi avaliada pelo método MTT. As células foram incubadas com 50 µg/mL de Sat durante 5 h, 8 h e 12 h. Os resultados obtidos no método colorimétrico indicaram 100% de viabilidade também quanto à capacidade metabólica, mesmo após 12 h de incubação com a toxina (dados não mostrados).

Figura 17 – Cinética da ação de Sat sobre as células da linhagem Y1.

Percentual de destacamento das células Y1 incubadas com 50 µg/mL e 100 µg/mL de Sat. As células foram incubadas por 2 h, 5 h, 8 h, e 24 h. Culturas celulares não tratadas com a toxina (controle negativo) foram consideradas com 0% de destacamento. O gráfico é representativo de três experimentos, realizados independentemente, em triplicata. A comparação entre as diferenças encontradas nas células incubadas com Sat e o C negativo foi feita por meio do teste estatístico ANOVA (**P<0,001) utilizando-se o programa GraphPad Prism 6 Versão 6.01.

Figura 18 – Avaliação da citotoxicidade de Sat em células da linhagem Y1.

Continuação da Figura 18

B

Células Y1 tratadas com toxina purificada (50 µg/mL e 100 µg/mL) durante 2h, 5h, 8h e 24h. **A)** Células incubadas com 100 µg/mL de Sat. Observação por microscopia de luz. Controle: DMEM + tampão de eluição (aumento: 100X). **B)** Efeito citotóxico e viabilidade celular. A porcentagem de viabilidade celular foi determinada pela incorporação de *Trypan Blue*, contando-se 300 células (aumento: 400X). A viabilidade celular não foi realizada no tempo de 24 h devido ao alto destacamento.

4.4.1.1 Neutralização da toxina

Para verificar se o efeito citotóxico nas células Y1 era realmente ocasionado por Sat, realizamos o ensaio de inibição da ação da toxina. A toxina, na concentração de 100 µg/mL, foi pré-incubada com anticorpo policlonal anti-Sat (75 µg/mL) durante 30 min. ou com inibidor de serino-proteases (PMSF), nas concentrações de 0,3 mM e 0,6 mM, durante 15 min. Em seguida, a fração da toxina exposta a cada tratamento foi adicionada às culturas celulares e as mesmas foram incubadas durante 8 h. As culturas mantidas com Sat sem tratamento ou que não receberam a toxina foram utilizadas como controles negativos.

Conforme mostra a Figura 19, o efeito citotóxico nas células que foram incubadas com a toxina tratada com o anticorpo anti-Sat resultou em 70% de inibição do destacamento celular, ao passo que nas células que receberam a toxina tratada com PMSF (0,3 mM e 0,6 mM) a inibição foi de 80% e 100%, respectivamente (Figura 19B).

Figura 19 – Neutralização do efeito citotóxico de Sat em células Y1.

A

Continuação da Figura 19

B

Células Y1 incubadas com 100 $\mu\text{g/mL}$ de Sat purificada previamente incubadas com IgG anti-Sat (75 $\mu\text{g/mL}$) ou com PMSF (0,3 mM e 0,6 mM), durante 30 min. e 15 min., respectivamente. As células incubadas com a toxina sem tratamento ou que não receberam a toxina foram utilizadas como controles negativos. **A)** Análise realizada por microscopia de luz (aumento: 100X). **B)** Percentual de inibição de destacamento celular das culturas tratadas com PMSF (0,3 mM e 0,6 mM) e anticorpo anti-Sat. A comparação das diferenças encontradas nas células incubadas com Sat não tratadas em relação às tratadas foi feita por meio do teste estatístico ANOVA (***) $P < 0,001$), utilizando-se o programa GraphPad Prism 6 Versão 6.01.

4.4.2 Células da linhagem LLC-PK1

Estabelecido o perfil de citotoxicidade de Sat em células Y1, utilizamos outra linhagem celular (LLC-PK1), originária de rim de porco. Inicialmente as culturas foram incubadas durante 2 h, 5 h, 8 h e 24 h com 100 $\mu\text{g/mL}$ de Sat. Depois de cada período, as culturas foram lavadas, fixadas e coradas para a avaliação tanto do destacamento celular como do efeito citotóxico.

A Figura 20A mostra as células após a incubação de 24 h com efeito citotóxico 4+, que corresponde a uma severa alteração morfológica e destacamento celular de cerca de 90% das células (Figura 20B). Por outro lado, as culturas incubadas por 2 h não apresentaram nenhum efeito citotóxico (Figura 20C). Tanto o destacamento como a alteração morfológica nas células LLC-PK1 só começaram a ser significativos após 8 h de incubação (Figuras 20B e 20C).

Paralelamente, a avaliação da permeabilidade da membrana, um marcador da viabilidade celular, foi determinada pelo método de exclusão com *Trypan Blue*. Conforme mostra a Figura 20C, a alteração da permeabilidade celular também foi detectada no período de 8 h e, devido ao destacamento celular maior do que 90% no período de 24 h, a mesma não foi avaliada para este tempo.

Figura 20 – Avaliação da citotoxicidade de Sat em células LLC-PK1.

Continuação da Figura 20

B **C**

Células LLC-PK1 incubadas com 100 µg/mL de Sat purificada durante 2 h, 5 h, 8 h e 24 h. **A)** Culturas incubadas por 24 h e visualizadas por microscopia de luz (aumento: 100X e 400X). Controles: DMEM + tampão de eluição; DMEM + 10% de SFB) **B)** Percentual de destacamento celular ao longo da cinética. **C)** Efeito citotóxico e viabilidade celular avaliada pelo método de exclusão por *Trypan Blue* das culturas tratadas com 100 µg/mL de Sat nos tempos de 2 h, 5 h e 8 h. A comparação das diferenças encontradas das células incubadas com Sat em relação ao C- foram realizadas pelo ANOVA (**P<0,001), utilizando-se o programa GraphPad Prism 6 Versão 6.01.

4.4.3 Células da linhagem HEK-293

Considerando que Guyer et al. (2002) demonstraram vacuolização nas células HEK-293 incubadas com 100 µg/mL da toxina após apenas 1 h, foram investigados tempos maiores, partindo-se de uma menor concentração de Sat. Para isso, as células foram incubadas inicialmente por 5 h e 8 h com 50 µg/mL. Após este período, foi feita a análise morfológica e determinação da porcentagem de destacamento. Tanto em 5 h como em 8 h nenhum destacamento ou alteração na morfologia foram observados (Figuras 21B e 21C). Apenas a viabilidade celular analisada pelo método de exclusão por *Trypan Blue* foi de 60% (Figura 21C).

Culturas incubadas com 100 µg/mL da toxina por 24 h apresentaram intenso arredondamento celular com 82% de destacamento (Figura 21A). No tempo de 24 h, em função do intenso destacamento, a permeabilidade celular não foi avaliada.

Para HEK-293, diferente das outras linhagens do trato urinário aqui estudadas, o efeito de Sat parece interferir inicialmente na membrana da célula e o destacamento só foi visto no tempo de 24 h.

Figura 21 – Avaliação da citotoxicidade de Sat em células HEK-293.

Continuação da Figura 21

Avaliação dos danos celulares induzidos por Sat purificada nas células da linhagem HEK-293. A) Células tratadas com a toxina (100 µg/mL) durante 24 h (aumento: 100X e 400X). Controles: DMEM + tampão de eluição DMEM + 10% de SFB. B) Percentual de destacamento obtido quantificando-se o número de células em 6 campos aleatórios (400X). C) Efeito citotóxico obtido segundo os parâmetros descritos por Saidi; Sears (1996) e Betancourt-Sanchez; Navarro-Garcia (2009).

4.4.4 Células da linhagem Caco-2

Considerando que o intestino, além do sistema urinário, é também um nicho de bactérias portadoras do gene *sat*, foram investigadas células intestinais humanas da linhagem Caco-2, não polarizadas, quanto a sensibilidade à Sat.

As culturas de células Caco-2, não polarizadas, foram incubadas com 100 µg/mL da toxina purificada. Nenhum efeito foi observado em culturas incubadas por tempos inferiores a 8 h de incubação (dados não mostrados). Após 8 h de incubação, o destacamento celular observado foi de apenas 15%, porcentagem esta muito menor do que o destacamento observado nas linhagens estudadas originárias do trato urinário. A alteração na morfologia celular observada assemelha-se mais a uma "retração celular" do que propriamente ao descolamento das células (Figura 22). Isto pode estar relacionado aos achados de Guignot et al. (2007), os quais demonstraram que Sat interfere em proteínas associadas às *tight junction*, alterando a permeabilidade intercelular.

