Fernanda Batista de Andrade

Interação da Serino Protease SepA de *Escherichia coli* Enteroagregativa com Células Epiteliais *in vitro*.

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

São Paulo
2019

Fernanda Batista de Andrade

Interação da Serino Protease SepA de *Escherichia coli* Enteroagregativa com Células Epiteliais *in vitro*.

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

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Dr. Waldir Pereira Elias Junior

Coorientadora: Dra. Roxane Maria Fontes Piazza

Versão Corrigida

São Paulo
2019

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)

Batista de Andrade, Fernanda
Interação da Serino Protease SepA de Esherichia coli Enteroagregativa com Células Epiteliais in vitro / Fernanda Batista de Andrade; orientador Dr. Waldir Pereira Elias Junior; coorientadora Dra. Roxane Maria Fontes Piazza. -- São Paulo, 2019.
201 p.

Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Escherichia coli. 2. Shigella. 3. Citotoxina. 4. Proteinases. 5. Células Epiteliais. I. Pereira Elias Junior, Dr. Waldir , orientador. II. Fontes Piazza, Dra. Roxane Maria, coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato: Fernanda Batista de Andrade

Título da **Dissertação/Tese**: Interação da Serino Protease SepA de *Escherichia coli* enteroagregativa com células epiteliais *in vitro*.

Orientador: Dr. Waldir Pereira Elias Junior

Coorientadora: Dra. Roxane Maria Fontes Piazza

A comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação, de Mestrado/ Tese de Doutorado em sessão pública realizada a / / , considerou

( ) Aprovado **( ) Reprovado**

Examinador (a): Assinatura .....

Nome .....

Instituição .....

Examinador (a): Assinatura .....

Nome .....

Instituição .....

Examinador (a): Assinatura .....

Nome .....

Instituição .....

Presidente: Assinatura .....

Nome.....

Instituição .....

ICBUSP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "***Papel da Serino Protease SepA nas Atividades Citotóxica e Pró-Inflamatória induzidas por Escherichia coli enteroagregativa e Shigella flexneri***", registrado sob o protocolo nº ***98/2015***, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **14/10/2015** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais tem validade de **04 (quatro) anos** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Waldir Pereira Elias Junior**
- Membros da Equipe: *Fernanda Batista de Andrade (Pós-graduanda)*

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

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "***Role of SepA serine protease on cytotoxic and pro-inflammatory activities induced by enteroaggregative Escherichia coli and Shigella flexneri***", protocol nº ***98/2015***, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for scientific research purposes, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **10/14/2015** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **04 (four) years** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Waldir Pereira Elias Junior**
- Team members: Fernanda Batista de Andrade (Graduate Student)

If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
Oryctolagus cuniculus	New Zealand	Fêmea/female	2,5 Kg	2

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

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

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

butantan

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

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Papel da serino protease SepA nas atividades citotóxica e pró-inflamatória induzidas por Escherichia coli enteroagregativa e Shigella flexneri", **protocolo nº 1395/15**, sob a responsabilidade de Waldir Pereira Elias Junior e Edson Luiz da Silva e Fernanda Batista de Andrade – 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 22/11/2017.

This is to certify that the proposal "Role of serine protease SepA in citotoxic and pro-inflamatory activities induced by enteroaggregative Escherichia coli and Shigella flexneri", **protocol nº 1395/15**, under the responsibility of Waldir Pereira Elias Junior and Edson Luiz da Silva e Fernanda Batista de Andrade – which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings) – has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee and approved in 11/22/2017. This proposal is in accordance with standards outlined by Brazilian laws for use of experimental animals, and with ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

Vigência do Projeto: 06/2015 - 12/2018	**N° de animais/espécie**	**Observação**
Laboratório de Bacteriologia	Sem adição de animais	Alteração de vigência

São Paulo, 24 de novembro de 2017

Dr. José Ricardo Jensen
Coordenador da CEUAIB

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Waldir Pereira Elias Junior, pela orientação, confiança depositada em meu trabalho, por ter contribuído sempre para o meu desenvolvimento profissional e mais uma vez ter me ensinado muito, afinal já são 8 anos trabalhando juntos com uma excelente convivência.

À Dra. Roxane Maria Fontes Piazza minha co-orientadora, pelo trabalho, orientação, discussões sobre o projeto e apoio para que pudéssemos chegar a um bom resultado e pela amizade.

Ao Dr. Fernando Navarro-Garcia, pela oportunidade de desenvolver parte desse projeto em seu laboratório no México e por ter me permitido viver essa experiência

À Jazmín Huerta e Lucia Dueñas pelo auxílio prestado durante minha estádia no México.

À Cristiane Castilho pelo auxilio nos experimentos de determinação da atividade de SepA.

Ao Paulo Vieira e Dra. Daniela Luz, pelo auxílio na purificação de SepA.

Ao Dr. Roberto Nepomuceo pelas discussões, colaboração e auxílio no desenvolvimento desse projeto.

Aos meus colegas de bancada Claudia Trigo, Paulo, Claudia Freire, Roberto, Jonatas, Jonathan pela ajuda sempre que precisei, pelas discussões científicas e aquelas nem tão científicas, só uma coisa para dizer: “Busquem Conhecimento”.

Á minha mãe Nivete pelo apoio á minha educação, por toda a dedicação e amor e carinho em toda minha vida.

Ao meu pai Robert pela admiração e incentivo sempre e pricipalmente pelo o amor e carinho por mim.

Ao Jaime por ser como um segundo pai, por seu apoio, dedicação amor e carinho sempre.

Aos meus irmãos queridos Barbara, Sofia, Lucas e Guilherme, agradeço por vocês existirem para que eu possa ter por quem me empenhar e ser um exemplo. Em especial para você Barbara, tenho muito orgulho de você irmãzinha.

Ao Mauricio que há pouco tempo faz parte da minha vida. Te agradeço muito pelo o que tem feito, a forma como você têm se dedicado a me fazer perceber como tudo tem que ser e sabe que sou capaz de dominar o mundo. Obrigada! Pelas conversas sempre muito produtivas, companhia, amor e carinho muito valiosos para mim.

Aos meus amigos de infância Karla, João e William, podemos ficar anos sem se ver e mesmo assim quando nos encontramos é como se nos víssemos todos os dias.

Ao Cristiano que fez parte desse processo e sempre me apoio e admirou pelo o que sou.

Um agradecimento especial aos meus amigos Ludmila, Afonso, Claudia Trigo, Matilde, Francielli, Fernando, Paulo, Bruno, Lidia e Landy todos os momentos com vocês foram muito marcantes, obrigada amigos por nossa amizade.

A todos os funcionários e pesquisadores do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan.

Muito obrigada!

AGRADECIMENTO ÀS AGÊNCIAS DE FOMENTO

O presente trabalho foi realizado com o auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan (São Paulo, Brasil), Processo n° 2014/186286-0, e no *Centro de Investigacíon y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional* (Cidade do México, México), Processo n° 2017/25248-6.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

ANDRADE, F. B. **Interação da serino protease SepA de *Escherichia coli* enteroagregativa com células epiteliais *in vitro*.** 2019. 201 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Escherichia coli enteroagregativa (EAEC) é definida como o patótipo de *E. coli* diarreiogênica que apresenta o padrão de adesão agregativo em células epiteliais. Após a colonização na mucosa intestinal, EAEC secreta diversas enterotoxinas e citotoxinas, dentre elas as proteínas denominadas serino proteases autotransportadoras de Enterobacteriaceae (SPATEs), classificadas em classe-1 (citotóxicas) e classe-2 (imunomoduladoras). SepA (*Shigella extracelular protein A*) é uma SPATE de 110 kDa de classe-2, que foi originalmente descrita em *Shigella flexneri* 5a e posteriormente em EAEC. A presença do gene *sepA* é um marcador associado à diarreia causada por EAEC, indicando que esta toxina tem um importante papel na sua patogênese. Entretanto, estudos caracterizando SepA como fator de virulência são restritos a *S. flexneri*. Nessa espécie, SepA participa da destruição e invasão do tecido epitelial, mas não apresenta efeito citotóxico em células HEp-2. No entanto, desestabiliza a integridade das junções oclusivas em células T84 polarizadas, através da ativação da cofilina. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivos avaliar a prevalência de *sepA* em uma coleção de EAEC isolada no Brasil, purificar SepA e analisar sua interação com as linhagens Caco-2, HEp-2, HeLa, HT-29, MDCK, Vero e Y-1, bem como a sua capacidade de induzir interleucinas em células HT-29. O gene *sepA* foi detectado em 13,5% das 193 cepas de EAEC e foi significativamente associado ao subgrupo de EAEC atípicas. SepA foi purificada em sua forma nativa a partir da cepa de *S. flexneri* 5a M90T, mostrando atividade biológica de serino protease. SepA causou alterações morfológicas nas células HeLa e HT-29, induzidas pela sua ligação à membrana dessas células, sem que ocorresse internalização. Os mesmos efeitos foram causados pela interação da cepa de EAEC produtora de SepA (BA732::pic) e a secreção dessa SPATE foi observada no foco de adesão das bactérias às células epiteliais. As alterações morfológicas em HeLa e HT-29 não levou à morte celular. SepA também foi capaz de induzir a produção de IL-8 nas células HT-29. Nossos dados indicam que, tal como em *Shigella*, SepA é um importante fator de virulência de EAEC, uma vez que induz efeito citopático e pró-inflamatório em células de origem intestinal humana, alterações sabidamente promovidas por EAEC em modelos experimentais.

Palavras-chave: *Escherichia coli. Shigella.* Citotoxina. Proteinases. Células epiteliais.

ABSTRACT

ANDRADE, F. B. **Interaction of the serine protease SepA of enteroaggregative *Escherichia coli* with epithelial cells *in vitro*.** 2019. 201 f. Ph.D. Thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) is defined as the pathotype of diarrheagenic *E. coli* that presents the aggregative adherence pattern on epithelial cells. After colonization of the intestinal mucosa, EAEC secretes several enterotoxins and cytotoxins, among them the proteins called serine proteases autotransporters of Enterobacteriaceae (SPATEs), classified in class-1 (cytotoxic) and class-2 (immunomodulatory). SepA (*Shigella* extracellular protein A) is a SPATE of 110 kDa class-2, which was originally described in *Shigella flexneri* 5a and later in EAEC. The presence of the *sepA* gene is a marker associated with diarrhea caused by EAEC, indicating that this toxin plays an important role in its pathogenesis. However, studies characterizing SepA as a virulence factor are restricted to *S. flexneri*. In this species, SepA participates in the destruction and invasion of epithelial tissue but has no cytotoxic effect on HEp-2 cells. However, it destabilizes the integrity of the tight junctions in polarized T84 cells, through the activation of the cofilin. Thus, the present study aimed to evaluate the prevalence of the *sepA* in a collection of EAEC isolated in Brazil, to purify SepA and to analyze its interaction with the Caco-2, HEp-2, HeLa, HT-29, MDCK, Vero and Y-1, as well as their ability to induce interleukins in HT-29 cells. The *sepA* gene was detected in 13.5% of the 193 EAEC strains and was significantly associated with the atypical EAEC subgroup. SepA was purified from *S. flexneri* M90T in its native form, showing biological activity of serine protease. SepA caused morphological changes in HeLa and HT-29 cells, induced by its binding to the membrane of these cells, without its internalization. The same effects were caused by the interaction of the SepA-producing EAEC strain (BA732:: pic) and the secretion of this SPATE was observed in the focus of bacterial adhesion on epithelial cells. The morphological changes in HeLa and HT-29 did not lead to cell death. SepA was also able to induce IL-8 production in HT-29 cells. Our data indicate that, as in *Shigella*, SepA is an important virulence factor of EAEC, since it induces cytopathic and proinflammatory effect in cells of human intestinal origin, changes known to be promoted by EAEC in experimental models.

Key words: *Escherichia coli. Shigella.* Cytotoxin. Proteinases. Epithelial cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Padrão de adesão agregativo de EAEC..... 21
Figura 2 – Esquema do modelo proposto para patogênese da infecção intestinal por EAEC..... 24
Figura 3 – Estrutura geral das proteínas que compõem as SPATEs..... 27
Figura 4 – Esquema de secreção de proteínas autotransportadoras através dos subtipos do SST5..... 28
Figura 5 – Análise filogenética das sequências de aminoácidos dos domínios passageiros das SPATEs..... 30
Figura 6 – Cristalografia do domínio passageiro de SepA..... 33
Figura 7 – Frequência de 12 genes que codificam SPATEs em 193 cepas de EAEC..... 71
Figura 8 – Frequência de 12 genes que codificam SPATEs em 108 EAEC típicas e 85 EAEC atípicas..... 72
Figura 9 – Ensaios de adesão das cepas de EAEC típica e atípicas em células HEp-2..... 76
Figura 10 – Imunodetecção da proteína Pic nas cepas BA198 e BA732..... 81
Figura 11 – Extração plasmideal e *Southern Blotting para detecção de sepA nas* cepas BA198 e BA732..... 84
Figura 12 – Perfil eletroforético da extração plasmideal da cepa BA732..... 87
Figura 13 – Predição da estrutura tridimensional de SepA das cepas BA732 e M90T..... 88
Figura 14 – Curva de crescimento em caldo LB da cepa BA732 e seus mutantes resistentes ao ácido nalidíxico (mut100NAL e mut50NAL)..... 90
Figura 15 – PCR para detecção do fragmento gene pic2b nos transformantes selecionados..... 91
Figura 16 – Perfil de restrição do plasmídeo do clone #2pic2b com EcoRI..... 92
Figura 17 – Detecção dos genes *aggR, aatA* e *sepA* nos transconjugantes *::pic*#1 e *::pic*#2..... 94
Figura 18 – Curva de crescimento em caldo LB da cepa mut100NAL e seu mutante isogênico 95

BA732::pic.....
Figura 19 – Localização dos iniciadores para sequenciamento da região mutagenizada em BA732∆pic..... 96
Figura 20 – Esquema de inserção de pJP5603(*pic2b*) no mutante BA732∆pic..... 97
Figura 21 – Imunodetecção de Pic nos mutantes ::pic#1 e ::pic#2 (BA732∆pic)... 98
Figura 22 – Purificação de SepA utilizando cromatografia de afinidade..... 99
Figura 23 – Purificação de SepA a partir da cepa M90T(pZK15)..... 101
Figura 24 – Superprodução de SepA pela cepa M90T transformada com pZK15.. 102
Figura 25 – Atividade enzimática de SepA purificada medida por FRET..... 103
Figura 26 – Inibição da atividade enzimática de SepA por PMSF medida por FRET..... 104
Figura 27 – Titulação do soro anti-SepA policlonal..... 105
Figura 28 – Imunodetecção de SepA empregando o soro policlonal anti-SepA..... 106
Figura 29 – Imunodetecção de SepA empregando o soro anti-SepA adsorvido..... 107
Figura 30 – Efeito da proteína SepA em células HeLa..... 110
Figura 31 - Efeito da proteína SepA em células HT-29..... 111
Figura 32 – Efeito da proteína SepA em células Y-1..... 112
Figura 33 – Interação de SepA com as linhagens celulares CaCo-2, HEp-2 e Vero..... 113
Figura 34 – Interação de SepA com células HeLa..... 115
Figura 35 – Interação de SepA com células HT-29 evidenciada por imunofluorescência..... 117
Figura 36 – Análises dos tratamentos para desagregação de SepA purificada..... 119
Figura 37 – Interação de SepA na forma não agregada com células HeLa..... 121
Figura 38 – Viabilidade das células HeLa após interação com SepA..... 125
Figura 39 – Viabilidade das células de HT-29 após interação com SepA..... 126
Figura 40 – Produção de SepA por ∆pic durante o processo de adesão..... 129
Figura 41 – Neutralização da atividade de SepA em células HeLa com inibidor de serino protease e anti-soro contra SepA..... 131
Figura 42 – Ensaio de ligação de SepA à membrana das células epiteliais HeLa, HT-29 e HEp-2..... 134
Figura 43 – Ensaio de ligação de SepA a membrana das células MDCK..... 138
Figura 44 – Detecção da secreção de IL-8, , IL-1β e de TNFα induzida por SepA

em células HT-29..... 140

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Cepas e plasmídeos utilizados no presente estudo..... 39
Tabela 2 – Sequências dos iniciadores, tamanhos dos amplicons e temperaturas de anelamento das PCRs para pesquisa da presença de genes que codificam de SPATEs em EAEC..... 43
Tabela 3 –Sequência dos iniciadores para o sequenciamento do gene *sepA*, tamanho dos amplicons e temperaturas de anelamento..... 48
Tabela 4 – Sequência dos iniciadores, tamanho dos amplicons e temperatura de anelamento para detecção dos genes *aggR, aatA, sepA* e *pic* por PCR..... 54
Tabela 5 – Sequência dos iniciadores utilizados para a confirmação da mutação em *pic* por sequenciamento, tamanho dos amplicons e temperatura de anelamento..... 59
Tabela 6 – Perfis de combinações de genes que codificam SPATES apresentados pelas 193 cepas de EAEC..... 73
Tabela 7 – Filogrupos das 193 cepas de EAEC..... 74
Tabela 8 – Perfis genéticos das 26 cepas de EAEC positivas para o gene *sepA*..... 75
Tabela 9 – Alterações de aminoácidos do gene SepA das cepas de EAEC comparadas com M90T..... 83
Tabela 10 – Principais características do genoma da cepa BA732..... 85
Tabela 11 – Sorotipo, genes de virulência e resistência a antimicrobianos identificados na cepa BA732..... 86

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 19
1.1 *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC)..... 20
1.2 SPATEs de classe-2..... 31
1.3 *Shigella extracelular protein* A (SepA)..... 32
2. OBJETIVO..... 36
2.1 Objetivos específicos..... 36
3 MATERIAL E MÉTODOS..... 37
3.1 Cepas bacterianas e plasmídeos..... 38
3.2 Condições de cultivo..... 41
3.3 Seleção das cepas carreadoras do gene *sepA*..... 41
3.3.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)..... 41
3.3.2 Determinação dos grupos filogenéticos de E. coli..... 45
3.3.3 Determinação do padrão de adesão em células epiteliais cultivadas..... 45
3. 4 Caracterização das cepas de EAEC *sepA*$^{+}$ que apresentam aderência agregativa..... 46
3.4.1 Sequenciamento de sepA..... 46
3.4.2 Localização gênica de sepA..... 49
3.4.3 Imunodetecção de Pic..... 50
3.4.4 Perfil de resistência a antibióticos..... 51
3.4.5 Predição da estrutura tridimensional de SepA..... 51
3.5 Caracterização fenotípica e genotípica da EAEC BA732..... 52
3.5.1 Obtenção de mutante espontâneo resistente a ácido nalidíxico..... 52
3.5.1.1 Curva de crescimento de mutantes espontâneos mut50NAL *e* mut100NAL..... 52
3.5.1.2 Caracterização bioquímica e genética dos mutantes espontâneos mut50NAL *e* mut100NAL..... 53
3.5.2 Sequenciamento do genoma completo da BA732..... 55

3.5.3 Obtenção de mutante isogênico em pic na BA732..... 55
3.5.3.1 Ensaios para a confirmação da mutação isogênica de pic..... 57
3.5.3.1.2 Sequenciamento de nucleotídeos do mutante em pic..... 57
3.6 Purificação de SepA..... 60
3.6.1 Concentração de sobrenadante de cultura de M90T..... 60
3.6.2. Purificação por exclusão molecular..... 60
3.6.3. Purificação por Cromatrografia de afinidade (coluna de serinoproteases)... 61
3.6.4 Superexpressão de SepA para purificação..... 61
3.6.4.1 Obtenção da cepa recombinante M90T(pZK15)..... 61
3.6.4.2 Obtenção de sobrenadante concentrado de M90T(pZK15)..... 62
3.6.4.3 Purificação de SepA por exclusão molecular..... 62
3.7 Determinação da ação proteolítica de serinoprotease de SepA por *Flourescence ressonance energy transfer* (FRET)..... 62
3.8 Obtenção do soro policlonal anti-SepA..... 62
3.8.1 Titulação do soro por ensaio imunoenzimático (ELISA)..... 64
3.8.2 Adsorção e purificação do soro anti-SepA..... 64
3.8.3 Imunodetecção de SepA..... 65
3.9 Ensaios com células epiteliais *in vitro*..... 66
3.9.1 Células epiteliais e cultivo celular..... 66
3.9.2 Ensaios de interação de SepA com as linhagens celulares..... 66
3.9.2.1 Viabilidade celular..... 67
3.9.3. Ensaios de ligação à membrana..... 68
3.9.4 Desagregação de SepA purificada..... 68
3.9.5 Teste de detecção da produção de SepA na adesão bacteriana 69
3.9.6 Ensaios de neutralização do efeito causado por SepA utilizando anti-SepA e PMSF..... 69
3.10 Dosagem das interleucinas IL-8, IL-1β e TNFα..... 70
4. RESULTADOS..... 71
4.1 Frequência dos genes que codificam SPATEs nas cepas de EAEC..... 71
4.2 Relação entre os filogrupos de *E. coli* e a presença dos genes que codificam SPATEs..... 74
4.3 Análise da presença do gene *sepA* na coleção de EAEC..... 74
4.4 Caracterização fenotípica e genotípica das cepas carreadoras de *sepA*.. 75

4.4.1 Análise do padrão de adesão..... 75
4.4.2 Produção de Pic nas cepas BA198 e BA732..... 80
4.4.3 Perfil de resistência a antibióticos das cepas BA198 e BA732..... 82
4.4.4 Determinação da sequência do gene sepA das cepas BA198 e BA732..... 82
4.4.5 Localização do gene sepA nas cepas BA198 e BA732..... 83
4.5 Seleção da cepa protótipo de EAEC produtora de SepA 84
4.5.1 Sequenciamento do genoma completo da cepa BA732..... 85
4.5.2. Análise in silico da presença de plasmídeos na cepa BA732..... 86
4.5.3 Comparação entre as estruturas tridimensionais preditas de SepA das cepas BA732 e M90T..... 87
4.5.4 Obtenção de BA732 apresentando resistência ao ácido nalidíxico..... 89
4.5.4.1 Características fenotípicas e genotípicas dos mutantes espontâneos NAL..... 89
4.6 Obtenção do mutante isogênico em *pic* utilizando o vetor suicida pJP5603..... 91
4.7 Purificação da proteína SepA..... 98
4.7.1 Purificação de SepA empregando cromatografia de afinidade a serino proteases..... 99
4.7.2 Purificação de SepA da cepa M90T(pZK15) empregando a técnica de exclusão molecular..... 100
4.8 Análise da atividade de serino protease de SepA purificada em ensaios de FRET..... 102
4.9 Obtenção do soro policlonal anti-SepA..... 104
4.10 Efeito de SepA em células epiteliais cultivadas..... 108
4.10.1 Análises em microscopia ótica comum..... 108
4.10.2 Análise da interação de SepA por ensaios de imunofluorescência..... 114
4.10.2.1 Efeito de SepA purificada a partir da cepa M90T(pZK15)..... 120
4.10.3 Viabilidade celular após interação com SepA não agregada..... 124
4.11 Ensaios de interação da EAEC BA732::pic com células HeLa..... 127
4.12 Neutralização do efeito citopático de SepA em células HeLa..... 131
4.13 SepA purificada se liga à membrana citoplasmática das células HeLa, HT-29 e HEp-2..... 133
4.14 Produção de interleucinas pela linhagem HT-29 após a interação com

SepA..... 140
5. DISCUSSÃO..... 142
6. CONCLUSÕES..... 157
REFERÊNCIAS..... 158
APÊNDICES..... 183
APÊNDICE A – Distribution of serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae in typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli.* … 184
APÊNDICE B – Alinhamento das sequências de nucleotídeos de *sepA*..... 188
APÊNDICE C – Alinhamento das sequências de aminoácidos de *sepA*..... 196

1 INTRODUÇÃO

A diarreia é considerada um problema de saúde pública em todo o mundo, sendo a causa estimada de 1,3 milhões de mortes por ano (GBD, 2015; WHO, 2018). É a segunda maior causa de mortalidade infantil no mundo. No ano de 2017 causou 424 mil mortes em crianças de até 5 anos (WHO, 2018). Em regiões onde as gastroenterites são endêmicas, como em países da África e do sudoeste asiático, 25% das mortes na infância são causadas por gastroenterites virais agudas (SIDOTI et al., 2015).

Devido à alta mortalidade causada pela diarreia, existem iniciativas governamentais estipuladas pela *United Nations Chidren´s* (UNICEF) e *World Health Organization* (WHO) para prevenir a doença, como por exemplo as políticas de combate à desnutrição crônica, à falta de saneamento básico e à falta de acesso à água potável (FISCHER et al., 2012).

Até o ano de 2011, 71,8% dos municípios brasileiros não possuíam uma política municipal de saneamento básico (IBGE, 2011). No ano de 2017, 41,5% dos 5.570 municípios brasileiros afirmaram possuir Plano Municipal de Saneamento Básico (IBGE, 2018). A situação do saneamento básico precário no país está melhorando a cada ano, porém nos municípios do norte os números ainda são preocupantes, onde apenas 450 municípios dessa região apresentam um Plano Municipal de Saneamento Básico (IBGE, 2018), o que impacta no risco de casos da doença.

A diarreia pode ser causada por vírus, bactérias e protozoários. Dentre os agentes bacterianos causadores da diarreia os principais são *Escherichia coli, Shigella* spp*., Campylobacter* spp*., Vibrio* spp. e *Salmonella* spp. (HODGES; GILL, 2010; PODEWILS et al., 2004).

Escherichia coli é um bacilo Gram negativo, anaeróbio facultativo, pertencente à família Enterobacteriaceae, que faz parte da microbiota intestinal de mamíferos e aves (BOOP et al., 2003). Ao longo da evolução alguns clones dessa espécie adquiriram fatores de virulência que conferiram adaptação a novos nichos e a capacidade de causar um amplo espectro de doenças (CLEMENTS et al*.,* 2012).

Os patótipos de *E. coli* podem causar principalmente as seguintes patologias: doença diarreica, infecção do trato urinário, meningite e sepse

(CLEMENTS et al., 2012; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Desta forma as cepas patogênicas de *E. coli* podem ser classificadas em diarreiogênicas ou extraintestinais (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; RUSSO; JOHNSON, 2000).

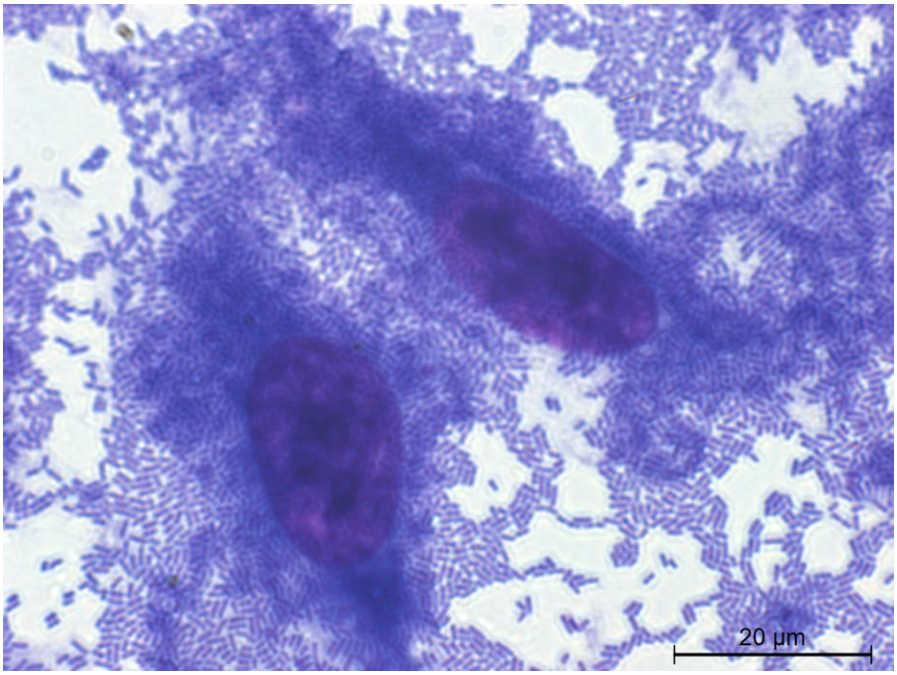
As *E. coli* diarreiogênicas (DEC) são divididas em seis categorias de acordo com os fatores de virulência que apresentam, as manifestações clínicas que causam e/ou padrões distintos de adesão que apresentam em células epiteliais *in vitro.* A classificação de DEC define os seguintes patótipos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* produtora da toxina Shiga (STEC) e sua subcategoria *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC) e *E. coli* que adere difusamente à células epiteliais (DAEC) (CLEMENTS et al., 2012; CROXEN; FINLAY, 2010; GOMES et al., 2016).

1.1 *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC)

Escherichia coli enteroagregativa (EAEC) é definida como o patótipo de DEC que apresenta o padrão de adesão agregativo (AA) em células epiteliais cultivadas (NATARO et al., 1987; NATARO; STEINER; GUERRANT, 1998). No padrão AA (**Figura 1**) as bactérias formam agregados que se assemelham a tijolos empilhados, aderindo à superfície das células eucarióticas e também à superfície da lamínula, em arranjos análogos a favos de colmeia (GOMES et al., 2016).

Esse padrão foi descrito durante a análise da aderência em células HEp-2 de cepas de *E. coli* isoladas em um estudo epidemiológico sobre a etiologia da diarreia aguda na infância, conduzido no Chile (NATARO et al., 1987). Nesse estudo, os autores foram capazes de subdividir o fenótipo anteriormente descrito como aderente-difuso (SCALETSKY; SILVA; TRABULSI, 1984) em duas classificações: aderência agregativa (AA) e a aderência difusa (AD) propriamente dita. A alta prevalência do padrão AA em cepas de *E. coli* isoladas de crianças com diarreia, levou à proposição do novo patótipo de DEC, denominado *E. coli* enteroagregativa ou EAggEC (NATARO et al., 1987). Posteriormente a literatura da área adotou a abreviatura EAEC (HEBBELSTRUP JENSEN, 2014; NATARO; KAPER, 1998).

Figura 1 – Padrão de adesão agregativo de EAEC.



Fonte: Este estudo
Padrão AA em células HEp-2 após 6 h de incubação do inóculo bacteriano da cepa de EAEC BA732 com as células epiteliais em confluência de ~80%. Pode-se observar o padrão AA, evidenciado pela presença de bactérias agregadas e aderidas na superfície da lamínula e também das células. Coloração com May-Grünwald e Giemsa. Aumento: 1.000 x.

Dentre os agentes etiológicos bacterianos da diarreia, EAEC se destaca como um dos principais enteropatógenos ao redor do mundo, incluindo países com altos e baixos índices de desenvolvimento socioeconômico (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006; HEBBELSTRUP JENSEN, 2014).

EAEC está associada à diarreia aguda, diarreia persistente e diarreia do viajante, tanto em adultos como em crianças, na forma endêmica e epidêmica.

A associação epidemiológica entre EAEC e diarreia aguda na infância tem sido descrita em países em desenvolvimento (ARAUJO et al., 2007; BENEVIDES-MATOS et al., 2015; BUERIS et al., 2007; IKUMAPAYI et al., 2017; LIMA et al., 2013; SPANO et al., 2017) e em países desenvolvidos (COHEN et al., 2005; HEBBELSTRUP JENSEN et al., 2017; NATARO et al., 2005; ROBINS-BROWNE et al., 2004).

EAEC é o patógeno de DEC mais prevalente nos casos de diarreia do viajante, que é aquela que afeta indivíduos residentes de países desenvolvidos que visitam países em desenvolvimento (ADACHI et al., 2001; JIANG et al., 2002; MOHAMED et al., 2007). Alguns autores verificaram a prevalência de EAEC em casos de diarreia em adultos (HEBBELSTRUP JENSEN, 2018; SPANO et al., 2017), não sendo caracterizada como diarreia do viajante.

A prevalência de EAEC foi verificada também na diarreia crônica em pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, ou SIDA (BERNIER; GOUNON; LE BOUGUÉNEC, 2002; HUANG et al., 2006; MATHEWSON et al., 1995; NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011; SAMIE et al., 2007).

Além dos quadros clínicos de diarreia aguda, EAEC está fortemente associada à diarreia persistente, ou seja, com duração maior que 14 dias (BHAN et al., 1993; BOLL et al., 2013; CRAVIOTO et al., 1991; FANG et al., 1995; GREENBERG et al., 2002; LIMA et al., 1992; PEREIRA et al., 2007; SHAZBERG et al., 2003), o que pode levar a má nutrição, problemas de crescimento e de desenvolvimento cognitivo (GUERRANT et al., 2008; LIMA et al., 2018; NAVARRO-GARCIA et al., 2010).

No Brasil, vários estudos epidemiológicos sobre a etiologia da diarreia aguda têm apontado EAEC como o patótipo de DEC mais prevalente (ARAUJO et al., 2007; BUERIS et al., 2007; GARCIA; SILVA; DINIZ, 2011; MORENO et al., 2010; PEREIRA et al., 2007; REGUA-MANGIA et al., 2004; RODRIGUES et al., 2002; SCALETSKY et al., 2002; SPANO et al., 2017).

A ingestão de alimentos contaminados talvez seja uma forma de infecção por EAEC, pois já houve relatos em países desenvolvidos da ocorrência de diversos surtos provocados por essa via (ITOH et al., 1997; HARADA et al., 2007; SMITH; CHEASTY; ROWE, 1997). No Brasil EAEC foi detectada em leite de mamadeiras de lactantes que haviam sido atendidos em ambulatórios de hospitais públicos, outro dado que favorece a possibilidade de infecção por EAEC a partir de alimentos contaminados (MORAIS; GOMES; SIGULEM, 1997).

Em 2011 um grande surto de diarreia que acometeu alguns países da Europa foi causado por uma cepa de *E. coli* produtora de toxina Shiga do subtipo Stx2 e pertencente ao sorotipo O104:H4 (BIELASZEWSKA et al.,

2011). O sequenciamento do genoma dessa cepa revelou que se tratava de uma EAEC que recebeu genes do fago que codifica Stx2, característica de STEC (RASKO et al., 2011). Esse surto foi associado ao consumo de alimento contaminado e teve graves consequências médicas, devido ao grande número de pacientes hospitalizados e que desenvolveram a síndrome hemolítica urêmica, patologia comumente decorrente da infecção por STEC (MUNIESA et al., 2012).

Os sintomas mais comuns relatados na infecção por EAEC são diarreia aquosa com ou sem sangue e muco, dor abdominal, náusea, vômito e pouca febre. A diversidade de sintomas clínicos na infecção por esse patótipo pode ser devido à heterogeneidade entre os isolados de EAEC, à dose infecciosa e a fatores de susceptibilidade genética do hospedeiro, assim como, à reposta imune (HARRINGTON, DUDLEY; NATARO, 2006; HUANG et al., 2006).

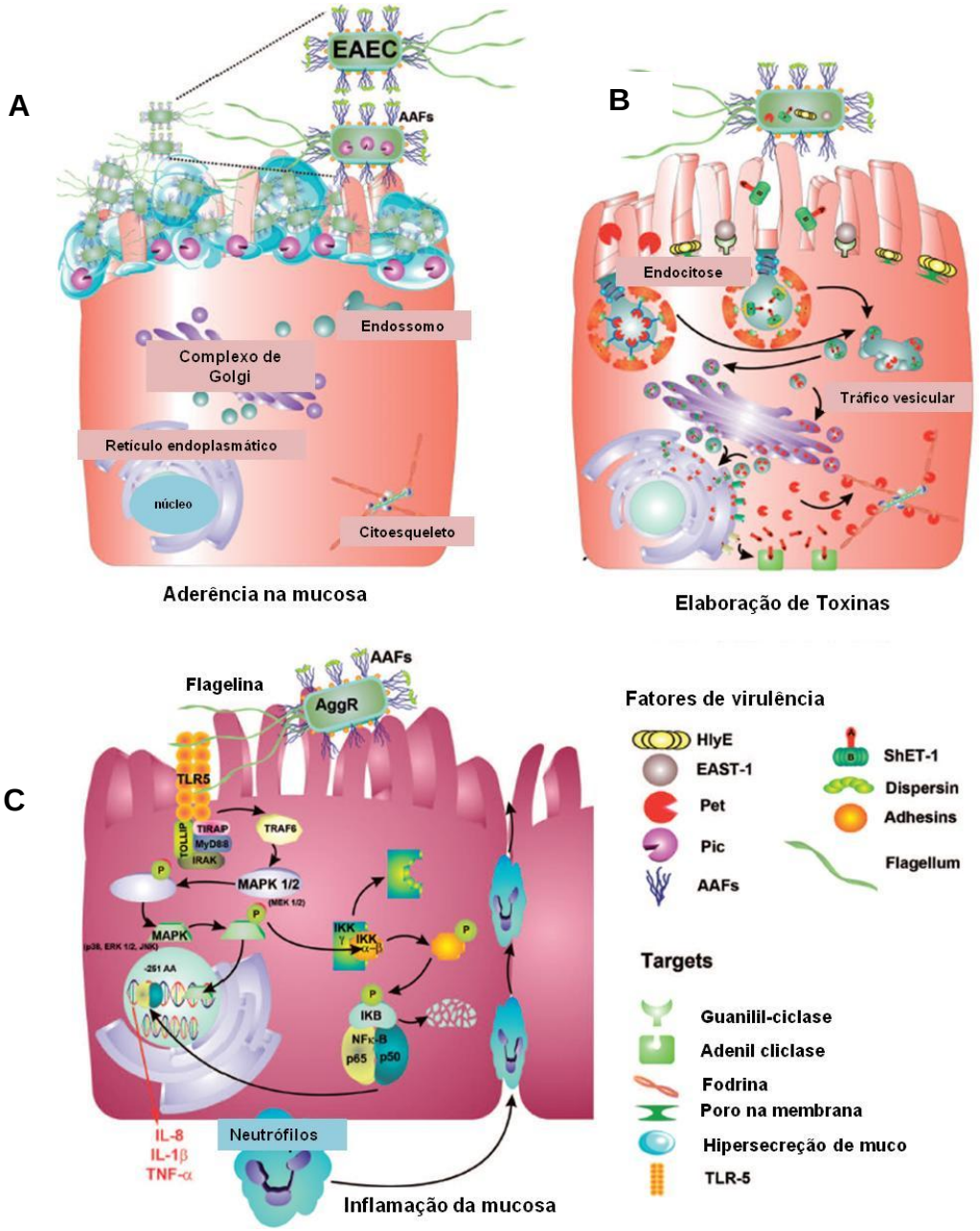
Essa heterogeneidade ficou bastante evidente em um estudo com voluntários humanos que receberam inóculo por via oral de quatro cepas de EAEC (17-2, 042, JM221 e 34b), sendo que apenas a cepa 042 foi capaz de causar diarreia (NATARO et al., 1995). A cepa EAEC 042 (sorotipo O44:H18) passou então a ser considerada como protótipo e amplamente caracterizada genetica e fenotipicamente (NAVARRO-GARCIA; ELIAS 2011).

Várias adesinas, toxinas, proteínas secretadas e mecanismos envolvidos em processos de patogenicidade têm sido identificados em EAEC, mas a prevalência dos genes que codificam esses marcadores é bastante variável e nenhum deles foi encontrado em todas as cepas (BOUZARI; JAFARI; ZAREPOUR, 2005; CZECZULIN et al., 1999; ELIAS et al., 2002; GIOPPO et al., 2000; JENKINS et al., 2006; MOHAMED et al., 2007; OKEKE et al., 2003; PIVA et al., 2003; ZAMBONI et al., 2004). Essa complexidade não permitiu que a patogênese da diarreia causada por esse patótipo fosse totalmente esclarecida (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006), porém um modelo com três estágios tem sido proposto para explicar a patogênese da diarreia causada por essas bactérias, tomando por base os fatores de virulência identificados na cepa 042.

Conforme esquematizado na **Figura 2**, o primeiro estágio envolve a aderência na mucosa intestinal e na camada de muco, através de adesinas fimbriais e/ou afimbriais; no segundo estágio há a formação de abundante

biofilme e aumento da produção de muco pelos enterócitos, o que pode promover uma colonização persistente e má absorção de nutrientes; por último há a secreção de toxinas e proteínas autotranportadoras levando à indução de resposta inflamatória, havendo alteração na mucosa e na secreção intestinal (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006; HUANG; DUPONT, 2004; NAVARRO-GARCIA et al., 2010).

Figura 2 – Esquema do modelo proposto para patogênese da infecção intestinal por EAEC.



Adaptado de: Navarro-Garcia e Elias (2011).

Modelo de 3 estágios para a infecção por EAEC na mucosa intestinal. (A) No primeiro estágio ocorre a aderência da bactéria à mucosa do hospedeiro com participação das fímbrias AAF (linhas azuis), dispersina (pequenas esferas verdes) e proteína Pic (esfera rosa), uma proteína que degrada muco. (B) No segundo estágio ocorre a elaboração de toxinas que agem principalmente no citoesqueleto da célula, como as toxinas Pet (esfera vermelha), EAST-1 (esfera cinza), ShET-1 (complexo A-B verde e vermelho) e enterohemolisina (esferas amarelas). (C) No terceiro estágio ocorre a indução da resposta inflamatória, mediada pela flagelina (linhas verdes), fímbrias AAF e outras estruturas não conhecidas.

Diversos potenciais fatores de virulência identificados em EAEC são codificados por genes localizados no plasmídeo ou no cromossomo da cepa 042, cujo genoma completo já foi sequenciado. Dentre esses fatores estão diversas adesinas, toxinas, proteínas secretadas e sideróforos (CHAUDHURI et al., 2010; NAVARRO-GARCIA et al., 2010).

A cepa 042 alberga um plasmídeo de ~100 kb denominado pAA2 (CZECZULIN et al., 1999). Nesse plasmídeo estão presentes diversos genes de virulência que têm a expressão regulada por AggR (CHAUDHURI et al., 2010; NAVARRO-GARCIA et al., 2010).

O gene *aggR* codifica um regulador transcricional global de EAEC envolvido na ativação de genes cromossômicos e plasmideais (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006). Morin et al. (2012) confirmaram a existência de ao menos 44 genes regulados por AggR utilizando a técnica de *microarray* e qRT-PCR (*Real Time Quantitative Reverse Transcription PCR*). Destes genes, 16 codificam proteínas hipotéticas e somente cinco mostram homologia com outras proteínas conhecidas, incluindo os genes da biogênese da fímbria AAF/II, Pet, dispersina e uma ilha de patogenicidade cromossômica.

Dentre os genes regulados por AggR na cepa 042 estão os que codificam as proteínas Pet e EAST-1, a fímbria de aderência agregativa AAF/II, a proteína dispersina, seu sistema de secreção do tipo ABC, as proteínas Shf, VirK e CapU, além da auto regulação de *aggR* (CHAUDHURI et al., 2010; CZECZULIN et al., 1999).