4.4.5 Células HUVEC

A prevalência do gene *sat* em amostras isoladas de bacteremia observadas pelo nosso grupo (comunicação pessoal), aliada aos achados recentes do gene *sat* em cepas isoladas de septicemia por Tapader et al. (2014) e de meningite por Iqbal et al. (2016), suscitaram investigar se as células endoteliais poderiam ser suscetíveis à Sat, já que, em ambos os tipos de infecção, inevitavelmente a bactéria interage com o endotélio.

Para isso, células HUVEC foram incubadas com 100 µg/mL de toxina por 2 h. Conforme mostra a Figura 23, após apenas 2 h de incubação o efeito citotóxico foi correspondente a 3+ com alteração na morfologia celular e cerca de 50% de destacamento celular (Figura 23). Estes resultados revelaram que as células endoteliais foram, dentre todas as linhagens aqui estudadas, a mais sensível à Sat.

A figura 24 sumariza os resultados obtidos no estudo da citotoxicidade das células Y1, LLC-PK-1, Caco-2 e HUVEC, incubadas com 100 µg/mL de Sat (efeito citotóxico, destacamento celular, permeabilidade e metabolismo celulares). Importante ressaltar que os resultados para cada linhagem são representativos do menor tempo de incubação necessário para alterar algum dos parâmetros considerados. A HUVEC foi a linhagem mais sensível à Sat, seguida pelas linhagens Y1 e LLC-PK1. As células Caco-2 foram as mais resistentes e as alterações observadas diferem daquelas observadas nas demais linhagens, uma vez que não impactam na perda celular.

Figura 22 - Avaliação da citotoxicidade de Sat em células Caco-2.

Células Caco-2, não polarizadas, foram incubadas durante 8 h com 100 $\mu\text{g/mL}$ de toxina purificada. Controles: DMEM + tampão de eluição; DMEM + 10% de SFB. Análise realizada por microscopia de luz (aumento: 100X e 400X).

Figura 23 – Avaliação da citotoxicidade de Sat em células HUVEC.

Células HUVECs foram incubadas durante 2 h com 100 $\mu\text{g/mL}$ de toxina purificada. Análise realizada por microscopia de luz (aumento: 100X e 400X). Controles: RPMI + tampão de eluição (C -); RPMI + 10% de SFB.

Figura 24 Análise comparativa do efeito citotóxico observado nas diferentes linhagens celulares, no menor tempo de incubação necessário ao dano celular.

Viabilidade	NT*	100 %	75 %	100 %	NT*	Trypan Blue
Celular	NT*	100 %	100 %	100 %	NT*	MTT

Resumo dos resultados obtidos na avaliação da citotoxicidade pelos diferentes parâmetros. Efeito citotóxico, percentual de destacamento e viabilidade celular verificadas pelos métodos de exclusão por *Trypan Blue* e MTT. As linhagens celulares foram incubadas com 100 µg/mL e os danos mostrados referem-se ao menor tempo de exposição à toxina capaz de comprometer a célula. HUVECs (2 h), Y1 (5 h), LLC-PK-1 (8 h), Caco-2 (8 h) e HEK-293 (24h). *NT: não testado.

4.5 Avaliação da ação citotóxica de Sat durante infecção *in vitro*

Ao estudar algum fator de virulência sempre há o interesse em analisar a sua ação no contexto da infecção. Desta forma, para analisar o papel de Sat na interação bactéria-célula hospedeira, uma estratégia utilizada foi avaliar a citotoxicidade durante a infecção por cepas bacterianas que expressam *sat*. Para realizarmos este estudo, as condições ideais de infecção foram previamente estabelecidas.

4.5.1 Estabelecimento das condições ideais do cultivo bacteriano para os ensaios de infecção celular

Considerando que Sat é secretada pelas bactérias cultivadas em meio LB e que este meio não é adequado às culturas celulares, a investigação da secreção de Sat no meio DMEM, acrescido de 1% de tripton, foi realizada conforme demonstrado por Betancourt-

Sanchez e Navarro-Garcia (2009), por ser considerada mais favorável para a secreção de Pet. Para isso, foi realizada uma cinética comparativa de secreção de Sat no meio LB e DMEM + 1% de triptona. O sobrenadante do cultivo da cepa de EAEC CV323 (cultivada em LB e em DMEM + 1% de triptona durante 2 h, 5 h, 8 h, 12 h e 24 h) foi precipitado com TCA, submetido ao SDS-PAGE e, posteriormente, ao *Western Blotting*. A Figura 25 mostra que Sat é secretada no meio DMEM, acrescido de 1% de triptona, de forma semelhante ao observado no meio LB. Em ambos os meios de cultura, a partir de 2 h de cultivo, já foi possível detectar Sat no sobrenadante. A secreção mostrou-se aumentada ao longo das 24 h de cultivo.

Uma vez estabelecido que Sat é secretada no meio DMEM suplementado com triptona, o próximo passo foi determinar o tempo necessário para que a cultura bacteriana atingisse, neste mesmo meio de cultura, a fase logarítmica de crescimento. Para isso, realizou-se uma cinética de crescimento das cepas EAEC CV323/77, DEC/Sat+, FBC114 e HB101 em meio DMEM + 1% de triptona ao longo de 8 h de cultivo. Conforme mostra a Figura 26, após cerca de 2 horas e meia de cultivo todas as cepas ensaiadas encontravam-se na metade da fase logarítmica de crescimento. Neste tempo, o número de UFC de todas as cepas bacterianas foi determinado, possibilitando usar na infecção o MOI 1:10.

Figura 25 - Cinética de secreção de Sat em meios de cultura distintos.

Cinética de secreção de Sat pela cepa EAEC CV323 ao longo de 24 h. As bactérias foram cultivadas em meio DMEM + 1% de triptona e, como controle de secreção, em meio LB. Os sobrenadantes do cultivo após 2 h, 5 h, 8 h, 12 h e 24 h de incubação foram reservados, precipitados e submetidos ao *Western Blotting*.

Figura 26 - Cinética de crescimento das diferentes cepas bacterianas.

Cinética de crescimento das cepas EAEC CV323, DEC/Sat+ e FBC114 (C+) e HB101 (C-). As cepas foram cultivadas em meio DMEM + 1% de triptona a 37°C e com agitação de 200 rpm. A DO (600nm) foi determinada a cada 30 min, ao longo das 8 h.

4.5.2 Infecção das células Y1 por cepas bacterianas secretoras de Sat

As células Y1 foram infectadas (durante 5 h e 24 h) com as cepas EAEC CV323 e DEC/Sat⁺ e como controles foram utilizadas as cepas FBC114 e HB101 (MOI 10). As bactérias resgatadas após 5 h de infecção foram utilizadas para a investigação da transcrição do gene *sat* através do RT-PCR semiquantitativo. Conforme mostra a Figura 27, o gene *sat* foi transcrito pelas cepas EAEC CV323 e DEC/Sat⁺ de forma semelhante à cepa FBC114, utilizada como controle positivo.

Figura 27 - Análise do perfil de transcrição do gene *sat* em bactérias durante a infecção.

Perfil de transcrição do gene *sat*, durante a infecção de células Y1, avaliado pelo RT-PCR semiquantitativo após 5 h de infecção bacteriana (MOI 10). Gel de agarose a 1%. Como controle foi utilizado o gene constitutivo da isocitrato desidrogenase (*icd*).

Foi investigada a presença de Sat no meio de cultura das células Y1 infectadas com as cepas bacterianas EAEC CV323 e DEC/Sat⁺ nos tempos de 5 h e 24 h. Após cada período, o sobrenadante do cultivo foi precipitado com TCA 20%, submetido ao SDS-PAGE e, em seguida, ao *Western blotting*. Conforme mostra a Figura 28, Sat está presente no meio de cultivo a partir de 5 h de infecção.

Uma vez detectada a presença de Sat durante a infecção, o efeito citotóxico foi também avaliado em ambos os períodos. Considerando que durante a infecção há consumo do meio de cultura e produção de metabólitos, espera-se que as células, independente da ação da toxina, apresentem alguma alteração. Em função disto, células infectadas com a cepa HB101 foram utilizadas controle negativo. Comparando-se as imagens das culturas infectadas e das cepas secretoras de Sat com a cultura infectada pela cepa HB101, nota-se nítida alteração na morfologia (Figuras 29A e 29B). O destacamento celular pode ser observado já no tempo de

5 h (Figuras 29A e 29C). O dano é ainda maior no tempo de 24 h, principalmente nas células infectadas com a cepa EAEC CV323. Porém, é muito possível que parte do dano observado no tempo de 24 h seja decorrente do perfil próprio das EAEC, cuja principal característica é a intensa adesão às células (Figura 29B).

Figura 28 – Sat secretada durante a infecção de células Y1.

Western blotting do sobrenadante do meio de cultura das células Y1 infectadas com as cepas EAEC CV323 e DEC/Sat+, por 5 h (A) e 24 h (B). As cepas FBC114 e HB101 foram utilizadas como controle positivo e controle negativo, respectivamente. As setas indicam a banda correspondente à toxina secretada durante a infecção.

Figura 29 – Avaliação da citotoxicidade de Sat durante a infecção em células Y1.

A – 5 h de infecção

100 X

400 X

Continuação da figura 29

B – 24 h de infecção

Continuação da figura 29

C

Células da linhagem Y1 infectadas com as cepas EAEC CV323, DEC/Sat+, DAEC FB114 (controle +) e HB101 (controle negativo) (MOI 10) durante 5 h e 24 h. **A)** Observação das células infectadas por 5h (aumento: 100X e 400X). **B)** Observação das células infectadas por 24 h (aumento 100X e 400X). **C)** Efeito citotóxico e % de descolamento induzidos pela infecção.

4.5.3 Neutralização do efeito de Sat durante a infecção

Para verificar se o efeito citotóxico observado durante a infecção era devido à ação de Sat, cepas bacterianas pré-incubadas com anticorpo policlonal anti-Sat (250 µg/mL) ou PMSF (0,6 mM) foram utilizadas para a infecção das células Y1 durante 5h. Após este período, as culturas foram lavadas, fixadas e coradas com Giemsa para a análise por microscopia de luz. Tanto o anticorpo policlonal anti-Sat como o inibidor de serino-protease (PMSF) foram capazes de inibir significativamente o dano celular (Figura 30A). O percentual de inibição pelo anticorpo foi de 84 % para as cepas FB114 e EAEC CV323 e de 81 % para a cepa DEC/Sat+. O PMSF inibiu 96 % o dano induzido por FB114, 99 % por EAEC CV323 e 96 % por DEC/Sat+ (Figura 30B).

Estes resultados comprovam que as bactérias secretaram Sat durante a infecção, ocasionando dano celular já no período de 5 h de infecção. Esses achados constituem o primeiro relato de que EAEC secreta Sat e que está é capaz de induzir efeito citotóxico durante a infecção.

Figura 30 – Neutralização de Sat durante a infecção de células Y1.

B

Células Y1 foram infectadas durante 5 h com as cepas EAEC CV323/77, DEC/Sat+, DAEC FB114 (C +) e HB101 (C-), previamente tratadas com anticorpo anti-Sat(250 µg/mL) ou com PMSF (0,6 mM). A) Análise por microscopia de luz (aumento: 100X). B) Percentual de inibição do destacamento celular determinado pela quantificação das células em seis campos escolhidos randomicamente. Microscopia de luz (aumento: 400X). O gráfico é representativo de 3 experimentos, realizados independentemente, em triplicata. Teste estatístico ANOVA (**P<0,001) utilizando o programa GraphPad Prism 6 Versão 6.01.

5 DISCUSSÃO

Bactérias patogênicas dispõem de um arsenal de fatores de virulência com funções complexas que são responsáveis pela sobrevivência, multiplicação e disseminação no hospedeiro mamífero. Estes determinantes de virulência são frequentemente expostos na superfície da bactéria ou secretados no meio externo.

Nas bactérias Gram-negativas há diferentes sistemas que garantem a secreção destes fatores de virulência. Entre eles, está o sistema de secreção do tipo V, que transporta exclusivamente as proteínas denominadas autotransportadoras. Esta classe de proteínas é formada por um peptídeo sinal na região N-terminal, que atravessa a membrana interna, um domínio passageiro, que corresponde à proteína madura secretada e um domínio localizado na região C-terminal, responsável pela formação de poro na membrana externa.

As propriedades de virulência destas proteínas estão associadas, exclusivamente, ao domínio passageiro, que é o responsável pela função fisiológica da proteína. A capacidade das proteínas autotransportadoras de carregar toda a informação necessária à secreção tem possibilitando avanços biotecnológicos. A substituição genética do domínio passageiro está sendo estudada como uma ferramenta para o direcionamento de proteínas heterólogas em diversos sistemas (JOSE; MEYER, 2007; RUIZ-PEREZ; NATARO, 2014; VAN ULSEN et al., 2014).

SPATE é uma família de proteases autotransportadoras extracelulares produzidas por membros da Família *Enterobacteriaceae*, cujas funções descritas incluem, por exemplo, a de funcionar como adesinas, proteases, esterases e lipases, preservando o mecanismo comum de exportação. Desde a descrição do primeiro membro desta Família por Provence e Curtiss (1994), o encontro de novos determinantes de virulência em diferentes patótipos de *E. coli*, *Shigella*, *Salmonella* e *Citrobacter* têm sido frequente (NIYOGI; VARGAS; VILLA, 2004; NHAN et al., 2011; VIJAYAKUMAR et al., 2014; ANDRADE et al., 2017).

De acordo com a filogenia e a atividade biológica, as SPATEs foram classificadas em dois grupos: Classe-1, que inclui aquelas com atividades citotóxicas (Pet, Sat, SigA, EspC e EspP) e Classe-2, que inclui as proteases com atividades imunomoduladoras e/ou mucinolíticas (Pic, Tsh, Vat, SepA, EatA, EpeA e EspI) (RUIZ-PEREZ; NATARO, 2014). No entanto, esta classificação tem se mostrado inadequada à medida que ações imunomodulatórias têm sido atribuídas às SPATEs de Classe I e, por outro lado, ações citopáticas têm sido descritas nas SPATEs de Classe II (VIJAYAKUMAR et al., 2014).

Sat é uma protease citotóxica que teve a sua expressão inicialmente descrita em UPEC (GUYER et al., 2000), depois em DAEC (TADDEI et al., 2003) e, mais recentemente, em uma cepa de probiótico (TOLOZA et al., 2015). No entanto, a presença do gene tem sido relatada, com menor frequência, também em EAEC, *Shigella*, EPEC e ETEC (GUYER et al., 2000; NIYOGI; VARGAS; VILLA, 2004; BOISEN et al., 2009; ANDRADE et al., 2017).

Neste trabalho foram estudadas duas cepas isoladas de diarreia, ambas portadoras do gene *sat*: a cepa CV323/77, identificada como EAEC (Figura 6) (Tabela 7) e a cepa EC233/93, a qual não apresentou nenhum dos marcadores de EPEC e EAEC (tabela 7), e tampouco outros patótipos de DEC, conforme descrito por Do Valle (1998) e que, em função disso, foi aqui denominada como DEC/Sat+.

No alinhamento da sequência do fragmento de 930 pb do gene *sat* das cepas EAEC CV323/77 e DEC/Sat+ com a UPEC cepa CFT073 observaram-se quatro mutações, porém apenas duas resultaram em troca de aminoácido (posições 2006 e 2311) (Figura 9). A identidade de Sat secretada no sobrenadante pela cepa DEC/Sat+ foi confirmada pela análise da banda de 107 kDa através de espectrometria de massa MS/LC/MS (Figura 11). O alinhamento da sequência de aminoácidos das cepas DEC/Sat+ e EAEC CV323 com a sequência de aminoácidos da amostra CFT073, mostrou que ambas as cepas apresentaram as mesmas mutações, sendo elas: valina por alanina (posição 669) e treonina por alanina (posição 771). Cabe ressaltar que a mutação na posição 669 também foi descrita na Sat da cepa de probiótico Nissle 1917 (Figura 11) (TOLOZA et al., 2015).

A mutação na posição 771 foi a única na qual a troca aconteceu entre aminoácidos de grupos diferentes. A treonina, que é um aminoácido polar, foi substituída pela alanina, de natureza apolar. Contudo, estas mutações não incidem na tríade catalítica composta por histidina (posição 121), ácido aspártico (posição 149) e serina (posição 256). No caso do fragmento do gene *sat* aqui amplificado, vale lembrar que a região que codifica a tríade catalítica não está inclusa, e em decorrência disso não é possível afirmar, pelo sequenciamento, que não haja mutação. Contudo, os ensaios para avaliar a atividade enzimática e a investigação da citotoxicidade *in vitro* da toxina purificada indicam que esta região está conservada.