Conforme mencionado anteriormente, durante os anos subsequentes à descrição de EAEC, um grande número de estudos foi publicado sobre a epidemiologia desse patótipo. Em seguida, os estudos caracterizando potenciais fatores de virulência que eram identificados em cepas de EAEC, mostraram a grande heterogeneidade em termos da prevalência desses

fatores em coleções de EAEC. Esse fato levou à proposição da subclassificação do patótipo EAEC nos grupos de EAEC típica e atípica. As cepas de EAEC são classificadas como típicas ou atípicas de acordo com a presença ou ausência do gene *aggR*, respectivamente (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO 2006; SARANTUYA et al., 2004).

Essa classificação definiria dois grupos de cepas: o primeiro constituído por cepas típicas, que apresentaria maior potencial patogênico pelo fato de albergarem o regulon AggR e o plasmídeo de virulência pAA e o segundo por cepas atípicas, com menor potencial patogênico devido à ausência desses fatores de virulência (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; SARANTUYA et al., 2004). Contrapondo esta conclusão de que EAEC atípica tem menor potencial patogênico, existe o relato de dois surtos de diarreia causados por cepas atípicas, sendo que em um deles houve o acometimento de mais de mais de 2.000 pessoas (ITOH et al., 1997; COBELJIĆ et al., 1996), demonstrando assim, o potencial patogênico dessas cepas.

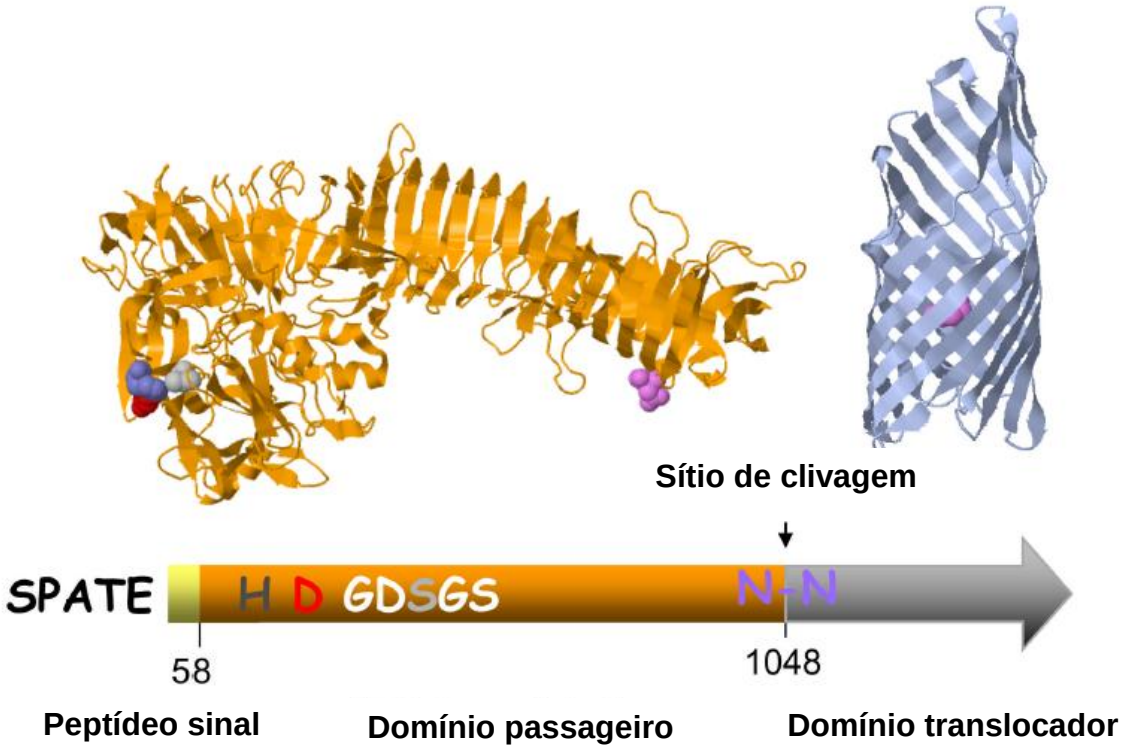
Dentre os diversos fatores de virulência presentes em cepas de EAEC estão as proteínas denominadas de serino proteases autotransportadoras ou SPATEs (*Serine Proteases Autotransporters of* Enterobacteriaceae) (HENDERSON, NAVARRO-GARCIA; NATARO, 1998; RUIZ-PEREZ; NATARO, 2014). Sendo que, a maioria das cepas de EAEC albergam pelo menos três genes que codificam proteínas dessa classe (BOISEN et al., 2009).

Serino proteases são enzimas cujo sítio ativo contém a tríade catalítica Ser/His/Asp, no qual o resíduo de serina realiza um ataque nucleofílico das ligações peptídicas (DAUTIN, 2010). As SPATEs são proteínas secretadas para o meio externo através do sistema de secreção do tipo V (SST5), sistema também conhecido como autotransportador (DESVAUX et al., 2009). Membros dessa família de proteínas são definidos como importantes fatores de virulência em muitos patógenos (HENDERSON, NAVARRO-GARCIA; NATARO, 1998).

As proteínas autotransportadoras (AT) apresentam uma estrutura comum (**Figura 3**). Todas as ATs têm em sua estrutura um peptídeo sinal, um domínio passageiro ou domínio α, que codifica a função biológica da proteína, e um domínio translocador ou β-barril, de sequência conservada dentre as

SPATEs (DAUTIN; BERNSTEIN, 2007; HENDERSON; NAVARRO-GARCIA; NATARO, 1998; LEO; GRIN; LINKE, 2012).

Figura 3 – Estrutura geral das proteínas que compõem as SPATEs.



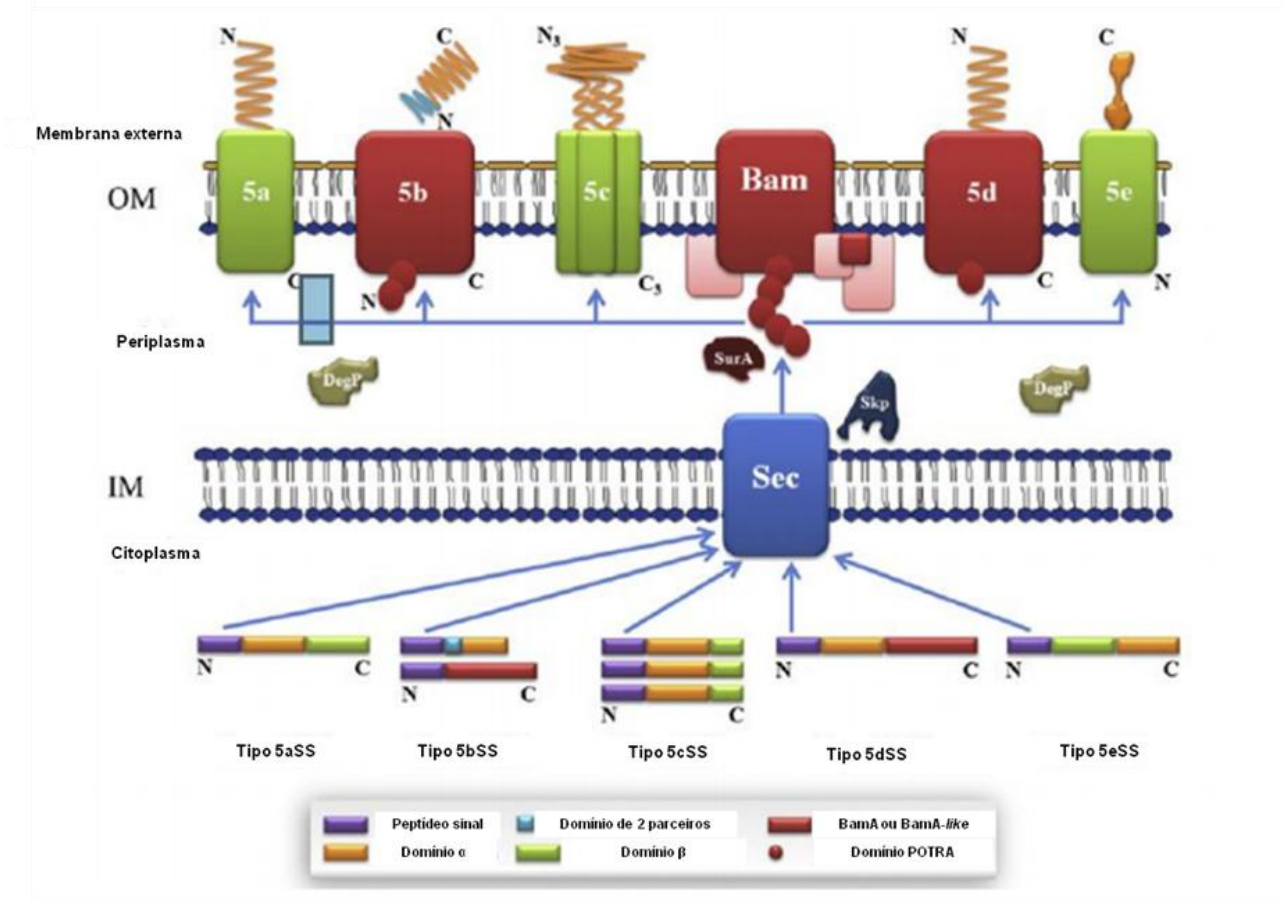
Adaptado de: Ruiz-Perez e Nataro (2014)
Esquema representativo da estrutura geral das SPATEs contendo um peptídeo sinal (amarelo), um domínio passageiro (laranja) que codifica a função biológica da proteína e um domínio translocador (lilás) que forma um poro na membrana pelo qual o domínio passageiro é translocado.

Essa família de proteína foi denominada como autotransportadora, pois inicialmente acreditava-se que as mesmas eram capazes de se inserir na membrana externa sem envolvimento de nenhum outro fator acessório, e assim seriam secretadas para o meio externo de maneira autônoma (KLAUSER; POHLNER; MEYER, 1993). No entanto, em estudos posteriores foi verificado que o sistema BAM (*β-barrel assembly machinery*) é essencial para que ocorra a biogênese das proteínas autotranportadoras (KNOWLES et al., 2009).

O SST5 é um dos sistemas mais amplamente distribuídos entre as bactérias Gram negativas (YEN et al., 2002). Esse sistema é subdividido em cinco grupos (**Figura 4**), que apresentam algumas particularidades durante a

secreção: o sistema 5a, também conhecido como clássico; o 5b ou tipo dois parceiros, que apresenta o domínio passageiro e o translocador em cadeias polipeptídicas separadas; o 5c ou de adesinas triméricas, é o sistema em que o poro translocador é constituído por três cadeias polipeptídicas; o 5d ou o sistema de dois parceiros fusionados, apresenta o domínio passageiro fusionado ao translocador; e por fim o 5e ou sistema clássico invertido, que apresenta o domínio translocador na porção N-terminal (HENDERSON; NAVARRO-GARCIA, NATARO, 1998; JACOB-DUBUISSON; LOCHT; ANTOINE, 2001; LINKE et al., 2006; SALACHA et al., 2010; OBERHETTINGER et al., 2012).

Figura 4 – Esquema de secreção de proteínas autotransportadoras através dos subtipos do SST5.



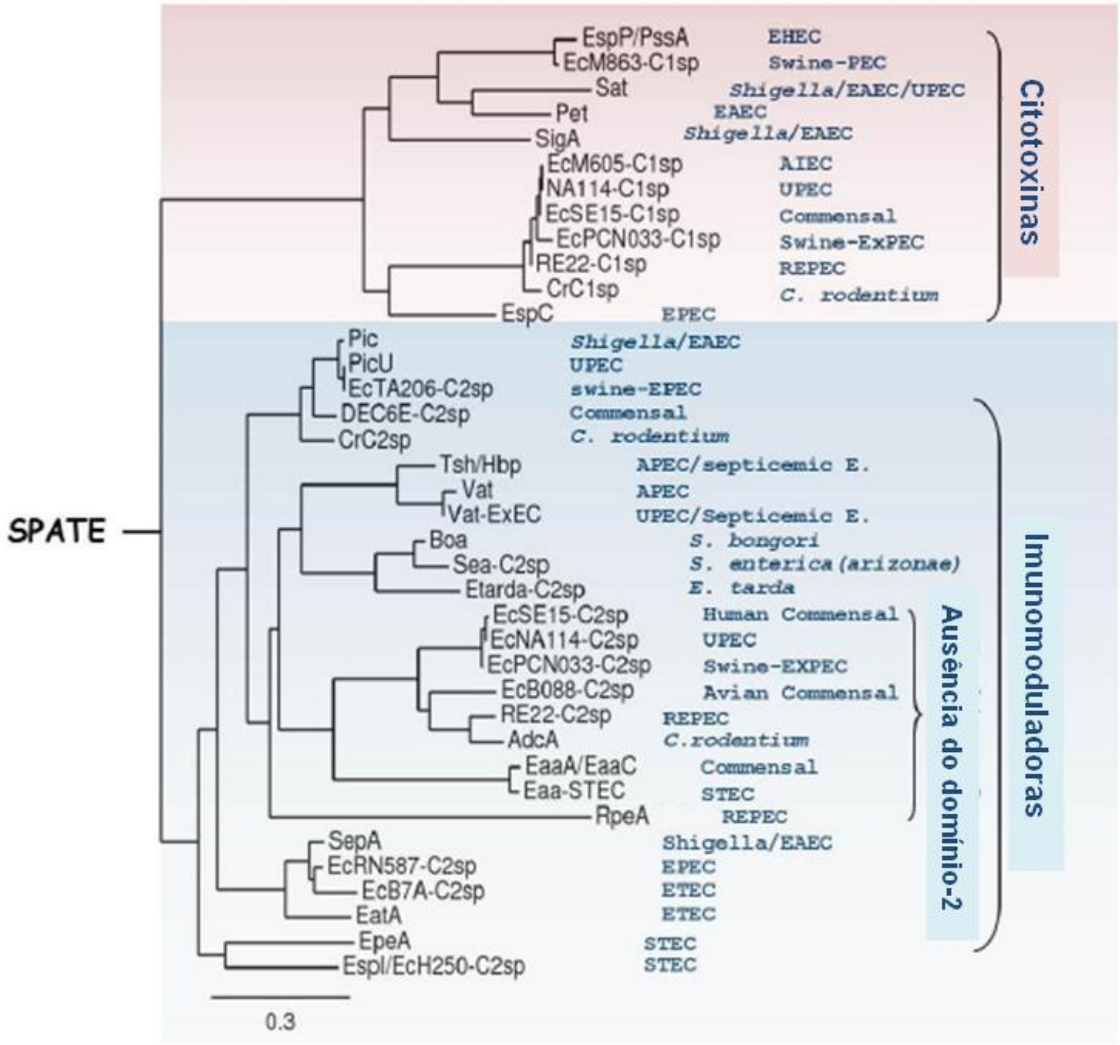
Adaptado de: Grijpstra et al. 2013.

Esquema dos subtipos do SST5 demonstrando as diferenças encontradas em cada um. 5a ou subtipo clássico; 5b ou sistema de dois parceiros; 5c ou sistema de adesinas triméricas; 5d ou sistema de dois parceiros; 5e ou sistema clássico invertido. O esquema apresenta também as proteínas assessorias do complexo Bam e algumas chaperonas identificadas (DegP, SurA e Skp). Em todos os subtipos a secreção se inicia pela clivagem do peptídeo sinal pelo sistema Sec, com o posterior tráfego da proteína pelo periplasma, inserção do domínio translocador na membrana externa e liberação do domínio passageiro no meio extracelular.

Resumidamente, no sistema clássico as SPATEs são secretadas para o meio externo da seguinte maneira: primeiro a proteína se liga ao sistema Sec pelo peptídeo sinal que então é clivado, em seguida o domínio translocador e o passageiro são liberados no periplasma, nesse momento ocorre a ligação de algumas chaperonas à SPATE e então o domínio translocador é inserido na membrana externa com o auxílio das proteínas do complexo BAM, formando um poro pelo qual o domínio passageiro é translocado e liberado para o meio externo na forma da proteína madura (DAUTIN, 2010; HENDERSON; NAVARRO-GARCIA; NATARO, 1998; RUIZ-PEREZ et al., 2009; TAPIA-PESTRANA et al., 2012).

A família das SPATEs inclui mais de 25 proteínas e são divididas filogeneticamente em duas classes, com base na sequência de aminoácidos do domínio passageiro (**Figura 5**). A classe-1 alberga as proteínas com efeito citotóxico (AL-HASANI et al., 2000; AL-HASANI et al., 2009; DJAFARI et al., 1997; ESLAVA et al., 1998; HENDERSON et al., 1999; MARONCLE et al., 2006; MELLIES et al., 2001; TADDEI et al., 2005), enquanto a classe-2 inclui as proteínas imunomoduladoras, que além de modularem o sistema imune, desempenham funções como a degradação de mucina e de glicoproteínas de superfície de leucócitos (GUTIÉRREZ-JIMÉNEZ; ARCINIEGA; NAVARRO-GARCIA, 2008; DUTTA et al., 2002; HARRINGTON et al., 2009; LEYTON et al., 2003; PARHAM, et al., 2004; RUIZ-PEREZ et al., 2011).

Figura 5 – Análise filogenética das sequências de aminoácidos dos domínios passageiros das SPATEs.



Adaptado de: Ruiz-Perez e Nataro (2014)
Árvore filogenética das sequências de aminoácidos das SPATEs. O domínio passageiro revela duas classes distintas: classe-1 (citotoxinas) e classe-2 (imunomoduladoras). EHEC, *E. coli* enterohemorrágica; Swine-PEC. *E. coli* enteropatogênica de suínos; EAEC, *E. coli* enteroagregativa; UPEC, *E. coli* uropatogênica; AIEC, *E. coli* enteroaderente-invasora; Commensal, *E. coli* comensal; REPEC, *E. coli* enteropatogênica de coelhos; *Citrobacter rodentium*; APEC, *E. coli* patogênica aviária; *Salmonella bongori*; *Salmonella enterica*; *Edwardsiella tarda*; Human comensal, *E. coli* comensal humana; Avian comensal, *E. coli* comensal de aves; STEC, *E. coli* produtora da toxina Shiga; EPEC, *E. coli* enteropatogênica; ETEC, *E. coli* enterotoxigênica.

Dentre as proteínas de classe-1 que são frequentemente encontradas em cepas de EAEC estão as proteínas Sat (GUYER et al., 2000), Pet (ESLAVA et al., 1998) e SigA (AL-HASANI et al, 2000). As de classe-2 frequentemente encontradas em EAEC são Pic (HENDERSON et al., 1999) e SepA (BENJELLOUN-TOUIMI et al., 1998).

1.2 SPATEs de classe-2

As SPATEs de classe-2, ou imunomoduladoras, são classificadas filogeneticamente com base na sequência de aminoácidos de seus domínios passageiros (HENDERSON, NAVARRO-GARCIA, NATARO, 1998; YEN et al., 2008).

A maioria delas apresenta o domínio-2, uma sequência de aminoácidos conservada no domínio translocador. Acreditava-se que esse domínio desempenhava papel no reconhecimento do substrato, mas sua função ainda permanece desconhecida, já que algumas SPATEs de classe-2 não o possuem (NISHIMURA et al., 2010; RUIZ-PEREZ; NATARO, 2014). Além disso, em um estudo com a SPATE Hbp (*hemonoglobulin binding protein*) o domínio-2 foi removido e a proteína continuou com sua atividade proteolítica, favorecendo a ideia de que o domínio-2 não está envolvido com reconhecimento do substrato (OTTO et al., 2005).

Pouco se sabe do papel de muitas das SPATEs classe-2 quanto ao substrato biológico, função na patogênese e mecanismo de ação (RUIZ-PEREZ; NATARO, 2014). Pic (*protease involved in intestinal colonization*), Tsh (*temperature-sensitive hemagglutinin*) e Hbp são as SPATEs de classe-2 melhor descritas quanto as suas funções (HENDERSON et al., 1999; OTTO et al., 1998; PROVENCE; CURTISS, 1994).

Pic foi originalmente descrito em *Shigella flexneri* 2a e EAEC (HENDERSON et al., 1999). Essa proteína apresenta função mucinolítica, cliva o fator de coagulação V, proteínas do complemento e glicoproteínas de superfície de leucócitos, além de apresentar atividade de hemaglutinina (ABREU et al., 2015; HENDERSON et al., 1999; KOSTAKIOTI; STATHOPOULOS, 2004; PARHAM et al., 2004; PROVENCE; CURTISS, 1994; RUIZ-PEREZ et al., 2011).

Hpb inicialmente identificada em uma cepa extraintestinal de *E. coli*, isolada de um paciente com infecção cirúrgica, difere de Tsh por somente dois aminoácidos (OTTO et al., 1998). A principal função de Hbp é degradar hemoglobulina e se ligar ao Heme exposto, mediando a captação de ferro (OTTO et al., 1998).

Tsh é uma SPATE com atividade de hemaglutinina que foi identificada em cepas de *E. coli* patogênica aviária (APEC) (PROVENCE; CURTISS, 1994). Tem capacidade de se ligar a hemoglobina, assim como Hpb, e também se liga a proteínas de matriz extracelular como fibronectina e colágeno IV, a aglutinação gerada por essa proteína é independente do domínio catalítico de serino protease (KOSTAKIOTI; STATHOPOULOS, 2004; PROVENCE; CURTISS, 1994).

Como se nota, essas três SPATEs de classe-2 resumidamente descritas, apresentam funções semelhantes o que é uma característica das proteínas desta família.

SepA, que também é uma SPATE de classe-2 será descrita com maior detalhes quanto a sua estrutura e funções conhecidas, por se tratar do objeto do presente estudo.

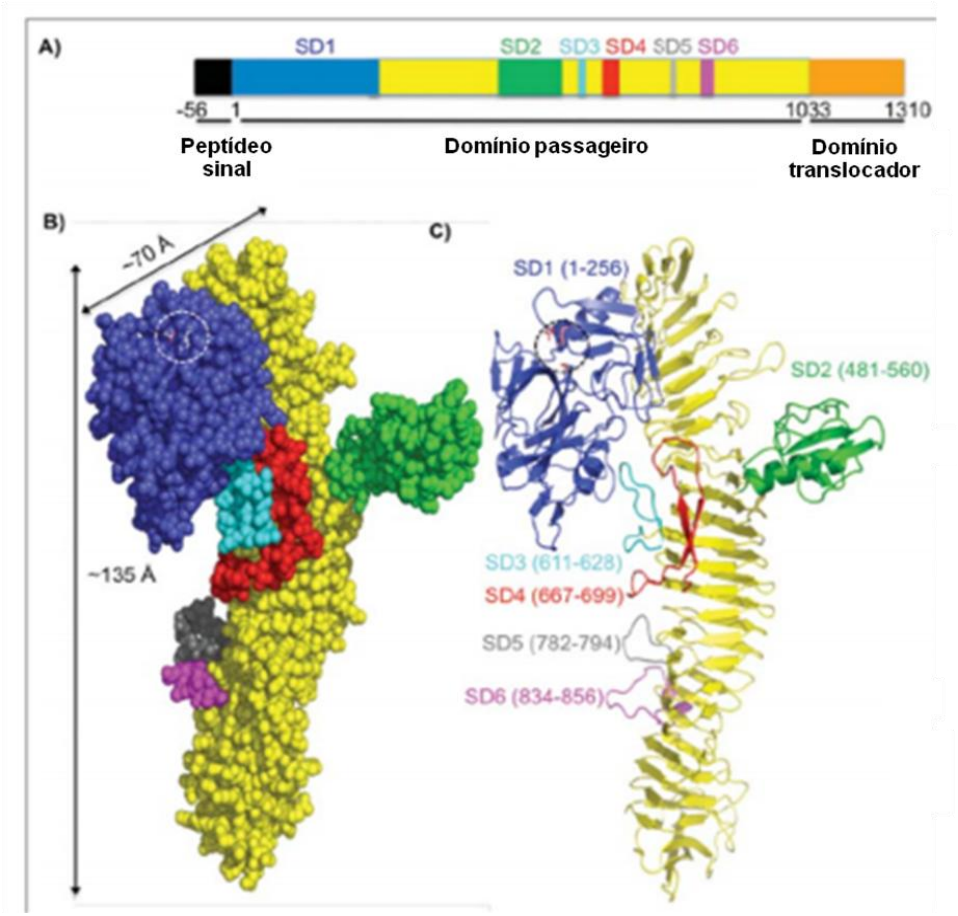
1.3 *Shigella extracelular protein A* (SepA)

SepA (*Shigella extracelular protein A*) foi originalmente descrita em *Shigella flexneri* 5a (BENJELLOUN-TOUMI et al., 1995) e posteriormente em isolados clínicos de EAEC (BOISEN et al., 2009; NATARO, 2011).

Essa SPATE é codificada por um gene plasmideal (*sepA*) em *Shigella flexneri*, e sintetizada como uma proteína precursora de 146 kDa que é convertida em sua forma madura extracelular de 110 kDa (BENJELLOUN-TOUMI et al., 1998). A sua expressão é termorregulada, havendo máxima expressão a 37°C, quando comparada com a expressão em baixas (20-30°C) ou altas (40-42°C) temperaturas (BENJELLOUN-TOUMI et al., 1995).

A estrutura do domínio passageiro de SepA foi resolvida por cristalografia, conforme apresentado na **Figura 6**.

Figura 6 – Cristalografia do domínio passageiro de SepA



Adaptado de: Maldonado-Contreras et al. (2017)
Estrutura do domínio passageiro de SepA em cristalografia. (A) Esquema linear do gene *sepA*, indicando o peptídeo sinal (preto); SD1 a SD6 indica o domínio passageiro. (B) Representação tridimensional do domínio passageiro. (C) Representação em fita do domínio passageiro.

SepA é a proteína majoritária secretada por *S. flexneri.* Nessas bactérias, participa da destruição do tecido epitelial (BENJELLOUN-TOUMI et al., 1998), não apresenta efeito citotóxico em células HEp-2, não está envolvida na formação de placas em células Caco-2, ou disseminação de *S. flexneri*, entre as células hospedeiras. Há indícios de sua participação nos danos na mucosa nos eventos iniciais da shigelose, desempenhando assim um papel na invasão de tecidos a partir da participação na ruptura da barreira epitelial do intestino (BENJELLOUN-TOUMI et al., 1998; DUTTA et al., 2002; MALDONADO-CONTRERAS et al., 2017).

No modelo de alça ligada de intestino de coelho, a infecção por *S. flexneri* mutante em *sepA* é caracterizada pela diminuição de acúmulo de

fluidos e da inflamação em curto período de infecção (8 h), indicando que SepA é necessária para o estabelecimento, mas não para a progressão da shigellose (DAUTIN, 2010).

SepA participa da ruptura da barreira epitelial do intestino na infecção por *S. flexneri,* facilitando o trânsito dessas bactérias para a porção basolateral do epitélio do hospedeiro (MALDONADO-CONTRERAS et al., 2017). Nesse mesmo estudo foi verificado que SepA age na dinâmica de actina por meio da diminuição dos níveis de LIM quinase I (LIMKI) que por sua vez inativa a cofilina, que age diretamente nos filamentos de actina, causando a despolimerização dessas estruturas do citoesqueleto. SepA diminui os níveis de LIMKI pela ação do domínio catalítico de serino protease, uma vez que os níveis de LIMKI permanecem inalterados na infecção por cepa de *S. flexneri* com SepA mutada neste domínio (MALDONADO-CONTRERAS et al, 2017).

O substrato biológico da proteína é desconhecido (RUIZ-PEREZ; NATARO, 2014). SepA hidrolisa diversos peptídeos sintéticos, semelhantes àqueles hidrolisados pela catepsina G, uma serino protease produzida por leucócitos polimorfonucleares, mas surpreendentemente não cliva os substratos naturais da catepsina G, como as fibronectinas, colágenos e angiotensinas (BENJELLOUN-TOUMI et al., 1998). Além disso, SepA não cliva nenhum dos substratos clivados por outras SPATEs de ambas as classes, como a mucina, glicoproteínas de leucócitos, α-espectrina, fator V ou pepsina (DUTTA et al., 2002; RUIZ-PEREZ et al., 2011).

Mesmo apresentando homologia de 67% com as SPATEs Pic e Tsh, ambas SPATES da classe-2 que tem predileção aos mesmos substratos, SepA parece não compartilhar dos mesmos substratos destas proteínas (RUIZ-PEREZ et al., 2014).

Aparentemente SepA tem papel importante na patogênese de EAEC, já que está presente em um grande número de cepas isoladas de pacientes com diarreia (BOISEN et al., 2012). A presença do gene *sepA* foi fortemente associada com casos da doença (BOISEN et al., 2012) e também com a formação de biolfilme (NEZARIEH et al., 2015).

Porém, na cepa de EAEC produtora da toxina de Shiga (O104:H4), causadora do surto de EAEC na Europa (BIELASZEWSKA et al., 2011), Munera et al. (2014) demonstraram *in vivo* que SepA não está envolvida com a

patogênese desta cepa. Neste hibrido, SepA está presente no plasmídeo pAA, que segundo esses autores tem papel somente na adesão agregativa da cepa.

Apesar disso, em um estudo posterior foi demonstrado que além de mediar o fenótipo agregativo, o plasmídeo pAA também aumenta a translocação de Stx2, aumentando a citotoxicidade da cepa (BOISEN et al., 2014), mas ainda assim a proteína SepA permaneceu sem um papel definido na virulência de EAEC produtora de Stx, pois o mutante em SepA não demonstrou alteração nos efeitos citotóxicos, o que pelo contrário ocorreu com os mutantes em *aggA* e *aggR* (genes também presentes no plasmídeo pAA) que tiveram a citotoxicidade significativamente diminuída (BOISEN et al., 2014).

Tendo em vista que SepA é um potencial fator de virulência em EAEC, sendo encontrada fortemente associada à diarreia (BOISEN et al., 2012), torna-se necessário determinar qual o papel dessa serino protease na patogenicidade destas bactérias.

2 OBJETIVO

Avaliar o contexto de SepA de *Escherichia coli* enteroagregativa na interação com diversas linhagens epiteliais *in vitro.*

2.1 Objetivos específicos

- Determinar a frequência de *sepA* em cepas de EAEC isoladas no Brasil;
- Caracterizar fenotípica e genotipicamente as cepas carreadoras de *sepA;*
- Selecionar uma cepa protótipo de EAEC carreadora de *sepA;*
- Purificar SepA;
- Avaliar os efeitos de SepA nas linhagens epiteliais *in vitro*: HEp-2, HeLa, Caco-2, HT-29, Y-1 e MDCK;
- Avaliar a produção de IL-8, IL-1β e TNFα em células HT-29 em resposta a SepA.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O delineamento experimental do presente estudo foi realizado nas etapas descritas a seguir.

(a) Pesquisa da frequência de 12 genes que codificam SPATEs, dentre eles o gene *sepA*, em uma coleção de 193 cepas de EAEC previamente isoladas em dois estudos epidemiológicos sobre a etiologia da diarreia na infância nas cidades de Salvador e São Paulo (BUERIS et al., 2007; GOMES et al., 1998).

(b) Seleção de cepas de EAEC albergando o gene *sepA*. Seis cepas *sepA*$^+$ (BA114, BA198, BA249, BA328, BA363 e BA732) foram selecionadas para análise do padrão de adesão em células HEp-2. Após a determinação do padrão de adesão agregativo, as cepas BA198 e BA732 foram escolhidas para dar continuidade ao estudo.

(c) Caracterização fenotípica e genotípica das cepas BA198 e BA732. O gene *sepA* das duas cepas foi sequenciado em sua totalidade, sua localização cromossômica ou plasmideal foi determinada e a estrutura terciária predita foi determinada a partir das sequências de aminoácidos deduzidas. Uma vez que, essas cepas também albergam o gene da SPATE *pic*, e seu produto foi detectado em sobrenadantes de culturas, foi necessário obter mutantes no gene *pic* em ambas as cepas. Nessa etapa a cepa BA198 foi excluída do estudo.

(d) Sequenciamento do genoma completo e mutagênese da cepa BA732. O genoma completo da cepa BA732 foi parcialmente analisado e o mutante BA732::pic foi obtido.

(e) Purificação da proteína SepA nativa. Nessa etapa foi utilizada a cepa de *Shigella flexneri* 5a M90T como protótipo de expressão. Para a purificação de SepA foram utilizadas três estratégias: exclusão molecular, coluna de afinidade e superexpressão de SepA.

(f) Ensaios fenotípicos com SepA purificada. SepA purificada foi utilizada para a obtenção de soro policlonal anti-SepA, em ensaios de *Flourescence ressonance energy transfer* (FRET) para a confirmação da atividade enzimática da proteína, nos ensaios de interação com diferentes linhagens celulares

epiteliais *in vitro* e nas análises de produção de interleucinas em culturas de células HT-29.

(g) Ensaios fenotípicos com EAEC *sepA*$^{+}$. Os ensaios de interação das cepas BA732 e BA732::pic, foram realizados com diferentes linhagens celulares epiteliais *in vitro*.

3.1 Cepas bacterianas e plasmídeos

As cepas bacterianas e os plasmídeos utilizados neste estudo estão listados na **Tabela 1.**

Tabela 1 - Cepas e plasmídeos utilizados no presente estudo.

Cepas ou plasmídeos	Descrição	Referência
Coleção de EAEC (BA)	100 cepas isoladas de crianças com diarreia na Bahia	BUERIS et al. (2007)
Coleção de EAEC (EPM)	93 cepas isoladas de crianças com diarreia em São Paulo	GOMES et al. (1998)
BA732	Cepa selvagem de EAEC (O17:H18)	BUERIS et al. (2007)
mut100NAL	BA732 mutante espontâneo resistente a 100 µg de ácido nalidíxico	Este estudo
BA732::pic	BA732 mutante em *pic*	Este estudo
042	Cepa protótipo de EAEC (O44:H18), controle positivo de produção de Pet, Pic e adesão agregativa	NATARO et al. (1985)
M90T	*Shigella flexneri* 5a cepa produtora de SepA, controle positivo de *sepA* e de produção de SepA	BENJELLOUN-TOUMI et al. (1995)
EH41	Cepa de EHEC (O113:H21), controle positivo de *epeA*	LEYTON et al. (2003)
H10407	Cepa protótipo de ETEC (O78:H11), controle positivo de *eatA*	EVANS et al. (1973)
E2348/69	Cepa protótipo de EPEC (0127:H6), controle positivo de *espC*	LEVINE et al. (1978)
O103:H2	Cepa classificada como EHEC (O103:H2), controle positivo de *espI*	SANTOS et al. (2010)
EDL933	Cepa classificada como EHEC (O157:H7), controle positivo de *espP*	KARMALI et al. (1983)
FBC114	Cepa classificada como DAEC, controle positivo de *sat*	SOUZA et al. (2002)
Shigella flexneri 2a	*Shigella flexneri,* controle positivo de *sigA*	BÂRZU et al. (1997)
APEC01	Cepa classificada como APEC controle positivo de *tsh*	DELICATO et al. (2002)
RS218	Cepa protótipo de meningite neonatal (O118:H7), controle positivo de *vat*	SILVER et al. (1980)
39R861	*E. coli* K-12 contendo plasmídeos de alto peso molecular conhecidos	THRELFALL et al. (1986)
V517	*E. coli* K-12 contendo plasmídeos de baixo peso molecular conhecidos	MACRINA et al. (1978)

Cepas ou plasmídeos	**Descrição**	**Referência**
DH5αλpir	*E. coli* K-12 lisogenizada com o fago lambda e albergando o gene *pir*	Stratagene
HB101	*E coli* K-12, controle negativo nas PCRs	SAMBROOK et al. (1989)
Plasmídeo pJP5603	Vetor suicida para mutagênese por recombinação homóloga	PENFOLD; PEMERTON (1992)
Plasmídeo pGEM-T Easy	Vetor de clonagem de alto número de cópias	Promega
Plasmídeo pZK15	Plasmídeo contendo *sepA* clonado em pUC19	BENJELLOUN-TOUMI et al. (1995)

3.2 Condições de cultivo

As cepas bacterianas foram cultivadas em meio *Lysogenic Broth* (LB) (BERTANI, 1951) a 37°C por 18 h. Após o crescimento em LB as culturas foram semeadas em ágar MacConkey para análise da pureza, e então uma colônia isolada foi selecionada e novamente semeada em meio LB. As colônias obtidas foram utilizadas nos ensaios propostos, ou estocadas em solução de 20% de glicerol em freezer -80°C. Quando necessário, os meios foram suplementados com os antibióticos kanamicina (50 µg/mL), cloranfenicol (25 µg/mL), apramicina (100 µg/mL) ou ácido nalidíxico (50 ou 100 µg/mL).

3.3 Seleção das cepas de EAEC que albergam o gene *sepA*

Nessa etapa foram utilizadas 193 cepas, previamente caracterizadas como EAEC (BA e EPM) (**Tabela 1**), totalizando 149 EAEC típicas e 44 EAEC atípicas (BUERIS et al., 2007; GOMES et al., 1998).

Para a seleção de cepas carreadoras de *sepA,* inicialmente foi realizada a pesquisa da presença de 12 genes que codificam SPATEs nessa coleção de EAEC, utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os genes a as respectivas sequências dos iniciadores estão listados na **Tabela 2.**

3.3.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a obtenção do DNA molde uma colônia isolada de cada uma das cepas (193 EAEC e os respectivos controles positivo e negativo) foi transferida para um tubo de polipropileno contendo 300 µL de água MilliQ estéril, submetida à fervura por 10 min e imediatamente resfriada em banho de gelo.

Para cada reação foram utilizados 1 µL do DNA molde, 1,0 U de *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen, EUA), 2,0 mM de cloreto de magnésio, tampão de PCR 1x e 0,2 mM da mistura de dNTPs (Invitrogen). Todos os iniciadores dos genes pesquisados foram utilizados na concentração de 40 pM. As temperaturas de anelamento e os tamanhos dos amplicons estão descritos na **Tabela 2**. As PCRs foram realizadas utilizando o seguinte ciclo de amplificação: 94°C/5 min, seguido de 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min nas

temperaturas específicas para cada gene (citadas na **Tabela 2**), 1 min a 72°C, seguido de extensão final por 7 min a 72°C.

Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1%. Para o preparo da agarose (Invitrogen) a mesma foi fundida por aquecimento em tampão TAE (Tris base 0,04 M, ácido acético glacial 1 M, EDTA 50 mM). Os fragmentos de DNA obtidos foram acrescidos de tampão de amostra (azul de bromofenol 0,25%; xileno cianol 0,25%; glicerol 30%). A eletroforese foi realizada utilizando como tampão de corrida o TAE em uma corrente constante de 70 a 80 V. Os amplicons foram detectadas por solução de *Gel Red* (Uniscience, EUA) na concentração de 1:20.000 ou UniSafe Dye (Unisicence) na mesma concentração e visualizadas utilizando um transiluminador de luz ultravioleta, registrando as imagens pelo sistema de captação Alliance HD 6 (Uvitec, Reino Unido).

Tabela 2 – Sequências dos iniciadores, tamanhos dos amplicons e temperaturas de anelamento das PCRs para pesquisa da presença de genes que codificam SPATEs em EAEC

Gene	Sequência de iniciadores (5'-3')	Tamanho do amplicon (pb)	Temperatura de Anelamento (°C)	Referência
eatA	TTGGCGTTCTGTCATCAGGA CCTTACCAGAGAGTGGATG	1.068	57	Este estudo (número de acesso no GenBank: AY163491.2)
epeA	GGGAGAGTTCAGGCATTTA CAGCGTTACCTTACTTGAG	783	57	ABREU et al. (2013)
espC	GACAGTTTTACGTTAGCTGG TCCTGCCGAAAACCGAAGC	1.099	55	Este estudo (número de acesso no GenBank: AF297061.1)
espI	ATGGACAGAGTGGAGACAG GCCACCTTTATTCTCACCA	560	52	SCHMIDT et al. (2001)
espP	GTCCATGCAGGGACATGCCA TCACATCAGCACCGTTCTCTAT	547	55	RESTIERI et al. (2007)
pet	GGCACAGAATAAAGGGGTGTTT CCTCTTGTTTCCACGACATAC	302	58	RESTIERI et al. (2007)
pic	GGGTATTGTCCGTTCCGAT ACAACGATACCGTCTCCCG	1.176	60	HENDERSON et al. (1999)
sat	TCAGAAGCTCAGCGAATCATTG CCATTATCACCAGTAAAACGCACC	930	59	BOISEN et al. (2009)
sepA	GCAGTGGAAATATGATGC GGC TTGTTCAGATCGGAGAAGAAC G	794	58	RESTIERI et al. (2007)
sigA	CCGACTTCTCACTTTCTCCCG CCATCCAGCTGCATAGTGTTTG	430	58	BOISEN et al. (2009)
tsh	CCGTACACAAATACGACGG GGATGCCCCTGCAGCGT	300	59	RESTIERI et al. (2007)

Gene	Sequência de iniciadores (5'-3')	Tamanho do amplicon (pb)	Temperatura de Anelamento (°C)	Referência
vat	AACGGTTGGTGGCAACAATCC AGCCCTGTAGAATGGCGAGTA	420	58	RESTIERI et al. (2007)

3.3.2 Determinação dos grupos filogenéticos de E. coli

A coleção de cepas de EAEC foi classificada filogeneticamente de acordo com a metodologia descrita por Clermont et al. (2013), utilizando uma PCR *quadruplex* que detecta os genes *chua*, *yjaA*, TSPE4.C2 e *arpA*, seguida de PCRs complementares de detecção do gene *trpA*, dependendo do resultado obtido nessa primeira análise. Essa tipagem permite classificar uma *E. coli* em um dos sete grupos filogenéticos distintos: A, B1, B2, C, D, E ou F, além dos clados I a V. Para cada reação de PCR *quadruplex* foram utilizados: 20 pmol de cada um dos iniciadores (*forward* e *reverse*), com exceção do iniciador *reverse* para o gene *arpA*, o qual é utilizado a uma concentração de 40 pmol, 1 U de Taq DNA Polymerase (Invitrogen), 2 mM de $MgCl_2$, 5 µL do tampão de reação de PCR a 50 mM (Invitrogen), 0,2 mM da mistura de dNTPs (Invitrogen), 1 µL do DNA bacteriano das cepas (obtido conforme descrito no item 3.3.1) e água milliQ estéril para um volume final de 25 µL. Após a reação de amplificação, os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose (item 3.3.1).

3.3.3 Determinação do padrão de adesão em células epiteliais cultivadas

A partir dos resultados obtidos por PCR para os genes que codificam SPATEs foram selecionadas 6 cepas da coleção de EAEC (BA e EPM) (BA114, BA198, BA328, BA363 e BA732) para a determinação do padrão de adesão.

O teste de adesão foi realizado utilizando células HEp-2, seguindo a metodologia descrita por Cravioto et al. (1979). A cepa EAEC 042 foi empregada como controle de adesão agregativa.

As células epiteliais foram cultivadas em placas de 24 orifícios (TPP, Suíça) contendo lamínulas de vidro e 1 mL de Meio Mínimo Essencial de Eagle, modificado por Dulbeco (DMEM; Cultilab, Brasil), suplementado com antibióticos (penicilina 1000 U/mL e estreptomicina 1 mg/mL; Sigma-Aldrich, EUA), 10% de soro fetal bovino (SFB; Cultilab) e mantidas a 37°C sob atmosfera de 5% de CO_2 até atingirem confluência de 80%.

Após atingiram a confluência as células epiteliais foram lavadas 6 vezes com PBS 0,01 M pH 7.4 e após as lavagens 1 mL de DMEM sem antibiótico com 2% SFB e 1% de D-manose foi acrescentado a cada orifício.

Uma alíquota de 20 µL de cada cepa bacteriana previamente cultivada em meio LB a 37°C por 18 h foi adicionada a cada poço das placas, as quais foram incubadas por 3 e 6 h a 37°C sob atmosfera de 5% de CO_2, com exceção da cepa 042 que foi incubada por 3 h. Após a incubação cada poço das placas foi novamente lavado por 6 vezes com PBS e as células foram fixadas com metanol absoluto por 30 min à temperatura ambiente. Em seguida foi realizada a coloração de May-Grünwald/Giemsa. Em cada poço das placas foram adicionados 250 µL do corante eosina-azul de metileno em solução segundo May-Grünwald (Merck, Alemanha), diluído 1:2 em tampão Sørensen (fosfato de potássio monobásico 8,6 mM; fosfato de sódio dibásico 28,6 mM), seguido de incubação por 5 min. Em seguida, esse corante foi desprezado e as lamínulas foram cobertas com 250 µL do corante azur-eosina-azul de metileno segundo Giemsa (Merck), diluído 1:3 em tampão Sørensen, seguido de incubação durante 20 min. Em seguida esse corante foi desprezado, os poços foram lavados com água destilada para a retirada do excesso dos corantes e as lamínulas foram retiradas das placas para secagem e montagem sobre lâminas de vidro para serem posteriormente analisadas sob microscopia óptica em aumentos de 400 e 1.000 vezes.

3.4 Caracterização das cepas de EAEC *sepA*$^+$ que apresentam aderência agregativa

3.4.1 Sequenciamento de sepA

O sequenciamento do gene *sepA* (4.094 pb) completo foi realizado nas cepas BA198, BA732 e M90T (**Tabela 1**) utilizando a estratégia de *walking primers*. As sequências dos iniciadores, tamanhos dos *amplicons* e condições de amplificação estão descritas na **Tabela 3**. Todos os iniciadores foram utilizados na concentração de 20 pM e as reações de PCR e análise de eletroforese em gel de agarose foram realizadas conforme descrito no item 3.3.1.

Após a amplificação os produtos foram purificados com auxílio do GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification *kit* (GE Healthcare, Inglaterra), de acordo com instruções do fabricante. Após a purificação, os fragmentos foram quantificados a partir de eletroforese em gel de agarose a 2% utilizando como padrão de concentração de DNA o marcador de massa molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen). O sequenciamento foi realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano (Universidade de São Paulo), utilizando o sequenciador automático ABI 3730 DNA Analyser (Thermo Fisher Scientific, EUA). As reações foram realizadas de acordo com o protocolo do fabricante, utilizando o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Thermo Fisher Scientific) e os iniciadores descritos na **Tabela 3**. As sequências obtidas foram analisadas e alinhadas com auxílio do software BioEdit e foram comparadas no banco de dados do Pubmed por BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/).

Tabela 3 - Sequência dos iniciadores para o sequenciamento do gene *sepA*, tamanho dos amplicons e temperaturas de anelamento

Iniciadores	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Amplicon (pb)	Temperatura de Anelamento (°C)	Referência
sepA(1)	GGTTGATGTTTCTATTATGAACA CGCATCATATTTCCACTG	1031	55	Este estudo (n° de acesso no GenBank: Z48219.1)
sepA(2)	AAATATGATGCGGCTAAGG CACATCCATATTGCCGTTTA	927	55	Este estudo (n° de acesso no GenBank: Z48219.1)
sepA(3)	CCAACTAAACGGCAATAT TTTCCGTCAGAGTACCACAG	960	55	Este estudo (n° de acesso no GenBank: Z48219.1)
sepA(4)	CTGACGGAAAATCAGAGGCC CGTATAGGTCAGAATGCCG	661	58	Este estudo (n° de acesso no GenBank: Z48219.1)
sepA(5)	GACCTATACGGACAGCAATG GAATCTTAAACAGGCTCACG	547	58	Este estudo (n° de acesso no GenBank: Z48219.1)
sepA(6)	CCAAACTGGCTCAAAATGATAA CATCGTGTCAGAACCGC	614	58	Este estudo (n° de acesso no GenBank: Z48219.1)
sepA(7)	GGCGGATTTTCTTGTTGGG AAGCACAACTGTCGGACGAC	768	53	Este estudo (n° de acesso no GenBank: Z48219.1)
sepA(8)	AAATATGATGCGGCTAAGG ATCTTGCCGTTCTGGACAG	1148	51	Este estudo (n° de acesso no GenBank: Z48219.1)
sepA(9)	CCAACTAAACGGCAATAT CATTTC CTGGCTGGTTTTGT	1164	58	Este estudo (n° de acesso no GenBank: Z48219.1)
sepA(10)	ACAAACCAGCCAGTGAAATG	1110	58	Este estudo (n° de acesso no GenBank: Z48219.1)

3.4.2 Localização gênica de sepA

A determinação da localização cromossômica ou plasmideal do gene *sepA* foi realizada nas cepas BA198 e BA732 pela técnica de *Southern Blot*. Primeiramente foi realizada a extração do DNA plasmideal das cepas BA198, BA732, 39R861, V517 e DH5α (**Tabela 1**). A extração plasmideal foi efetuada utilizando o kit *Pure Yield Plasmid Midiprep System* (Promega, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante, porém modificando a etapa de lise celular com uma incubação de 1 h a 55 °C, com a finalidade de eliminar a porção do DNA cromossômico da extração plasmideal.

O perfil plasmideal das cepas foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8%. O preparo do gel de agarose e a eletroforese foram executados de acordo com o descrito no item 3.3.1.

Após a eletroforese, o DNA plasmidial contido no gel de agarose foi tratado com solução de HCl 0,25 M durante 30 min. Em seguida o gel foi lavado com água destilada e tratado com solução desnaturante (NaOH 0,5 M/NaCl 1,5 M) por 30 min. O gel foi novamente lavado com água destilada e tratado com solução neutralizante (Tris-HCl 1 M/NaCl 2 M) por 30 min. Após esse tratamento, os plasmídeos foram transferidos para uma membrana de *nylon* carregada positivamente (GE Healthcare) utilizando o sistema à vácuo Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Amersham Pharmacia Biotech, Reino Unido), segundo recomendações do fabricante.

O DNA plasmideal das 5 cepas foram submetidos a uma reação de hibridização com uma sonda genética correspondente ao gene *sepA*. A sonda genética foi obtida a partir de um amplicon de *sepA* proveniente da cepa M90T por meio de PCR (item 3.3.1). O amplicon também foi utilizado como controle positivo na hibridização. A marcação da sonda e hibridização da membrana foram realizadas com auxílio do kit *AlkPhos Direct Labelling* (GE Healthcare), conforme instruções do fabricante. Posterior à hibridização, a membrana foi incubada com o reagente *Super Signal West Pico Chemoluminescent Substrate* (Thermo Fisher Scientific), conforme instruções do fabricante e exposta a um filme de raios-X durante 1 h e após o filme foi revelado com auxílio do revelador e fixador de filme de raios-X (GE Helthcare), de acordo com as orientações do fabricante.

3.4.3 Imunodetecção de Pic

As proteínas de sobrenadante de cultura das cepas BA198 e BA732 foram analisadas por SDS-PAGE em condições redutoras e desnaturantes, segundo o protocolo descrito por Laemmli (1970). Os extratos de proteínas foram submetidos à corrida eletroforética em corrente constante de 100 V por aproximadamente 2 h em tampão Tris-Glicina (tris (hidroximetil) aminometano 3%; glicina 14%; dodecil sulfato de sódio 1%).

Após a corrida, o gel foi corado utilizando nitrato de prata para a visualização das proteínas ou transferido para uma membrana de nitrocelulose (Hybond-C Extra) para a visualização da proteína Pic por imunodetecção.

A coloração por nitrato de prata foi realizada seguindo o seguinte procedimento. Primeiramente as proteínas contidas no gel (SDS-PAGE) foram fixadas com 50% de metanol, 12% de ácido acético e 37% de formaldeído por 18 h, seguido de 4 lavagens de 20 min em solução 30% de metanol. Em seguida, o gel foi incubado com solução de 0,02 % de tiossulfato de sódio ($Na_2S_2O_3$.5H2O) por 1 min. Posteriormente, o gel foi lavado 3 vezes com água destilada por 30 seg. Após as lavagens, o gel foi incubado com 0,2% de nitrato de prata por 20 min, seguido de 3 lavagens com água destilada, e posteriormente foi adicionada uma solução reveladora contendo 0,05% de formaldeído e 3% de carbonato de sódio (Na_2CO_3) até o aparecimento das bandas proteicas. A reação foi interrompida com 12% de ácido acético em 50% de metanol e o gel mantido em uma solução com 50% de etanol e 10% de glicerol. Todas as etapas da coloração foram realizadas sob leve agitação.

A transferência do conteúdo proteico para a membrana de nitrocelulose foi realizada com auxílio do sistema *Trans-Blot SD Semi-Dry* (BioRad, EUA), utilizando o tampão de transferência (200 mL de metanol, 100 mL de Tris-glicina e 700 mL de água destilada) em corrente elétrica constante de 10 V por 30 min. Em seguida a membrana de nitrocelulose foi bloqueada por 1 h com 1% de PBS contendo 5% de leite em pó desnatado. A membrana foi lavada 3 vezes por 5 min sob agitação com PBS-Tween 0,05% e então incubada com soro anti-Pic (NAVARRO-GARCIA et al., 2010) na diluição de 1:500 em

solução de bloqueio e mantida em agitação por 1 h, decorrido o período de incubação a membrana foi lavada novamente com PBS-Tween 0,05% como descrito anteriormente. Em seguida às lavagens, a membrana foi revelada conforme descrito no item 3.4.2 com exposição de 1 e 5 min.

3.4.4 Perfil de resistência a antibióticos

Para a determinação do perfil de resistência das cepas BA198 e BA732, ambas foram cultivadas em caldo LB como descrito no item 3.2, porém com adição dos seguintes antibióticos separadamente no meio de cultivo: cloranfenicol (100 µg/mL), amplicilina (100 µg/mL), canamicina (25 µg/mL), apramicina (30 µg/mL), tetraciclina (15 µg/mL), ácido nalídixico (30 µg/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). As culturas foram mantidas a 37°C com agitação de 150 rpm por 18 h e verificado a multiplicação bacteriana pela semeadura em ágar MacConkey seguida de incubação a 37°C por 18 h.

3.4.5 Predição da estrutura tridimensional de SepA

A predição da estrutura tridimensional da proteína SepA das cepas M90T, BA198 e BA732 foi realizada utilizando as sequências de nucleotídeos do gene *sepA* dessas cepas, obtidas conforme descrito no item 3.4.1. para as cepas BA198 e BA732, e a partir da sequência do gene *sepA* depositada no GenBank (N° de acesso: Z48219.1) para a cepa M90T. A partir das sequências preditas de aminoácidos de cada uma das cepas e utilizando a plataforma *Protein Homology/Analogy Recognition Engine V 2.0* (PHYRE2), disponível em htpp://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index, as estruturas terciárias preditas de SepA foram obtidas.

3.5 Caracterização fenotípica e genotípica da EAEC BA732

3.5.1 Obtenção de mutante espontâneo resistente ao ácido nalidíxico

Para a obtenção de um mutante espontâneo resistente a ácido nalidíxico (NAL), inicialmente foi realizado o cultivo da cepa BA732 utilizando 100 mL de

caldo LB a 37°C com agitação de 150 rpm por 18 h. Posteriormente a cultura foi centrifugada a 4.000 x g por 15 min, sendo descartado o sobrenadante e o sedimento ressuspenso em 1 mL de PBS. Em seguida, 200 µL dessa suspensão foram semeados em placas de LB ágar contendo 50 ou 100 µg/mL de NAL com auxílio de alças de vidro do tipo Drigalski. As placas foram mantidas a 37°C por 18 h e após esse período foi avaliada a presença ou não de colônias. Posteriormente uma colônia isolada obtida de cada uma das placas de LB ágar contendo 50 µg/mL ou 100 µg/mL de NAL, foram semeadas em placas de ágar MacConkey (contendo as mesmas concentrações de antibióticos) e essas placas foram incubadas a 37°C por 18 h para confirmação das características de fermentação da lactose e morfologia da colônia.

3.5.1.1 Curva de crescimento dos mutantes espontâneos mut50NAL e mut100NAL

Para a realização das curvas de crescimento uma colônia isolada de placas de MacConkey contendo 50 ou 100 µg/mL de NAL e uma colônia isolada da cepa BA732, foram cultivadas em 3 mL de caldo LB com agitação de 150 rpm por 18 h.

Após esse período foi realizado o ajuste da densidade óptica (DO) a 0,6 utilizando espectrofotômetro ajustado para comprimento de onda 600 nm. Uma alíquota de 1 mL de cada uma das cepas foi transferida para 100 mL de caldo LB (suplementado com NAL quando necessário) e a cultura foi mantida a 37°C com agitação constante de 200 rpm.

Transcorrido o período de 1 h foi realizada a leitura da DO da multiplicação bacteriana utilizando uma alíquota de 1 mL de cada uma das cepas, esse processo foi repetido em intervalos de 1 h até atingir o período de 8 h. O ensaio foi realizado em triplicatas técnicas e biológicas.

3.5.1.2 Caracterização bioquímica e genética do mutante espontâneo mut50NAL e mut100NAL

Inicialmente os mutantes espontâneos (NAL resistentes) foram cultivados em ágar MacConkey a 37 °C por 18 h para análise do crescimento e

da utilização ou não da lactose. Uma colônia fermentadora da lactose foi isolada do cultivo em ágar MacConkey e foi transferida para os meios de identificação bioquímica de enterobactérias EPM, Mili e Citrato (Probac do Brasil, São Paulo), os quais foram mantidos a 37°C por 18 h. Após esse período foram observadas as características do perfil bioquímico de *E. coli*, semelhantes ao apresentado pela cepa selvagem (BA732).

Em seguida, algumas marcas genéticas de virulência da cepa BA732 foram pesquisadas nos mutantes espontâneos NAL selecionados. A presença dos genes *aggR*, *sepA*, *aatA* e *pic* foi analisada por PCR.

Os ensaios de PCR para esses genes foram realizados utilizando o DNA molde dos mutantes espontâneos, obtidos conforme descrito no item 3.3.1. As sequências dos iniciadores e as temperaturas de anelamento utilizadas estão descritas na **Tabela 4**. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose, conforme também descrito no item 3.3.1.

Tabela 4 – Sequência dos iniciadores, tamanho dos amplicons e temperatura de anelamento para detecção dos genes *aggR, aatA, sepA* e *pic* por PCR

Gene	Sequências dos iniciadores (5' 3')	Tamanho do amplicon (pb)	Temperatura de anelamento (°C)	Referência
sepA	GCAGTGGAA ATATGATGCGGC TTGTTCAGATCGGAGAAGAACG	794	58	Boisen et al. (2009)
aggR	CGATACATTAAGACGCCTAAAG TCTGATACATTAAATTCATCTGC	346	56	Andrade et al. (2014)
aatA	CTGGCGAAAGACTGTATCAT CAATGTATAGAAATCCGCTGTT	630	56	Schmidt et al. (1995)
pic2b	CCGGTGACAACTTGCATAA TGCAGTCGGGTGAAGGTAA	552	56	Abreu et al. (2016)

3.5.2 Sequenciamento do genoma completo da BA732

O sequenciamento do genoma completo da cepa BA732 foi realizado a partir da plataforma HiSeq 1500® System (Illumina, EUA) pelo Dr. Enéas de Carvalho do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan.

Resumidamente, o DNA foi extraído utilizando o kit *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega) e quantificado com o auxílio do kit *PicoGreen* (Thermo Fisher Scientific), ambos de acordo com as instruções do fabricante. Após a quantificação, o DNA foi preparado utilizando kits específicos do sequenciamento por Illumina para a obtenção de uma biblioteca de DNA e realizada a clusterização. A biblioteca foi gerada a partir de sequências fragmentadas, que foram ligadas a adaptadores que são sequências homólogas às contidas na placa de sequenciamento. Após essa etapa os nucleotídeos foram marcados com fluoróforos e as sequências obtidas foram processadas a partir do software Casava (Illumina); utilizadas para a montagem do genoma, com o auxílio do programa SPAdes (Nurk et al., 2013) e, por fim, o genoma montado foi anotado utilizando o programa Prokka (Seemann, 2014).

A presença de sequências homólogas com cepas de referência foi avaliada por *Basic Local Aligment Search Tool* (BLAST) e a predição *in silico* do sorotipo, genes de virulência, presença de plasmídeos e de genes de resistência a antimicrobianos foi realizada pelo site do *Center for Genomic Epidemiology* (disponível em: http://www.genomicepidemiology.org).

3.5.3 Obtenção de mutante isogênico em pic na BA732

Para a obtenção do mutante isogênico em *pic* a partir da cepa BA732, foi utilizada a técnica de recombinação homóloga com auxílio do vetor suicida pJP5603 (RIEDEL et al., 2013).

Para isso foi necessária a clonagem do gene *pic* no vetor pGEM-T *Easy* (Promega), para a inserção de sítios de restrição EcoRI nas extremidades do fragmento amplificado de *pic*, conforme descrito a seguir

Inicialmente foi realizado ensaios de PCR com os iniciadores *pic2b* (F) e *pic2b* (R) (**Tabela 4**). A PCR foi realizada de acordo com o item 3.3.1 nas seguintes condições: uma desnaturação inicial de 94°C por 5 min, 30 ciclos de

94°C 1 min/56°C 1 min/72°C 1 min, com uma extensão final de 72°C por 7 min. Os produtos de PCR foram analisados em eletroforese em gel de agarose (item 3.3.1). Após a eletroforese o fragmento de DNA obtido foi purificado utilizando o kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare), de acordo com as recomendações do fabricante. O fragmento purificado foi submetido à ligação com vetor pGEM-T *Easy* (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante e utilizado para a quimiotransformação de *E. coli* DH5α competentes, obtidas conforme descrito em Sambrook et al. (1989).

Em seguida, 50 µL de suspensão de *E. coli* DH5α quimiocompetentes foram utilizadas para a transformação com 10 µL da ligação pGEM-T *Easy* com o inserto *pic2b*. A mistura foi mantida a 4°C por 30 min, a 42°C por 2 min e novamente a 4°C por 10 min. As bactérias transformadas foram recuperadas em 1 mL de caldo LB a 37°C com agitação de 180 rpm por 1 h. Transcorrido o período de recuperação foi realizada a semeadura das bactérias transformadas em placas de LB contendo ampicilina (100 µg/mL). Também foi adicionado ao meio 1 mM de isopropil β-D-tiogalactopiranoside (IPTG) e 40 µg/mL de 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-galactopiranosídeo (X-Gal). As placas foram mantidas a 37°C por 18 h. Após essa incubação, foram selecionadas 6 colônias brancas para a confirmação da correta transformação, realizada pela detecção do fragmento *pic2b* por PCR. Uma dessas colônias foi selecionada para o cultivo em caldo LB contendo ampicilina (100 µg/mL) para posterior extração do DNA seguido de digestão com a enzima de restrição EcoRI (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante, para a obtenção do fragmento correspondente a *pic2b* contendo os sítios de restrição EcoRI em ambas as extremidades. Esse fragmento foi posteriormente purificado utilizando o kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare), de acordo com as recomendações do fabricante, e utilizado para ligação com o vetor suicida pJP5603, previamente digerido com EcoRI. A ligação foi realizada utilizando a enzima T4 ligase (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante.

Essa ligação foi utilizada para transformar *E. coli* DH5αλpir quimiocompetentes, conforme descrito acima. Após serem recuperadas as bactérias transformadas foram semeadas em placas contendo canamicina (50 µg/mL), IPTG (1 mM) e X-Gal (40 µg/mL) e incubadas a 37°C por 18 h.

Posteriormente foram selecionadas 10 colônias brancas para a confirmação da correta transformação utilizando a PCR (item 3.3.1) com os iniciadores *pic2b*, conforme descrito anteriormente.

Um clone positivo por PCR para o gene *pic* foi selecionado para realização da próxima etapa da mutação que consistiu em uma conjugação com a cepa mut100NAL.

Para a realização da conjugação primeiramente a cepa mut100NAL foi cultivada em caldo LB contendo ácido nalidíxico (100 µg/mL) a 37°C por 18 h sem agitação. O clone transformado com o vetor pJP5603 contendo o inserto *pic2b* foi cultivado da mesma maneira, porém na presença de canamicina (50 µg/mL). Após o crescimento das duas cepas foi realizada a conjugação utilizando 200 µL de cultura da cepa mut100NAL junto a 1 mL de cultura do clone (pJP5603 contendo *pic2b*) em 10 mL de caldo LB. Essa cultura bacteriana foi mantida a 37°C por 18 h sem agitação na ausência de antibióticos. No dia seguinte a cultura contendo os possíveis conjugantes foi semeada em placas de LB ágar contendo ácido nalidíxico (100 µg/mL) e canamicina (50 µg/mL) e as placas foram incubadas a 37°C por 18 h para a seleção de possíveis mutantes no gene *pic.*

3.5.3.1 Ensaios para a confirmação da mutação isogênica de pic

Ensaios fenótipos e genotípicos foram realizados para a confirmação da mutação isogênica de *pic* por meio da comparação das características de dois conjugantes (possíveis mutantes obtidos) com as características da cepa mut100NAL. Os ensaios realizados foram os seguintes: curva de crescimento (item 3.5.1.1), identificação bioquímica por EPM, Mili e Citrato (item 3.5.1.2), PCR para os genes de virulência da cepa BA732 (item 3.5.1.3), imunodetecção de Pic (item 3.4.3) e sequenciamento de DNA conforme descrito a seguir.

3.5.3.1.2 Sequenciamento de nucleotídeos do mutante em pic

Para o sequenciamento, primeiramente foi realizada a extração do DNA genômico dos dois conjugantes obtidos, utilizando o kit *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante. A

PCR foi realizada utilizando para cada reação 1 µL do DNA genômico de cada um dos conjugantes, 1,0 U de Taq DNA Polymerase (Invitrogen), 2,0 mM de cloreto de magnésio, tampão de PCR 50 mM e 1 mM da mistura de dNTPs (Invitrogen). O seguinte ciclo de amplificação foi utilizado: uma denaturação inicial de 94°C por 5 min; 35 x (94°C/1 min; 56°C/1 min; 72°C/1 min e 30 seg) com uma extensão final de 72°C 7 min.

Os seguintes iniciadores foram utilizados *pic*MUT(F) e *pic*MUT(R) e os iniciadores correspondentes ao vetor suicida pJP5603 (**Tabela 5**). As PCRs foram realizadas com os iniciadores nas seguintes combinações: *pic*MUT(F) com KmRv; *pic*MUT(R) com KmFw; *pic*MUT (R) com M13pjP5603; *pic*MUT(F) com M13(R). As sequências dos iniciadores e temperaturas de anelamento estão descritas na **Tabela 5**. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose (item 3.3.1) e purificados do gel de agarose com auxílio do kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare), para posterior sequenciamento de nucleotídeos, realizado conforme descrito no item 3.4.1.

Tabela 5 – Sequência dos iniciadores utilizados para a confirmação da mutação em *pic* por sequenciamento, tamanho dos amplicons e temperatura de anelamento.

Gene	Sequência de iniciadores (5'-3')	Anelamento (°C)	Referência
M13pJP5603	CGTTTACAACGTCGTGACTGGG	60	N° de acesso no GenBank: JQ769377.1
KmFw	TATCATGGTGGAAAATGGCC	58	Riedel et al. (2003)
KmRv	GGCCATTTTCCACCATGATA	58	
*pic*MUT (F)	CGAACTGGTGGAATGTCATA	60	Este estudo N° de acesso no GenBank: Z48219.1
*pic*MUT (R)	CCAATCGTCGGTTCACTGAC	60	

3.6 Purificação de SepA

A purificação de SepA foi realizada utilizando a cepa de *S. flexneri* 5a M90T, empregando diferentes estratégias de purificação descritas a seguir.

3.6.1 Concentração de sobrenadante de cultura de M90T

A obtenção de proteínas secretadas da cepa M90T foi realizada por meio da concentração sob centrifugação em membranas filtrantes. O cultivo da cepa foi realizado conforme descrito no item 3.2. A concentração das proteínas de sobrenadante foi realizada da seguinte forma: 1 L de cultura foi centrifugado a 4.000 x g por 15 min a 4°C e em seguida o sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,22 µm. Alíquotas de 15 mL foram transferidas para o aparato Amicon Ultra–15 de 50 kDa (Merck Millipore, Reino Unido) e centrifugadas a 4.000 x g por 5 min a 4°C, até que o volume total de cultura fosse concentrado. O conteúdo retido na membrana foi coletado e armazenado a 4°C para posterior análise em SDS-PAGE (item 3.4.3). A confirmação da identidade da proteína SepA foi realizada por espectrometria de massas (LC-MS/MS) em solução (*gel free*) no aparelho LTQ Orbitrap Velos. Essa etapa foi realizada pelo Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada (LETA) do Instituto Butantan. O banco de dados *Mascot Search Results* foi utilizado, para a análise do conteúdo proteico.

3.6.2. Purificação por exclusão molecular

A primeira estratégia de purificação da proteína SepA foi a exclusão molecular por meio de uma coluna de gel filtração. A coluna Superdex 16/60 (GE Healthcare) foi equilibrada com 121 mL de NaCl 0,05 M pH 8.3 e em seguida lavada com 242 mL de NaCl 0,15 M pH 8.3. Após o preparo da coluna, alíquotas do sobrenadante concentrado (item 3.6.1) foram diluídos em tampão NaCl 0,15 M/Fosfato de sódio 0,05 M pH 8.3 (proporção de 1:1) e aplicados na coluna. O mesmo tampão utilizado na diluição do sobrenadante concentrado foi utilizado para a eluição da amostra.

Uma vez que, a coluna foi acoplada ao sistema de purificação *ÄKTA Pure Chromatography System* (GE Healthcare), as alíquotas eluídas da coluna foram coletadas em tubos estéreis. Neste sistema, para cada alíquota coletada é feita uma leitura de absorbância e um gráfico é gerado. Em seguida, as frações referentes aos picos gerados na purificação foram analisadas por SDS-PAGE (item 3.4.3) e verificada a existência de frações contendo a proteína purificada.

3.6.3 Purificação por Cromatrografia de afinidade (coluna de serinoproteases)

Essa estratégia de purificação foi realizada utilizando uma coluna afinidade para serinoproteases acoplada ao sistema ÄKTA (GE Healthcare). Para isto, a coluna Sepharose 4FF (GE Healthcare) foi equilibrada com tampão de ligação (0,05 M de Tris-base e 0,5 M de NaCl, pH 7.4) e em seguida a coluna foi lavada com tampão de eluição (0,05 M de glicina HCl, pH 3.0) para que a fração proteica fosse desligada da coluna de afinidade. Após, as frações foram coletadas em microtubos de 2 mL contendo 30 µl de tampão de neutralização (0,5 M de Tris-base, pH 9.0) e por fim o pH das frações foi mensurado, a fim de verificar a faixa de pH ideal entre 8.0 e 7.0, logo após a coleta das frações as mesmas foram mantidas em gelo. Em seguida, as frações referentes aos picos gerados na purificação foram analisadas por SDS-PAGE (item 3.4.3).

3.6.4 Superexpressão de SepA para purificação

3.6.4.1 Obtenção da cepa recombinante M90T(pZK15)

Nessa estratégia de purificação de SepA a cepa M90T foi transformada com o plasmídeo pZK15 (plasmídeo contendo o clone mínimo de expressão de SepA) (BENJELLOUN-TOUIMI, SANSONETTI; PARSOT, 1995) para que ocorresse uma superexpressão de SepA, com consequente maior rendimento na purificação da proteína.

As bactérias M90T eletrocompetentes foram obtidas de acordo com a metodologia descrita por Sambrook et al. (1989). A transformação foi realizada

com 10 ng de plasmídeo (pZK15) utilizando uma cubeta de eletroporação *Gene Pulser/MicroPulser Eletroporation Cuvetes* (BioRad) de 0,2 cm, a qual foi submetida a um pulso elétrico de 2.5 V utilizando o *Gene Pulser* II (BioRad). As bactérias recém-transformadas foram recuperadas em 1 mL de LB a 37 °C por 1 h com agitação de 180 rpm. Após a recuperação 50 e 100 µL da suspensão bacteriana foram cultivados em placa de LB contendo ampicilina (100 µg/mL) e incubadas a 37°C por 18 h.

Após a obtenção da cepa recombinante M90T(pZK15), foi realizada a indução da produção da proteína SepA. Para isso uma colônia de M90T(pZK15) foi transferida para 250 mL de caldo tríptico de soja (TSB; Difco, Reino Unido) e incubada a 30 °C com agitação de 180 rpm, até que atingisse a DO de 0,6 em comprimento de onda de 600 nm. Após, foi adicionado 1 mM de IPTG e a cultura foi mantida a 30 °C com agitação de 180 rpm por 4 h, para que houvesse a indução da superexpressão de SepA. Esse procedimento foi realizado em um volume total de 1 L de meio de cultura.

3.6.4.2 Obtenção de sobrenadante concentrado de M90T(pZK15)

A obtenção do sobrenadante de cultura concentrado de M90T(pZK15) foi realizada de acordo com o item 3.6.1., e a presença da proteína SepA no sobrenadante concentrado foi verificada em gel de SDS-PAGE, de acordo com o descrito no item 3.4.3.

3.6.4.3 Purificação de SepA por exclusão molecular

O sobrenadante de M90T(pZK15) concentrado contendo a proteína SepA foi submetido a purificação por exclusão molecular de acordo com o descrito no item 3.6.2.

3.7 Determinação da ação proteolítica de serinoprotease de SepA por *Flourescence ressonance energy transfer* (FRET)

A atividade de serinoprotease de SepA foi avaliada por meio da clivagem do substrato peptídico fluorescente (FRET) denominado Abz-FRSSR-EDDnp. A

reação continha 0,05 µg de SepA, tampão Tris HCl 80 mM, pH 7.4 e $CaCl_2$ 1 mM e 5 µM do substrato FRET. A reação foi mantida a 37°C sob agitação e monitorada em fluorímetro Victor 3™ (Perkin-Elmer, EUA) nos comprimentos de onda de emissão de 420 nm, e excitação de 320 nm, durante 15 min. A atividade foi expressa por unidade de fluorescência livre de substrato clivado/minuto/µg de SepA (UF/min/µg). Como controle negativo o substrato foi incubado somente com o tampão. Os resultados foram analisados utilizando o programa GraFit.

Para a confirmação da ação proteolítica por meio da porção de serinoprotease foi realizada uma incubação inicial de 15 min da proteína SepA e o substrato FRET com *phenylmethylsulfonyl flouride* (PMSF), um inibidor de serinoprotease, e realizada a leitura e análise conforme descrito anteriormente.

3.8 Obtenção do soro policlonal anti-SepA

Para a obtenção do soro policlonal anti-SepA uma coelha da linhagem Nova Zelândia com 2,5 Kg, fornecida pelo Biotério Central do Instituto Butantan, foi imunizada via intramuscular com 1 mL de solução contendo 100 µg de SepA e 2,5 mg de hidróxido de alumínio como adjuvante, seguindo o esquema de duas imunizações com intervalo de 15 dias entre cada uma delas. Antes da primeira imunização uma amostra de sangue foi coletada pela via auricular para a obtenção do soro pré-imune. Após a primeira imunização o procedimento foi realizado novamente e dessa vez a amostra foi utilizada para a obtenção do soro imune. O soro pré-imune e o imune foram utilizados para a titulação do soro anti-SepA.

Transcorridos 45 dias da segunda imunização o animal foi eutanasiado para obtenção do soro hiperimune. Para a obtenção do soro o sangue foi incubado a 37°C por 30 min para que houvesse a coagulação, seguido de centrifugação a 180 x g por 10 min a 4°C. O soro foi coletado e incubado a 56°C durante 30 min para inativação do complemento. Em seguida foi resfriado e mantido a -20°C.

Este protocolo de experimentação animal teve a aprovação das Comissões de Ética no uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da

Universidade de São Paulo (Protocolo n° 98/2015) e do Instituto Butantan (Protocolo nº 1385/15).

3.8.1 Titulação do soro por ensaio imunoenzimático (ELISA)

A titulação do soro policlonal foi realizada por meio do ensaio imunoenzimático *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) indireto (ENGVALL; PERLMANN, 1971). Para isso, microplacas *MaxiSorp* (Thermo Fisher Scientific) foram sensibilizadas com 1 µg da proteína SepA por poço, a placa foi incubada por 2 h a 37°C, seguido de bloqueio com PBS contendo 1% de albumina do soro bovino (BSA) 1 h a 37°C e lavada 3 vezes com PBS-Tween 0,05%. Diluições seriadas do soro hiperimune ou pré-imune foram incubadas por 1 h a 37°C por 1 h em seguida foram realizadas 3 lavagens com PBS-Tween 0,05%. Posteriormente anticorpos de cabra anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase na diluição de 1:5000 foram adicionadas à placa e o ensaio foi revelado com tetrametilbenzidina (TMB; BD Biosciences, EUA). Os valores de DO a 450 nm foram aferidos no leitor de ELISA *Multiskan EX* (Labsystems, EUA).

3.8.2 Adsorção e purificação do soro anti-SepA

Para a eliminação de anticorpos inespecíficos o soro hiperimune foi adsorvido contra extratos bacterianos da cepa EAEC 042. Para isso, essa cepa foi cultivada em 100 mL de caldo TSB a 37°C por 18 h. O cultivo foi centrifugado a 12.800 x g por 10 min o sedimento foi ressuspendido em 14 mL de PBS estéril e em seguida foi adicionado 1 mM de PMSF e foram feitas alíquotas de 1 mL do precipitado. As alíquotas foram centrifugadas 12.800 x g por 20 min e o precipitado foi ressuspendido em 1,5 mL de anti-SepA mantido sob agitação por 2 h e em seguida incubado a 4°C por 18 h. O procedimento foi repetido utilizando as 14 alíquotas de 1 mL do precipitado obtido. Após a última adsorção o soro foi filtrado em membrana de nitrocelulose de 0,22 µm e armazenado a -20°C até o momento do uso.

Além disso, também foi realizada a purificação em coluna de afinidade à proteína G *HiTrap Protein G Collumn* (GE Healthcare) do soro anti-SepA. Para

isso, a coluna foi equilibrada com o tampão de ligação (20 mM de Na_2HPO_4) pH 7.0 e em seguida 20 mL do soro foram aplicados na coluna em uma velocidade de 3 mL por min. Para a eluição do soro foi utilizado um tampão de eluição (100 mM de glicina) pH 2.7 que permitiu a dissociação do soro anti-SepA purificado. As frações obtidas foram coletadas em tubos de polipropileno de 2 mL contendo um tampão de neutralização (1 M de Tris) pH 8.0. A presença de proteína nas frações foi verificada pela técnica de Bradford (BioRad). Após as frações contendo proteínas foram dialisadas em PBS por 48 h a 4°C. A reatividade do soro foi testada por imunodetecção (item 3.4.3).

3.8.3 Imunodetecção de SepA

A imunodetecção de SepA foi realizada utilizando as proteínas do sobrenadante de cultura precipitado com ácido tricloroacético (TCA) 20% (v/v) das cepas BA732, BA732::pic, M90T (controle positivo) e 042 (controle negativo).

A precipitação foi realizada seguindo os seguintes passos: primeiramente as cepas foram cultivadas em 10 mL de LB a 37°C com agitação de 180 rpm por 18 h, após as culturas foram centrifugadas a 16.000 x g por 10 min e o sobrenadante coletado e fracionado em alíquotas de 1 mL. Em cada alíquota foi adicionado 1 mL de TCA, seguido de incubação a 4°C por 18 h. Uma centrifugação a 16.000 x g a 4°C foi realizada posteriormente e as proteínas precipitadas foram lavadas com 500 µL de acetona e submetidas à centrifugação, conforme descrito anteriormente. Por fim, as proteínas precipitadas foram ressuspensas em 30 µL de Tris 1 M pH 8.8, analisadas em SDS-PAGE (item 3.4.3) e transferidas para membrana de nitrocelulose para imunodetecção, conforme descrito no item 3.4.3. A imunodetecção de SepA foi realizada de acordo com o descrito no item 3.4.3, com a utilização do soro anti-SepA nas seguintes diluições 1:200; 1:500; 1:1000 e 1:5000. Para o bloqueio também foi utilizado PBS contendo 1% de BSA, além da solução de leite desnatado 5% em PBS.

3.9 Ensaios com células epiteliais *in vitro*

3.9.1 Células epiteliais e cultivo celular

Para a realização dos ensaios de interação da proteína SepA com células eucarióticas foram utilizadas as seguintes células epiteliais imortalizadas: HeLa (célula humana proveniente de adenocarcionoma de colo do útero), HEp-2 (célula humana proveniente de carcinoma de laringe contaminada com células HeLa), CaCo-2 (célula humana proveniente de adenocarcinoma colorretal), Vero (célula de macaco verde africano proveniente de rim), Y-1 (célula murina proveniente de carcinoma adrenocortical), HT-29 (célula humana proveniente de adenocarcinoma colorretal) e MDCK (célula da raça de cães *cocker spaniel* proveniente de rim). O cultivo de todas as células foi realizado de acordo com o descrito no item 3.3.3.

3.9.2 Ensaios de interação de SepA com as linhagens celulares

Os ensaios de interação de SepA com linhagens celulares foram reveladas de duas formas: utilizando a coloração por eosina-azul de metileno em solução, segundo May-Grünwald, e azur-eosina-azul de metileno, segundo Giemsa (May-Grünwald/Giemsa), e pela reação de imunofluorescência utilizando marcadores específicos.

Parte dos ensaios utilizando imunofluorescência foram realizados no Departamento de *Biología Celular do Centro de Investigacíon y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional* (CINVESTAV, México).

Nos ensaios de interação de SepA com as células epitelias evidenciados pela coloração May-Grünwald/Giemsa a proteína SepA foi utilizada em uma concentração final de 20 ou 10 µg/mL. Estes ensaios foram realizados de acordo com o descrito por Dutta et al. (2002). Nesta etapa a proteína SepA foi incubada com as linhagens celulares HeLa, HEp-2, Y-1, CaCo-2, HT-29 e VERO por períodos de 5, 10, 18 e 30 h. A coloração e análise das lâminas foi realizada de acordo com descrito no item 3.3.3.

Os ensaios de citotoxicidade empregando a imunofluorescência foram realizados utilizando SepA nas concentrações finais de 20, 40 ou 80 µg/mL,

sendo a proteína diluída em meio DMEM sem SFB ou antibióticos. Um volume final de 100 µL por poço foi adicionado a uma lâmina Lab-Tek de oito poços (Thermo Fisher Scientific), contendo as células HeLa, HEp-2, HT-29 ou MDCK. A incubação foi realizada por períodos de 3, 4, 5 ou 18 h em condições normais de cultivo. Após, o meio de cultura foi removido e as células lavadas duas vezes com PBS e fixadas com 4% de paraformaldeído em PBS durante 20 min à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram permeabilizadas com 0,1 % de Triton X-100 durante 7 min à temperatura ambiente.

As células fixadas e permeabilizadas foram incubadas com o soro anti-SepA por 1 h à temperatura ambiente, seguido de incubação pelo mesmo período com anticorpo IgG de cabra anti-coelho biotinilado, e posterior incubação com DTAF (dichorotriazinylamino fluorescein) (Jackson Imunoresearch, EUA) ou Alexa-Fluor 488 conjugado com IgG de cabra anti-coelho, também com incubação de 1 h, para evidenciar a presença de SepA por fluorescência.

Para a marcação das células foram utilizados Rhodamine Phalloidin (Thermo Fisher Scientific) para visualização dos filamentos de actina e TO-PRO-3 (Thermo Fisher Scientific) ou *4´,6-dianidino-2-phenylindole* (DAPI) (Thermo Fisher Scientific), para a visualização do DNA.

3.9.2.1 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi verificada por meio da técnica de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) em células HeLa e HT-29 após a interação com SepA.

As células foram cultivadas em placas de 96 poços por 48 h, conforme descrito no item 3.3.3. Após, foi realizado o ensaio de interação com SepA nas duas linhagens celulares de acordo com o item 3.9.2. Transcorrido o período de interação, as células foram incubadas com 0,2 mg/mL de MTT por 1 h e 30 min em estufa com atmosfera de 5% de CO_2 a 37°C. Posteriormente foram adicionados 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) em cada poço para a

solubilização dos cristais de formazan. Em seguida os valores de DO a 595 nm foram aferidos no leitor de ELISA *Multiskan EX* (Labsystems, EUA).

3.9.3 Ensaios de ligação à membrana

Nesses ensaios foram utilizadas as células HeLa, HT-29 e MCDK, cultivadas de acordo com o descrito anteriormente (item 3.3.3). Para a realização do ensaio de ligação de SepA à membrana celular, as células foram pré-fixadas em uma solução de 0,25% de paraformaldeído em PBS por 1 h em banho de gelo. Após, 40 µg/mL de SepA foram incubados por 1 h a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO_2 e em seguida as células foram fixadas por 20 min à temperatura ambiente em solução de 4% de paraformaldeído em PBS.

O ensaio foi preparado para a reação de imunofluorescência da mesma maneira que o descrito no item 3.9.2, utilizando os mesmos fluóroforos, e as lâminas foram observadas em microcópio de varredura a Laser Confocal TCS SP5 (Leica, Alemanha) em aumento de 1.000 x, utilizando os seguintes filtros: UV (excitação de 340-380 nm e emissão de 425 nm), azul (excitação de 450-490 nm e emissão de 515 nm) e verde (excitação de 515-560 nm e emissão de 590 nm).

3.9.4 Desagregação de SepA purificada

No decorrer do desenvolvimento dos experimentos realizados no CINVESTAV foi observado que a proteína SepA purificada por cromatografia de afinidade (item 3.6.3) encontrava-se agregada. Três estratégias foram utilizadas na tentativa de desagregar a proteína, conforme descrito a seguir.