Sat foi purificada a partir da cepa DEC/Sat+, uma vez que esta não amplificou nenhum dos 20 genes de proteínas autotransportadoras investigados (Tabela 8). Dois métodos de obtenção da proteína foram testados: gel filtração (Figura 12) e coluna de afinidade à serino-

protease (Figura 13), sendo que por afinidade, tanto a pureza como o rendimento da proteína foram superiores. A identidade de Sat secretada por DEC/Sat+ foi confirmada por espectrometria de massa MS/LC/MS, através do *software* Mascot, com 1934 de pontuação (Figura 11).

A atividade enzimática de Sat foi testada nos substratos: i) phe-arg-ser-ser-arg; ii) ala-gli-leu-ala; iii) phe-leu-arg-arg-val, mas apenas o primeiro substrato (phe-arg-ser-ser-arg) apresentou atividade e foi inibida por PMSF. A atividade da enzima só foi detectada após 6 h de incubação com o substrato (Figura 14). Embora a atividade da enzima não tenha sido detectada em tempos inferiores, em estudo no qual a atividade enzimática de diferentes SPATEs foi testada em diversos substratos, Dutta et al. (2002) só detectaram atividade de Sat após 12 h de incubação. Estes autores sugeriram que aminoácidos hidrofóbicos eram mais sensíveis à Sat, no entanto, o substrato com características mais hidrofóbicas aqui testado (ala-gli-leu-ala) não foi clivado pela toxina (Figura 14). Além disso, dentre os 17 substratos testados, apenas 5 foram sensíveis à Sat, sugerindo que os nossos achados (Figura 14) podem estar relacionados às características de Sat.

Ainda que se considere como alta a homologia entre os membros de SPATE, já foi relatada que a especificidade aos substratos diferiu entre as proteases testadas (DUTTA et al., 2002). Com a obtenção de Sat enzimaticamente ativa e a produção do anticorpo anti-Sat (que não reconhece cruzadamente nem Pic nem Pet, conforme Figura 16, sendo esta última a que apresenta maior homologia em relação à Sat (com 53,8 % de identidade e 71,1% de similaridade), obtivemos as ferramentas necessárias para o prosseguimento do trabalho.

A primeira descrição de Sat em UPEC foi a partir de uma cepa isolada de pielonefrite (GUYER et al., 2000), os estudos relacionados ao seu papel foram melhor abordados em células de rim e bexiga (GUYER et al., 2000, 2002; MARONCLE et al., 2006). A indução de vacuolização (GUYER et al., 2002), o destacamento celular (TADDEI et al., 2005) e a alteração da morfologia celular (MARONCLE et al., 2006) são alguns exemplos de efeitos atribuídos à toxina. Em função da diversidade das informações sobre os efeitos citotóxicos atribuídos à Sat, bem como dos tempos de incubação necessários para a indução de efeito, foi proposta uma uniformização de ensaios com diferentes linhagens celulares. Inicialmente, a toxina foi testada em três diferentes linhagens celulares originárias do trato urinário (Y1, LLCPK-1, HEK293) e a cinética de indução de dano foi realizada pela primeira vez (Figura 17).

Entre as linhagens do trato urinário aqui estudadas, a mais sensível à Sat foi a linhagem Y1. Na cinética realizada com esta linhagem, observou-se que após 5 h de contato com a toxina, 50% das células foram perdidas (Figura 18), tempo de ação muito próximo ao da atividade enzimática medida (Figura 14). Em algumas linhagens celulares, o destacamento celular tem sido relacionado ao fato da espectrina, proteína associada à actina F, ser o alvo de Sat (MARONCLE et al., 2006). O tratamento prévio da toxina com anti-Sat ou PMSF inibiram o efeito citotóxico de destacamento celular e morte, confirmando que o dano observado era decorrente da ação de Sat (Figura 19). Esta linhagem já havia sido indicada como sensível à Sat por Taddei et al. (2005). No entanto, o dano por eles relatado foi menor, e só foi observado após 36 h de incubação, possivelmente devido à toxina encontrar-se no sobrenadante em concentração menor à toxina purificada testada no presente trabalho.

Sabe-se que é importante, ao investigar algum efeito citotóxico, avaliar mais do que um parâmetro (FRESHNEY, 2011). Seguindo esta linha, além do destacamento celular, a morfologia, a permeabilidade e o metabolismo da célula foram avaliados. Com relação à Y1, Sat induziu arredondamento celular também de forma tempo-dependente, mas curiosamente não interferiu nem na permeabilidade da membrana, nem no metabolismo celular (Figura 18). Na análise da ação de Sat na linhagem LLCPK-1, também de origem renal, o destacamento celular induzido foi menor (40%) e só foi observado após 8 h, tempo superior ao observado em Y1 (Figura 20B). No entanto, em células LLCPK-1, Sat interferiu na permeabilidade da membrana de 40% das células (Figura 20C).

No caso das células da linhagem HEK-293, originária de rim, alguns estudos já haviam relatado a sensibilidade à Sat (GUYER et al., 2000, 2002). Estes autores atribuíram vacuolização celular às culturas incubadas por 1 h com Sat em concentrações de 5 µg/mL a 100 µg/mL, ao passo que Maroncle et al. (2006) descreveram alteração morfológica após 2 h de incubação. Partindo destes achados, as células HEK-293 foram inicialmente incubadas, durante 5 h e 8 h, com uma menor concentração de Sat (50 µg/mL). Nestas condições, nem alteração morfológica nem destacamento celular foram observados, sendo que a ocorrência de destacamento celular só foi detectado nas culturas com 100 µg/mL da toxina, durante 24 h de incubação (76%) (Figura 21A e 21B). No entanto, na concentração menor da toxina (50 µg/mL), após 8 h de incubação, 40% das células apresentaram permeabilidade alterada. Esses resultados foram semelhantes aos observados na linhagem LLCPK-1 (Figura 21C).

Uma hipótese a ser considerada para entender porque nas células Y1, linhagem mais sensível à toxina do que as linhagens LLCPK-1 e HEK293, não foi detectada alteração na permeabilidade da membrana, pode estar relacionada ao intenso descolamento. No entanto, o comportamento diferenciado entre linhagens celulares foi também sugerido por Maroncle et al. (2006) que, trabalhando com células de bexiga e de rim, observaram que as células de bexiga eram mais sensíveis à Sat do que as células renais (HEK-293), quando expostas às mesmas condições. Neste trabalho, 2 h de incubação com Sat foram suficientes para identificar a toxina associada ao citoesqueleto das células de bexiga (MARONCLE et al., 2006).

Com relação ao intestino, uma vez que a expressão de Sat também foi demonstrada em DAEC, a ação da toxina em células intestinais poderia contribuir na compreensão da patogenia da diarreia. Em função disso, este trabalho também utilizou as células de origem intestinal Caco-2. Nos ensaios com estas células, não polarizadas, as alterações observadas assemelharam-se mais a uma “retração celular” do que propriamente à detecção de perda da célula (Figura 22), uma vez que o percentual de destacamento das células Caco-2, incubadas durante 8 h com a toxina, foi de apenas 15% (Figura 22). Estes resultados estão de acordo com os trabalhos abordando células Caco-2, nos quais Sat parece afetar diretamente a distribuição e a expressão de proteínas, como ZO-1, ZO-3 e ocludina, associadas às *tight junctions*. Desta forma, conforme sugerido por Guignot et al. (2007), nas células Caco-2 o efeito de Sat estaria mais relacionado ao aumento da permeabilidade intercelular e não ao destacamento, uma vez que o citoesqueleto parece não ser o alvo da toxina nestas células.

Os resultados aqui demonstrados, à luz de relatos anteriores (GUIGNOT et al., 2007; LIÉVIN-LE MOAL et al., 2011; TOLOZA et al., 2015), sugerem que o mecanismo de ação de Sat nas células intestinais seja diferente do mecanismo de ação em células do trato urinário. Em células Caco-2, a toxina parece não interagir com a actina-F, no entanto, a ausência da interação pode também ser um acontecimento característico de células intestinais não polarizadas. Ensaios com células polarizadas foram realizados por Toloza et al. (2015), tendo sido demonstrada a secreção de Sat na cepa Nissle 1917, que é probiótica. Interessante ressaltar que a toxina secretada pelo probiótico é incapaz de induzir quaisquer efeito sobre as células Caco-2. No entanto, a Sat secretada pela cepa HB101, que expressava o gene do probiótico, aumentou a permeabilidade intercelular em células Caco-2 polarizadas (TOLOZA

et al., 2015). Estes achados fortalecem a hipótese de que realmente o alvo de Sat nas células intestinais, diferentemente do que ocorre em outras linhagens, realmente não seja a actina-F.