Na primeira estratégia, 100 µL de SepA na concentração de 100 µg/mL foram centrifugados a 4.000 x g por 15 min a 4°C e o sobrenadante foi coletado e armazenado a 4°C até o momento do uso. Na segunda estratégia, 100 µL de SepA (100 µg/mL) foram sonicados a uma amplitude de 50% por 30 seg e também armazenada a 4°C. Na terceira estratégia, 500 µL de SepA na concentração de 40 µg/mL foram dialisados durante 18 h a 4°C em 500 mL de PBS sob leve agitação. Em seguida foram realizadas três trocas do PBS (igual

volume) pelo período de 1 h cada e a proteína dialisada mantida a 4°C até o momento do uso. As proteínas obtidas após cada um dos tratamentos foram quantificadas por Bradford (BioRad) e utilizadas para os ensaios de interação de SepA com as células epiteliais, conforme descrito no item 3.9.2.

3.9.5 Teste de detecção da produção de SepA na adesão bacteriana

Os testes de adesão visando a detecção da produção de SepA e a presença de efeito citotóxico ou citopático gerado pela interação da proteína foram realizados com a linhagem celular HeLa e a cepa BA732::pic por períodos de 4 h e 30 min, 6 e 8 h de interação. Para isso foi utilizada a MOI de 1,0 ou 0,5 de bactérias/células epiteliais. O ensaio de adesão foi realizado de acordo com o descrito no item 3.3.3 e a reação de imunofluorescência de acordo com o item 3.9.2.

3.9.6 Ensaios de neutralização do efeito causado por SepA utilizando anti-SepA e PMSF

Os ensaios de neutralização do efeito de SepA verificado a partir dos ensaios de interação com as linhagens celulares (item 3.9.2) foram realizados utilizando somente as células HeLa. A neutralização foi realizada utilizando a proteína SepA purificada pré-incubada com o soro anti-SepA, ou com inibidor de serino protease PMSF.

O soro anti-SepA na concentração de 35 µg/mL foi incubado previamente com a proteína SepA (40 µg/mL) a 37°C por 30 min e após esse período a mistura anti-SepA/SepA foi adicionada às células e realizado o ensaio de interação. Para a neutralização com PMSF, 0,6 mM do inibidor foram incubados com 40 µg/mL de SepA e a solução mantida a 37°C por 15 min. Ambos os ensaios foram evidenciados pela coloração por May-Grünwald/Giemsa (item 3.3.3).

3.10 Dosagem das interleucinas IL-8, IL-1β e TNFα

Para a realização desta etapa foram utilizadas as células HT-29, as quais foram cultivadas em placas de 24 poços com DMEM (Cultilab) contendo 10% de SFB durante 10 dias, sendo que havia troca de meio de cultivo celular a cada dois dias com o intuito de promover a polarização das células. Após a polarização, as células foram incubadas com SepA (40 µg/mL) durante 5 h a 37°C em atmosfera de CO_2. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas técnicas e biológicas.

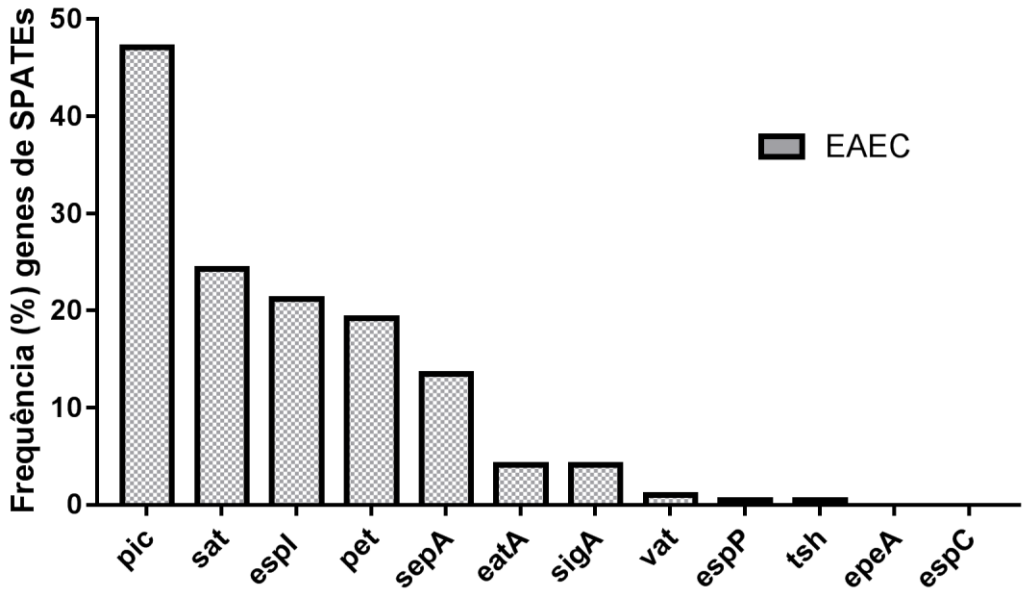
Após a interação de HT-29 e SepA o meio de cultivo foi coletado de cada poço e os sobrenadantes foram obtidos por centrifugação a 2.000 x g por 10 min a 4°C. Os sobrenadantes foram testados por ELISA de captura com os kits *Human* IL-8, IL-1β e TNFα *BD OptEIA* (BD Biosciences), de acordo com as instruções do fabricante. As placas foram reveladas com TMB e os valores de DO foram aferidos em um leitor de ELISA *Multiskan EX* (item 3.8.1).

4. RESULTADOS

4.1 Frequência dos genes que codificam SPATEs nas cepas de EAEC

Dez dentre os 12 genes pesquisados que codificam SPATES foram encontrados na coleção de 193 EAEC (**Figura 7**), independentes de serem classificadas como EAEC típica ou atípica os genes foram encontrados na seguinte ordem do mais frequente para o menos frequente: *pic* (47,1%), *sat* (24,3%), *espI* (21,2%), *pet* (19,2%), *sepA* (13,5%), *eatA* e *sigA* (4,1%), *vat* (1,0%), *espP* e *tsh* (0,5%). Os genes *pic*, *sat*, *espI*, *pet* e *sepA* foram os mais frequentes, enquanto *epeA* e *espC* não foram detectados. O gene *sepA,* que codifica a SPATE em estudo no presente projeto, foi encontrado em 26 (13,5%) cepas.

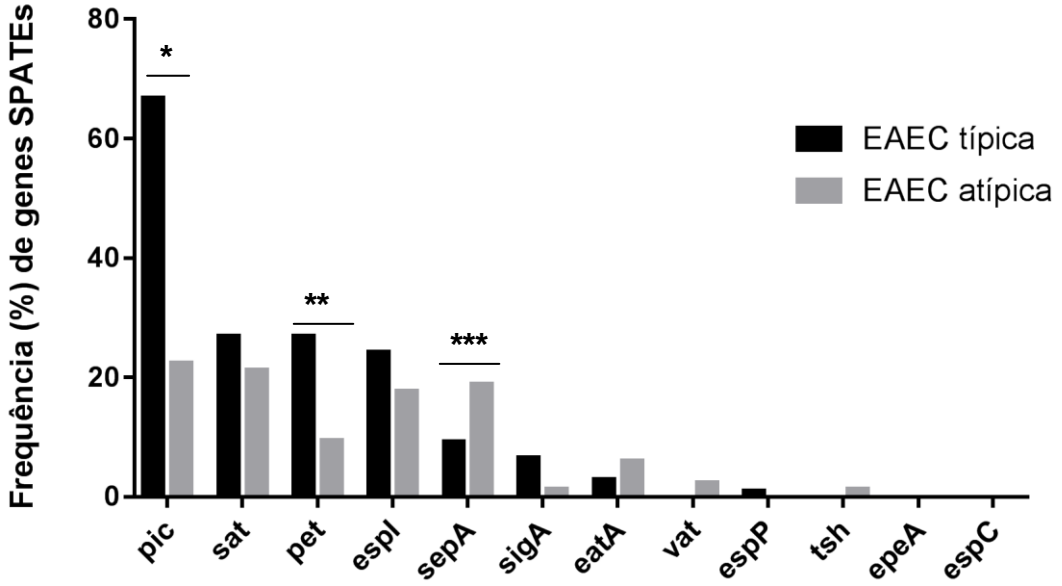
Figura 7 – Frequência de 12 genes que codificam SPATEs em 193 cepas de EAEC.



Porcentagem de cepas carreadores dos genes *pic, sat, espI, pet, sepA, eatA, sigA, vat, espP, tsh, epeA,* e *espC* na coleção de EAEC.

A análise da presença desses genes quando as cepas da coleção foram classificadas em típicas ou atípicas está apresentada na **Figura 8**. Conforme observado, a distribuição dos genes de SPATEs entre os dois subgrupos de EAEC apresentou diferença de distribuição entre os genes *pic, pet* e *sepA*, sendo que *pic* está presente em 66,7% *pet* 26,8% e *sepA* em 9,4% em EAEC típica, já nas cepas de EAEC atípica *pic* foi detectado em 22,3%, *pet* em 9,4% e *sepA* em 18,8%. Foi observada associação entre os genes *pic* (P<0,001) e *pet* (P=0,00029) às cepas de EAEC típica. O gene *sepA,* foi encontrado em 10 (9,2%) cepas típicas e 16 (18,8%) cepas atípicas, estando associado às cepas de EAEC atípica (P=0,043).

Figura 8 – Frequência de 12 genes que codificam SPATEs em 108 EAEC típicas e 85 EAEC atípicas.



Porcentagem de cepas carreadores dos genes *pic, sat, pet, espI, sepA, sigA, eatA, vat, espP, tsh, epeA* e *espC.* EAEC típicas (preto) e EAEC atípicas (cinza). *P<0,001; **P=0,043; ***P=0,00029.

Na análise de combinação gênica apresentada por cada cepa (**Tabela 6**), foi verificado que em EAEC típica a presença simultânea de *pet* e *pic* foi a combinação mais frequente (perfil 14). Por outro lado, nas cepas de EAEC atípica a presença de mais de um gene em cada cepa foi pouco frequente, não

permitindo a correlação do perfil genético nessa subcategoria. Também foi observada a presença de somente um dos genes pesquisados. Os genes *pic* (perfil 26) e *sat* (perfil 27) foram os mais frequentes.

Tabela 6 – Perfis de combinações de genes que codificam SPATES apresentados pelas 193 cepas de EAEC.

Perfil	Combinação gênica	Nº (%) de cepas		
		EAEC típica	EAEC atípica	Total
1	*espI pic sat sepA*	3 (2,8)	1 (1,2)	4 (2,1)
2	*espI pet pic sepA*	1 (0,9)	0	1 (0,5)
3	*eatA espI pic sigA*	1 (0,9)	0	1 (0,5)
4	*pet pic sat sepA*	0	1 (1,2)	1 (0,5)
5	*espI pic sat*	6 (5,6)	2 (2,3)	8 (4,1)
6	*pet pic sat*	2 (1,8)	0	2 (1,0)
7	*pic sat sepA*	1 (0,9)	1 (1,2)	2 (1,0)
8	*pet pic sepA*	1 (0,9)	1 (1,2)	2 (1,0)
9	*espI pet pic*	1 (0,9)	0	1 (0,5)
10	*pet sat sigA*	1 (0,9)	0	1 (0,5)
11	*eatA espI sat*	0	1 (1,2)	1 (0,5)
12	*eatA espI sepA*	0	1 (1,2)	1 (0,5)
13	*espP pic sigA*	1 (0,9)	0	1 (0,5)
14	*pet pic*	19 (17,6)	3 (3,5)	22 (11,4)
15	*pic sat*	10 (9,2)	0 (0,0)	10 (5,2)
16	*espI pic*	9 (8,3)	1 (1,2)	10 (5,2)
17	*pic sepA*	4 (3,7)	5 (5,6)	9 (4,7)
18	*pic sigA*	3 (2,8)	0	3 (1,6)
19	*espI pet*	2 (1,8)	1 (1,2)	3 (1,6)
20	*eatA sat*	2 (1,8)	1 (1,2)	3 (1,6)
21	*espI sat*	0	2 (2,3)	2 (1,0)
22	*pet sepA*	0	1 (1,2)	1 (0,5)
23	*espI sepA*	0	1 (1,2)	1 (0,5)
24	*eatA tsh*	0	1 (1,2)	1 (0,5)
25	*sat vat*	0	1 (1,2)	1 (0,5)
26	*pic*	10 (9,2)	4 (4,7)	14 (7,3)
27	*sat*	4 (3,7)	8 (9,4)	12 (6,2)
28	*espI*	3 (2,8)	5 (5,6)	8 (4,1)
29	*sepA*	0	4 (4,7)	4 (2,1)
30	*pet*	2 (1,8)	1 (1,2)	3 (1,6)
31	*sigA*	1 (0,9)	1 (1,2)	2 (1,0)
32	*eatA*	0	1 (1,2)	1 (0,5)
33	*vat*	0	1 (1,2)	1 (0,5)
34	None	21 (19,4)	35 (41,2)	56 (29,0)
	Total	**108**	**85**	**193**

4.2 Relação entre os filogrupos de *E. coli* e a presença dos genes que codificam SPATEs

As 193 cepas de EAEC foram classificadas dentro dos filogrupos de *E. coli* conhecidos. O filogrupo A foi o mais frequente, sendo 78 (40,41%) cepas classificadas nesse filogrupo, seguido do filogrupo B1 com um total de 45 (23,31%) cepas. Na **Tabela 7** estão listados os filogrupos encontrados com as respectivas prevalências.

Nenhuma das cepas estudadas foi classificada no filogrupo C. Não houve diferença na distribuição nos filogrupos entre as cepas de EAEC típicas e atípicas, e ainda nenhuma relação foi estabelecida entre a distribuição dos genes que codificam SPATEs e os filogrupos de *E. coli.*

Tabela 7 – Filogrupos das 193 cepas de EAEC.

Filogrupos	N° (%) de cepas		
	EAEC típica (n=108)	EAEC atípica (n=85)	Total (n=193)
A	41 (37,96%)	37 (43,52%)	78 (40,41%)
B1	22 (20,37%)	23 (27,05%)	45 (23,31%)
B2	9 (8,33%)	11 (12,94%)	20 (10,36%)
D	10 (9,25%)	3 (3,52%)	13 (6,73%)
E	11 (10,18%)	6 (7,05%)	17 (8,80%)
F	2 (1,85%)	1 (1,17%)	3 (1,55%)
Indefinido	9 (8,33%)	6 (7,05%)	15 (7,77%)

4.3 Análise da presença do gene *sepA* na coleção de EAEC

Conforme descrito acima, o gene *sepA* foi detectado em 26 (13,5%) cepas dentre as cepas da coleção de EAEC, sendo 10 (9,2%) EAEC típicas e 16 (18,8%) atípicas. Dentre as 26 cepas *sepA*$^+$ também foi observada a presença de outros genes que codificam SPATEs, tais como *sat*, *pet*, *espC*, *pic* e *espI*. Essas combinações gênicas estão listadas na **Tabela 8**.

Foram observados 10 perfis de combinação gênica, sendo que o perfil 7 *sepA/pic* foi o mais frequente (**Tabela 8**).

Tabela 8 – Perfil genético das 26 cepas de EAEC que apresentam o gene *sepA.*

Perfil	Combinação gênica	EAEC típica (n=10) Nº. (%) de cepas	EAEC atípica (n=16) Nº. (%) de cepas	Total (n=26) Nº. (%) de cepas
1	*sepA espI pic sat*	3 (30%)	1 (6,3%)	4 (65%)
2	*sepA espI pet pic*	1 (10%)	0	1 (3,9%)
3	*sepA pet pic sat*	0	1 (6,3%)	1 (3,9%)
4	*sepA pic sat*	1 (10%)	1 (6,3%)	2 (7,7%)
5	*sepA pet pic*	1 (10%)	0	1 (3,9%)
6	*sepA pic pet*	0	1 (6,3%)	1 (3,9%)
7	*sepA pic*	4 (40%)	5 (31,25%)	9 (34,6%)
8	*sepA espI*	0	2 (12,5%)	2 (7,7%)
9	*sepA pet*	0	1 (6,3%)	1 (3,9%)
10	*sepA*	0	4 (25%)	4 (15,4%)

Os dados obtidos quanto às análises de frequência dos genes de SPATEs foram publicados no artigo apresentado no Apêndice A (Andrade et al., 2017).

A partir desses resultados, duas cepas de EAEC típicas (BA198 e BA732), que apresentaram o perfil 7 de combinação gênica, e quatro cepas de EAEC atípicas (BA114, BA259, BA328 e BA363), que apresentaram o perfil 10, foram selecionadas para a realização das próximas etapas do estudo.

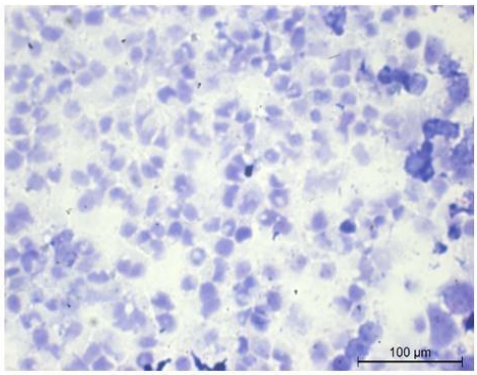
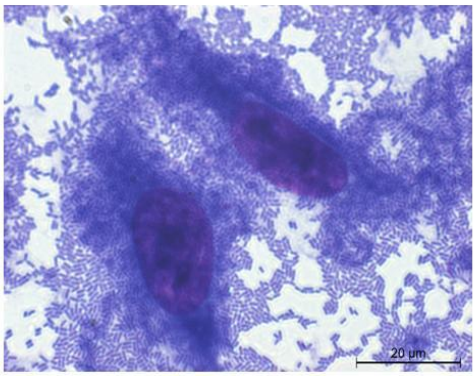
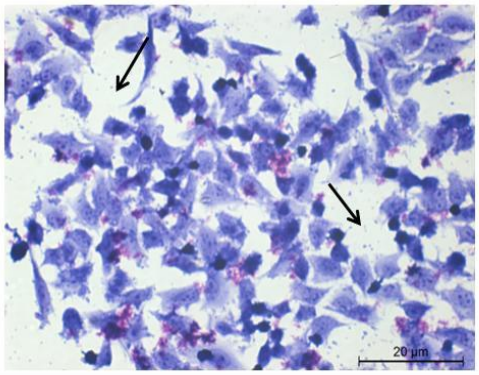
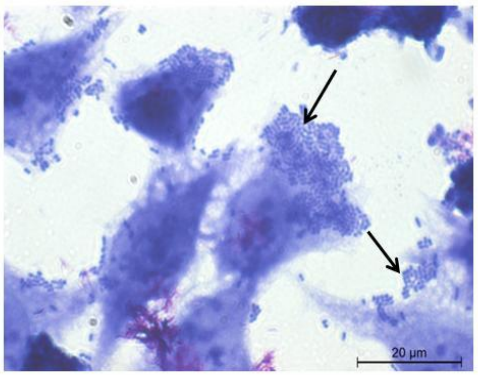
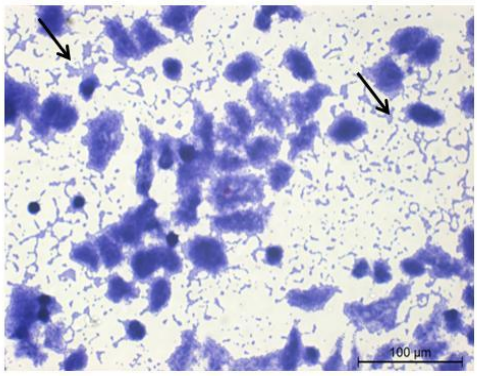
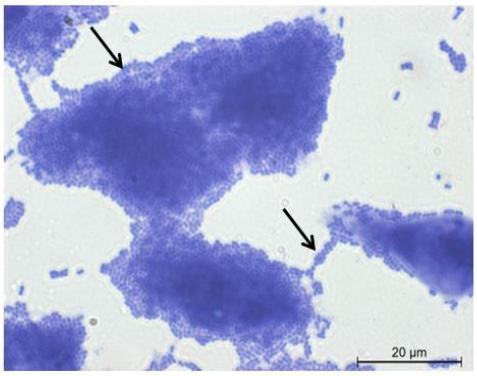
4.4 Caracterização fenotípica e genotípica das cepas carreadoras de *sepA*

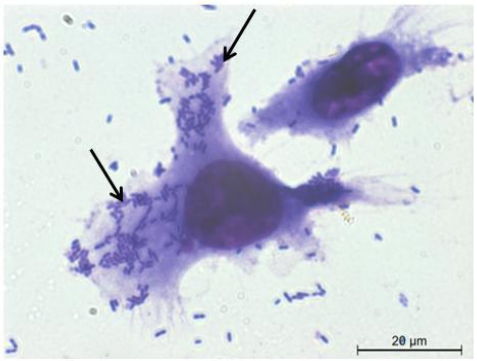
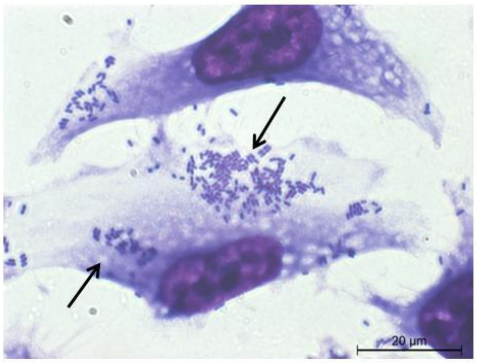
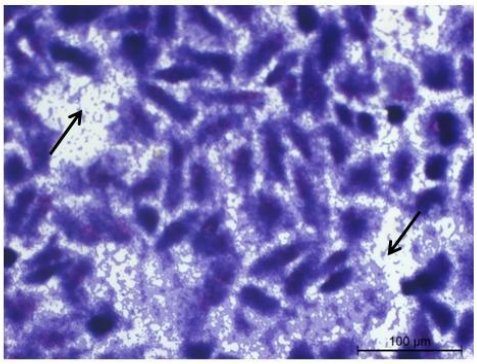
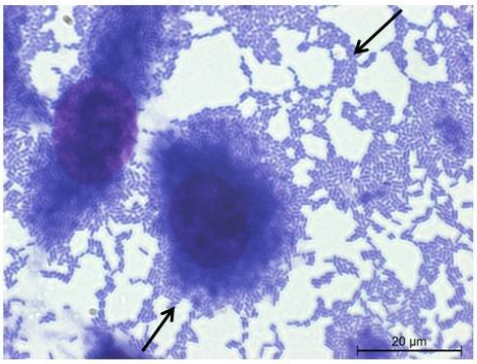
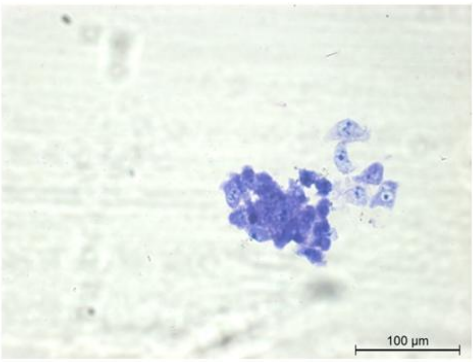
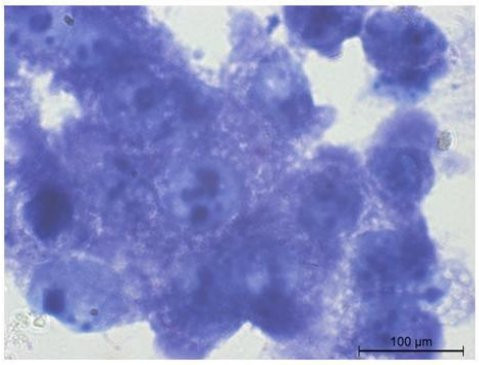
4.4.1 Análise do padrão de adesão

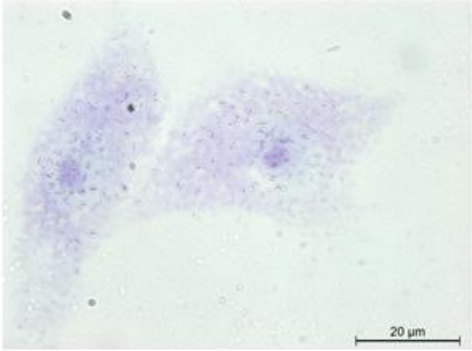
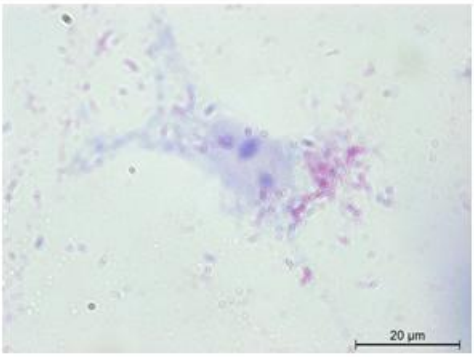
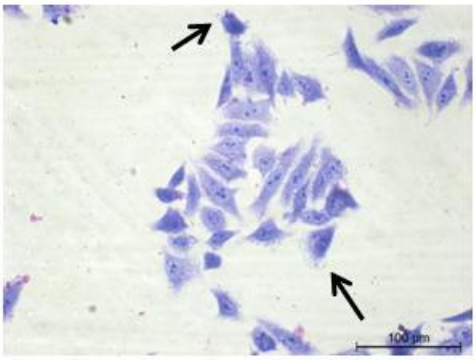
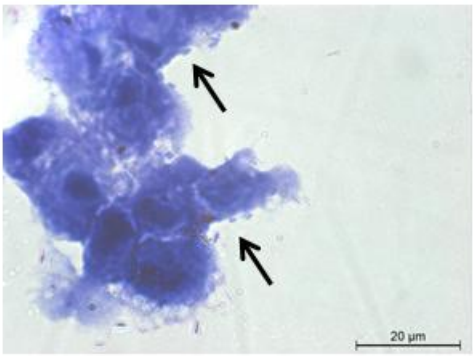
As cepas de EAEC típicas BA198 e BA732 apresentaram o padrão de adesão agregativo melhor evidenciado no ensaio de 6 h de incubação

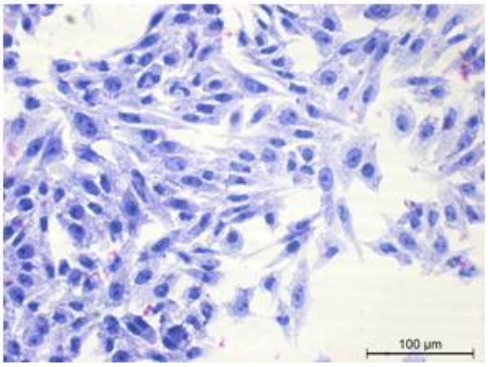
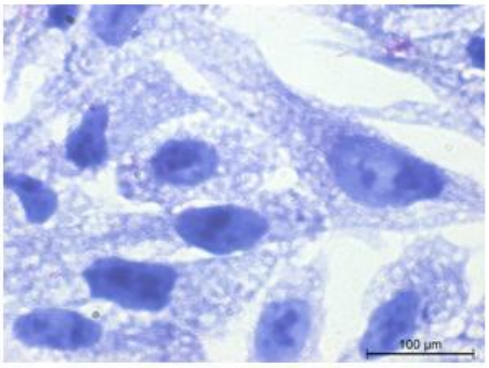
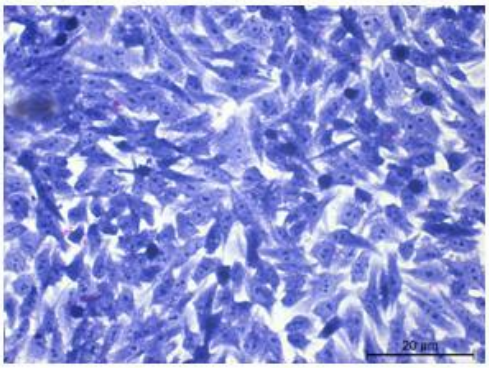
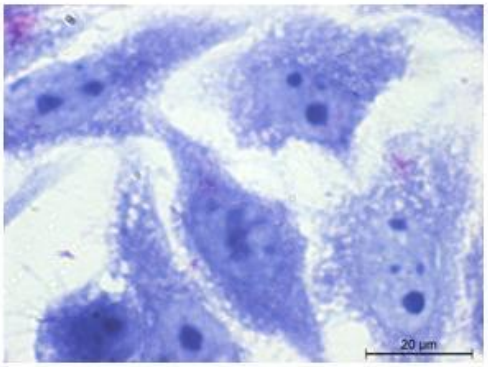
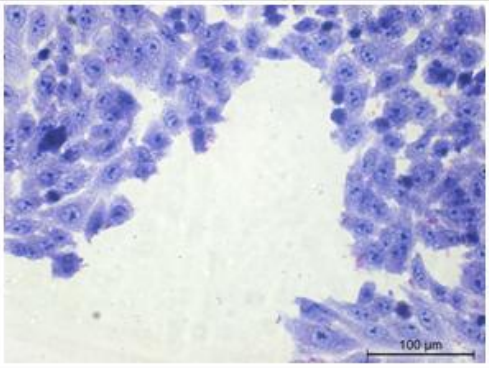
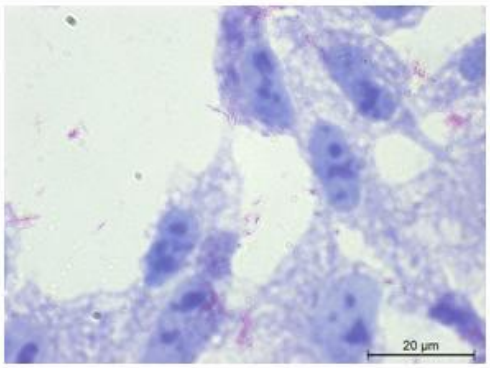
bactérias-células epiteliais. A cepa BA198 apresentou aderência preferencial às células epiteliais e a BA732 aderiu tanto à lamínula como nas células epiteliais (**Figura 8**). As cepas de EAEC atípicas BA249 e BA328 apresentaram ação citodestacantes nos ensaios, e as cepas BA114 e BA363 não aderiram às células epiteliais (**Figura 9**).

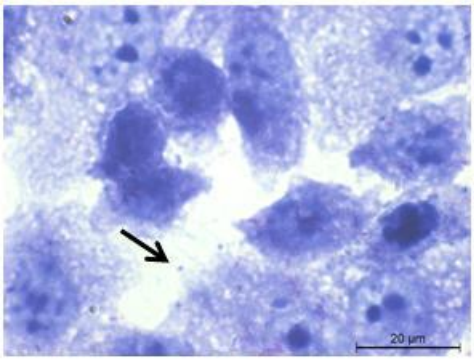
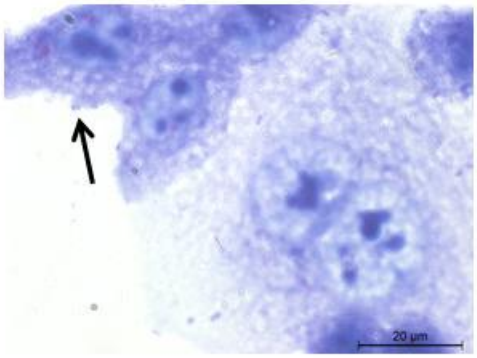
Figura 9 – Ensaios de adesão das cepas de EAEC típica e atípicas em células HEp-2.

Células	Controle (3 h) – Aumento 200x	042 (3 h) – Aumento 1000x
HEp-2		
	BA198 (3 h) – Aumento 200x	BA198 (3 h) – Aumento 1000x
HEp-2		
	BA198 (6 h) – Aumento 200x	BA198 (6 h) – Aumento 1000x
		

Células	BA732 (3 h) – Aumento 1000x	BA732 (3 h) – Aumento 1000x
HeLa		
	BA732 (6 h) – Aumento 200x	BA732 (6 h) – Aumento 1000x
		
	BA249 (3 h) – Aumento 200x	BA249 (3 h) – Aumento 1000x
HEp-2		

Células	BA249 (6 h) – Aumento 1000x	
HEp-2		
	BA328 (3 h) – Aumento 1000x	
HEp-2		
	BA328 (6 h) – Aumento 200x	BA328 (6 h) – Aumento 1000x
		

Células	BA114 (3 h) – Aumento 200x	BA114 (3 h) – Aumento 1000x
HEp-2		
	BA114 (6 h) – Aumento 200x	BA114 (6 h) – Aumento 1000x
		
	BA363 (3 h) – Aumento 200x	BA363 (3 h) – Aumento 1000x
HEp-2		

Células	BA363 (6 h) – Aumento 200x	BA363 (6 h) – Aumento 1000x
HEp-2		

Ensaio de adesão: interação de células HEp-2 com as cepas BA114, BA198, BA249, BA328, BA363, BA732 e a cepa protótipo de EAEC 042 (controle positivo), durante 3 e 6 h de incubação. As células foram coradas com May-Grünwald/Giemsa e observadas em microscópio ótico comum sob aumentos de 200 e 1.000 vezes. As cepas BA198 e BA732 apresentaram o padrão de adesão agregativo; as cepas BA249 e BA328 tiveram ação citodestacante; e as cepas BA114 e BA363 não aderiram às células epiteliais testadas. As setas indicam a presença de bactérias.

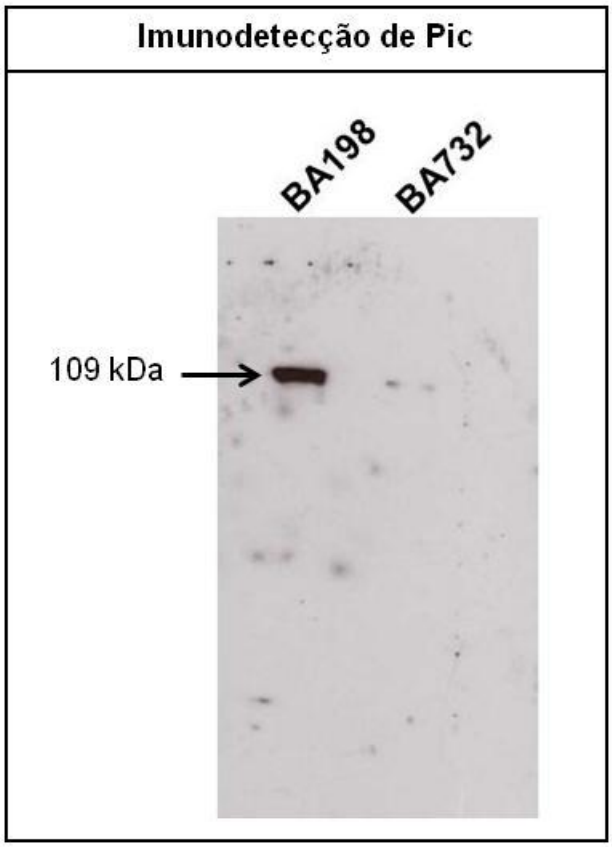
Por apresentarem padrão de adesão agregativo, considerado o padrão ouro para o diagnóstico de EAEC, e serem classificadas como EAEC típicas (*aggR*$^{+}$), as cepas de BA198 e BA732 foram selecionadas para a realização das próximas etapas do estudo.

4.4.2 Produção de Pic nas cepas BA198 e BA732

As cepas de EAEC típicas BA198 e BA732 foram selecionadas como potenciais cepas protótipo para a continuidade deste estudo. Entretanto, em ambas o gene *pic* também foi detectado (perfil 7, **Tabela 8**). Dessa forma o estudo prosseguiu na análise da produção de Pic nessas cepas, uma vez que a expressão de Pic poderia interferir nos ensaios de atividades biológicas de SepA, ambas proteínas autotransportadoras de classe 2.

Em ambas as cepas a produção de Pic foi detectada em sobrenadantes de culturas (**Figura 10**), indicando a necessidade da obtenção de um mutante no gene *pic.*

Figura 10 - Imunodetecção da proteína Pic nas cepas BA198 e BA732.



Os sobrenadantes de cultura das cepas BA198 e BA732 concentrados submetidos à análise eletroforética por SDS-PAGE (8%) e transferidos para uma membrana de nitrocelulose. A imunodetecção foi realizada com o soro anti-Pic (1:1000) e soro de cabra anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase (1:5000), seguido da revelação com o kit *ECL™ Western Blotting Analysis System* (GE Healthcare). A imagem corresponde ao filme de raios-X após exposição ao *immunoblotting* durante 5 min, seguida de revelação.

4.4.3 Perfil de resistência a antibióticos das cepas BA198 e BA732

Dentre os antibióticos testados a cepa BA198 apresentou resistência a canamicina e a cepa BA732 não apresentou resistência a nenhum dos antibióticos.

4.4.4 Determinação da sequência do gene sepA das cepas BA198 e BA732

O sequenciamento do gene *sepA*, utilizando a cepa *S. flexneri* 5a M90T como padrão de comparação, mostrou que as cepas BA198 e BA732 apresentam 97% de identidade com a cepa M90T (número de acesso no GenBank: Z48219.1). Foram sequenciados 4.291 pares de bases correspondendo ao gene *sepA* completo. O **Apêndice B** apresenta o alinhamento das sequências de nucleotídeos obtidas das três cepas.

Nas sequências de nucleotídeos das cepas BA198 e BA732 foram verificadas 6 deleções, quando comparadas com a sequência da cepa M90T. Na cepa BA732 há 19 alterações na sequência de nucleotídeos e na cepa BA198, além dessas 19 ocorrem outras 4 alterações, totalizando 23 alterações em comparação com a sequência da cepa M90T.

Nas sequências traduzidas para aminoácidos (**Apêndice C**) foram observadas 5 deleções que não geram códon de terminação em ambas as cepas de EAEC, em comparação com a sequência da proteína SepA de M90T. Além disso, na sequência de aminoácidos da cepa BA732 foram observadas 9 alterações e na sequência da cepa BA198 foram verificadas 11 alterações (**Tabela 9**), ainda em comparação com a sequência da cepa M90T.

Tabela 9 – Alterações de aminoácidos do gene SepA das cepas de EAEC comparadas com M90T.

Cepa	Localização	Alterações	Trocas de aminoácidos
BA732 e BA198	Domínio passageiro	7	D/N; S/A; N/S; H/R; N/K; R/W e E/A
	Domínio Translocador	2	A/D; A/V
BA198	Domínio passageiro	2	G/A e R/T

D = ácido aspártico; N = asparagina; S = serina; H = histidina; R = arginina; K = lisina; W = triptofano; E = ácido glutâmico; A = alanina; V = valina; G = glicina; T = treonina.

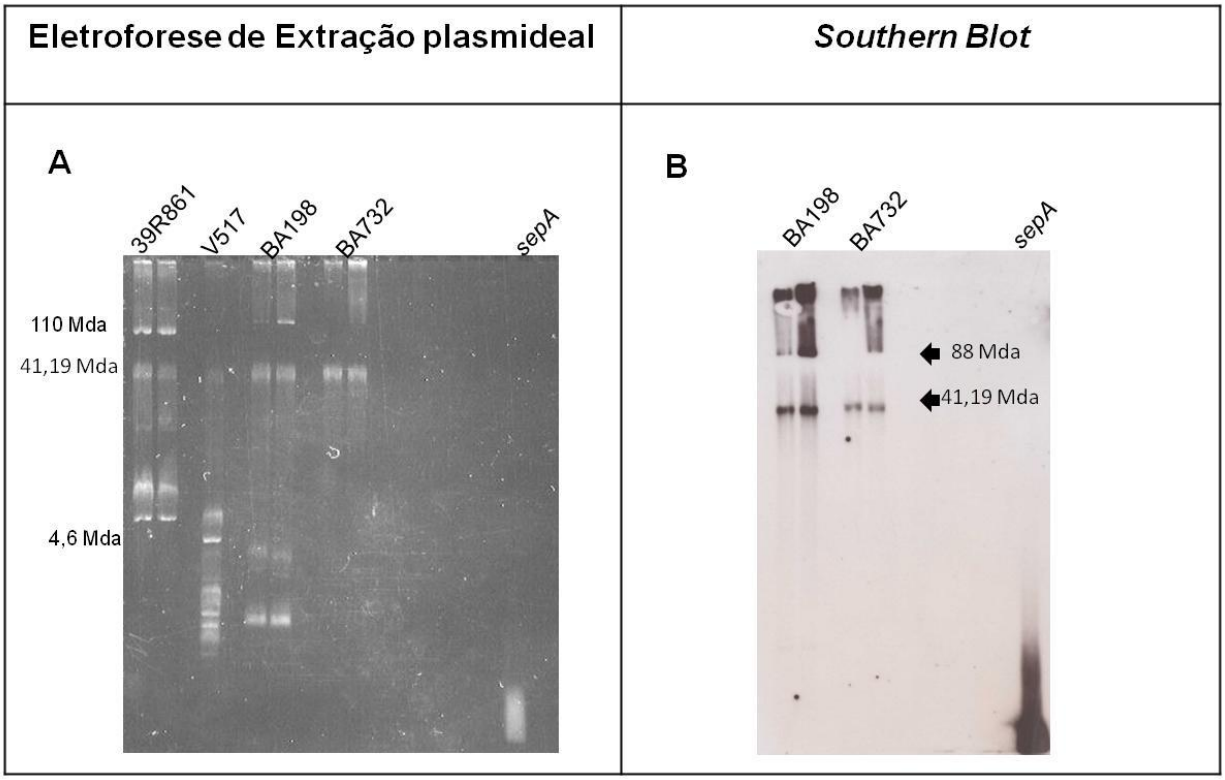
É importante salientar que a porção de serino protease nas sequências de aminoácidos das três cepas não apresentou alteração (**Apêndice C**). A alteração nessa porção da proteína levaria ao comprometimento da funcionalidade de SepA. Sendo assim, as alterações observadas não foram consideradas significativas.

4.4.5 Localização do gene sepA nas cepas BA198 e BA732

Na análise eletroforética da extração plasmideal foi verificado que a cepa BA198 apresenta 3 bandas plasmideais com os seguintes tamanhos aproximados: 2,8 MDa, 6 MDa e 88 MDa. Nesta análise, não foi detectada a presença de plasmídeos na cepa BA732 (**Figura 11**).

A extração plasmideal foi submetida a um *Southern Blot*, usando o gene *sepA* como sonda genética. Dessa forma, foi determinado que, assim como na cepa M90T, o gene *sepA* está presente em um plasmídeo na cepa BA198 de massa molecular de ~88 MDa. Com relação à cepa BA732 o gene *sepA* inicialmente foi detectado no conteúdo cromossômico (**Figura 11**).

Figura 11 – Extração plasmideal e *Southern Blotting para detecção de sepA nas* cepas BA198 e BA732.



Extração plasmideal e respectivo *Southern Blot,* utilizando a sonda genética *sepA*. **(A)** Perfil eletroforético em gel de agarose (0,8%) da extração plasmideal das cepas 39R861, V517, BA198 e BA732, realizado em duplicatas. A última canaleta corresponde ao amplicon do gene *sepA* a partir do DNA da cepa M90T (controle positivo). **(B)** Filme de raio-X exposto à membrana de *nylon* contendo o DNA transferido do gel de agarose apresentado em **(A),** após a hibridização com a sonda *sepA* e detecção. Reatividade com a sonda *sepA* na banda plasmideal de ~88 MDa na cepa BA198; na região correspondente ao DNA cromossômico de ~41,19 MDa da cepa BA732; e no amplicon *sepA* da cepa M90T. A porção cromossômica (~41,19 MDa) foi observada em todas as cepas.

4.5 Seleção da cepa protótipo de EAEC produtora de SepA

A cepa BA732 foi selecionada como protótipo de EAEC para dar continuidade ao presente estudo, uma vez que a cepa BA198 apresentou resistência à canamicina, o que dificultaria as etapas de mutagênese.

4.5.1 Sequenciamento do genoma completo da cepa BA732

As principais características do genoma da cepa BA732 foram analisadas e estão apresentadas na **Tabela 10**.

Tabela 10 - Principais características do genoma da cepa BA732.

Características avaliadas	**Cepa BA732**
Tamanho (pb)	5.085.903
Scaffolds	181
Genes	4830
N50[1]	244013
N75[2]	123303
L50[3]	7
L75[4]	14
Conteúdo G+C (%)	50,5

[1]Tamanho em pb na qual os *scaffolds* com este ou maior tamanho incluem metade do genoma.
[2]Tamanho em pb na qual os *scaffolds* com este ou maior tamanho incluem 75% do genoma.
[3]Número de *scaffolds* que são maiores ou iguais ao tamanho N50.
[4]Número de *scaffolds* que são maiores ou iguais ao tamanho N75.

As análises *in silico* mostraram que a cepa BA732 pertence ao sorotipo O17:H18 e alberga o gene de resistência ao antibiótico eritromicina (**Tabela 11**). Na **tabela 11** também estão listados os principais genes de virulência da cepa BA732, encontrados na sequência do genoma completo.

Tabela 11 - Sorotipo, genes de virulência e resistência a antimicrobianos identificados na cepa BA732.

Cepa	Sorotipo	Perfil de virulência	Perfil de resistência
BA732	017:H18	*aap, aggR, aatAPBCD, sepA, pic, aaiC, aaiA, aaiG, hlyE e* AAF-IV	*ereA*

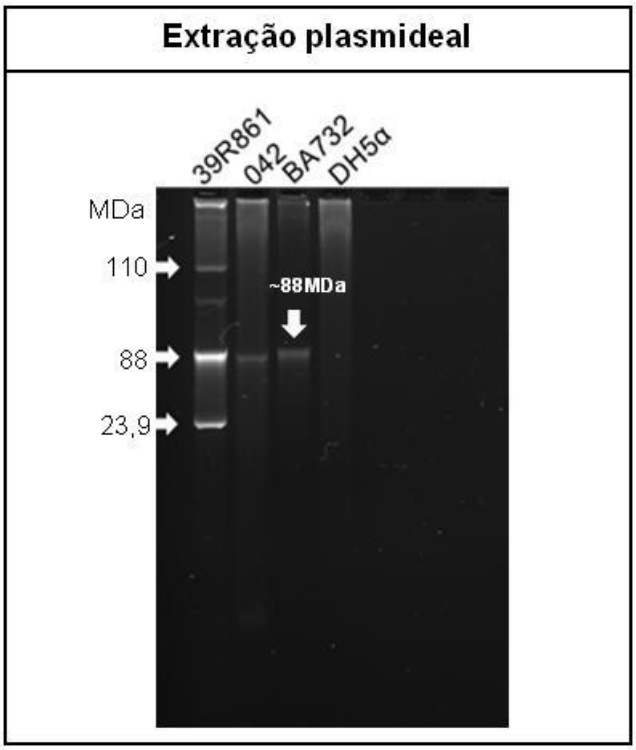
aap, codifica a proteína de superfície Dispersina; *aggR*, codifica o regulador global AggR; *aatPABCD*, codificam o sistema de secreção do tipo ABC; *sepA*, codifica a SPATE SepA; *pic*, codifica a SPATE Pic; *aaiACIG*, codificam proteínas do sistema de secreção do tipo VI; *hlyE*, codifica a enterohemolisina; *ereA*, eritromicina esterase que medeia a resistência à eritromicina.

4.5.2 Análise in silico da presença de plasmídeos na cepa BA732

A partir das análises *in silico* do genoma completo da cepa BA732 foi possível verificar a presença de características que evidenciavam a presença de pelo menos um plasmídeo, embora as primeiras análises de perfil plasmideal dessa cepa (**Figura 11**) tenham mostrado a ausência de plasmídeos. A sequência do gene *sepA* foi localizada inserida nesse plasmídeo, o qual pertence ao grupo de incompatibilidade IncFII e contém os seguintes genes de virulência: *aatAPBCD, sepA, aggR* e *aap*.

Sendo assim, uma nova análise do conteúdo plasmideal da cepa BA732 foi realizada, incluindo adaptações no protocolo de extração (item 3.4.2) que eliminam a porção correspondente ao cromossomo (**Figura 12**). Ao utilizar esse novo protocolo de extração plasmideal foi possível evidenciar um plasmídeo de ~88 MDa, massa molecular semelhante aos plasmídeos de virulência de EAEC denominados pAA.

Figura 12 – Perfil eletroforético da extração plasmideal da cepa BA732.



Perfil eletroforético em gel de agarose (0,8%) da extração plasmideal das cepas 39R861, 042, BA732 e *E. coli* DH5α. As cepas EAEC 042 e *E. coli* DH5α foram empregadas como controles da presença ou ausência de plasmídeos de alta massa molecular, respectivamente. A seta indica a presença de um plasmídeo de ~88 MDa.

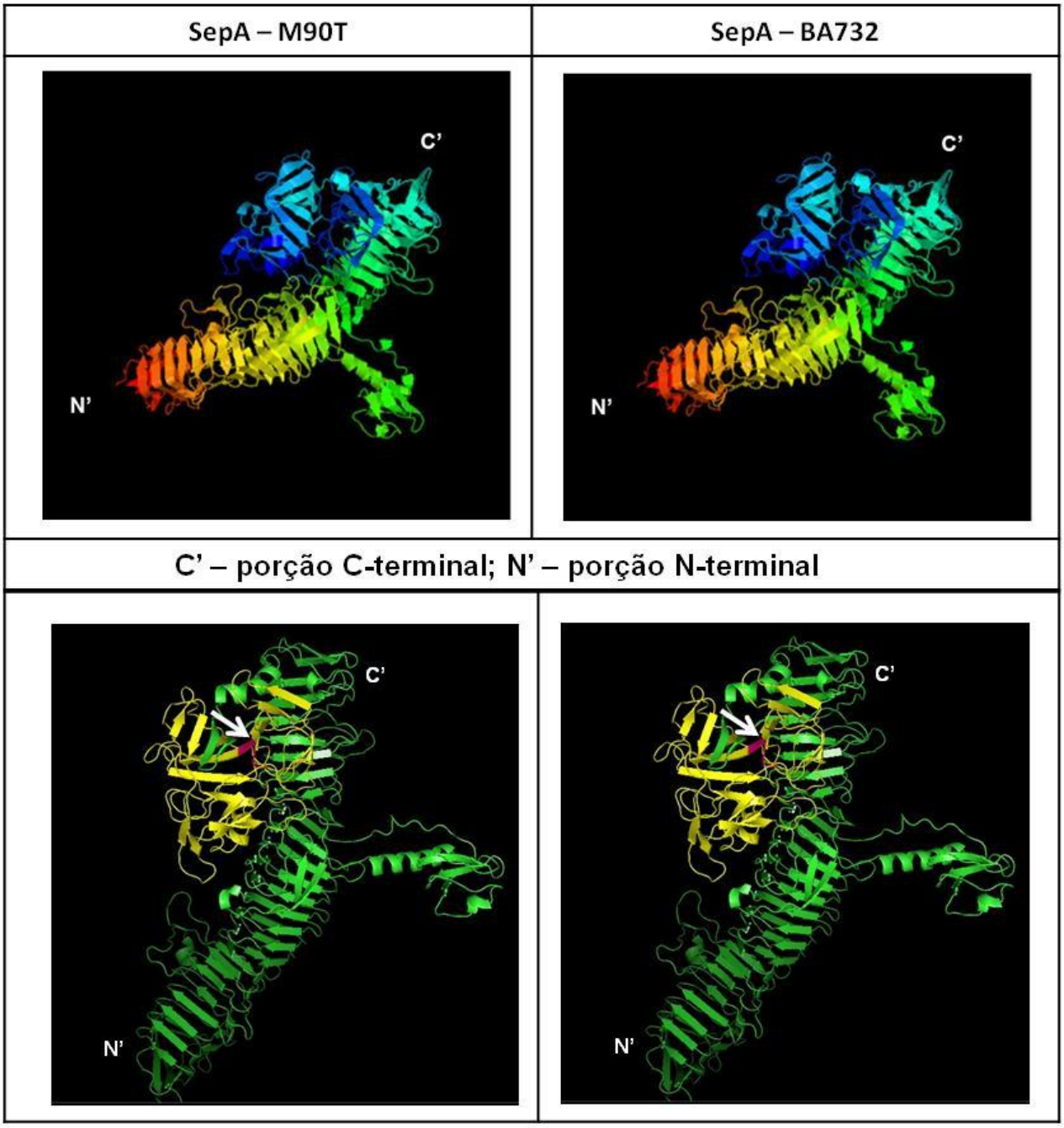
4.5.3 Comparação entre as estruturas tridimensionais preditas de SepA das cepas BA732 e M90T

Com os resultados obtidos no sequenciamento completo do gene *sepA* (item 4.7), onde foi verificado que há diferenças em alguns aminoácidos em SepA expressa por M90T e BA732, foi levantada a possibilidade de que a estrutura da proteína SepA de EAEC fosse diferente da proteína produzida por *S. flexneri*.

Para uma análise mais detalhada dessas alterações, foi realizada a predição da estrutura tridimensional da proteína SepA. Para isso a sequência de aminoácidos das proteínas produzidas pelas cepas BA732 e M90T foram analisadas por meio do banco de dados disponível em *Protein Homology/Analogy Recognition Engine V 2.0* (PHYRE2) gerando a predição da

estrutura tridimensional de SepA (**Figura 13**). Conforme se observa, as estruturas terciárias são muito semelhantes e o sítio de atividade de serino protease (His/Asp/Ser) da proteína expressa por M90T e BA732 é conservado.

Figura 13 - Predição da estrutura tridimensional de SepA das cepas BA732 e M90T.



Predição da estrutura tridimensional de SepA gerada pelo banco de dados disponível em *Protein Homology/Analogy Recognition Engine V 2.0* (PHYRE2), a partir das

sequências de aminoácidos das cepas BA732 e M90T traduzidas a partir das respectivas sequências de DNA. As setas indicam o sítio catalítico de serino protease das proteínas – His/Asp/Ser (porção marcada em rosa). As porções marcadas em amarelo indicam o subdomínio 1.

4.5.4 Obtenção de BA732 apresentando resistência ao ácido nalidíxico

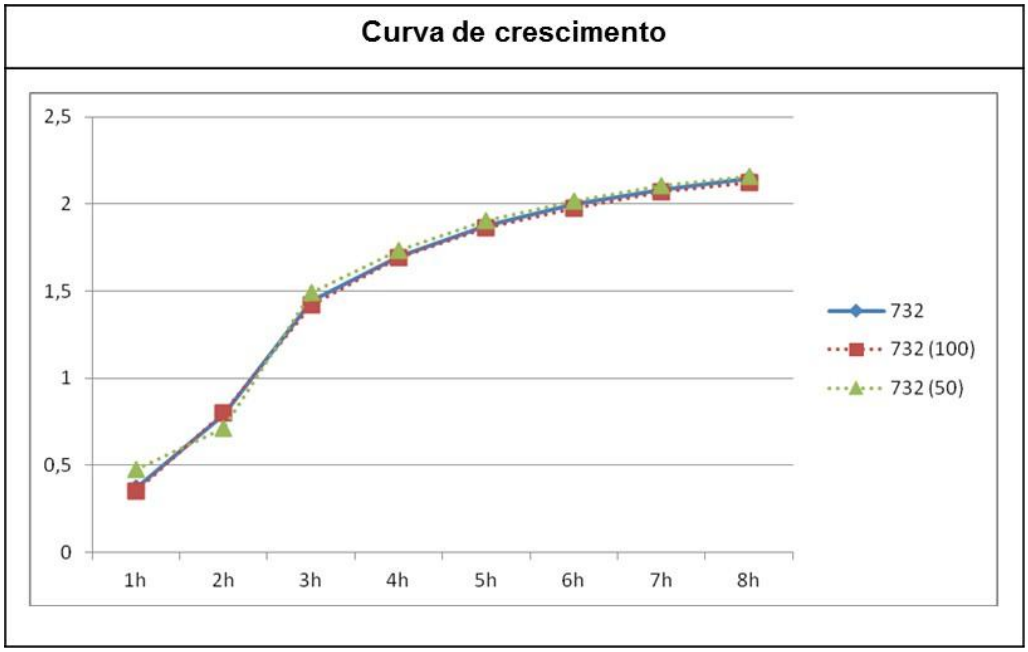
A cepa BA732 não apresenta resistência aos principais antibióticos utilizados como marca de resistência para ensaios de mutação. Embora a presença do gene de resistência à eritromicina tenha sido detectada nas análises *in silico*, essa etapa de sequenciamento do genoma completo da cepa BA732 ocorreu posteriormente aos ensaios de mutagênese. Como havia a necessidade da obtenção de um mutante em *pic*, era necessário que a cepa BA732 apresentasse uma marca de resistência. Dessa forma, foi realizada a seleção de mutação espontânea ao ácido nalidíxico (NAL) a partir da cepa BA732. Foram obtidos dois mutantes espontâneos resistentes a NAL que foram denominados de mut50NAL e mut100NAL.

4.5.4.1 Características fenotípicas e genotípicas dos mutantes espontâneos NAL

Algumas características fenotípicas e genotípicas foram testadas após a obtenção dos mutantes espontâneos resistentes ao NAL em comparação com a cepa selvagem (BA732), a fim de verificar efeitos deletérios decorrentes da mutação. Para isso foram realizados os seguintes ensaios: análise da curva de crescimento, perfil bioquímico e PCR para detecção dos genes *aagR, sepA, pic* e *aatA.*

Os mutantes mut100NAL e mut50NAL não apresentaram alteração no padrão de crescimento *in vitro*, quando comparados com a cepa BA732 (**Figura 14**).

Figura 14 - Curva de crescimento em caldo LB da cepa BA732 e seus mutantes resistentes ao ácido nalidíxico (mut100NAL e mut50NAL).



O gráfico representa a curva de crescimento das cepas BA732 (barra azul), mut100NAL (tracejado vermelho) e mut50NAL (tracejado verde) em caldo LB cultivado sob agitação de 200 rpm a 37°C, determinada pela leitura da densidade ótica em comprimento de onda de 600 nm. No eixo y estão expressos os valores em densidade óptica (DO) e no eixo x o tempo em horas.

Os mutantes mut100NAL e mut50NAL foram também analisados quanto ao perfil bioquímico de identificação presuntiva de *E. coli*, com auxílio dos meios de identificação EPM, MILi e Citrato. Ambos os mutantes mantiveram as mesmas características bioquímicas da cepa BA732. Finalizando, a presença dos genes *aggR, sepA, aatA* e *pic* foi confirmada por meio de PCR nos mutantes mut50NAL e mut100NAL. Sendo assim, a mutação espontânea não afetou características fenotípicas e genotípicas relevantes.

Após a confirmação de que a mutação espontânea não gerou nenhuma outra alteração na bactéria mutante resistente a NAL, a cepa mut100NAL foi escolhida para a posterior obtenção de um mutante em *pic,* utilizando a técnica de mutagênese por recombinação homóloga com o vetor suicida pJP5603.

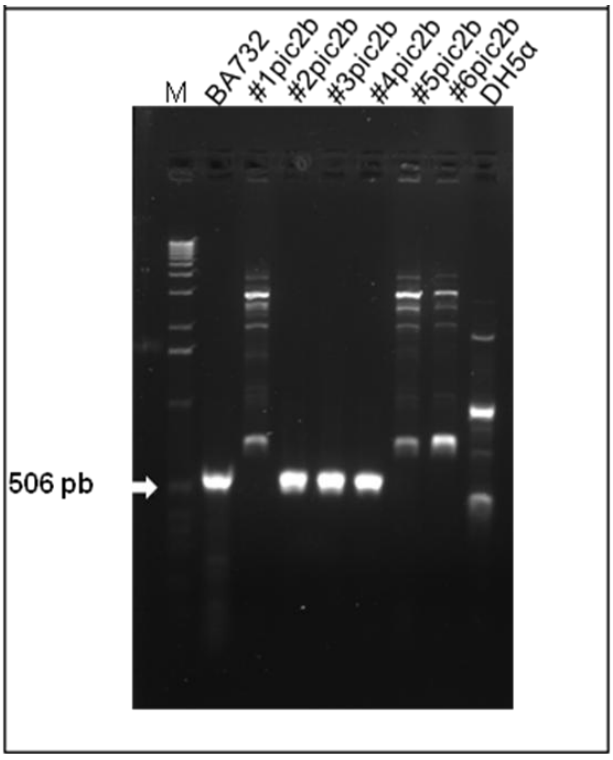
4.6 Obtenção do mutante isogênico em *pic* utilizando o vetor suicida pJP5603

A técnica de mutagênese utilizada para inativar o gene *pic* é baseada na recombinação homóloga entre o gene de interesse e um fragmento interno do mesmo, clonado no vetor suicida pJP5603 (PENFOLD; PEMBERTON, 1992).

A clonagem do fragmento interno de *pic* (506 pb) foi inicialmente realizada no vetor pGEM-T *Easy*, para a obtenção do inserto de pic2b contendo os sítios de restrição para EcoRI nas suas extremidades. Para isso, o fragmento interno pic2b foi amplificado por PCR. Após a ligação do inserto pic2b com o vetor pGEM-T *Easy*, células competentes de *E. coli* DH5α foram transformadas com a construção e os transformantes selecionados em ágar LB contendo ampicilina.

Foram obtidos 6 clones na transformação da ligação entre pGEMT *Easy* e pic2b, sendo que o correto inserto foi detectado em três, os quais foram denominados de #2pic2b, #3pic2b e #4pic2b (**Figura 15**).

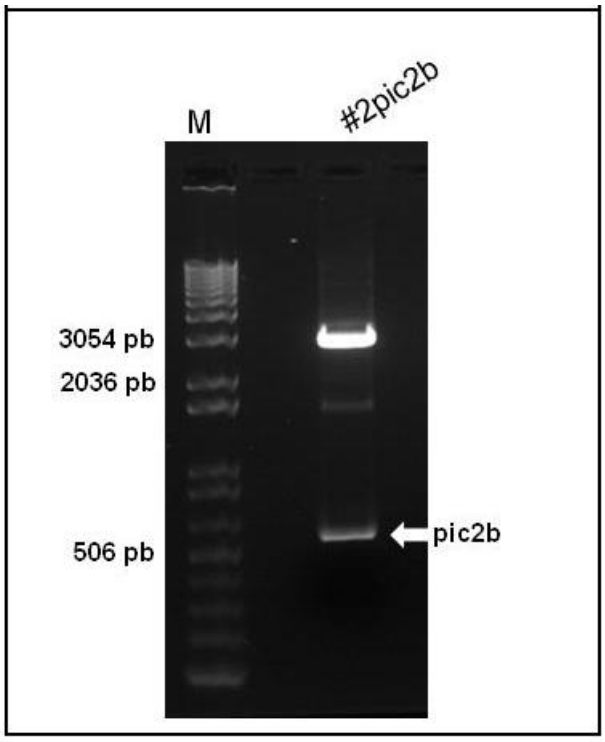
Figura 15 – PCR para detecção do fragmento gene pic2b nos transformantes selecionados.



Perfil eletroforético em gel de agarose (1%) dos produtos de PCR para a detecção do fragmento *pic2b.* A cepa BA732 foi utilizada como controle positivo e a cepa *E. coli* DH5α como controle negativo. Somente os clones #2pic2b, #3pic2b e #4pic2b apresentaram positividade para o fragmento pic2b. A seta indica o tamanho correto do fragmento amplificado pic2b (506 pb).

Após a confirmação da presença do fragmento pic2b em três dos clones selecionados, o clone #2pic2b foi selecionado para prosseguir com a subclonagem em pJP5603. O plasmídeo extraído desse clone foi submetido à digestão com a enzima de restrição *Eco*RI para liberação do fragmento de pic2b contendo os sítios para *Eco*RI (**Figura 16**). Esse fragmento foi utilizado na ligação com o vetor suicida pJP5603.

Figura 16 – Perfil de restrição do plasmídeo do clone #2pic2b com EcoRI.



Perfil eletroforético em gel de agarose (1%) da digestão do plasmídeo do clone #2pic2b com a enzima de restrição EcoRI indicando a correta liberação do inserto *pic2b*. A seta indica o tamanho correto do fragmento amplificado pic2b (506 pb).

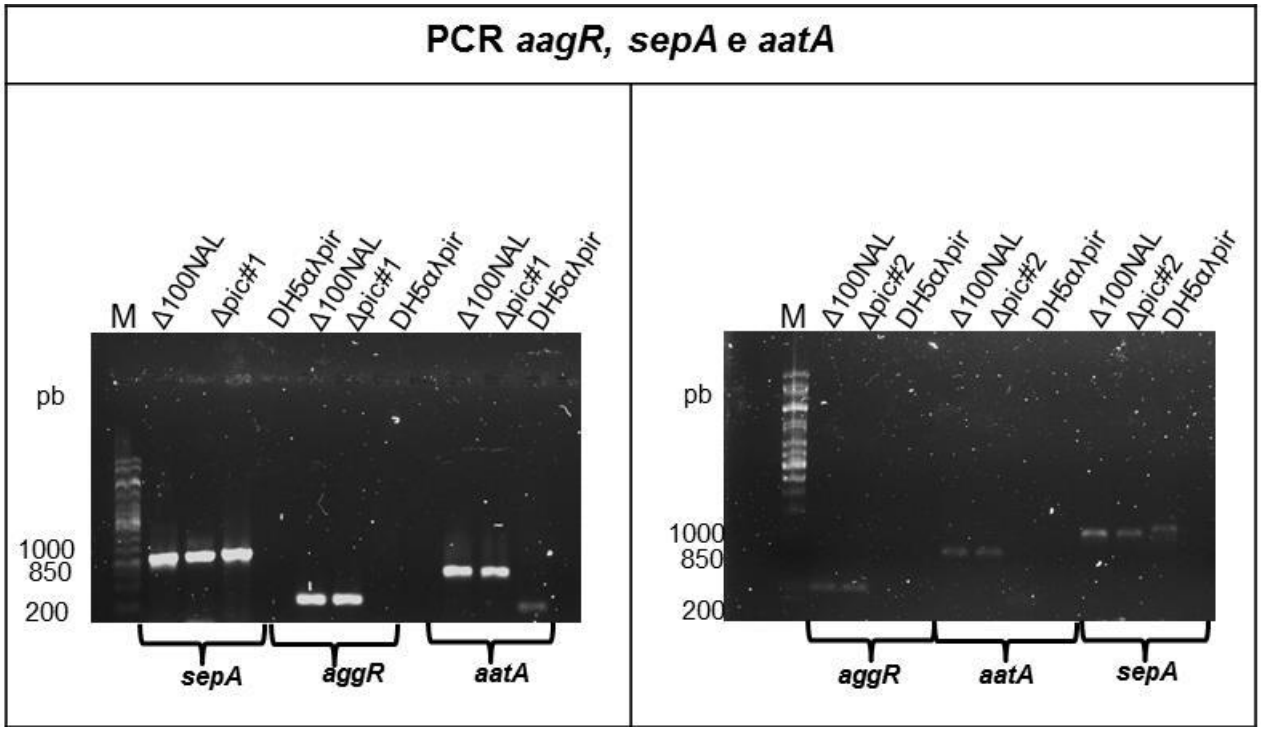
Após a ligação do inserto pic2b(EcoRI) com o vetor pJP5603, células competentes de *E. coli* DH5αλpir foram transformadas com a construção e os transformantes selecionados em ágar LB contendo canamicina. Dez transformantes foram selecionados e confirmados quanto à correta clonagem com auxílio da PCR para detecção do inserto pic2b.

Em seguida, um desses transformantes foi selecionado para a conjugação com a cepa BA732 resistente ao ácido nalidíxico (mut100NAL). Os transconjugantes foram selecionados em placas de ágar LB contendo ácido nalidíxico e canamicina. Dessa conjugação foram selecionados dois transconjugantes, denominados BA732::pic#1 e BA732::pic#2, os quais foram submetidos a ensaios fenotípicos e genotípicos para confirmar a mutação em *pic.*

Ambos os transconjugantes foram analisados quanto ao perfil bioquímico de identificação presuntiva de *E. coli*, com auxílio dos meios de identificação EPM, MILi e Citrato, mostrando que ambos mantiveram as mesmas características bioquímicas da cepa BA732.

Em seguida, a presença de genes de virulência presentes na cepa selvagem BA732 foi verificada nos transconjugantes por PCR. Ambos apresentaram resultados positivos para os genes *aggR, aatA e sepA* (**Figura 17**), confirmando que a mutação realizada não alterou nenhum dos genes importantes para o estudo.

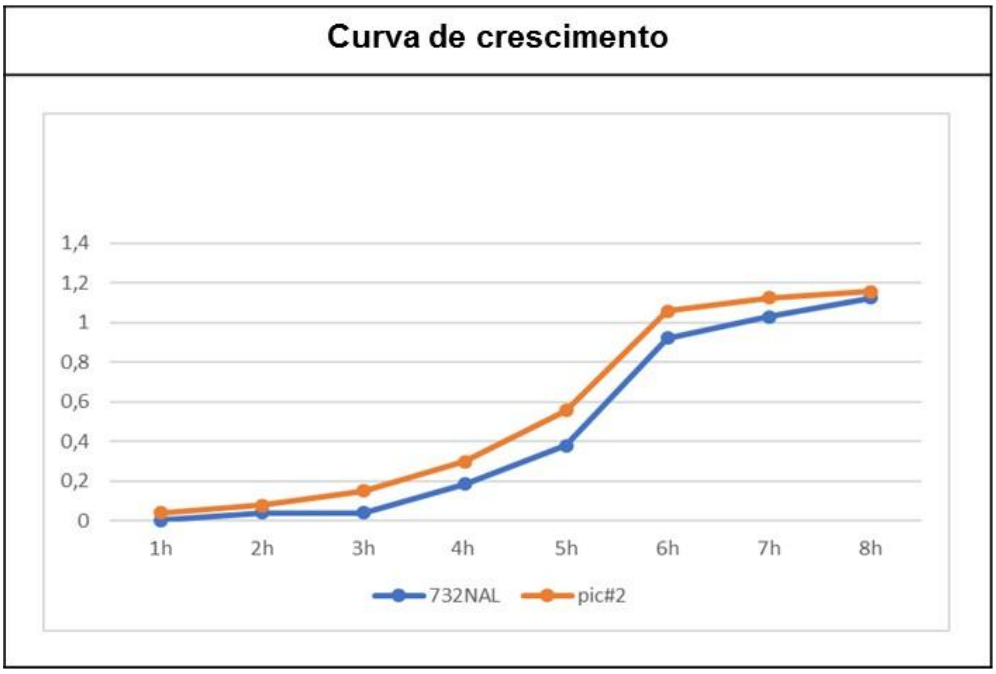
Figura 17 – Detecção dos genes *aggR, aatA* e *sepA* nos transconjugantes BA732*::pic*#1 e BA732*::pic*#2.



Perfil eletroforético em gel de agarose (1%) dos produtos de PCR para a detecção dos genes *sepA*, *aggR* e *aatA* nos transconjugantes BA732::pic#1 e BA732::pic#2. A cepa mut100NAL foi utilizada como controle positivo e a cepa *E. coli* DH5α como controle negativo. Os genes *sepA*, *aggR* e *aatA* foram amplificados nos dois transconjugantes avaliados. As setas indicam os tamanhos corretos dos fragmentos amplificados: *sepA* (794 pb), *aggR* (346 pb) e *aatA* (630 pb).

O mutante ::pic#2 foi então selecionado para a realização dos demais ensaios de confirmação da mutação em *pic*. O mutante ::pic#2 passou a ser chamado de BA732::pic somente. Esse mutante foi então analisado quanto a sua curva de crescimento. Conforme se observa na **Figura 18**, o mutante BA732::pic não apresentou alteração no padrão de crescimento *in vitro*, quando comparados com a cepa mut100NAL.

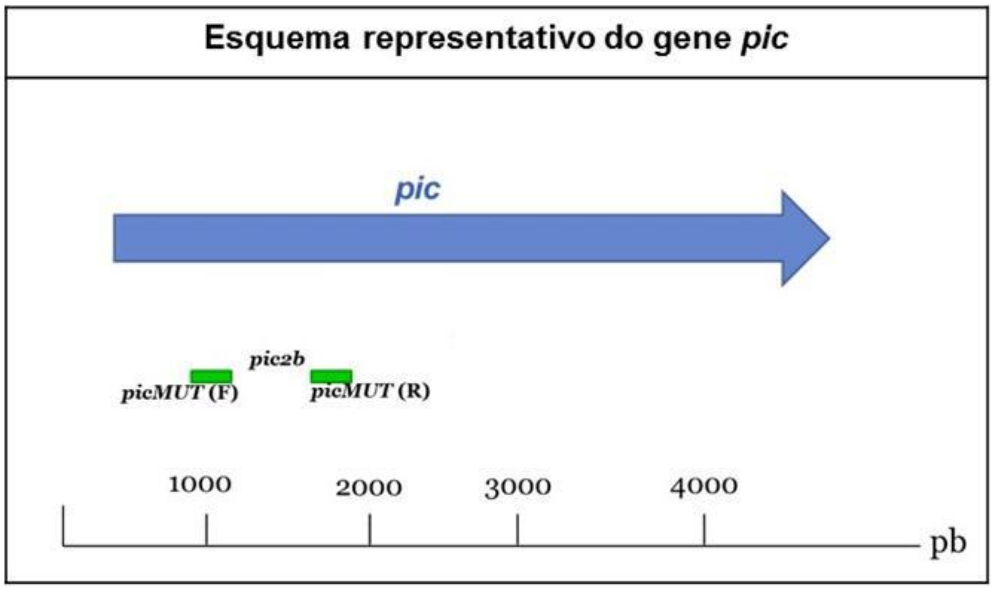
Figura 18 - Curva de crescimento em caldo LB da cepa mut100NAL e seu mutante isogênico BA732::pic.



O gráfico representa a curva de crescimento das cepas mut100NAL (traço azul) e BA732::pic (traço laranja) em caldo LB cultivado sob agitação de 200 rpm a 37°C, determinada através da leitura da densidade ótica em comprimento de onda de 600 nm. No eixo y estão expressos os valores em densidade óptica (DO) e no eixo x o tempo em horas.

Em seguida, a região correspondente à mutação em *pic* foi analisada por sequenciamento de nucleotídeos, usando o DNA do mutante BA732::pic como molde e os iniciadores *pic*MUT(F) e *pic*MUT(R), com a finalidade de obter um fragmento mais próximo da porção dos iniciadores *pic2b* no gene *pic* (**Figura 19**).

Figura 19 – Localização dos iniciadores para sequenciamento da região mutagenizada em BA732::pic.

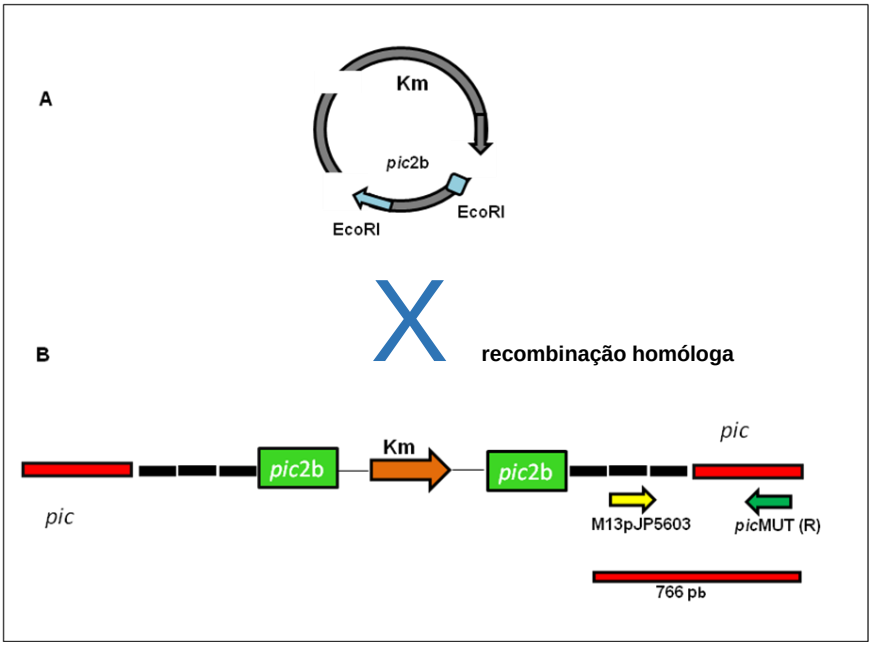


Esquema representativo do gene *pic* e a localização dos iniciadores para o sequenciamento. O iniciador *pic*MUT(F) está localizado 89 pb *upstream* ao fragmento pic2b. O iniciador *pic*MUT(R) (verde) está localizado 85 pb *downstream* ao fragmento *pic2b*.

Após otimização da PCR, o iniciador *pic*MUT (*reverse*) foi usado em conjunto com o iniciador M13pJP5603 (*forward*), que anela na região correspondente ao bacteriófago M13 contida no vetor pJP5603. Com essa combinação foi possível obter um fragmento amplificado de 766 pb, o qual foi utilizado no sequenciamento com esses mesmos iniciadores. A amplificação de tal fragmento só seria possível no caso da inserção do plasmídeo pJP5603 no genoma da cepa selvagem, conforme apresentado na **Figura 20**.

As sequências obtidas com os iniciadores M13pJP5603(F) e *pic*MUT(R) foram analisadas por BLAST mostrando identidade de 96% com o gene *pic* da cepa protótipo de EAEC 042 (N° de acesso no GenBank: FN 554766.1) e com a sequência do percursor da proteína Pic (N° de acesso no GenBank: AF097644.1).

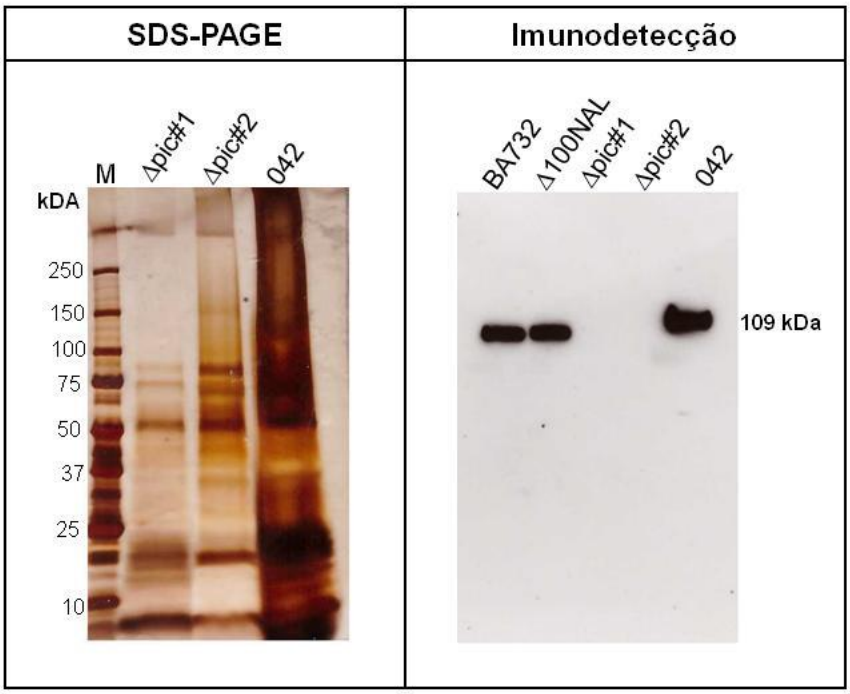
Figura 20 – Esquema de inserção de pJP5603(*pic2b*) no mutante BA732::pic.



Esquema da mutação apolar no gene *pic* da cepa BA732, baseado na recombinação homóloga entre o vetor pJP5603 contendo o inserto *pic2b* e o genoma da cepa BA732. (**A**) Vetor pJP5603 com o fragmento *pic*2b clonado no sítio de EcoRI (azul) do Sítio Múltiplo de Clonagem; Km, cassete de resistência à canamicina; (**B**) Esquema linear da inserção de pJP5603(*pic2b*) no gene *pic* da cepa BA732. O gene *pic* está representado pelas linhas vermelhas, *pic2b* pelos quadrados verdes, o cassete de resistência à canamincina (Km) pela seta laranja, e as sequências do vetor suicida pJP5603 pelas linhas pretas. Houve a amplificação de um fragmento de 766 pb (retângulo vermelho) após a PCR utilizando os iniciadores M13pJP5603 (seta amarela) e picMUT (seta verde). Foi possível confirmar a correta mutação, pois esse amplicon correspondeu à junção do vetor pJP5603 e a sequência do gene *pic* da cepa selvagem.

Por fim, a principal comprovação da mutação em *pic* foi obtida com a verificação da perda da expressão de Pic no mutante BA732::pic, em um ensaio de *immunoblotting*. Conforme apresentado na **Figura 21**, os dois clones mutantes ::pic#1 e ::pic#2 (BA732::pic) deixaram de expressar a proteína.

Figura 21 – Imunodetecção de Pic nos mutantes ::pic#1 e ::pic#2 (BA732::pic).



Os sobrenadantes de cultura concentrados dos mutantes ::pic#1 e::pic#2 (BA732::pic) e da cepa EAEC 042 foram submetidos à análise eletroforética por SDS-PAGE (gradiente de 4 a 20%) e transferidos para uma membrana de nitrocelulose. A imunodetecção foi realizada com o soro anti-Pic (1:1000) e soro de cabra anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase (1:5000), seguido da revelação com o kit *ECL™ Western Blotting Analysis System* (GE Healthcare). A imagem corresponde ao filme de raios-X após exposição do *immunoblotting* durante 15 min, seguida de revelação. As cepas 042, BA732 e mut100NAL foram utilizadas como controles positivos de secreção. Pode-se observar que os mutantes ::pic#1 e ::pic#2 não produziram a proteína Pic. M = *Precision Plus Protein Standards Unstained* (BioRad) com as respectivas massas moleculares indicadas ao lado.

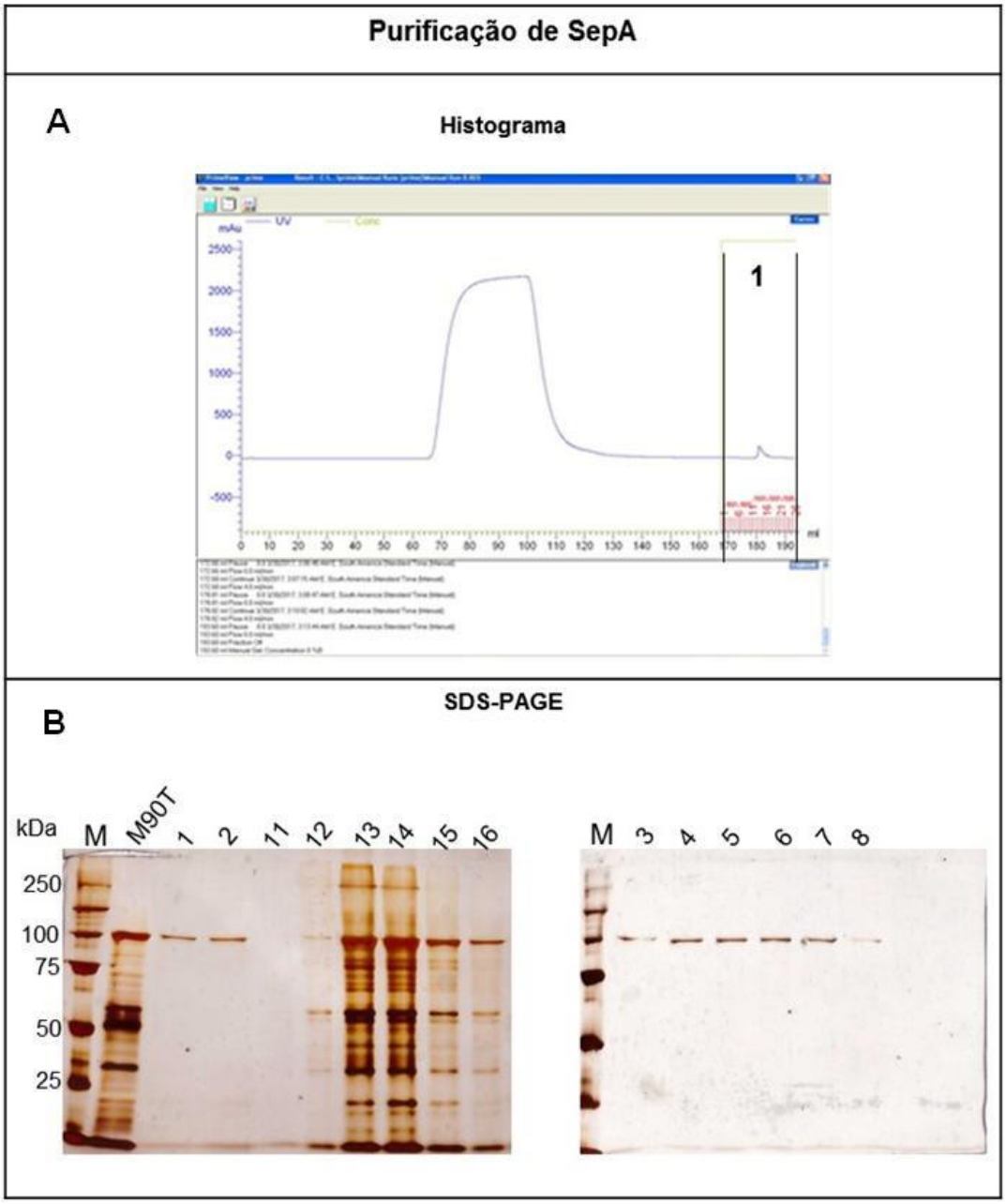
4.7 Purificação da proteína SepA

Três estratégias de purificação de SepA foram utilizadas. A primeira foi baseada na técnica de exclusão molecular, usando uma coluna de gel filtração. Como não foi possível purificar a proteína utilizando essa metodologia, outras duas estratégias foram empregadas.

4.7.1 Purificação de SepA empregando cromatografia de afinidade a serino proteases

A proteína SepA foi purificada do sobrenadante de cultura da cepa M90T, com um rendimento de 115 µg/ml. Na **Figura 22** se observa a fração correspondente ao peso molecular de 110 kDa (massa molecular de SepA).

Figura 22 – Purificação de SepA utilizando cromatografia de afinidade.