O nosso grupo tem observado alta prevalência do gene *sat* em cepas originárias de bacteremia (dados não mostrados). De forma semelhante, Tapader et al. (2016) verificou que membros da família SPATE são mais frequentes em cepas isoladas de septicemia neonatal do que em cepas isoladas de fezes ou em amostras provenientes do meio ambiente. Importante ressaltar que Vat (*vacuolating autotransporter toxin*) e Sat têm sido descritas como as duas proteínas mais prevalentes em SPATEs. Iqbal et al. (2016), investigando marcadores de virulência em cepa isolada de meningite fatal, encontraram apenas o gene *sat* dentre as SPATEs. Vale lembrar que *Escherichia coli* isolada de bacteremia pode atingir a corrente sanguínea em decorrência de uma infecção do trato urinário ou da translocação intestinal da bactéria.

Embora sejam conhecidos diferentes fatores de risco relacionados ao hospedeiro que possam favorecer essa migração, os determinantes de virulência relacionados à bactéria devem ser explorados no contexto da bacteremia, pois é possível que determinados fatores de virulência possam assumir uma extrema relevância na colonização de outro nicho no hospedeiro. Sendo assim, no caso da bacteremia, a interação da bactéria ao endotélio é um fato, e, portanto, a ação de Sat sobre células endoteliais deveria ser considerada. Desta forma, no estudo da ação de Sat sobre as células HUVEC, demonstramos ineditamente que células endoteliais são muito mais sensíveis à toxina do que as células originárias do trato urinário ou mesmo intestinal. Após apenas 2 h de incubação, praticamente mais de 50% das células foram perdidas (Figura 23).

Os resultados aqui apresentados sugerem que Sat possa ter um papel diferenciado nos distintos nichos de infecção. Sendo assim, na infecção intestinal, Sat poderia exercer um papel restrito na virulência das bactérias quando comparado às bactérias presentes no trato urinário. No entanto, uma vez que a bactéria ganhe a corrente sanguínea, a importância da toxina na patogenia pode ser exacerbada.

Por fim, além dos estudos da ação da toxina purificada diretamente sobre as células, um outro objetivo deste trabalho foi estudar a interação da EAEC, secretora de Sat, no contexto da infecção. A relação do dano relacionado à SPATE na infecção de EAEC só foi

descrita por Ruiz et al. (2014), os quais estudaram a ação da toxina Pet durante a infecção. Segundo estes autores, amostras secretoras de Pet induzem um intenso dano celular.

Na infecção de células Y1 com as cepas EAEC CV323 e DEC/Sat+ durante 5 h e 24 h, a toxina Sat foi detectada no sobrenadante da infecção já no tempo de 5 h (Figura 27 e 28), coincidindo com o dano celular observado (Figura 29A). O destacamento celular verificado no tempo de 5 h de infecção foi um pouco maior nas células infectadas com EAEC CV323 (75%) quando comparado aos efeitos induzidos pela cepa DEC/Sat+ (60%) (Figura 29A). Por outro lado, para o período de infecção de 24 h, o aumento do efeito citotóxico não parece ser representativo da ação de Sat, podendo ser decorrente dos efeitos adversos da infecção (presença de metabólitos e acidificação do meio, entre outros) (Figura 29B). O destacamento celular induzido na infecção por EAEC secretora de Sat foi menor do que o observado na infecção com cepas de EAEC secretoras de Pet, conforme descrito por Ruiz et al. (2014).

De forma similar ao descrito na infecção pela EAEC secretora de Pet (Ruiz et al., 2014), o presente trabalho possibilitou constatar que tanto o PMSF como o anticorpo específico neutralizaram o efeito da toxina durante a infecção, evitando o surgimento de quaisquer danos (Figura 30).

Embora a citotoxicidade bem caracterizada na infecção por EAEC seja devido à Pet, o gene *pet* só está presente em cerca de 20% das amostras de EAEC (HENDERSON et al., 1999; ELIAS et al., 2002; PIVA et al., 2003; BOISEN et al., 2009; ANDRADE et al., 2017), o que indica que outras SPATEs possam ter função equivalente e estar contribuindo na citotoxicidade da EAEC.

Como EAEC é um grupo muito heterogêneo, a patogenia ainda não foi totalmente elucidada. De maneira consensual, considera-se que a alta capacidade aderente, a secreção de citotoxinas, a indução de resposta inflamatória e a produção de muco sejam aspectos cruciais na determinação da infecção. Desta forma, os resultados aqui obtidos sugerem que Sat possa ser a outra SPATE responsável pela citotoxicidade característica da patogenia por EAEC, na ausência de Pet, ou até na presença dela. No caso da cepa aqui estudada, EAEC CV323, portadora de *sat* e *pic*, tanto a citotoxicidade como a colonização bacteriana estariam asseguradas pela presença desses marcadores.

6 CONCLUSÕES

- Em duas cepas isoladas de diarreia (DEC/Sat⁺ e EAEC CV323) foi demonstrada a expressão de Sat. Ambas apresentaram a mesma mutação: dois resíduos de aminoácido nas posições 669 e 771 foram substituídos. Esta substituição não influenciou o sítio catalítico e, portanto, a atividade enzimática da proteína foi mantida. A cepa DEC/Sat⁺, a qual não apresentou nenhum dos 27 genes que codificam fatores de virulência, possibilitou a purificação da toxina;
- A ação citotóxica de Sat foi tempo e linhagem celular dependente. Entre as diferentes linhagens celulares estudadas, as células endoteliais foram as mais sensíveis, seguidas das culturas originárias do trato urinário e depois do sistema gastrointestinal. Este é o primeiro relato da ação de Sat em células endoteliais. Estes achados, junto aos relatos de alta prevalência do gene *sat* em cepas isoladas de bacteremia, sugerem que Sat possa ter um papel também relevante quando a bactéria está presente na corrente sanguínea;
- Sat foi secretada por EAEC CV323 durante a infecção. A detecção da toxina no meio coincidiu com o surgimento do dano celular, o qual foi inibido pela presença do anticorpo anti-Sat e pelo inibidor de serino-protease. Este é o primeiro trabalho que demonstra a secreção de Sat por EAEC, o que sugere que Sat possa desempenhar um papel importante na citotoxicidade característica da patogênese deste patótipo.

7 REFERÊNCIAS

- ABREU, A. G.; ABE, C. M.; NUNES, K. O.; MORAES, C. T. P.; CHAVEZ-DUEÑAS, L.; NAVARRO-GARCIA, F.; BARBOSA, A. S.; PIAZZA, R. M. F.; ELIAS, W. P. The serine protease Pic as a virulence factor of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Gut microbes**, v. 7, n. 2, p. 115–125, 2016.
- 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* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 1, p. 411–414, 2013.
- AL-HASANI, K.; HENDERSON, I. R.; SAKELLARIS, H.; RAJAKUMAR, K.; GRANT, T.; NATARO, J. P.; ROBINS-BROWNE, R.; ADLER, B. The sigA gene which is borne on the she pathogenicity island of *Shigella flexneri* 2a encodes an exported cytopathic protease involved in intestinal fluid accumulation. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 5, p. 2457–2463, 2000.
- ANDRADE, F. B.; ABREU, A. G.; NUNES, K. O.; GOMES, T. A. T.; PIAZZA, R. M. F.; ELIAS, W. P. Distribution of serine protease autotransporters of *Enterobacteriaceae* in typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 50, p. 83–86, 2017.
- ASSIS, F. E. A.; WOLF, S.; SUREK, M.; DE TONI, F.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; FARAH, S. M. S. S.; PICHETH, G.; FADEL-PICHETH, C. M. T. Impact of *Aeromonas* and diarrheagenic *Escherichia coli* screening in patients with diarrhea in Paraná, Southern Brazil. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 12, p. 1609–1614, 2014.
- BARON, F.; COCHET, M. F.; ABLAIN, W.; GROSSET, N.; MADEC, M. N.; GONNET, F.; JAN, S.; GAUTIER, M. Rapid and cost-effective method for microorganism enumeration based on miniaturization of the conventional plate-counting technique. **Lait**, v. 86, n. 3, p. 251–257, 2006.
- BECK, N. K.; CALLAHAN, K.; NAPPIER, S. P.; KIM, H.; SOBSEY, M. D.; MESCHKE, J. S. Development of a spot-titer culture assay for quantifying bacteria and viral indicators. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 455–464, 2009.