Histograma e análise eletroforética por SDS-PAGE da purificação de SepA empregando uma coluna de afinidade a serino proteases. **(A)** Histograma obtido pelo sistema ÄKTA (*Pure Chromatography System*, GE Healthcare) de purificação de proteínas, onde o número 1 representa as frações coletadas durante a purificação. **(B)** Análise das frações coletadas do sistema ÄKTA em SDS-PAGE (8%) após coloração por prata. Os números de 1 a 16 representam as frações coletadas durante a purificação. SepA purificada foi observada nas frações de 1 a 8. M = *Precision Plus Protein Standards Unstained* (BioRad, EUA).

A proteína SepA purificada por meio dessa estratégia foi utilizada para a obtenção do soro policlonal anti-SepA em coelho, nos ensaios de interação com células epiteliais e para a determinação da atividade enzimática de SepA.

Após essas etapas foi verificado que a proteína purificada apresentava-se na forma de agregados. A agregação da proteína só pôde ser observada nos ensaios de imunofluorescência, os quais serão apresentados posteriormente. Por esse motivo foi necessária a aplicação de uma nova estratégia de purificação de SepA.

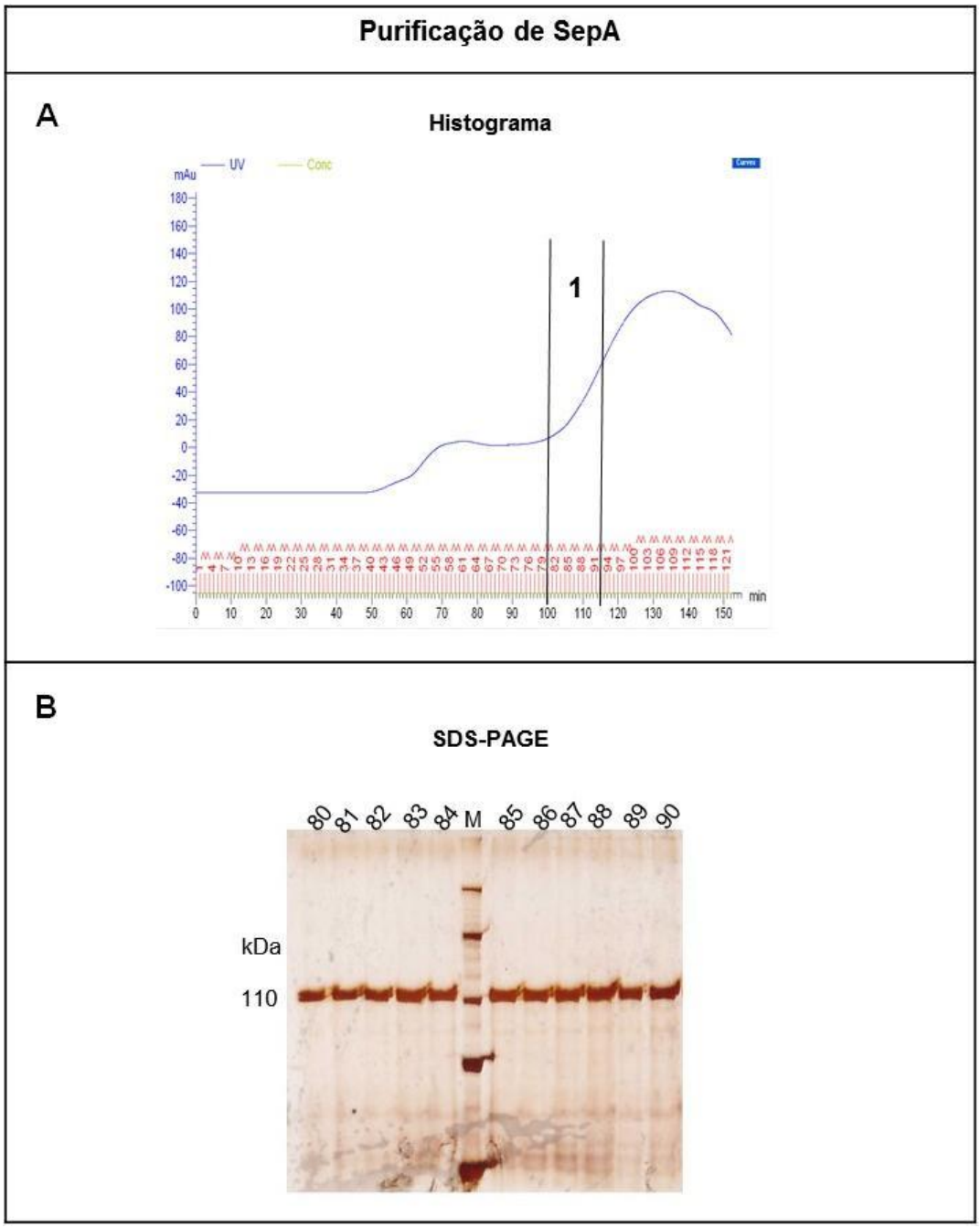
4.7.2 Purificação de SepA da cepa M90T(pZK15) empregando a técnica de exclusão molecular

Com o intuito de se obter maior rendimento de SepA purificada, foi utilizada uma estratégia para superprodução dessa proteína a partir da cepa M90T transformada com o clone mínimo de expressão de SepA (item 3.6.4), e posterior purificação por exclusão molecular.

A terceira estratégia de purificação foi bem sucedida com um rendimento de 976 µg/mL (**Figura 23**). A superprodução de SepA também foi observada na cepa M90T(pZK15) visualmente em comparação com a cepa selvagem (M90T) (**Figura 24**).

SepA purificada por essa estratégia foi utilizada nos ensaios de interação com células HeLa analisados por imunofluorescência (item 3.9.3), para a dosagem de interleucinas produzidas por HT-29 após a interação com SepA (item 3.10) e nos ensaios de MTT (item 3.9.8).

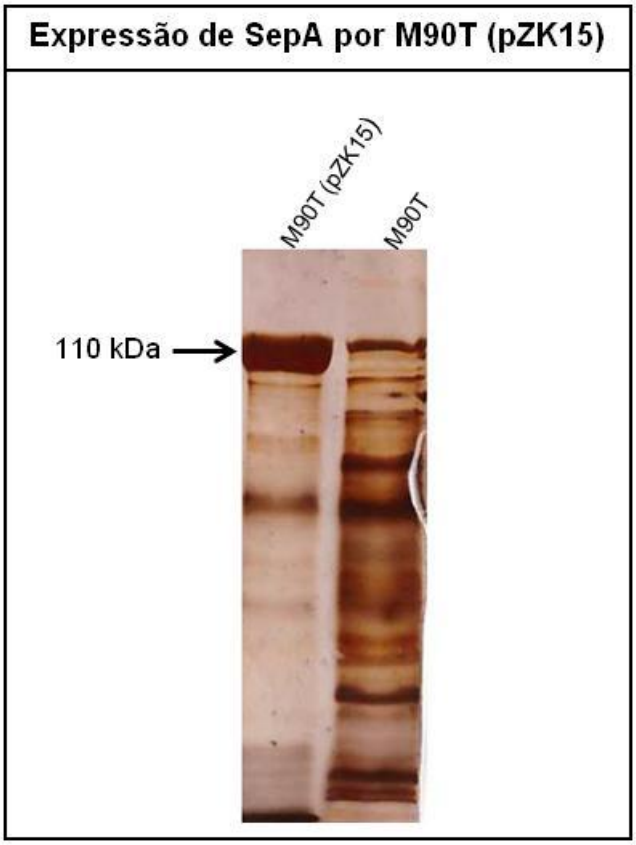
Figura 23 – Purificação de SepA a partir da cepa M90T(pZK15).



Histograma e análise eletroforética por SDS-PAGE da purificação de SepA a partir da cepa M90T(pZK15) empregando uma coluna de exclusão molecular. **(A)** Histograma obtido pelo sistema ÄKTA (Pure Chromatography System, GE Healthcare) de purificação de proteínas, onde o número 1 representa as frações coletadas durante a purificação. **(B)** Análise das frações coletadas do sistema ÄKTA em SDS-PAGE (8%) após coloração por prata. Os números de 80 a 90 representam as frações coletadas

durante a purificação. SepA purificada foi observada nas frações de 1 a 8. M = *Precision Plus Protein Standards Unstained* (BioRad, EUA).

Figura 24 – Superprodução de SepA pela cepa M90T transformada com pZK15.

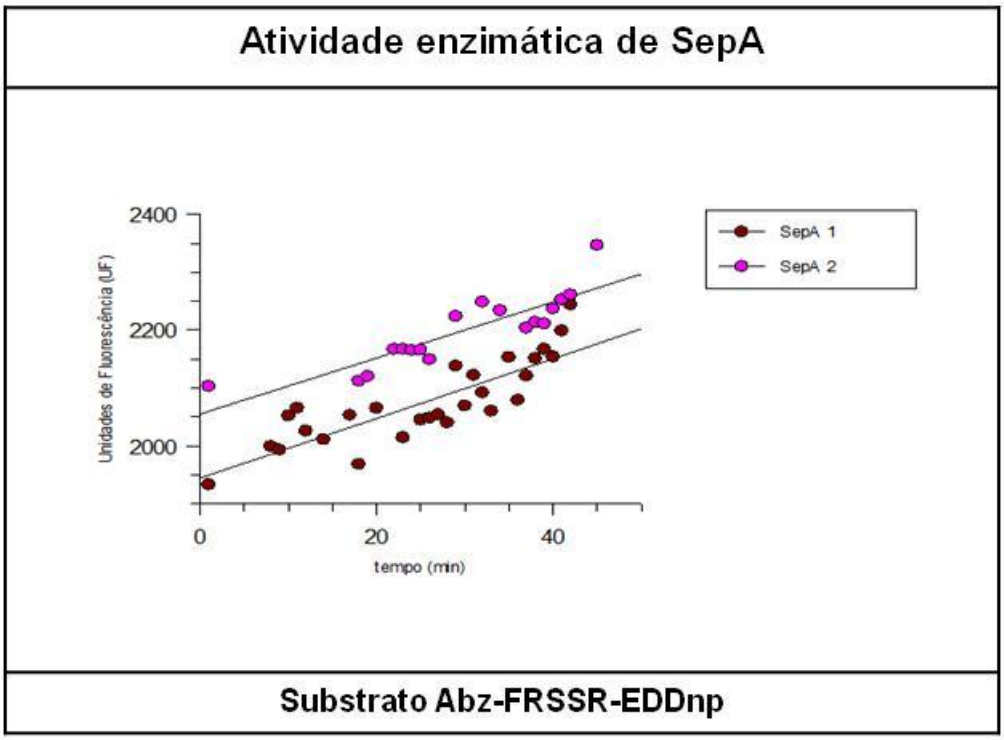


Análise eletroforética por SDS-PAGE (8%) das proteínas obtidas dos sobrenadantes de culturas concentrados em membrana filtrante amicon (*cut off* de 50 kDA), a partir dos cultivos das cepas M90T e M90T(pZK15) em caldo LB. A superprodução de SepA é evidenciada na canaleta correspondente a M90T(pZK15) em comparação com a expressão de SepA por M90T. A seta indica a massa molecular de SepA (110 kDa).

4.8 Análise da atividade de serino protease de SepA purificada em ensaios de FRET

SepA purificada por coluna de afinidade foi capaz de degradar o substrato Abz-FRSSR-EDDnp (substrato degradado por serino proteases), o que indica que a tríade catalítica (Ser/His/Asp) da proteína estava ativa. No gráfico da **Figura 25** é possível observar a degradação do substrato.

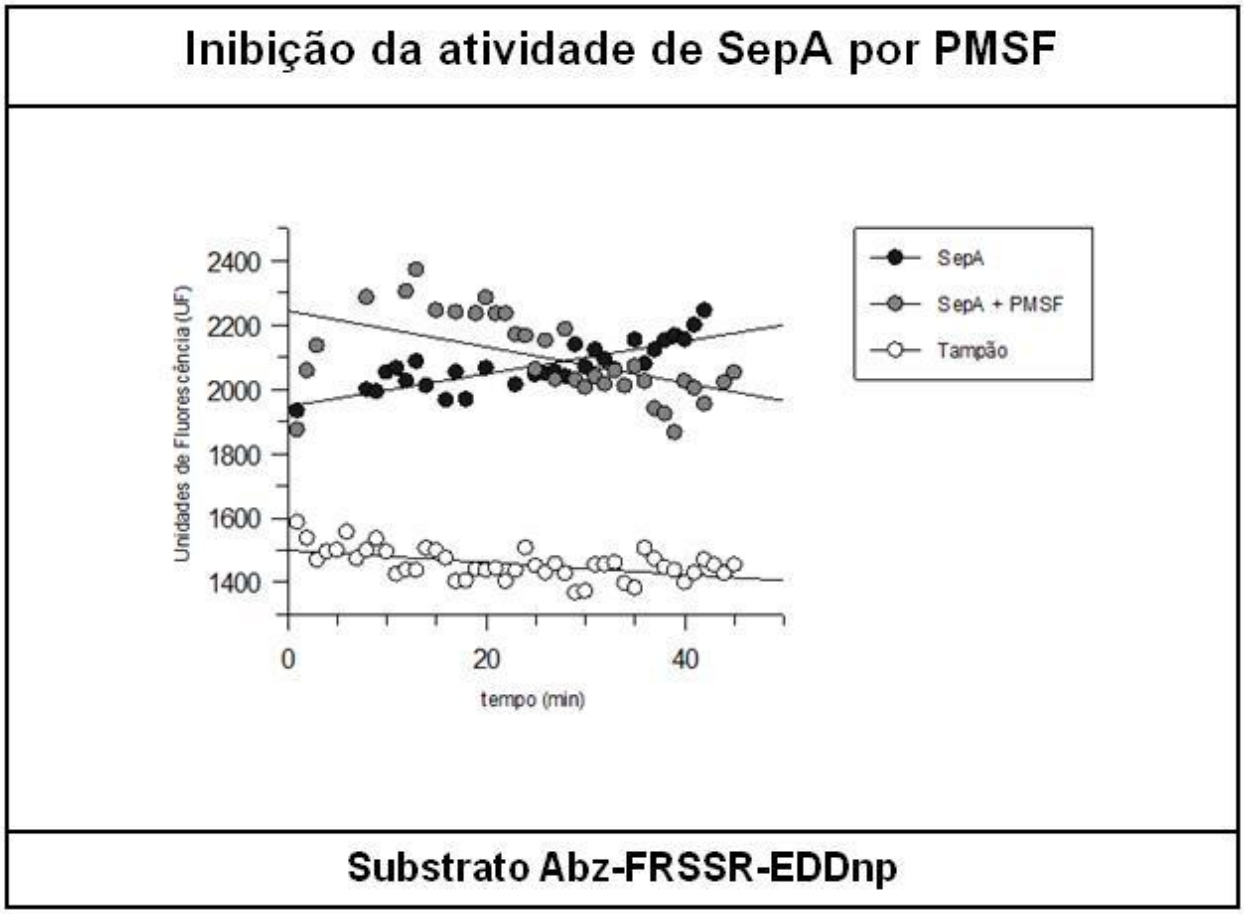
Figura 25 – Atividade enzimática de SepA purificada medida por FRET.



A atividade enzimática de SepA é demonstrada em um período de 40 min de incubação. A ação da porção de serino protease da proteína pode ser observada desde o início das leituras, havendo aumento de degradação a cada minuto até a última leitura. O ensaio foi realizado em duplicata.

A inibição da atividade de SepA com PMSF também comprovou a atividade enzimática da porção de serino protease dessa proteína, já que quando na presença de PMSF SepA foi incapaz de degradar o mesmo substrato Abz-FRSSR-EDDnp. Isso decorre da inativação da sua atividade enzimática pelo inibidor de serino protease PMSF (**Figura 26**).

Figura 26 – Inibição da atividade enzimática de SepA por PMSF medida por FRET.

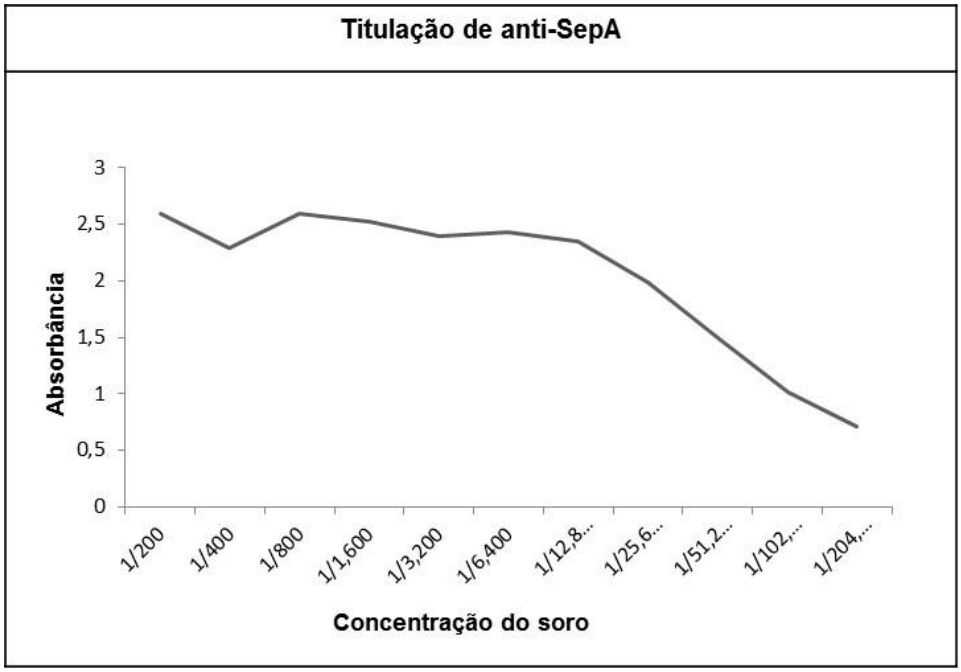


A inibição da atividade enzimática de SepA é demonstrada em um período de 40 min de incubação. Nesse ensaio foram avaliadas três condições: a atividade de SepA degradando o substrato Abz-FRSSR-EDDnp (círculos pretos), a inibição da degradação do substrato causada por PMSF (círculos cinza) e nenhuma atividade enzimática de SepA, quando incubada com o tampão de solubilidade do PMSF (círculos brancos).

4.9 Obtenção do soro policlonal anti-SepA

O soro policlonal anti-SepA obtido em coelho detectou a proteína SepA purificada nos ensaios de ELISA até a diluição máxima realizada (1:20.400), demonstrando a eficiência do soro no reconhecimento de SepA (**Figura 27**).

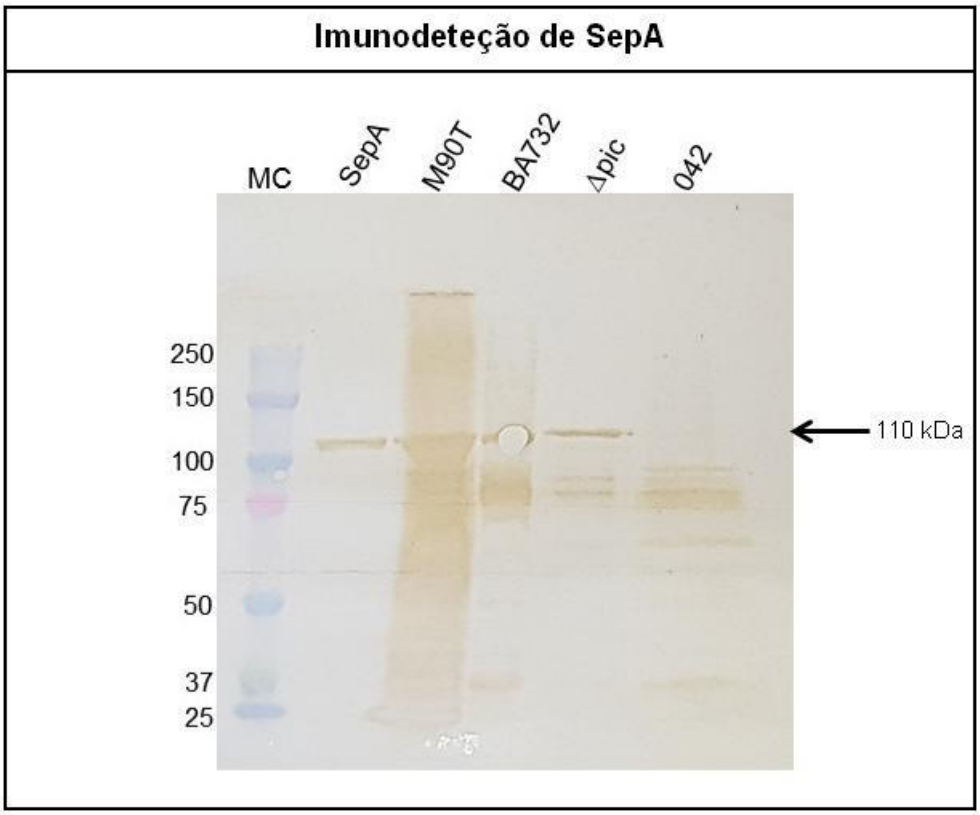
Figura 27 – Titulação do soro anti-SepA policlonal.



Titulação do soro anti-SepA pelo método de ELISA. A proteína SepA (1 µg) utilizada na imunização do coelho foi usada na sensibilização de uma placa de 96 poços na presença de tampão carbonato (1:10), com posterior incubação a 37°C por 2 h, seguido de incubação a 4°C por 18 h. Após bloqueio com BSA (1%) a quantificação de SepA foi realizada utilizando o anticorpo anti-SepA nas diluições de 1:200 a 1:20.400 e soro de cabra anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase (1:5000), seguido da revelação com o kit *TMB substrate OptEIA Regent Set* (BD Biosciences). A leitura das absorbâncias foi realizada em comprimento de onda de 450 nm. O soro foi capaz de reconhecer a proteína SepA purificada em todas as diluições.

A reatividade do soro anti-SepA também foi analisada por *immunoblotting*. Conforme se observa na **Figura 28**, o soro obtido detectou a proteína SepA purificada e também proteínas nos sobrenadantes de culturas concentrados das cepas BA732, BA732::pic e M90T com massa molecular relativa correspondente à SepA. Porém, reatividades inespecíficas foram detectadas pelo soro nos sobrenadantes de cultura dessas cepas, bem como na cepa de EAEC 042.

Figura 28 – Imunodetecção de SepA empregando o soro policlonal anti-SepA.

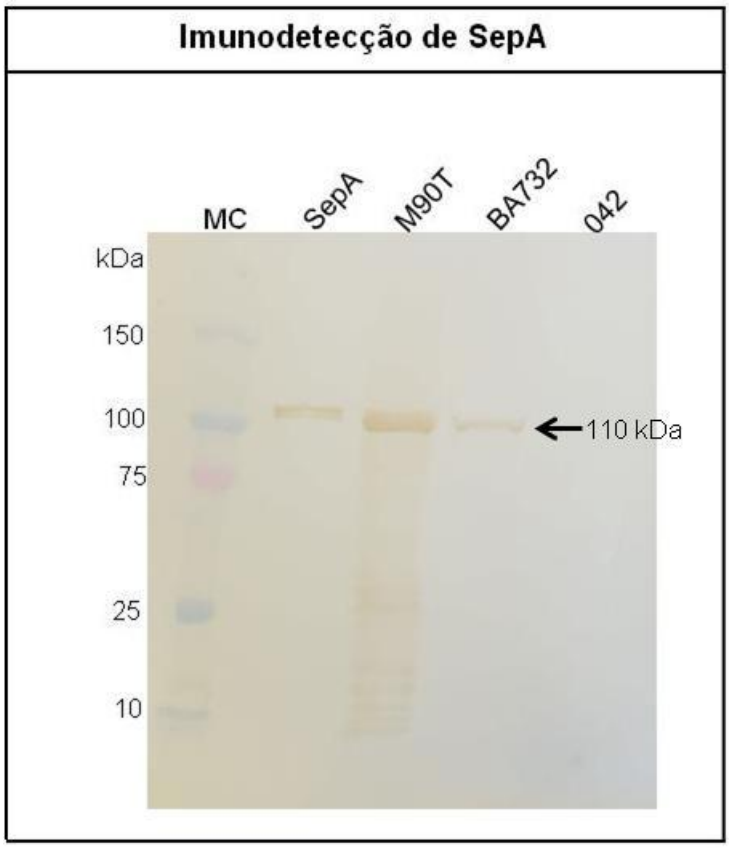


Os sobrenadantes concentrados de cultura das cepas M90T, BA732, BA732::pic e 042, bem como a proteína purificada SepA, foram submetidos à análise eletroforética por SDS-PAGE (8%) e transferidos para uma membrana de nitrocelulose. A imunodetecção foi realizada com anti-SepA (1:500). O anticorpo secundário anti-imunoglobulina de coelho produzida em cabra e conjugada à peroxidase foi usado na diluição de 1:5.000. A revelação foi realizada com solução reveladora (3,3-diaminobenzidina, 5 µg; peróxido de hidrogênio, 150 µL) em PBS/Tween 20. A seta indica a mobilidade eletroforética relativa correspondente à proteína SepA (110 kDa).

Esse resultado indicou a necessidade da adsorção do soro para que a eliminação de sua inespecificidade. Após a realização do protocolo de adsorção do soro contra a cepa EAEC 042, o mesmo foi usado na imunodetecção de SepA, utilizando as mesmas cepas anteriormente analisadas. Conforme se observa na **Figura 29**, a reatividade inespecífica foi eliminada. O soro adsorvido detectou proteínas com massa molecular relativa correspondente à SepA, tanto nos sobrenadantes de culturas concentrados das

cepas BA732, BA732::pic e M90T, quanto na canaleta correspondente à SepA purificada. A ausência de reatividade com o sobrenadante de cultura da cepa de EAEC 042 que não expressa SepA confirmou a sua especificidade.

Figura 29 – Imunodetecção de SepA empregando o soro anti-SepA adsorvido.



Os sobrenadantes concentrados de cultura das cepas M90T, BA732 e 042, bem como a proteína purificada SepA, foram submetidos à análise eletroforética por SDS-PAGE (8%) e transferidos para uma membrana de nitrocelulose. A imunodetecção foi realizada com anti-SepA (1:500). O anticorpo secundário anti-imunoglobulina de coelho produzida em cabra e conjugada à peroxidase foi usado na diluição de 1:5.000. A revelação foi realizada com solução reveladora (3,3-diaminobenzidina, 5 µg; peróxido de hidrogênio, 150 µL) em PBS/Tween 20. A seta indica a mobilidade eletroforética relativa correspondente à proteína SepA (110 kDa).

4.10 Efeito de SepA em células epiteliais cultivadas

Duas formas foram utilizadas para verificar a atividade da proteína SepA nas linhagens celulares Caco-2, HT-29, HeLa, HEp-2, Y-1 e Vero: análises em microscopia ótica comum, após coloração das células com May-Grünwald/Giemsa e análises em microscopia de fluorescência.

Nos ensaios de microscopia ótica comum foi empregada a proteína SepA purificada em coluna de afinidade e nos ensaios de imunofluorescência, além da proteína obtida por essa estratégia de purificação, foi utilizada a proteína SepA purificada por exclusão molecular após superprodução por M90T(pZK15).

4.10.1 Análises em microscopia ótica comum

Dentre as linhagens celulares avaliadas foi observada alteração morfológica induzida por SepA nas células HeLa, HT-29 e Y-1.

Nas células HeLa após um período de 5 h foi observado início de alteração morfológica. Após 10 h de incubação o dano celular foi mais evidente ocorrendo também diminuição na confluência celular (**Figura 30**). No período de 18 e 30 h de incubação com SepA as células do controle negativo e as células incubadas com a proteína apresentaram o mesmo comportamento, mostrando alteração morfológica, dessa forma essas alterações não puderam ser consideradas.

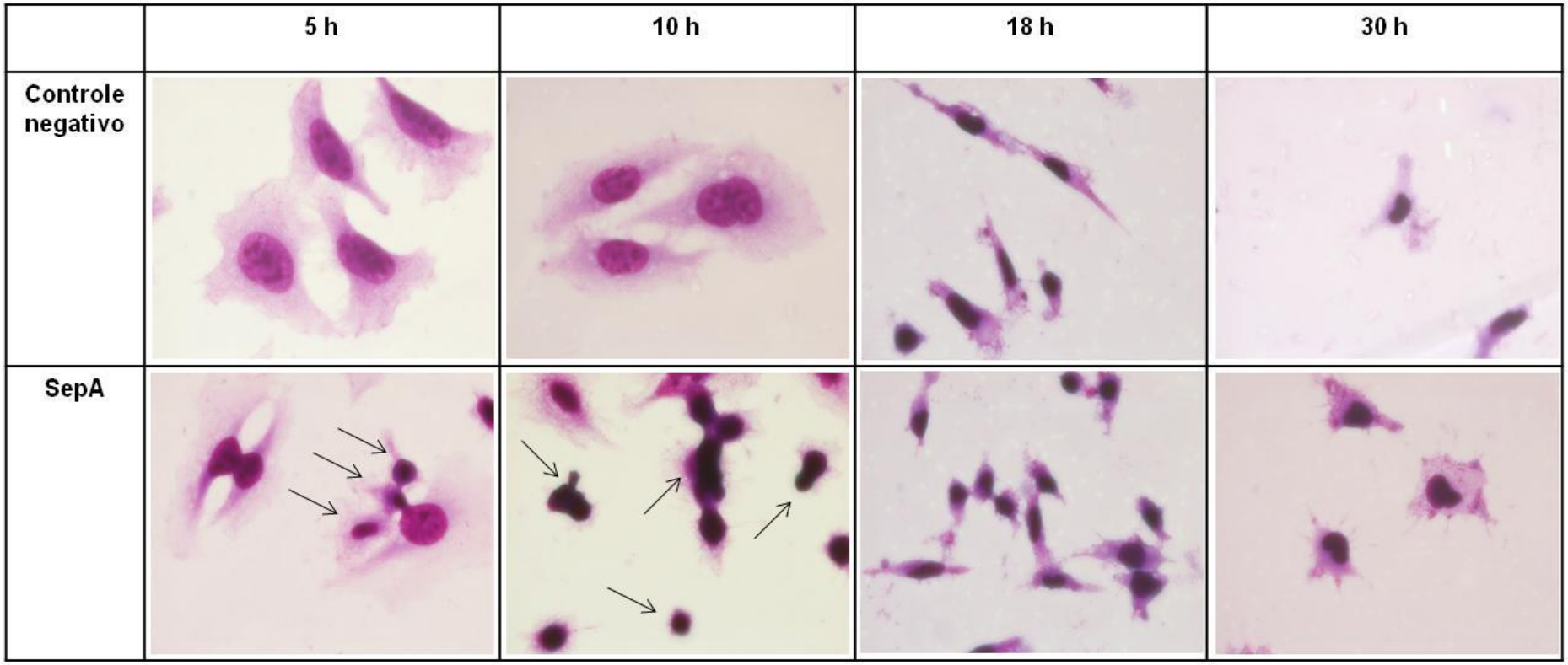
Na linhagem HT-29, uma alteração morfológica celular mais pronunciada foi observada após 5 h de interação com a proteína SepA. Após 18 h de interação, a alteração morfológica causada mostrou-se mais evidente (**Figura 31**). Após 30 h de incubação as células do controle negativo e as células incubadas com SepA apresentaram o mesmo comportamento, ou seja, alteração morfológica e diminuição na confluência, sendo assim os resultados verificados nesse período de incubação não foram considerados válidos (**Figura 31**).

Nas células Y-1 a alteração morfológica causada por SepA foi observada após o período de 18 h, caracterizada por grande diminuição na confluência, evidenciando a ocorrência de destacamento celular (**Figura 32**). Porém, as

células do controle negativo também apresentam alteração nesse mesmo período de incubação, apesar desse efeito ser mais evidente quando na presença de SepA. Sendo assim, as análises de interação de SepA com células epiteliais não prosseguiram com a linhagem Y-1 no desenvolvimento do estudo (**Figura 32**).

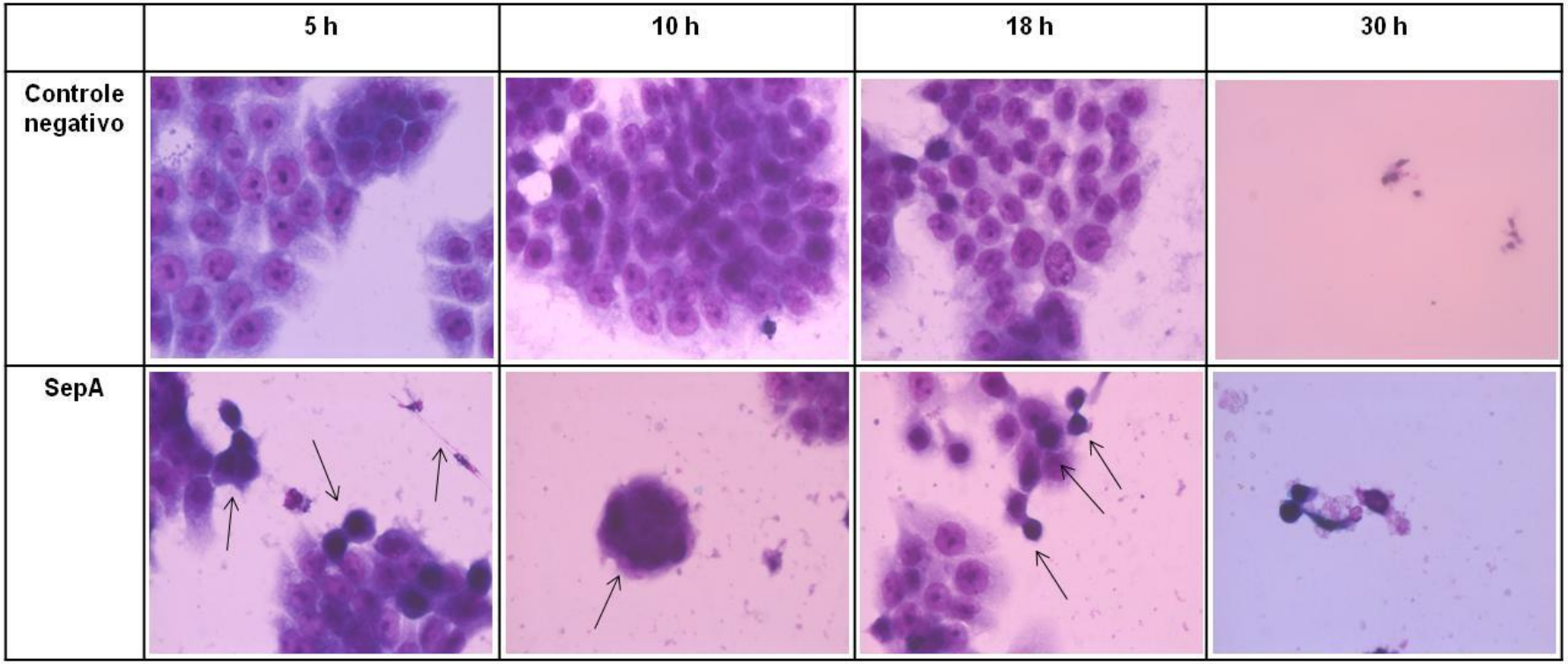
Nas demais linhagens celulares (Caco-2, HEp-2 e Vero) não foram observadas alterações celulares induzidas por SepA em nenhum dos períodos de incubação (**Figura 33**).

Figura 30 – Efeito da proteína SepA em células HeLa.



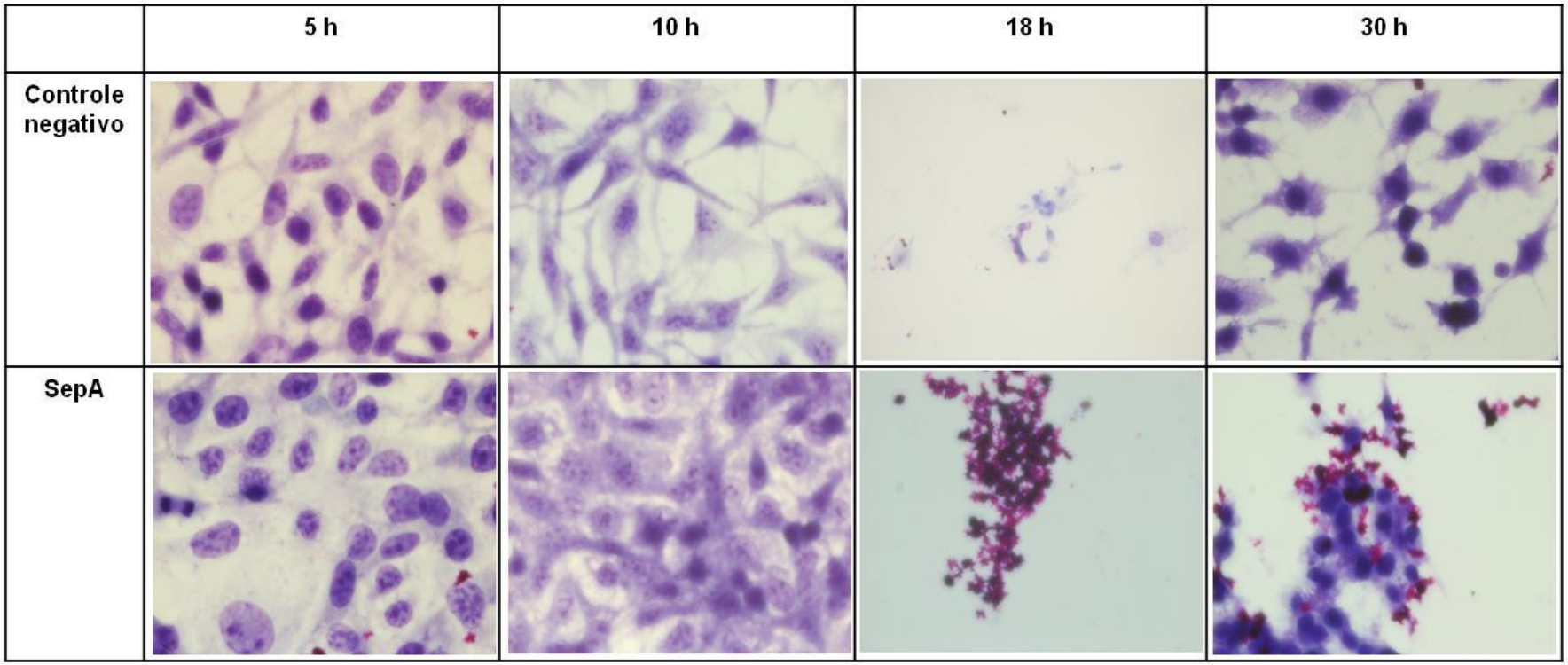
Interação de SepA com células HeLa. As células foram incubadas com 20 µg/mL de SepA e em seguida fixadas e coradas com May-Grünwald/Giemsa. No período de 5 h de incubação ocorreu uma leve alteração morfológica (células arredondadas), sendo esse efeito mais evidente após 10 h de incubação. As células do controle negativo apresentaram morfologia inalterada. Nos ensaios nos períodos de incubação de 18 e 30 h, a mesma alteração morfológica observada na presença de SepA também ocorreu nos controles negativos. As setas indicam as células com alterações morfológicas. Aumento de 1.000 x.

Figura 31 - Efeito da proteína SepA em células HT-29.



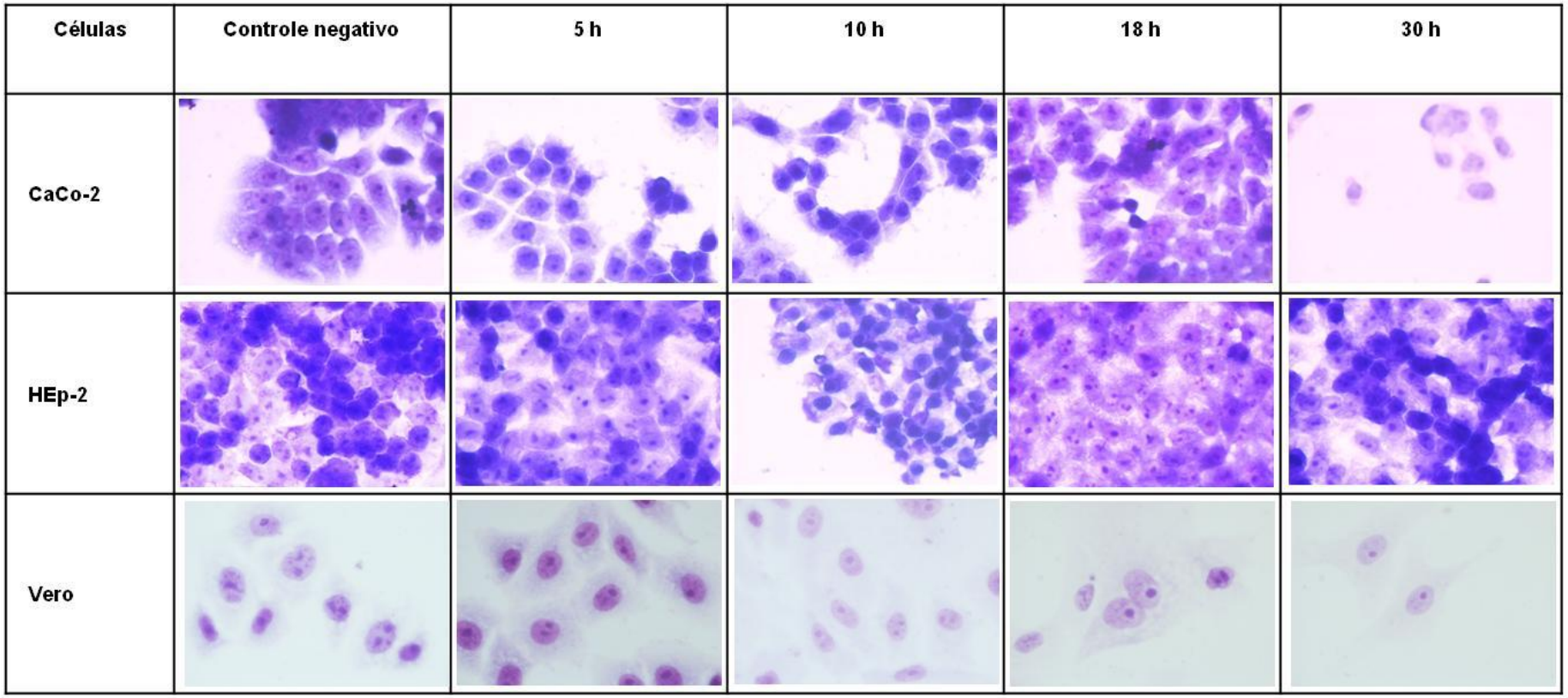
Interação de SepA com células HT-29. As células foram incubadas com 20 µg/mL de SepA no período de 5 h e em seguida fixadas e coradas com May-Grünwald/Giemsa. No período de 5 h de incubação ocorreu uma leve alteração morfológica (células arredondadas), sendo esse efeito mais evidente após 18 h de incubação. As células do controle negativo apresentam morfologia inalterada nos períodos de incubação de 5, 10 e 18 h. Nos ensaios com incubação de 30 h, a mesma alteração morfológica na presença de SepA ocorreu no controle negativo. As setas indicam as células com alterações morfológicas. Aumento de 1.000 x.

Figura 32 - Efeito da proteína SepA em células Y-1.



Interação de SepA com células Y-1. As células foram incubadas com 20 µg/mL de SepA e em seguida fixadas e coradas com May-Grünwald/Giemsa. Nos períodos de 5 e 10 h não ocorreu qualquer alteração morfológica, semelhante ao observado nos controles negativos. Após 18 e 30 h de incubação foram observadas células arredondadas. Nas células dos controles negativos, após incubação de 18 h foi verificada diminuição na confluência e após 30 h houve alteração morfológica. As setas indicam as células com alterações morfológicas. Aumento de 1.000 x.

Figura 33 – Interação de SepA com as linhagens celulares CaCo-2, HEp-2 e Vero.



Interação de SepA com células CaCo-2, HEp-2 e Vero. As células foram incubadas com 20 µg/mL de SepA e em seguida fixadas e coradas com May-Grünwald/Giemsa. Nos períodos de 5, 10, 18 e 30 h de incubação não ocorreu qualquer alteração morfológica, semelhante ao observado nos controles negativos. Aumento de 1.000 x.

4.10.2 Análise da interação de SepA por ensaios de imunofluorescência

Os ensaios de imunofluorescência foram realizados utilizando as linhagens HeLa e HT-29.

Conforme pode ser observado na **Figura 34**, após 5 h de interação das células HeLa com SepA foi observado arredondamento celular e essa alteração morfológica foi visualizada a partir da marcação dos filamentos de actina por TRITC.

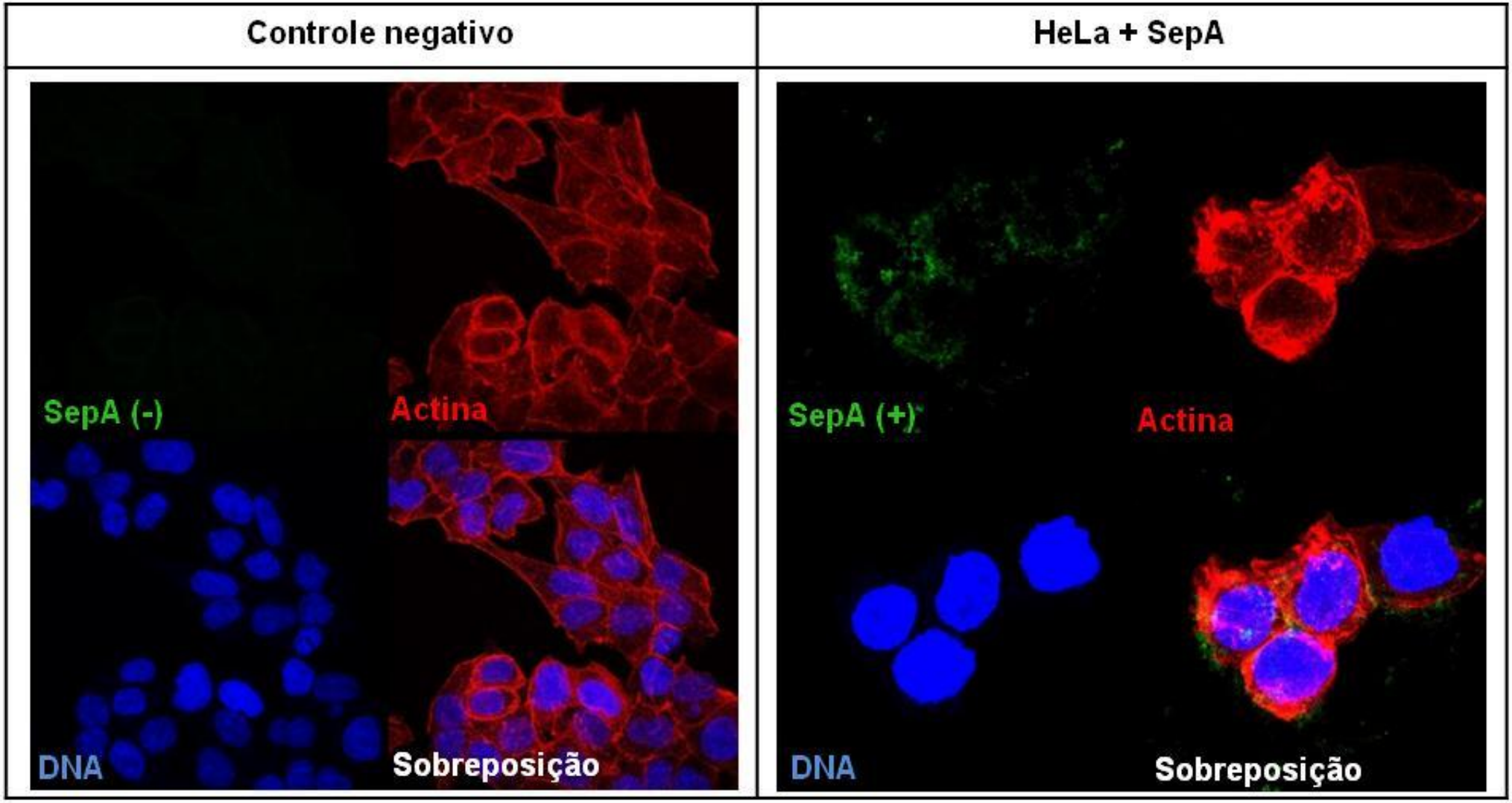
A incubação de SepA com as células HT-29 provocou redistribuição de actina nas células após 5 h de interação e um discreto arredondamento celular (**Figura 35**).

Nesses ensaios com células HeLa e HT-29 foi observado que a proteína SepA purificada por cromatografia de afinidade (item 3.6.3) estava formando agregados, dessa forma os resultados verificados poderiam estar superestimados, já que mais de um monômero de SepA estaria interagindo com as células. Por esse motivo, foram realizadas três estratégias para a desagregação de SepA utilizando a centrifugação, sonicação e diálise.

Nenhuma dessas estratégias para a desagregação de SepA foi bem sucedida, ou seja, a proteína permaneceu agregada após todos os processos (**Figura 36**).

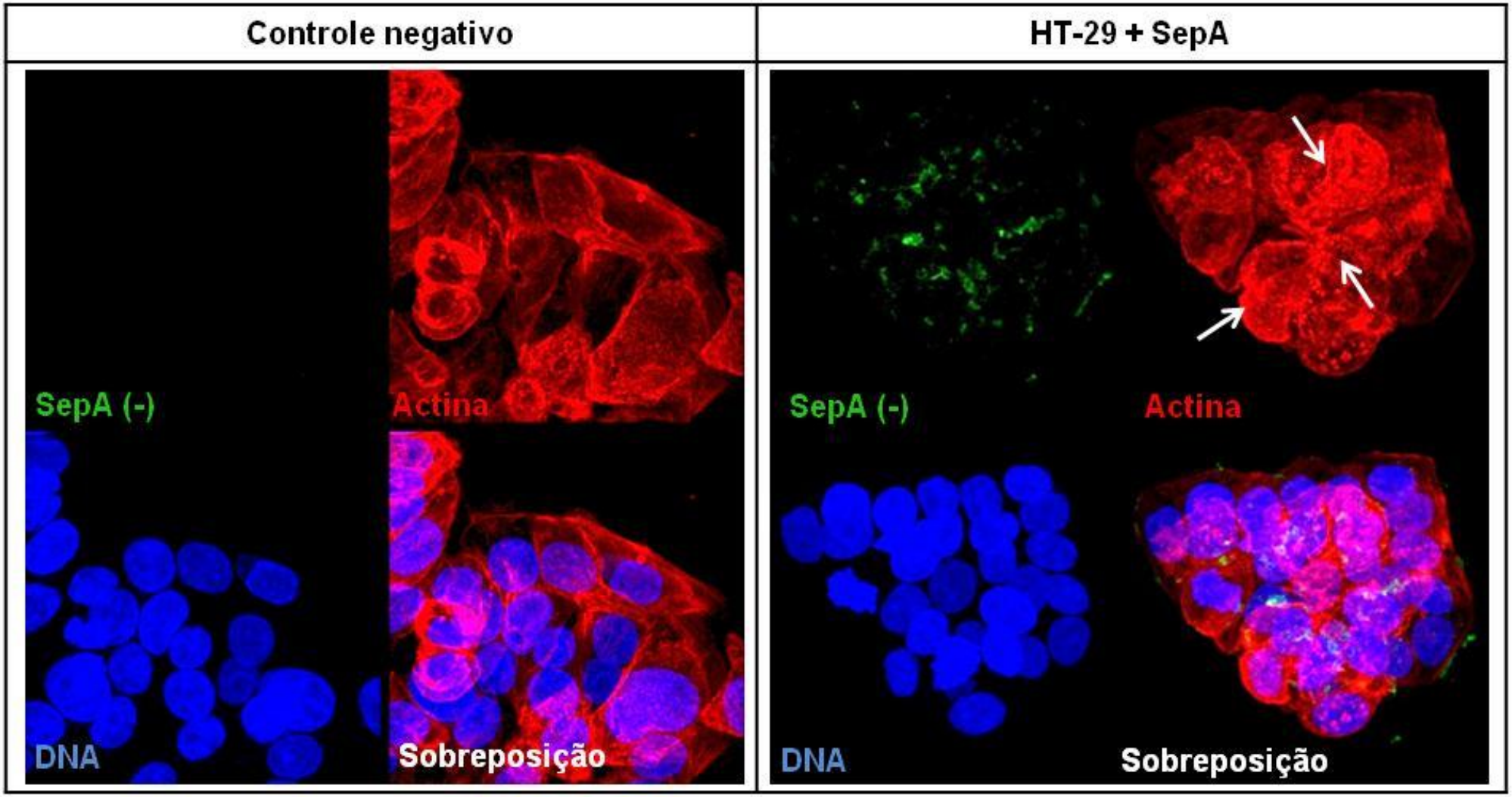
Por esse motivo a proteína SepA foi purificada por uma nova estratégia (superprodução de SepA pela cepa M90T) e os ensaios de interação com SepA realizados novamente, a fim de comprovar o efeito causado pela proteína nas células HeLa e HT-29.

Figura 34 – Interação de SepA com células HeLa.



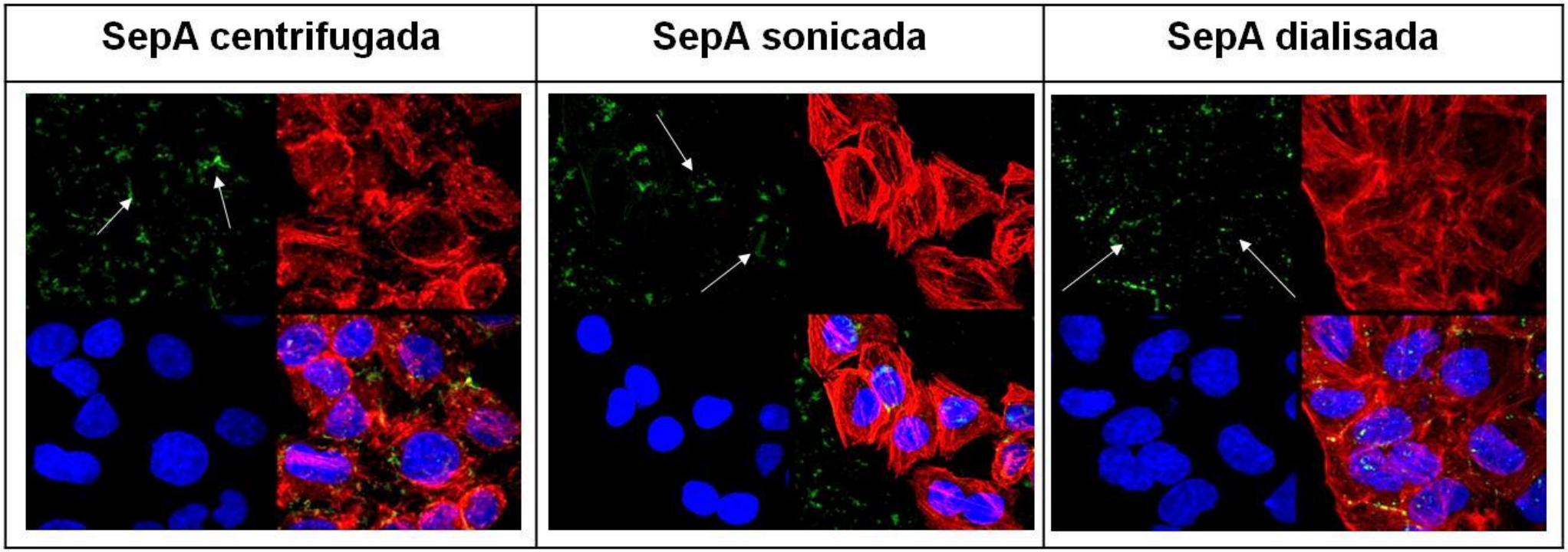
Interação de SepA (40 µg/mL) com células HeLa após 5 h. Após esse período as células foram fixadas, permeabilizadas e tratadas com fluoróforos e anti-SepA. É possível observar o arredondamento celular nas células incubadas com SepA, enquanto no controle negativo as células permanecem com a morfologia alongada. Os filamentos de actina são observados em vermelho, o DNA em azul e a proteína SepA em verde, cuja a marcação está ausente no controle negativo. Aumento de 1.000 x. Visualizado em Microscópio Confocal de Varredura a Laser microscópio confocal TCS SP5 (Leica). Filtros utilizados: UV (excitação de 340-380 nm e emissão de 425 nm), azul (excitação de 450-490 nm e emissão de 515 nm) e verde (excitação de 515-560 nm e emissão de 590 nm).

Figura 35 - Interação de SepA com células HT-29 evidenciada por imunofluorescência.



Interação de SepA (40 µg/mL) com células HT-29 após 5 h. Após esse período as células foram fixadas, permeabilizadas e tratadas com fluoróforos e anti-SepA. Pode-se observar redistribuição de actina nas células incubadas com SepA (setas brancas). No controle negativo as células permanecem com a morfologia normal da linhagem. Os filamentos de actina são observados em vermelho, o DNA em azul e a proteína SepA em verde, cuja a marcação está ausente no controle negativo. Aumento de 1.000 x Visualizado em Microscópio Confocal de Varredura a Laser microscópio confocal TCS SP5 (Leica). Filtros utilizados: UV (excitação de 340-380 nm e emissão de 425 nm), azul (excitação de 450-490 nm e emissão de 515 nm) e verde (excitação de 515-560 nm e emissão de 590 nm).

Figura 36 – Análises dos tratamentos para desagregação de SepA purificada.



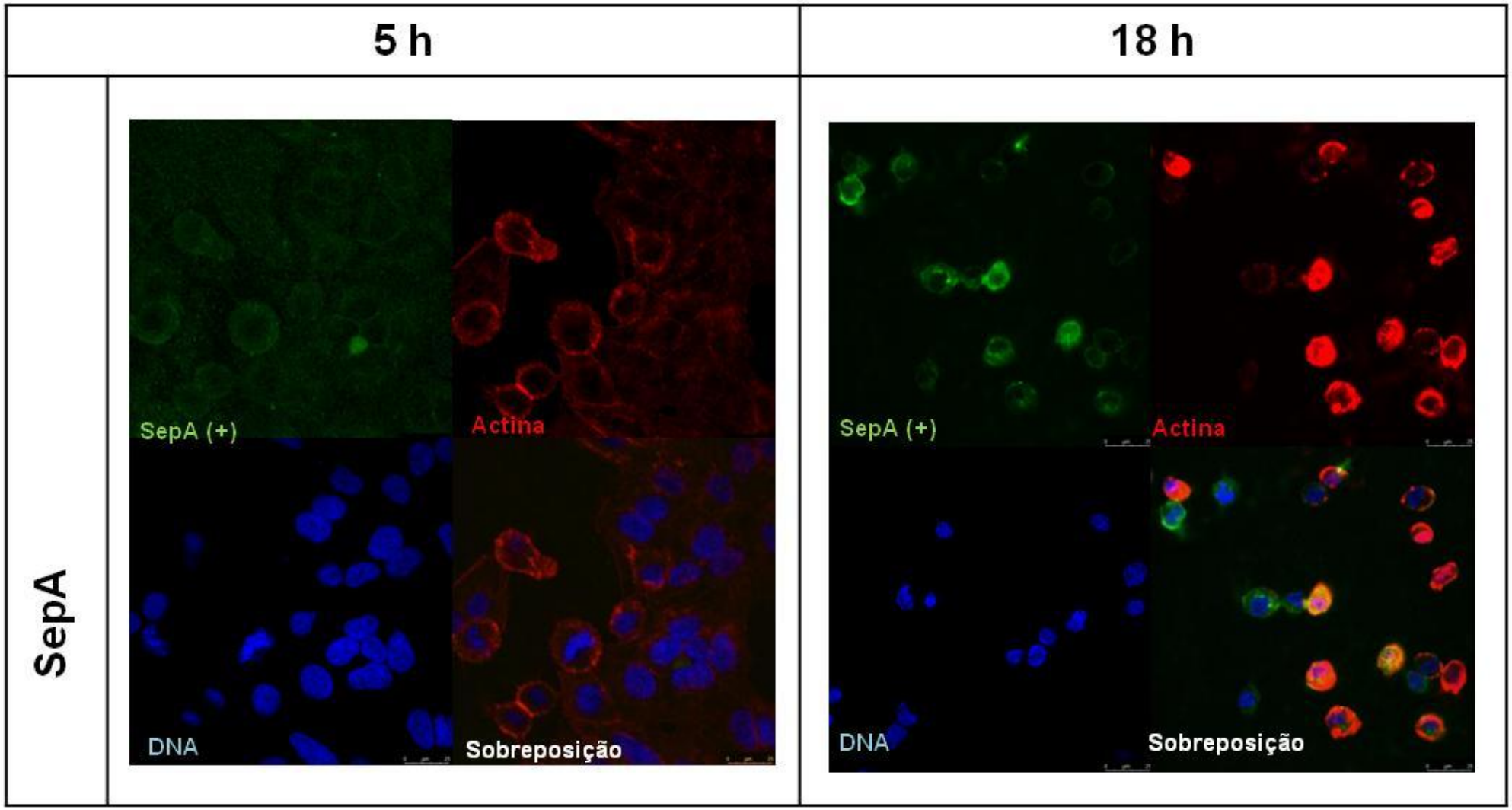
Interação entre células HeLa e SepA processada por centrifugação, sonicação e diálise. Após os tratamentos, a proteína SepA (40 µg/mL) foi incubada com as células HeLa durante 5 h. Após esse período as células foram fixadas, permeabilizadas e tratadas com fluoróforos e anti-SepA. Pode-se observar que SepA permaneceu agregada após os três tratamentos. As setas indicam os agregados de proteína SepA. Os filamentos de actina são observados em vermelho, o DNA em azul e a proteína SepA em verde. Aumento de 1.000 x. Visualizado em Microscópio Confocal de Varredura a Laser microscópio confocal TCS SP5 (Leica). Filtros utilizados: UV (excitação de 340-380 nm e emissão de 425 nm), azul (excitação de 450-490 nm e emissão de 515 nm) e verde (excitação de 515-560 nm e emissão de 590 nm).

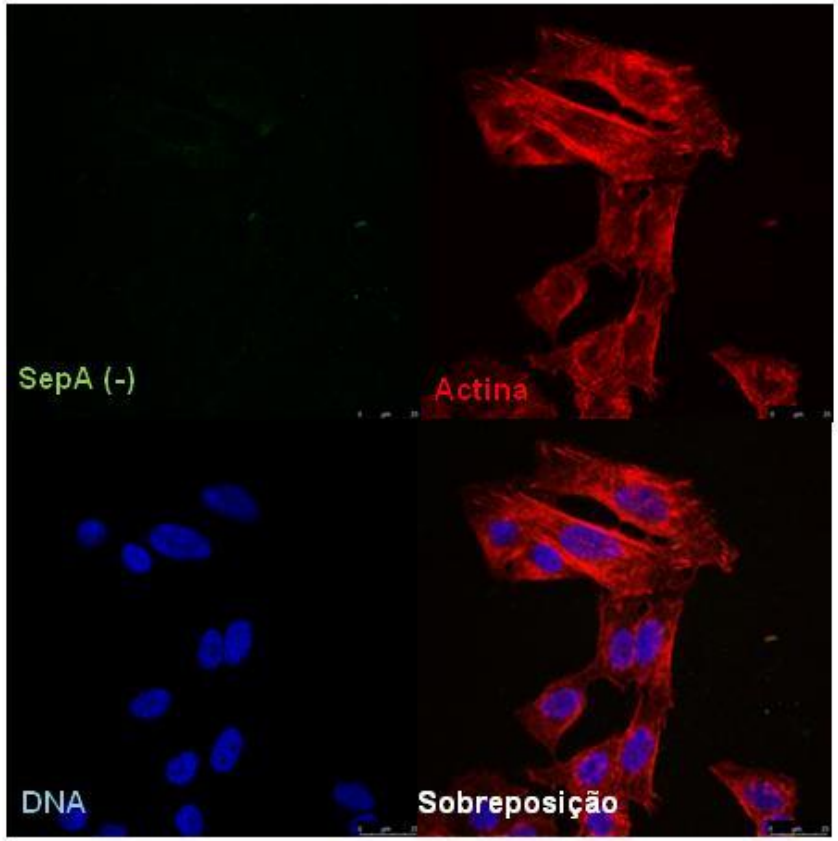
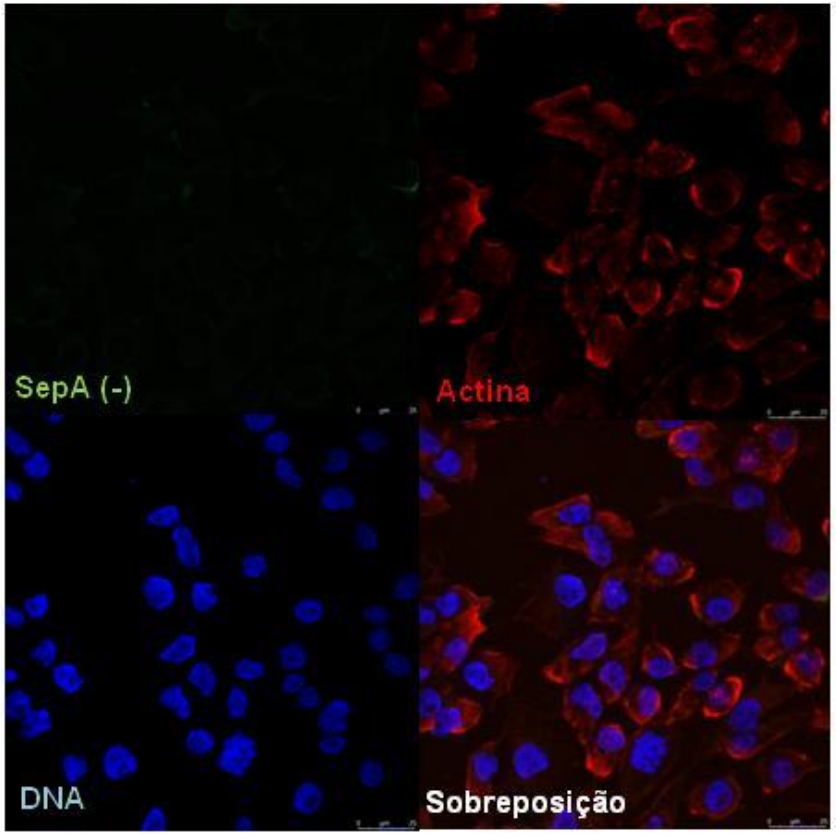
4.10.2.1 Efeito de SepA purificada a partir da cepa M90T(pZK15)

A purificação de SepA pela estratégia de superprodução da proteína pela cepa M90T(pZK15), com posterior purificação por exclusão molecular gerou uma proteína que não formou agregados nos ensaios de interação com linhagens celulares.

Nessa etapa foram utilizadas as células HeLa com ensaios de incubação com SepA por 5 e 18 h. Após 18 h de incubação foi possível observar alteração morfológica de HeLa causada por SepA, sendo observado o arredondamento celular (**Figura 37**), assim como verificado anteriormente nos ensaios com a proteína SepA agregada. Esse resultado confirma que SepA altera morfologicamente as células HeLa.

Figura 37 - Interação de SepA na forma não agregada com células HeLa.



	5 h	18 h
Controle negativo		

Interação de SepA não agregada (40 µg/mL) com células HeLa após 5 h e 18 h. Observou-se arredondamento celular após a incubação de 5 h e no período de 18 h essa alteração está mais evidenciada com um maior número de células arredondadas. No controle negativo as células permanecem com a morfologia alongada normal da linhagem e não há marcação em verde devido a ausência da SepA. Os filamentos de actina são observados em vermelho, o DNA em azul e a proteína SepA em verde, marcação ausente no controle negativo. Aumento de 1.000 x. Visualizado em Microscópio Confocal de Varredura a Laser (TCS SP8, Leica). Filtros utilizados: UV (excitação de 340-380 nm e emissão de 425 nm), azul (excitação de 450-490 nm e emissão de 515 nm) e verde (excitação de 515-560 nm e emissão de 590 nm).

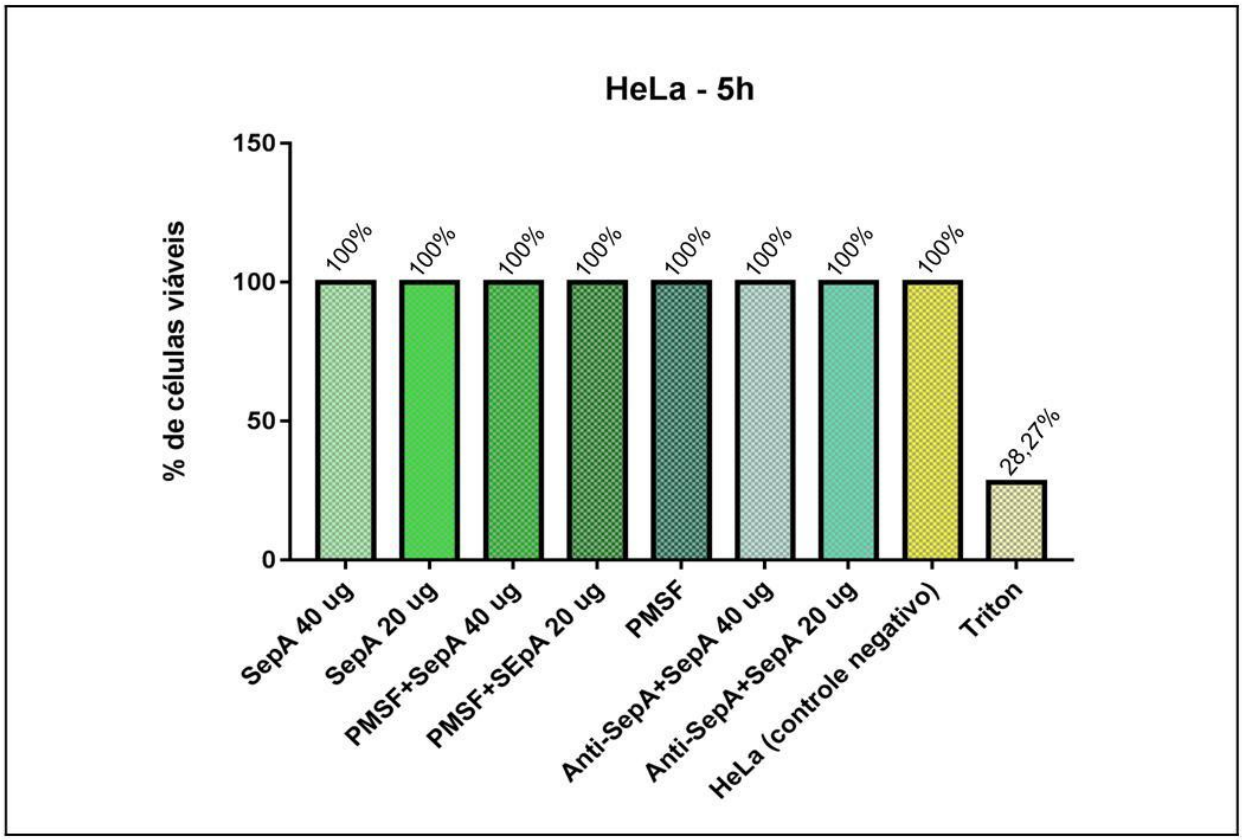
4.10.3 Viabilidade celular após interação com SepA não agregada

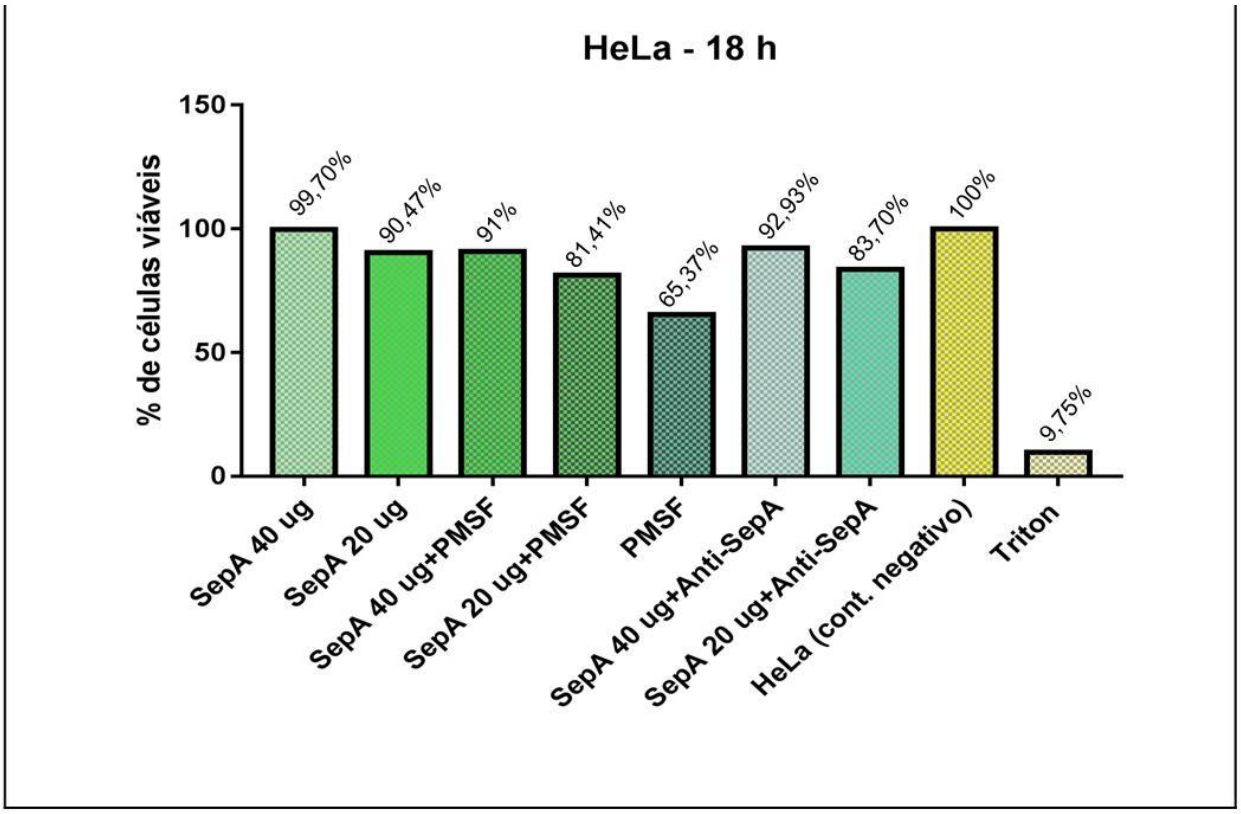
Após a confirmação de que SepA causava alterações morfológicas nas células epiteliais HeLa e HT-29, foi realizado o ensaio de MTT, que é um indicador de viabilidade celular para determinar se uma toxina tem efeito citotóxica ou citopático.

Os resultados de viabilidade celular com MTT mostraram que SepA é uma proteína citopática. Após 5 h de incubação com células HeLa, SepA nas concentrações de 20 e 40 µg/mL não causou morte celular (**Figura 38**). Após 18 h de incubação foi verificado 99,70% de células viáveis no ensaio utilizando 40 µg/mL de SepA e 90,47% de células viáveis utilizando 20 µg/mL de SepA. Quando na presença de PMSF ou do soro anti-SepA, não houve diferença com relação aos efeitos com SepA apenas (**Figura 38**).

Na linhagem HT-29, após 5 h de incubação com 40 µg/mL de SepA houve 67,29% de células viáveis e na incubação com 20 µg/mL houve 81% de células viáveis (**Figura 39**). Após 18 h de interação nas duas concentrações utilizadas de SepA houve 100% de células viáveis, indicando assim o efeito citopático da proteína. Quando na presença de PMSF ou do soro anti-SepA, foram observadas pequenas diferenças com relação aos efeitos com SepA apenas (**Figura 39**).

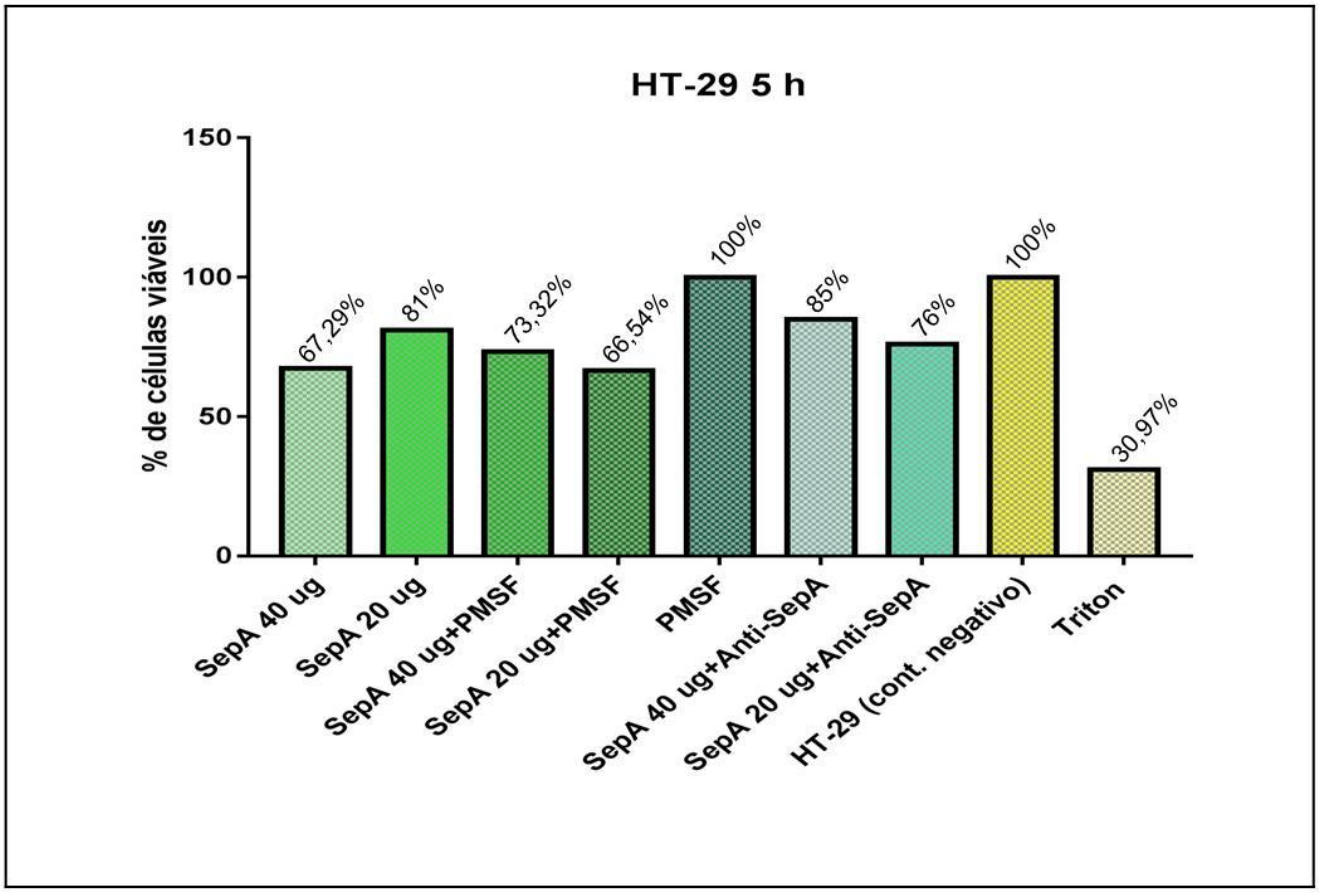
Figura 38 – Viabilidade das células HeLa após interação com SepA.

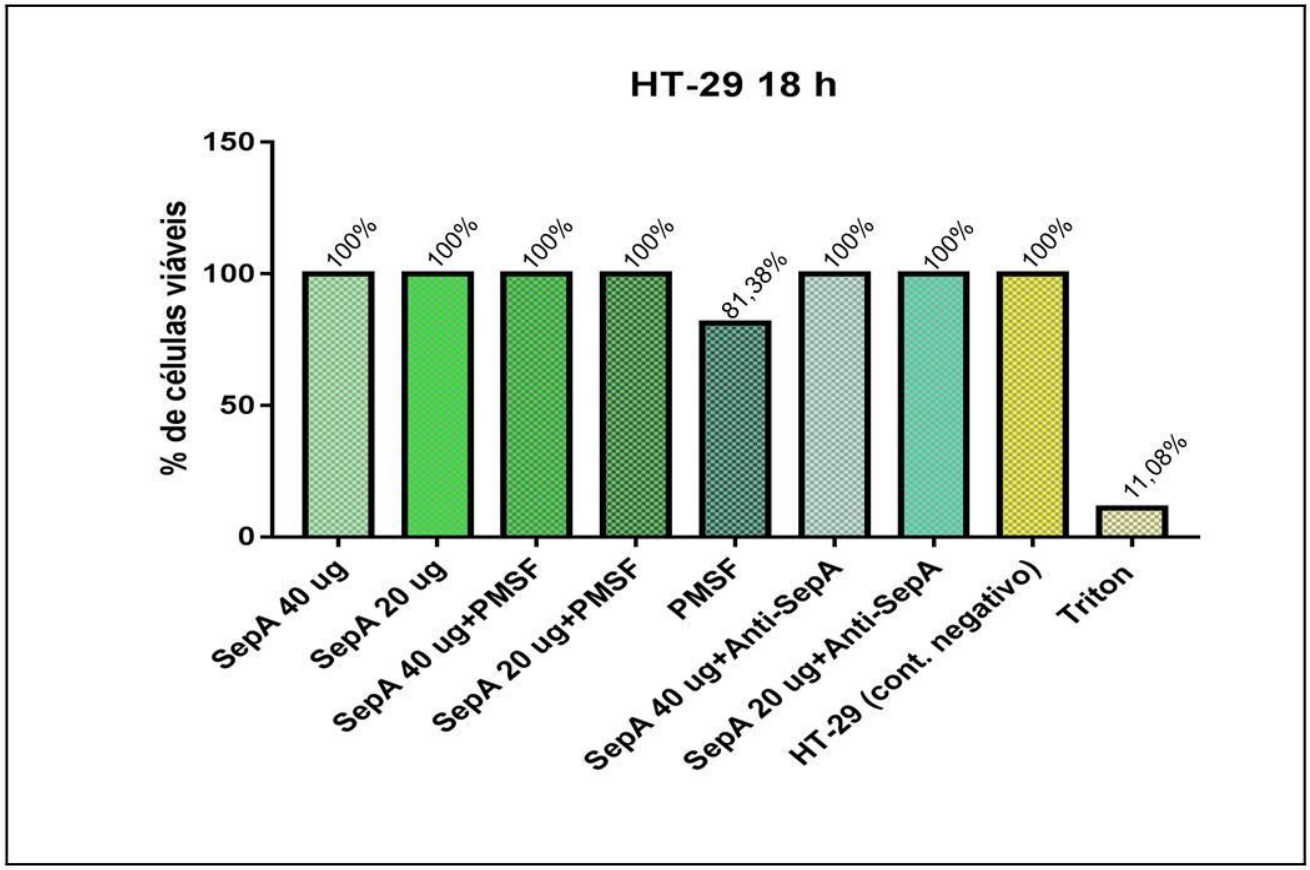




Ensaio de viabilidade celular após a interação de HeLa com SepA, medida pela técnica de MTT. A proteína SepA apresentou efeito citopático não causando morte celular após interação de 5 h com as células HeLa. Uma baixa porcentagem de morte celular foi verificada após 18 h de interação de HeLa com SepA. Não houve neutralização do efeito de SepA tanto por PMSF como por anti-SepA.

Figura 39 - Viabilidade das células de HT-29 após interação com SepA.





Ensaio de viabilidade celular após a interação de HT-29 com SepA, medida pela técnica de MTT. A proteína SepA apresenta efeito citopático e causa cerca até 32,72% de morte celular após interação de 5 h com as células HT-29. Em ensaio de 18 h de interação não foi verificada morte celular. A neutralização do efeito de SepA foi observado utilizando PMSF em 5 h de interação.