BECKER-DREPS, S.; BUCARDO, F.; VILCHEZ, S.; ZAMBRANA, L. E.; LIU, L.; WEBER, D. J.; PEÑA, R.; BARCLAY, L.; VINJÉ, J.; HUDGENS, M. G.; NORDGREN, J.; SVENSSON, L.; MORGAN, D. R.; ESPINOZA, F.; PANIAGUA, M. Etiology of childhood diarrhea after rotavirus vaccine introduction: a prospective, population-based study in Nicaragua. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 33, n. 11, p. 1156–63, 2014.

BETANCOURT-SANCHEZ, M.; NAVARRO-GARCIA, F. Pet secretion, internalization and induction of cell death during infection of epithelial cells by enteroaggregative *Escherichia coli*. **Microbiology**, v. 155, n. 9, p. 2895–2906, 2009.

BOISEN, N.; RUIZ-PEREZ, F.; SCHEUTZ, F.; KROGFELT, K. A.; NATARO, J. P. Short Report: High Prevalence of Serine Protease Autotransporter Cytotoxins among Strains of Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 80, n. 2, p. 294–301, 2009.

BRUNDER, W.; SCHMIDT, H.; KARCH, H. EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. **Molecular Microbiology**, v. 24, n. 4, p. 767–778, 1997.

CÁRCAMO, C.; HOOTON, T.; WENER, M. H.; WEISS, N. S.; GILMAN, R.; AREVALO, J.; CARRASCO, J.; SEAS, C.; CABALLERO, M.; HOLMES, K. K. Etiologies and Manifestations of Persistent Diarrhea in Adults with HIV-1 Infection: A Case-Control Study in Lima, Peru. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 191, n. 1, p. 11–19, 2005.

CORRÊA, L. M. **Investigação e expressão de genes de proteínas autotransportadoras (SPATEs) em isolados de *Escherichia coli* enteropatogênica atípica.** 02/2013. 52p. Trabalho de conclusão de curso (Programa de aprimoramento profissional em microbiologia - Secretaria de Estado da Saúde do Estado de São Paulo) - Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan.

CRAVIOTO, A.; GROSS, R. J.; SCOTLAND, S. M.; ROWE, B. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. **Current Microbiology**, v. 3, n. 2, p. 95–99, 1979.

CROXEN, M. A.; LAW, R. J.; SCHOLZ, R.; KEENEY, K. M.; WLODARSKA, M.; FINLAY, B. B. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 822–880, 2013.

DIAS, R. C. B.; DOS SANTOS, B. C.; DOS SANTOS, L. F.; VIEIRA, M. A.; YAMATOGLI, R. S.; MONDELLI, A. L.; SADATSUNE, T.; SFORCIN, J. M.; GOMES, T. A. T.; HERNANDES, R. T. Diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes investigation revealed atypical enteropathogenic *E. coli* as putative emerging diarrheal agents in children living in Botucatu, São Paulo State, Brazil. **APMIS**, v. 124, n. 4, p. 299–308, 2016.

DUTTA, P. R.; DUTTA, P. R.; CAPPELLO, R.; CAPPELLO, R.; NAVARRO-GARC, F.; NAVARRO-GARC, F.; NATARO, J. P.; NATARO, J. P. Functional Comparison of Serine Protease Autotransporters of. **Society**, v. 70, n. 12, p. 7105–7113, 2002.

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

ELIAS, W. P.; NAVARRO-GARCIA, F. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC). In: ***Escherichia coli in the Americas***. Switzerland: Springer International Publishing, 2016. p. 27–57.

ELIAS, W. P.; UBER, A. P.; TOMITA, S. K.; TRABULSI, L. R.; GOMES, T. A. T. Combinations of putative virulence markers in typical and variant enteroaggregative *Escherichia coli* strains from children with and without diarrhoea. **Epidemiology and Infection**, v. 129, n. 1, p. 49–55, 2002.

ELSINGHORST, E. A.; WEITZ, J. A. Epithelial cell invasion and adherence directed by the enterotoxigenic *Escherichia coli* tib locus is associated with a 104-kilodalton outer membrane protein. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 8, p. 3463–3471, 1994.

ESLAVA, C.; NAVARRO-GARCÍA, F.; CZECZULIN, J. R.; HENDERSON, I. R.; CRAVIOTO, A.; NATARO, J. P. Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 7, p. 3155–3163, 1998.

ESTRADA-GARCIA, T.; NAVARRO-GARCIA, F. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathotype: A genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 281–298, 2012.

FREITAS DO VALLE, G. R.; TARDELLI GOMES, T. A.; IRINO, K.; TRABULSI, L. R. The traditional enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) serogroup O125 comprises serotypes which are mainly associated with the category of enteroaggregative *E. coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 152, n. 1, p. 95–100, 1997.

FREITAS DO VALLE, G. R. **Propriedades de virulência de *Escherichia coli* dos sorogrupos O125 e O126**. 11/12/1998. 100p. Dissertação (Mestrado em Ciências - Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications: Sixth Edition**. [s.l: s.n.]

FUJIYAMA, R.; NISHI, J.; IMUTA, N.; TOKUDA, K.; MANAGO, K.; KAWANO, Y. The shf gene of a *Shigella flexneri* homologue on the virulent plasmid pAA2 of enteroaggregative *Escherichia coli* 042 is required for firm biofilm formation. **Current Microbiology**, v. 56, n. 5, p. 474–480, 2008.

GÓMEZ-DUARTE, O. G.; ROMERO-HERAZO, Y. C.; PAEZ-CANRO, C. Z.; ESLAVA-SCHMALBACH, J. H.; ARZUZA, O. Enterotoxigenic *Escherichia coli* associated with childhood diarrhoea in Colombia, South America. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 7, n. 5, p. 372–381, 2013.

GONZALES, L.; JOFFRE, E.; RIVERA, R.; SJÖLING, Å.; SVENNERHOLM, A. M.; IÑIGUEZ, V. Prevalence, seasonality and severity of disease caused by pathogenic *Escherichia coli* in children with diarrhoea in Bolivia. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. PART 11, p. 1697–1706, 2013.

GRAD, Y. H.; LIPSITCH, M.; FELDGARDEN, M.; ARACHCHI, H. M.; CERQUEIRA, G. C.; FITZGERALD, M.; GODFREY, P.; HAAS, B. J.; MURPHY, C. I.; RUSS, C.; SYKES, S.; WALKER, B. J.; WORTMAN, J. R.; YOUNG, S.; ZENG, Q.; ABOUELLEIL, A.; BOCHICCHIO, J.; CHAUVIN, S.; DESMET, T.; GUJJA, S.; MCCOWAN, C.; MONTMAYEUR, A.; STEELMAN, S.; FRIMODT-MOLLER, J.; PETERSEN, A. M.; STRUVE, C.; KROGFELT, K. A.; BINGEN, E.; WEILL, F.-X.; LANDER, E. S.; NUSBAUM, C.; BIRREN, B. W.; HUNG, D. T.; HANAGE, W. P. Genomic epidemiology of the *Escherichia coli* O104:H4 outbreaks in Europe, 2011. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 8, p. 3065–3070, 2012.

GUIGNOT, J.; CHAPLAIS, C.; COCONNIER-POLTER, M. H.; SERVIN, A. L. The secreted autotransporter toxin, Sat, functions as a virulence factor in Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* by promoting lesions in tight junction of polarized epithelial cells. **Cellular Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 204–221, 2007.

GUTIÉRREZ, E. J.; PINEDA, V.; CALZADA, J. E.; GUERRANT, R. L.; NETO, J. B. L.; PINKERTON, R. C.; SALDAÑA, A. Enteric parasites and enteroaggregative *Escherichia coli* in children from Cañazas County, Veraguas Province, Panama. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, n. 2, p. 267–272, 2014.

GUYER, D. M.; HENDERSON, I. R.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Identification of Sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 53–66, 2000.

GUYER, D. M.; RADULOVIC, S.; JONES, F. E.; MOBLEY, H. L. T. Sat, the secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*, is a vacuolating cytotoxin for bladder and kidney epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 8, p. 4539–4546, 2002.

HARRINGTON, S. M.; DUDLEY, E. G.; NATARO, J. P. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **FEMS Microbiol. Lett**, v. 254, n. 1, p. 12–18, 2006.

HENDERSON, I. R.; CZECHULIN, J.; ESLAVA, C.; NORIEGA, F.; NATARO, J. P. Characterization of Pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 11, p. 5587–5596, 1999.

HENDERSON, I. R.; NAVARRO-GARCIA, F.; DESVAUX, M.; FERNANDEZ, R. C.; ALA'ALDEEN, D. Type V Protein Secretion Pathway : the Autotransporter Story Type V Protein Secretion Pathway : the Autotransporter Story. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 68, n. 4, p. 692–744, 2004.

HENDERSON, I. R.; NAVARRO-GARCIA, F.; NATARO, J. P. **The great escape: Structure and function of the autotransporter proteins** **Trends in Microbiology**, 1998. .

HEROLD, S.; PATON, J. C.; PATON, A. W. Sab, a novel autotransporter of locus of enterocyte effacement-negative shiga-toxigenic *Escherichia coli* O113:H21, contributes to adherence and biofilm formation. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 8, p. 3234–3243, 2009.

IQBAL, J.; DUFENDACH, K. R.; WELLONS, J. C.; KUBA, M. G.; NICKOLS, H. H.; GÓMEZ-DUARTE, O. G.; WYNN, J. L. Lethal neonatal meningoencephalitis caused by multi-drug resistant, highly virulent *Escherichia coli*. **Infectious Diseases**, v. 48, n. 6, p. 461–466, 2016.

JENSEN, B. H.; OLSEN, K. E. P.; STRUVE, C.; KROGFELT, K. A.; PETERSEN, A. M. Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 3, p. 614–630, 2014.

JOSE, J.; MEYER, T. F. The Autodisplay Story, from Discovery to Biotechnical and Biomedical Applications. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, n. 4, p. 600–619, 2007.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123–140, 2004.

KENNY, B.; FINLAY, B. B. Protein secretion by enteropathogenic *Escherichia coli* is essential for transducing signals to epithelial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 17, p. 7991–7995, 1995.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LEYTON, D. L.; SLOAN, J.; HILL, R. E.; DOUGHTY, S.; HARTLAND, E. L. Transfer Region of pO113 from Enterohemorrhagic *Escherichia coli*: Similarity with R64 and Identification of a Novel Plasmid-Encoded Autotransporter, EpeA. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 11, p. 6307–6319, 2003.

LIÉVIN-LE MOAL, V.; COMENGE, Y.; RUBY, V.; AMSELLEM, R.; NICOLAS, V.; SERVIN, A. L. Secreted autotransporter toxin (Sat) triggers autophagy in epithelial cells that relies on cell detachment. **Cellular Microbiology**, v. 13, n. 7, p. 992–1013, 2011.

LIU, L.; HILL, K.; OZA, S.; HOGAN, D.; CHU, Y.; COUSENS, S.; MATHERS, C.; STANTON, C.; LAWN, J.; BLACK, R. E. Levels and Causes of Mortality under Age Five Years. In: **Disease Control Priorities, Third Edition (Volume 2): Reproductive, Maternal, Newborn, and Child Health**. 2016. p. 71–83.

- MARONCLE, N. M.; SIVICK, K. E.; BRADY, R.; STOKES, F. E.; MOBLEY, H. L. T. Protease activity, secretion, cell entry, cytotoxicity, and cellular targets of secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 11, p. 6124–6134, 2006.
- MORIN, N.; SANTIAGO, A. E.; ERNST, R. K.; GUILLOT, S. J.; NATARO, J. P. Characterization of the AggR regulon in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 1, p. 122–132, 2013.
- NAGHILI, H.; TAJIK, H.; MARDANI, K.; RAZAVI ROUHANI, S. M.; EHSANI, A.; ZARE, P. Validation of drop plate technique for bacterial enumeration by parametric and nonparametric tests. **Veterinary research forum : an international quarterly journal**, v. 4, n. 3, p. 179–83, 2013.
- NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 1, p. 142–201, 1998.
- NATARO, J. P.; YIKANG, D.; COOKSON, S.; CRAVIOTO, A.; SAVARINO, S. J.; GUERS, L. D.; LEVINE, M. M.; TACKET, C. O. Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated. **Journal of Infectious Diseases**, v. 171, n. 2, p. 465–468, 1995.
- NAVARRO-GARCIA, F.; ELIAS, W. P. Autotransporters and virulence of enteroaggregative *E. coli*. **Gut Microbes**, v. 2, n. 1, 2011.
- NAVARRO-GARCÍA, F.; SEARS, C.; ESLAVA, C.; CRAVIOTO, A.; NATARO, J. P. Cytoskeletal effects induced by Pet, the serine protease enterotoxin of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 5, p. 2184–2192, 1999.
- NHAN, N. T.; DE VALDIVIA, E. G.; GUSTAVSSON, M.; HAI, T. N.; LARSSON, G. Surface display of Salmonella epitopes in *Escherichia coli* and *Staphylococcus carnosus*. **Microbial Cell Factories**, v. 10, 2011.
- NIYOGI, S. K.; VARGAS, M.; VILLA, J. Prevalence of the sat, set and sen genes among diverse serotypes of *Shigella flexneri* strains isolated from patients with acute diarrhoea. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, n. 6, p. 574–576, 2004.

- PAI, M.; KANG, G.; RAMAKRISHNA, B. S.; VENKATARAMAN, A.; MULIYIL, J. An epidemic of diarrhoea in south India caused by enteroaggregative *Escherichia coli*. **Indian Journal of Medical Research**, v. 106, n. JULY, p. 7–12, 1997.
- PALLEN, M. J.; CHAUDHURI, R. R.; HENDERSON, I. R. **Genomic analysis of secretion systems** *Current Opinion in Microbiology*, 2003. .
- PALMER, C.; BIK, E. M.; DIGIULIO, D. B.; RELMAN, D. A.; BROWN, P. O. Development of the human infant intestinal microbiota. **PLoS Biology**, v. 5, n. 7, p. 1556–1573, 2007.
- PARREIRA, V. R.; GYLES, C. L. A novel pathogenicity island integrated adjacent to the thrW tRNA gene of avian pathogenic *Escherichia coli* encodes a vacuolating autotransporter toxin. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 9, p. 5087–5096, 2003.
- PATEL, S. K.; DOTSON, J.; ALLEN, K. P.; FLECKENSTEIN, J. M. Identification and Molecular Characterization of EatA, An Autotransporter Protein of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 3, p. 1786–1794, 2004.
- PATZI-VARGAS, S.; ZAIDI, M. B.; PEREZ-MARTINEZ, I.; LEÓN-CEN, M.; MICHEL-AYALA, A.; CHAUSSABEL, D.; ESTRADA-GARCIA, T. Diarrheagenic *Escherichia coli* Carrying Supplementary Virulence Genes Are an Important Cause of Moderate to Severe Diarrhoeal Disease in Mexico. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 3, 2015.
- PIVA, I. C.; PEREIRA, A. L.; FERRAZ, L. R.; SILVA, R. S. N.; VIEIRA, A. C.; BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; BLANCO, J.; GIUGLIANO, L. G. Virulence markers of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from children and adults with diarrhea in Brasília, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 1827–1832, 2003.
- PLATTS-MILLS, J. A.; BABJI, S.; BODHIDATTA, L.; GRATZ, J.; HAQUE, R.; HAVT, A.; MCCORMICK, B. J. J.; MCGRATH, M.; OLORTEGUI, M. P.; SAMIE, A.; SHAKOOR, S.; MONDAL, D.; LIMA, I. F. N.; HARIRAJU, D.; RAYAMAJHI, B. B.; QURESHI, S.; KABIR, F.; YORI, P. P.; MUFAMADI, B.; AMOUR, C.; CARREON, J. D.; RICHARD, S. A.; LANG, D.; BESSONG, P.; MDUMA, E.; AHMED, T.; LIMA, A. A. A. M.; MASON, C. J.; ZAIDI, A. K. M.; BHUTTA, Z. A.; KOSEK, M.; GUERRANT, R. L.; GOTTLIEB, M.; MILLER, M.; KANG, G.; HOUP, E. R.; CHAVEZ, C. B.; TRIGOSO, D. R.; FLORES, J. T.; VASQUEZ, A. O.; PINEDO, S. R.; ACOSTA, A. M.; AHMED, I.; ALAM, D.; ALI, A.; RASHEED, M.; SOOFI, S.; TURAB, A.; YOUSAFZAI, A. K.; BOSE, A.; JENNIFER, M.

S.; JOHN, S.; KAKI, S.; KOSHY, B.; MULIYIL, J.; RAGHAVA, M. V.; RAMACHANDRAN, A.; ROSE, A.; SHARMA, S. L.; THOMAS, R. J.; PAN, W.; AMBIKAPATHI, R.; CHARU, V.; DABO, L.; DOAN, V.; GRAHAM, J.; HOEST, C.; KNOBLER, S.; MOHALE, A.; NAYYAR, G.; PSAKI, S.; RASMUSSEN, Z.; SEIDMAN, J. C.; WANG, V.; BLANK, R.; TOUNTAS, K. H.; SWEMA, B. M.; YARROT, L.; NSHAMA, R.; AHMED, A. M. S.; TOFAIL, F.; HOSSAIN, I.; ISLAM, M.; MAHFUZ, M.; CHANDYO, R. K.; SHRESTHA, P. S.; SHRESTHA, R.; ULAK, M.; BLACK, R.; CAULFIELD, L.; CHECKLEY, W.; CHEN, P.; LEE, G.; MURRAY-KOLB, L. E.; SCHAEFER, B.; PENDERGAST, L.; ABREU, C.; COSTA, H.; MOURA, A. Di; FILHO, J. Q.; LEITE, Á.; LIMA, N.; MACIEL, B.; MORAES, M.; MOTA, F.; ORÍA, R.; QUETZ, J.; SOARES, A.; PATIL, C. L.; MAHOPO, C.; MAPULA, A.; NESAMVUNI, C.; NYATHI, E.; BARRETT, L.; PETRI, W. A.; SCHARF, R.; SHRESTHA, B.; SHRESTHA, S. K.; STRAND, T.; SVENSEN, E. Pathogen-specific burdens of community diarrhoea in developing countries: A multisite birth cohort study (MAL-ED). **The Lancet Global Health**, v. 3, n. 9, 2015.

PROVENCE, D. L.; CURTISS, R. Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 4, p. 1369–1380, 1994.

RESTIERI, C.; GARRISS, G.; LOCAS, M. C.; DOZOIS, C. M. Autotransporter-encoding sequences are phylogenetically distributed among *Escherichia coli* clinical isolates and reference strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 5, p. 1553–1562, 2007.

ROGER, L. C.; MCCARTNEY, A. L. Longitudinal investigation of the faecal microbiota of healthy full-term infants using fluorescence in situ hybridization and denaturing gradient gel electrophoresis. **Microbiology**, v. 156, n. 11, p. 3317–3328, 2010.

RUIZ-PEREZ, F.; NATARO, J. P. Bacterial serine proteases secreted by the autotransporter pathway: Classification, specificity, and role in virulence. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 5, p. 745–770, 2014.

RUIZ, R. C.; MELO, K. C. M.; ROSSATO, S. S.; BARBOSA, C. M.; CORRÊA, L. M.; ELIAS, W. P.; PIAZZA, R. M. F. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* secretes plasmid encoded toxin. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

- SAIDI, R. F.; SEARS, C. L. *Bacteroides fragilis* toxin rapidly intoxicates human intestinal epithelial cells (HT29/C1) in vitro. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 12, p. 5029–5034, 1996.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning. **Society**, v. 68, n. 3, p. 1232–1239, 1989.
- SAMUELSON, P.; GUNNERIUSSON, E.; NYGREN, P. Å.; STÅHL, S. **Display of proteins on bacteria** *Journal of Biotechnology*, 2002. .
- SCHMIDT, H.; KNOP, C.; FRANKE, S.; ALEKSIC, S.; HEESEMANN, J.; KARCH, H. Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 701–705, 1995.
- SCHMIDT, H.; ZHANG, W. L.; HEMMRICH, U.; JELACIC, S.; BRUNDER, W.; TARR, P. I.; DOBRINDT, U.; HACKER, J.; KARCH, H. Identification and characterization of a novel genomic island integrated at selC in locus of enterocyte effacement-negative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 11, p. 6863–6873, 2001.
- SUHR, M.; BENZ, I.; SCHMIDT, M. A. Processing of the AIDA-I precursor: Removal of AIDA(c) and evidence for the outer membrane anchoring as a β -barrel structure. **Molecular Microbiology**, v. 22, n. 1, p. 31–42, 1996.
- TADDEI, C. R.; FASANO, A.; FERREIRA, A. J. P.; TRABULSI, L. R.; MARTINEZ, M. B. Secreted autotransporter toxin produced by a diffusely adhering *Escherichia coli* strain causes intestinal damage in animal model assays. **FEMS Microbiology Letters**, v. 250, n. 2, p. 263–269, 2005.
- TADDEI, C. R.; MORENO, A. C. R.; FERNANDES FILHO, A.; MONTEMOR, L. P. G.; MARTINEZ, M. B. Prevalence of secreted autotransporter toxin gene among diffusely adhering *Escherichia coli* isolated from stools of children. **FEMS Microbiology Letters**, v. 227, n. 2, p. 249–253, 2003.
- TAPADER, R.; CHATTERJEE, S.; SINGH, A. K.; DAYMA, P.; HALDAR, S.; PAL, A.; BASU, S. The high prevalence of serine protease autotransporters of *Enterobacteriaceae* (SPATEs) in *Escherichia coli* causing neonatal septicemia. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 33, n. 11, p. 2015–2024, 2014.

TIETZE, E.; DABROWSKI, P. W.; PRAGER, R.; RADONIC, A.; FRUTH, A.; AURA, P.; NITSCHKE, A.; MIELKE, M.; FLIEGER, A. Comparative genomic analysis of two novel sporadic shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 strains isolated 2011 in Germany. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, 2015.

TOLOZA, L.; GIMÉNEZ, R.; FÁBREGA, M. J.; ALVAREZ, C. S.; AGUILERA, L.; CAÑAS, M. A.; MARTÍN-VENEGAS, R.; BADIA, J.; BALDOMÀ, L. The secreted autotransporter toxin (Sat) does not act as a virulence factor in the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. **BMC microbiology**, v. 15, p. 250, 2015.

TORRES, A. G.; PERNA, N. T.; BURLAND, V.; RUKNUDIN, A.; BLATTNER, F. R.; KAPER, J. B. Characterization of Cah, a calcium-binding and heat-extractable autotransporter protein of enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 951–966, 2002.

TORRES, A. G.; ZHOU, X.; KAPER, J. B. Adherence of Diarrheagenic *Escherichia coli* Strains to Epithelial Cells MINIREVIEW Adherence of Diarrheagenic *Escherichia coli* Strains to Epithelial Cells. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 1, p. 18–29, 2005.

UNITED; MORTALITY, N. I. G. for C. Levels and trends in child mortality. **United Nations Children's Fund**, p. 1–36, 2017.

VAN ULSEN, P.; RAHMAN, S. ur; JONG, W. S. P.; DALEKE-SCHERMERHORN, M. H.; LUIRINK, J. **Type V secretion: From biogenesis to biotechnology** *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 2014. .

VARELA, G.; BATTHYÁNY, L.; BIANCO, M. N.; PÉREZ, W.; PARDO, L.; ALGORTA, G.; ROBINO, L.; SUÁREZ, R.; NAVARRO, A.; PÍREZ, M. C.; SCHELOTTO, F. Enteropathogens associated with acute diarrhea in children from households with high socioeconomic level in uruguay. **International Journal of Microbiology**, v. 2015, 2015.

VIJAYAKUMAR, V.; SANTIAGO, A.; SMITH, R.; SMITH, M.; ROBINS-BROWNE, R. M.; NATARO, J. P.; RUIZ-PEREZ, F. Role of class 1 serine protease autotransporter in the pathogenesis of *Citrobacter rodentium* colitis. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 6, p. 2626–2636, 2014.

WEINTRAUB, A. Enteroaggregative *Escherichia coli*: Epidemiology, virulence and detection. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 4–8, 2007.

WELLS, T. J.; SHERLOCK, O.; RIVAS, L.; MAHAJAN, A.; BEATSON, S. A.; TORPDAHL, M.; WEBB, R. I.; ALLSOPP, L. P.; GOBIUS, K. S.; GALLY, D. L.; SCHEMBRI, M. A. EhaA is a novel autotransporter protein of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 that contributes to adhesion and biofilm formation. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 589–604, 2008.