4.11 Ensaios de interação da EAEC BA732::pic com células HeLa

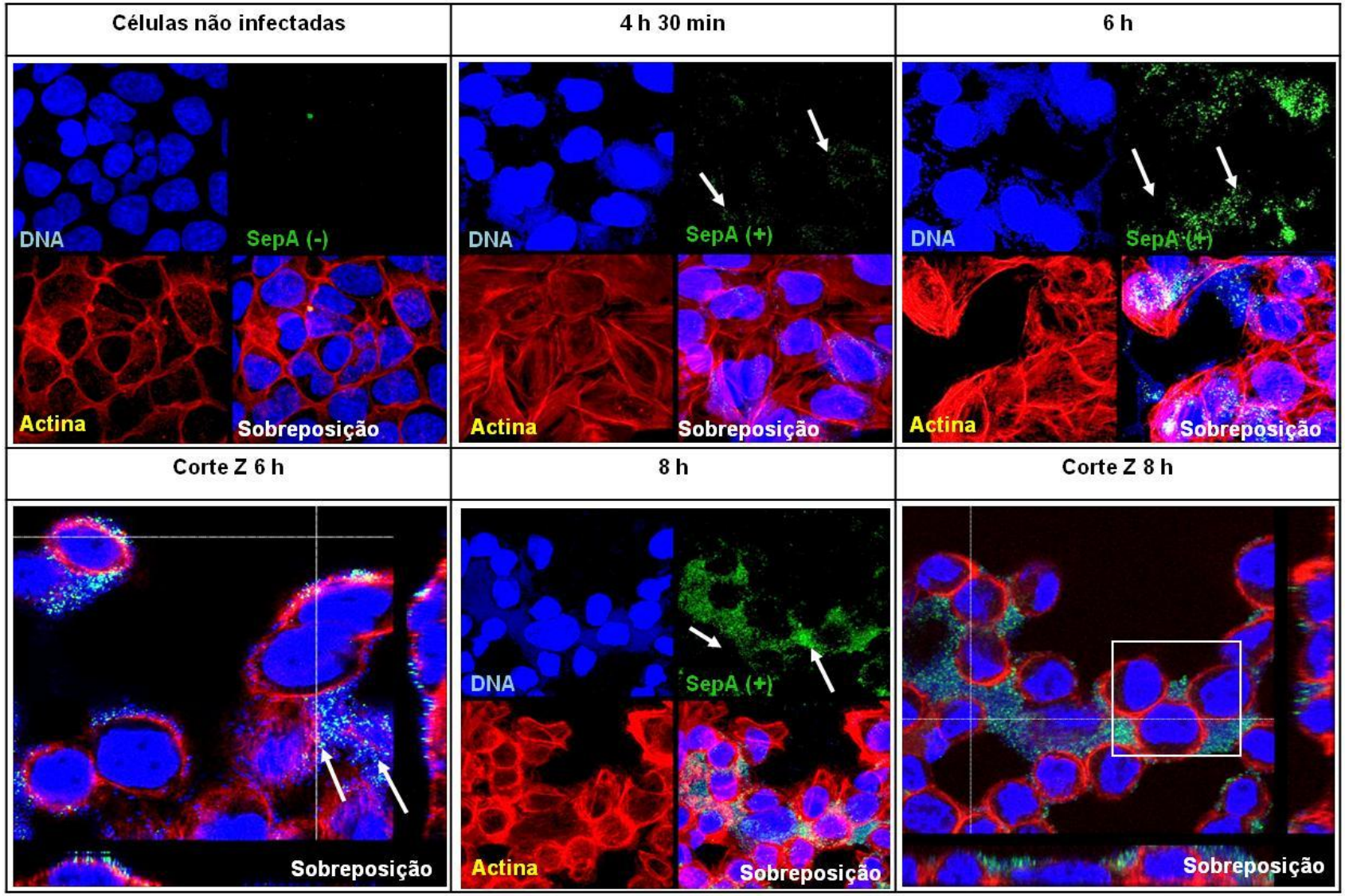
A cepa BA732 escolhida como protótipo de EAEC típica produtora de SepA neste estudo foi mutagenizada no gene *pic* para que a mesma ficasse desprovida de outra SPATE de classe 2. Dessa forma, a cepa BA732::pic apresenta um perfil de expressão de uma única SPATE: SepA (**Figura 28**).

Para analisar a capacidade de secreção de SepA na interação bactéria-célula epitelial, foi realizado o teste de adesão da cepa BA732::pic em células HeLa, linhagem celular que foi sensível à ação de SepA purificada. Esse ensaio foi evidenciado por imunofluorescência com o soro anti-SepA.

Foram analisados três períodos de incubação: 4 h e 30 min, 6 h e 8 h (**Figura 40**). Após 4 h e 30 min a cepa BA732::pic mostrou-se aderente,

iniciando o estabelecimento do padrão de adesão agregativo. A secreção da proteína SepA pôde ser detectada na região de adesão às células HeLa, mas nesse período não foi observado efeito citopático. Após 6 h de interação, o padrão de adesão agregativo mostrou-se bem estabelecido, assim como a secreção de SepA foi detectada na região de adesão, sem evidencia de efeito citopático nas células HeLa. Após 8 h de incubação, além do padrão de adesão agregativo e da secreção de SepA no local da adesão, foi observado efeito citopático.

Figura 40 – Produção de SepA por BA732::pic durante o processo de adesão.



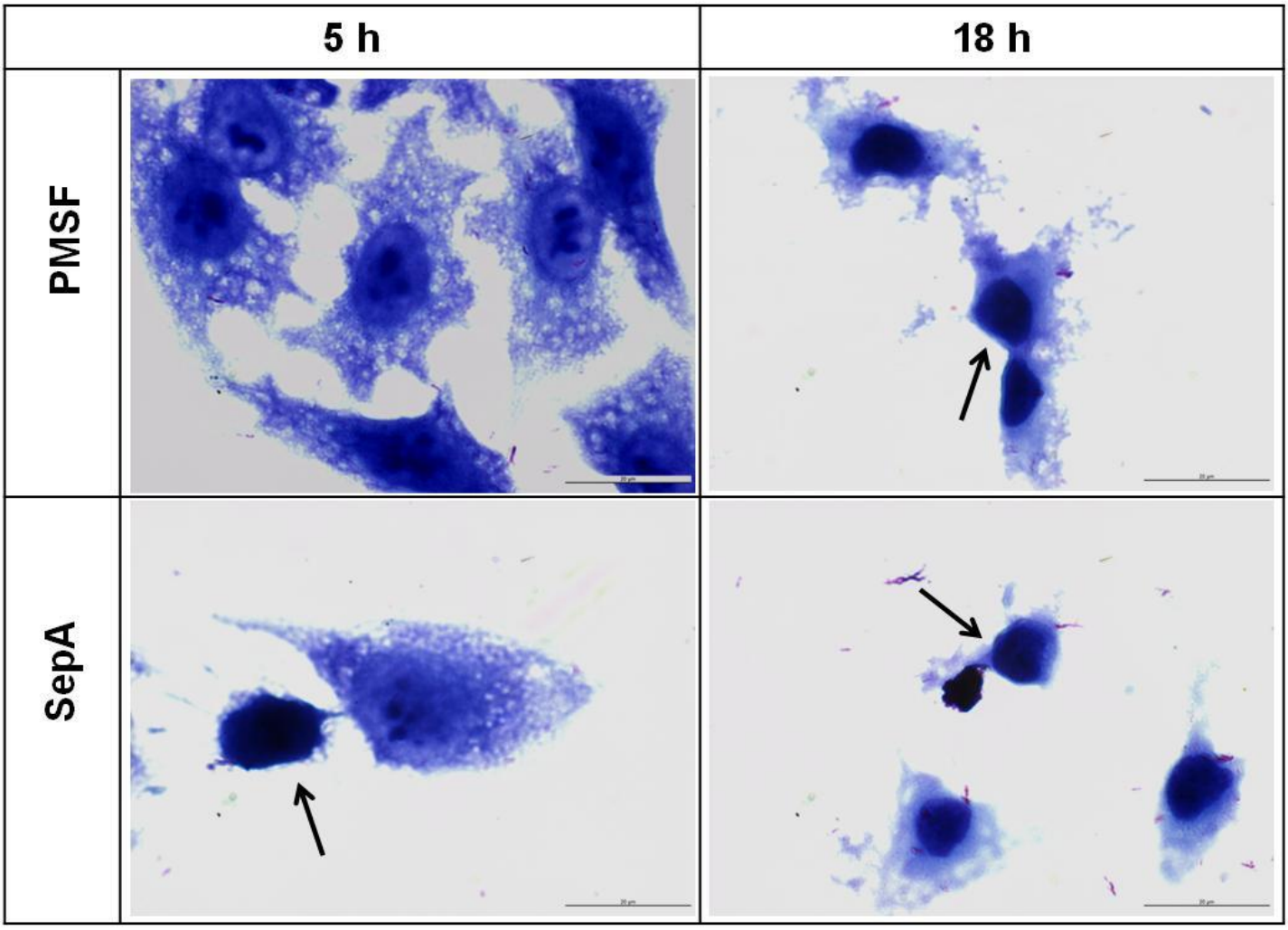
Secreção de SepA por BA732::pic na adesão em células HeLa. As células epiteliais foram infectadas com a cepa BA732::pic na MOI de 0,5, seguido de incubações por 4 h e 30 min, 6 h e 8 h. Após esse período as células foram fixadas, permeabilizadas e tratadas com fluoróforos e anti-SepA. Os filamentos de actina estão evidenciados em vermelho, o DNA das células e das bactérias em azul e a proteína SepA em verde. Nas células não infectadas a marcação em verde não é observada. No ensaio de 4 h 30 min, a proteína SepA secretada por BA732::pic é observada sem causar alteração celular. No ensaio de 6 h, a secreção de SepA também é observada e nenhuma alteração celular foi verificada. No ensaio de 8 h a produção de SepA também foi detectada, mas alterações morfológicas nas células HeLa podem ser observadas, indicando o efeito citopático. Nos cortes em Z se observa a proteína SepA sendo secretada em 6 h. No período de 8 h além da secreção de SepA foi verificado o arredondamento celular (quadrado branco). Aumento de 1.000 x. Visualizado em Microscópio Confocal de Varredura a Laser microscópio confocal TCS SP5 (Leica). Filtros utilizados: UV (excitação de 340-380 nm e emissão de 425 nm), azul (excitação de 450-490 nm e emissão de 515 nm) e verde (excitação de 515-560 nm e emissão de 590 nm).

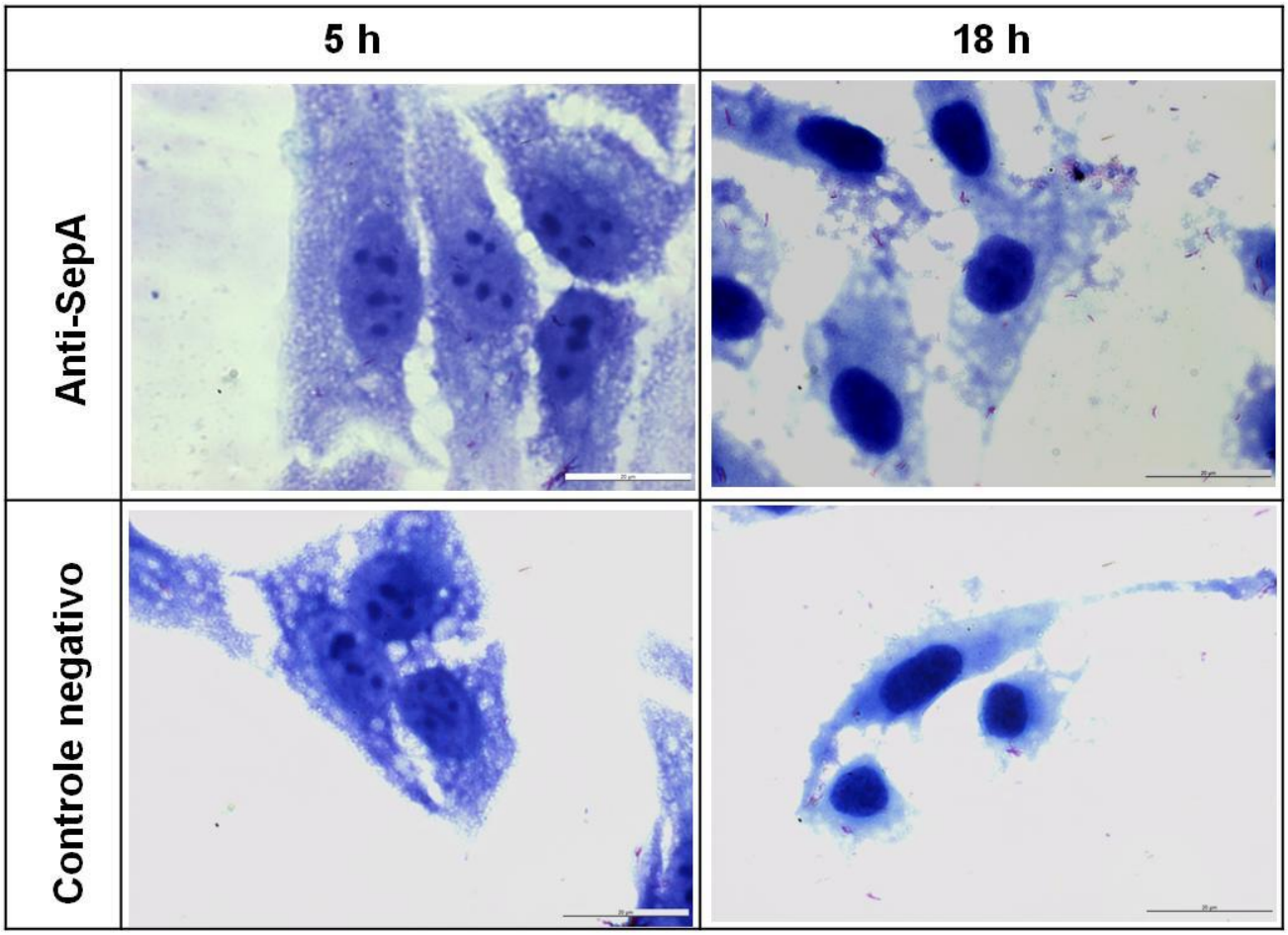
4.12 Neutralização do efeito citopático de SepA em células HeLa

Nesses ensaios foi utilizada a proteína SepA produzida por M90T(pZK15) em interação com células HeLa.

Conforme se observa na **Figura 41**, o inibidor de protease PMSF foi capaz de neutralizar o efeito citopático de SepA no período de 5 h de interação. Nesse ensaio as células apresentaram a morfologia alongada habitual para a linhagem HeLa e não foi observado arredondamento celular. No período de 18 h o efeito causado por SepA não foi neutralizado por PMSF. Esse mesmo ensaio também foi realizado utilizando o soro anti-SepA, o qual foi capaz de neutralizar o efeito de SepA em ambos os períodos de incubação (5 e 18 h).

Figura 41 – Neutralização da atividade de SepA em células HeLa com inibidor de serino protease e anti-soro contra SepA.



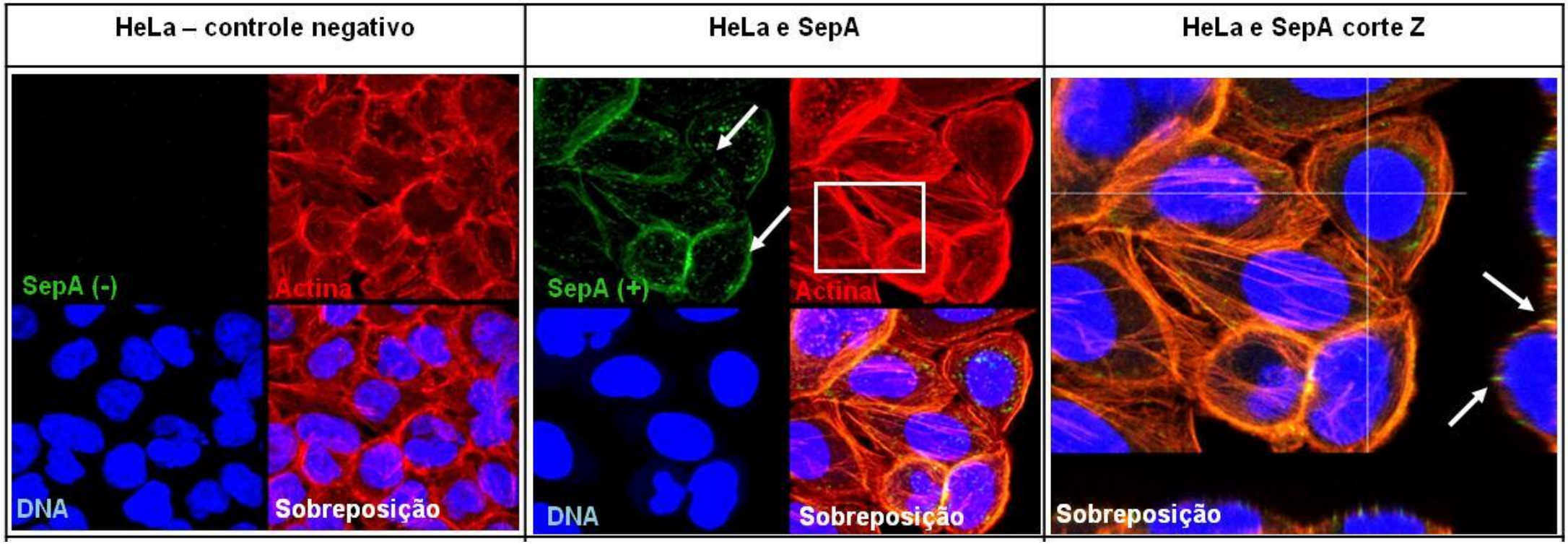


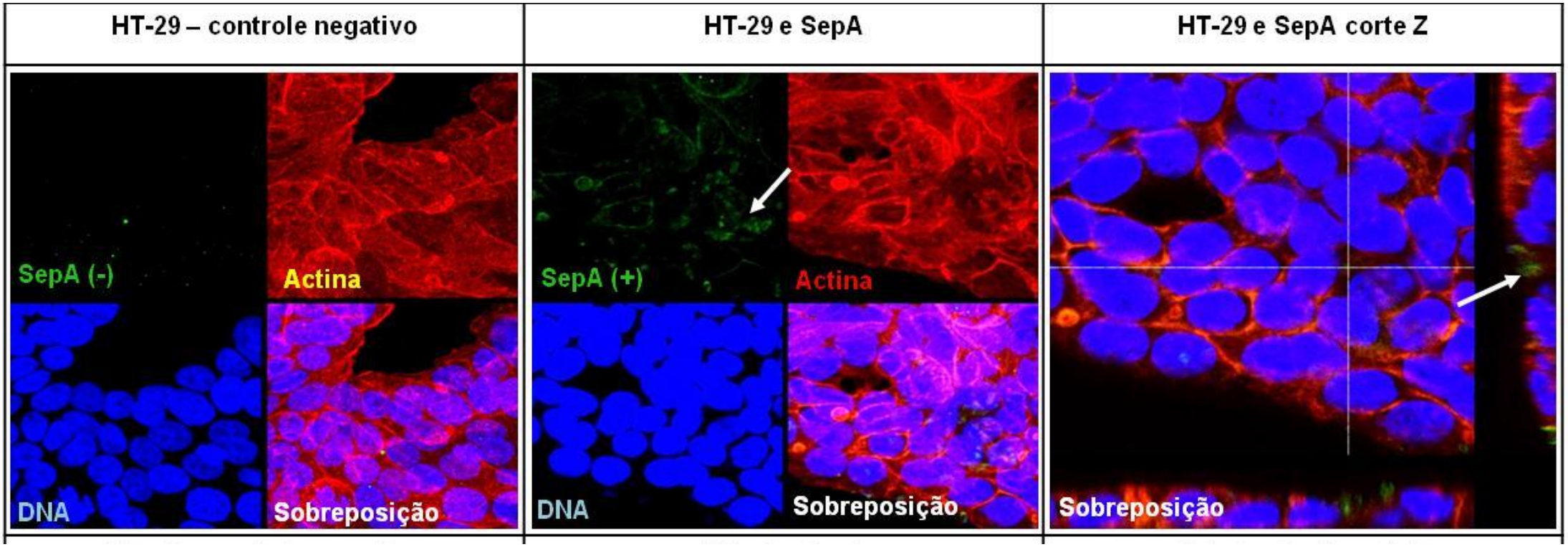
Ensaio de neutralização do efeito citopático de SepA em células HeLa. As células epiteliais foram incubadas com 40 µg/mL de SepA nos períodos de 5 e 18 h, na presença de 100 mM de PMSF ou soro anti-SepA (1:40). Em seguida as células foram fixadas e coradas com May-Grünwald/Giemsa. Nos ensaios utilizando PMSF houve neutralização do efeito de SepA no período de incubação de 5 h, evidenciando as células com a morfologia inalterada. No período de 18 h de interação foram incoclusivos, pois as células do controle negativo apresentavam morfologia alterada. Nos ensaios utilizando anti-SepA foi verificada a neutralização do efeito citopático causado por SepA nos dois períodos de incubação. No controle negativo as células HeLa são observadas com a morfologia habitual. As setas indicam as células com alteração morfológica. Aumento de 1.000 x.

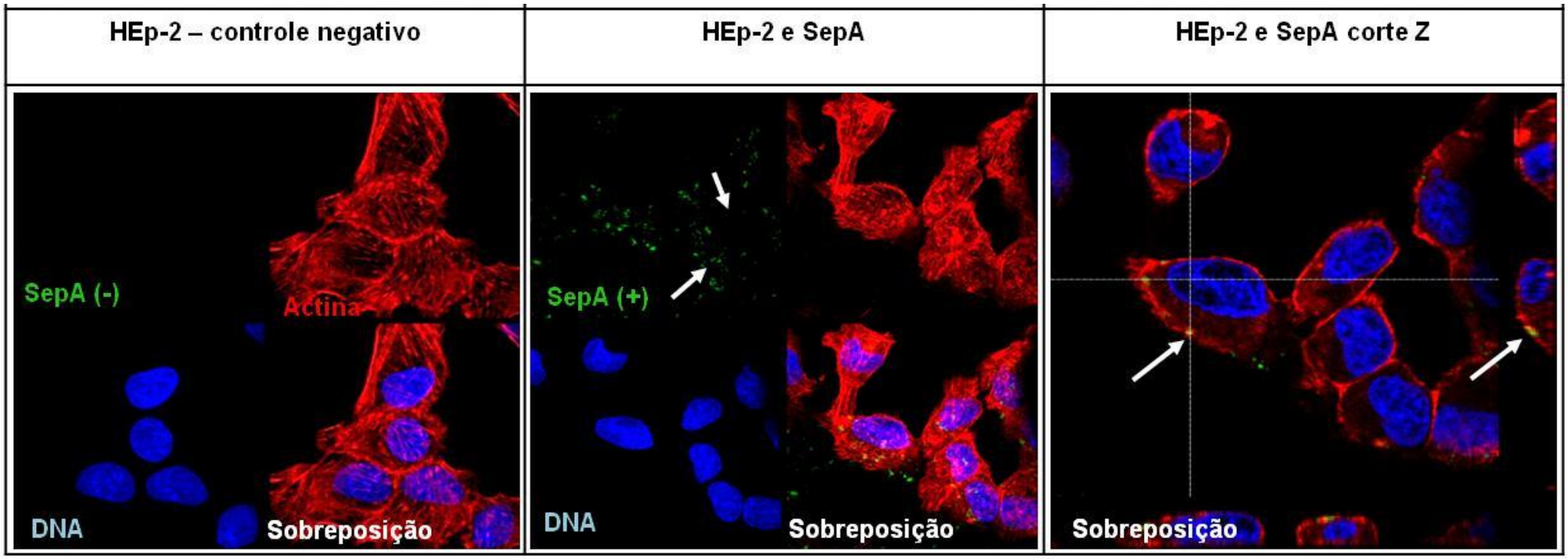
4.13 SepA purificada se liga à membrana citoplasmática das células HeLa, HT-29 e HEp-2

O ensaio de ligação à membrana foi realizado utilizando SepA purificada e as linhagens HeLa, HT-29, HEp-2 e MDCK. Foi observada a ligação de SepA à membrana citoplasmática das células HeLa, HT-29 e HEp-2 (**Figura 42**), e ausência de ligação à membrana da linhagem MDCK (**Figura 43**).

Figura 42 – Ensaio de ligação de SepA à membrana das células epiteliais HeLa, HT-29 e HEp-2.



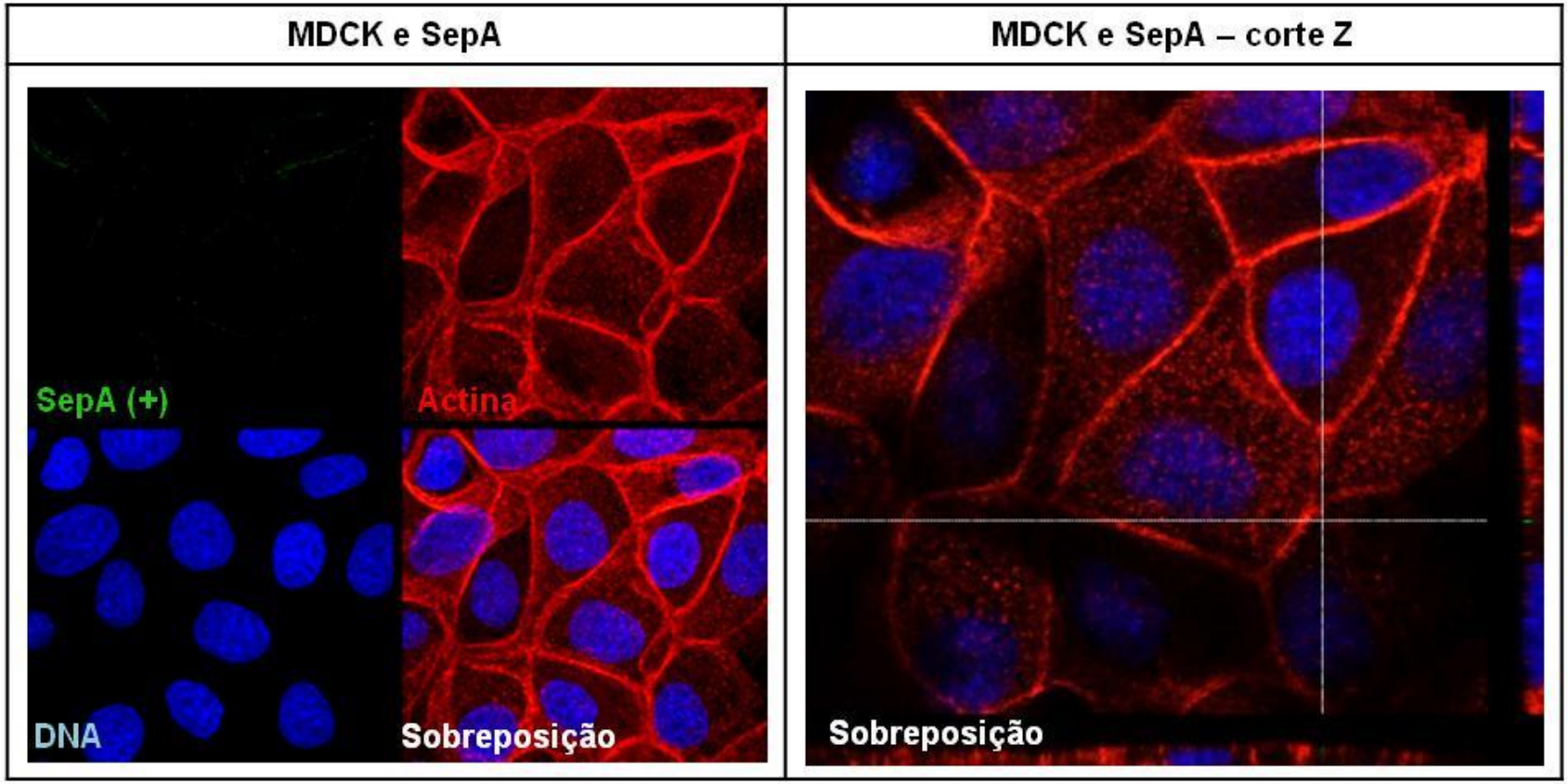

HT-29 – controle negativo
HT-29 e SepA
HT-29 e SepA corte Z
SepA (-)
Actina
DNA
Sobreposição
SepA (+)
Actina
DNA
Sobreposição
Sobreposição



Ensaios de ligação de SepA à membrana citoplasmática das células HeLa, HEp-2 e HT-29. As células epiteliais foram tratadas com 40 µg/mL de SepA, seguido de incubação por 5 h. Após esse período as células foram fixadas, permeabilizadas e tratadas com fluoróforos e anti-SepA. Os filamentos de actina estão evidenciados em vermelho, o DNA das células e da bactéria em azul e a proteína SepA em verde. Nos controles negativos das três linhagens a marcação em verde não é observada. Na interação de SepA com a membrana das três linhagens a proteína SepA foi detectada (setas brancas) na superfície das células. Nos cortes Z os pontos de colocalização de SepA com a membrana das células podem ser observados em coloração amarelada (setas brancas). Aumento de 1.000 x. Visualizado em Microscópio Confocal de Varredura a

Laser microscópio confocal TCS SP5 (Leica). Filtros utilizados: UV (excitação de 340-380 nm e emissão de 425 nm), azul (excitação de 450-490 nm e emissão de 515 nm) e verde (excitação de 515-560 nm e emissão de 590 nm).

Figura 43 – Ensaio de ligação de SepA à membrana das células MDCK.



Ensaios de ligação de SepA à membrana citoplasmática de células MDCK. As células epiteliais foram tratadas com 40 µg/mL de SepA, seguido de incubação por 5 h. Após esse período as células foram fixadas, permeabilizadas e tratadas com fluoróforos e anti-SepA. Os

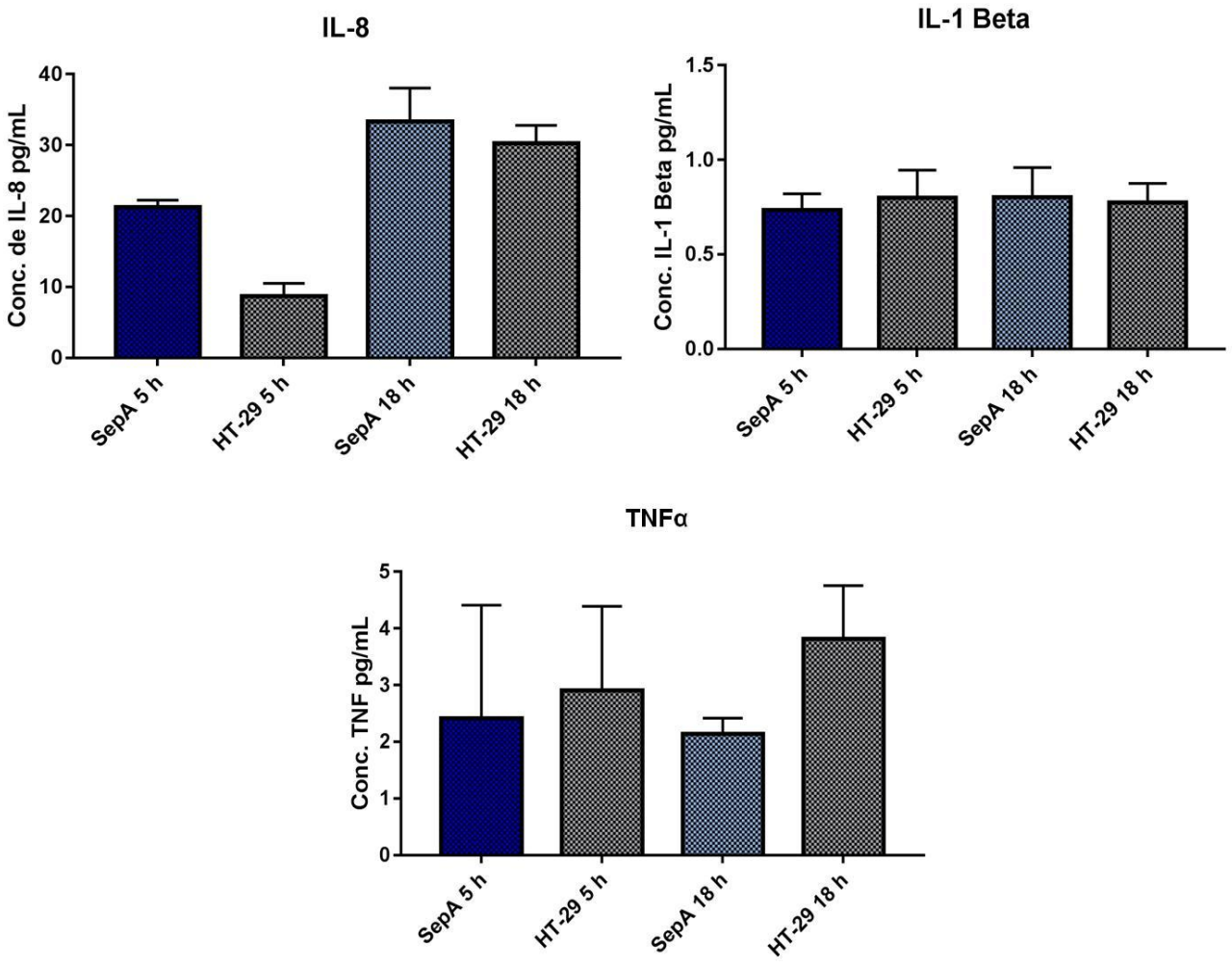
filamentos de actina estão evidenciados em vermelho, o DNA das células e da bactéria em azul e proteína SepA estaria marcada em verde, se fosse detectada. Na interação de SepA com MDCK a proteína SepA não foi detectada na superfície das células. Aumento de 1.000 x. Visualizado em Microscópio Confocal de Varredura a Laser microscópio confocal TCS SP5 (Leica). Filtros utilizados: UV (excitação de 340-380 nm e emissão de 425 nm), azul (excitação de 450-490 nm e emissão de 515 nm) e verde (excitação de 515-560 nm e emissão de 590 nm).

4.14 Produção de interleucinas pela linhagem HT-29 após a interação com SepA

Nessa etapa foi utilizada a proteína SepA purificada da cepa M90T(pZK15) e a linhagem HT-29 de origem intestinal humana, a qual mostrou-se sensível à ação de SepA.

Nos ensaios de dosagem de interleucinas foi observado que a proteína SepA foi capaz de induzir a produção de IL-8 nas células HT-29 após 5 e 18 h de interação (**Figura 44**). As demais interleucinas quantificadas (IL-1β e TNFα) não foram induzidas por SepA nessa linhagem celular.

Figura 44 – Detecção da secreção de IL-8, IL-1β e de TNFα induzida por SepA em células HT-29.



Dosagens de interleucinas produzidas por HT-29 após a interação com a proteína SepA purificada da cepa M90T(pZK15). As células epiteliais foram tratadas com 40 µg/mL de SepA, seguido de incubação por 5 ou 18 h. Após esse período, os sobrenadantes dos cultivos celulares foram recolhidos, filtrados e usados para a detecção de IL-8, IL1-β e TNFα pelo método de ELISA (BD Bioscience). Os ensaios foram realizados em triplicatas biológicas e técnicas. SepA foi capaz de induzir a produção de IL-8 em células HT-29 no período de 5 e 18 h. As interleucinas, IL1-β e TNFα não foram induzidas por SepA nessa linhagem celular.

5 DISCUSSÃO

EAEC é um enteropatógeno que tem como principal definição a capacidade de aderir em células epiteliais cultivadas no característico padrão de adesão agregativo (NATARO; KAPER, 1998). Esse patótipo de DEC foi descrito há três décadas como agente de diarreia aguda em crianças chilenas (NATARO et al., 1987) e atualmente é considerado um patógeno globalmente difundido e associado à diarreia aguda e persistente (HEBBELSTRUP JENSEN et al., 2014). Uma meta-análise da literatura publicada entre 1987 e 2006, mostrou que EAEC está estatisticamente associada à diarreia aguda e persistente em países desenvolvidos e em desenvolvimento, à diarreia em pacientes com HIV e à diarreia do viajante (HUANG et al., 2006). Outro estudo de meta-análise também mostrou associação entre EAEC e diarreia aguda em crianças vivendo em países do sudoeste asiático (PABALAN et al., 2013).

Nos últimos anos, importantes relatos mostraram que EAEC também coloniza crianças assintomáticas de áreas endêmicas em países em desenvolvimento (HEBBELSTRUP JENSEN et al., 2014; LIMA et al., 2018; ROGAWSKI et al., 2017). A persistência de EAEC na mucosa intestinal pode induzir inflamação intestinal crônica, mesmo na ausência de diarreia, reduzindo sua função absortiva e levando à desnutrição e diminuição do desenvolvimento físico e cognitivo (LIMA et al., 2000; OPINTAN et al., 2010; ROCHE et al., 2010). Portanto, o quadro inflamatório induzido por EAEC na mucosa intestinal, no curso da diarreia ou na colonização assintomática, é de grande importância em termos de saúde pública (LIMA; MEDEIROS; HAVT, 2018).

Conforme mencionado anteriormente, a patogênese da infecção intestinal por EAEC pode ser resumida nas etapas de colonização com intensa produção de muco e formação de biofilme, seguida de efeitos enterotóxicos e inflamatórios. Diversas adesinas, toxinas e proteínas secretadas têm sido identificadas em cepas de EAEC, como potenciais fatores envolvidos nessas etapas da patogênese (CROXEN; FINLAY, 2010; GOMES et al., 2016; NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011).

Dentre esses diversos fatores de virulência codificados por EAEC estão as SPATEs, as quais apresentam diversos mecanismos de ação envolvidos na

colonização, toxicidade, evasão e modulação do sistema imune (ABREU et al., 2015; AL-HASANI et al., 2000; AL-HASANI et al., 2009; BENJELLOUN-TOUIMI et al., 1998; DJAFARI et al., 1997; DUTTA et al., 2002; ESLAVA et al., 1998; GUTIÉRREZ-JIMÉNEZ; ARCINIEGA; NAVARRO-GARCIA, 2008; GUYER et al., 2000; HARRINGTON et al., 2009; HENDERSON et al, 1999; LEYTON et al., 2003; MARONCLE et al., 2006; MELLIES et al., 2001; PARHAM et al., 2004; PARREIRA; GYLES, 2003; PATEL et al., 2004; PROVENCE; CURTISS, 1994; TADDEI et al., 2005; RUIZ-PEREZ et al., 2011).

A serino protease SepA que foi o objeto do presente estudo é classificada como uma SPATE de classe 2, que inclui aquelas com atividade imunomoduladora (RUIZ-PEREZ; NATARO, 2014). Na literatura há relatos de sua participação na destruição do tecido epitelial, não há evidencia de efeito citopático em células HEp-2 causado por SepA, essa SPATE também não realiza clivagem de muco e de IgA (BENJELLOUN-TOUIMI et al., 1998; DUTTA et al., 2002).

Cepas de EAEC que albergam o gene *sepA* estão associadas a casos de diarreia com quadros severos (BOISEN et al., 2012; IKUMAPAYI et al., 2017; MEDEIROS et al., 2017). Porém, o papel de SepA na patogênese de EAEC permanece pouco esclarecido. Dessa forma, o presente estudo teve como principal objetivo investigar os mecanismos de ação de SepA em diferentes linhagens celulares.

A primeria etapa do estudo correspondeu à determinação da frequência de genes que codificam SPATEs, incluindo *sepA*, em uma grande coleção de EAEC isolada em nosso meio (ANDRADE et al., 2017). Os genes *pic* e *sat* foram os mais frequentes, corroborando dados de estudos prévios (HOSSEINI-NAVE et al., 2018; TAPADER, 2014; BOISEN et al., 2012; BOISEN et al., 2009; JENKINS, et al., 2006; CZECZULIN et al., 1999). O gene *sepA* foi detectado em 13,5% das cepas, estando entre os cinco mais frequentes. Essa frequência foi menor do que a encontrada em cepas de EAEC isoladas em outras localidades, nas quais as frequências variaram entre 21 e 39% (BOISEN et al., 2009; BOISEN et al., 2012; DURAND et al., 2016; HAVT et al., 2017; HEBBELSTRUP JENSEN et al., 2017; LIMA et al., 2013).

Zude et al. (2014) verificaram a presença do gene *sepA,* assim como, de outros genes codificadores de ATs em cepas de *E. coli* causadoras de

infecções intestinais no geral, as quais foram nomeadas como IPEC (*E. coli* enteropatogênica intestinal), em cepas de ExPEC e em *E. coli* não patogêncicas. Nesse estudo *sepA* esteve presente em 19,2% das cepas de IPEC e em 55,6% das cepas de ExPEC. Em comparação com *pic* e *sat,* ATs que também são encontradas em ExPEC, *sepA* foi o gene mais prevalente dentre as cepas estudadas (ZUDE et al., 2014).

O gene *sepA* também foi detectado em cepas causadoras de septicemia neonatal (TAPADER et al., 2014), no estudo mencionado *sepA* foi verificado em 11% das cepas, sendo o segundo gene mais prevalente seguido de *espP* que foi detectado em 13% das cepas.

Quando as cepas de EAEC foram analisadas separadamente nos grupos típica e atípica, a presença de *sepA* foi significantemente associada às cepas atípicas. Considerando que a presença de *sepA* foi associada à diarreia e à severidade da doença (BOISEN et al., 2012; IKUMAPAYI et al., 2017; MEDEIROS et al., 2017), o achado de tal associação com as cepas atípicas de nossa coleção aponta para o papel patogênico desse subgrupo de EAEC. De fato, alguns estudos epidemiológicos mostram que a frequência de EAEC atípica é superior a de EAEC típica e significativamente associada à diarreia (HUANG et al., 2007; JIANG et al., 2002; MONFARDINI, 2012). Além disso, cepas de EAEC atípica foram responsáveis por surtos de diarreia na Sérvia (COBELJIĆ et al., 1996) e Japão, sendo que neste último foram acometidas 2.697 crianças (ITOH et al., 1997).

Os patógenos que carreiam SPATEs geralmente apresentam genes combinados de classe 1 e 2 (BOISEN et al., 2009; RASKO et al., 2011). Resultado similar foi verificado no presente estudo, sendo que 59% dos perfis genéticos seguiram esse padrão de genes de SPATEs de classe 1 e 2, em diversas combinações. O perfil genético *pet*/*pic* foi o mais frequente (11,4%) nas cepas da coleção estudada, o qual é semelhante ao apresentado pela cepa protótipo de EAEC 042 (CHAUDHURI et al., 2010).

O gene *sepA* foi detectado em associação com outros genes (classe 1 ou 2) em 22 (11,4%) cepas, sendo a combinação *sepA*/*pic* a mais frequente (4,7%). Esse dado está de acordo com o relatado por Boisen et al. (2009) ao avaliar uma coleção de EAEC isoladas de diferentes países.

A distribuição de EAEC em filogrupos tem se mostrado uma característica heterogênea, ao se comparar cepas de diferentes localidades (ALI et al., 2014; BOISEN et al., 2012; FRANÇA et al., 2013; KHALIL et al., 2016; SOBIESZCZAŃSKA et al., 2011). No presente estudo foi observado que a maioria das cepas estudadas pertenceu ao filogrupo A (40,4%), seguido do filogrupo B1 (23,3%) e B2 (10,4%). Em outro estudo realizado no Brasil, foi verificada a distribuição de EAEC de maneira uniforme nos filogrupos A e D (FRANÇA et al., 2013). Por outro lado, outros estudos apontam o filogrupo B2 (KHALIL et al., 2016; SOBIESZCZAŃSKA et al., 2011) ou o filogrupo D (ALI et al., 2014; BOISEN et al., 2012) como os mais prevalentes em cepas de EAEC. É importante mencionar que esses autores utilizaram o método *triplex* PCR (CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000), ao passo que no presente estudo a metodologia utilizada foi a *quadruplex* PCR (CLERMONT et al., 2013), técnica mais recente para determinação de filogrupos de *E. coli*. Este dado novamente corrobora a conhecida heterogeneidade genética de EAEC (HEBBELSTRUP JENSEN, 2014; NATARO et al., 1995).

As cepas que albergavam o gene *sepA* aqui estudadas foram distribuídas em 4 filogrupos, sendo a maioria pertencente ao filogrupo B1 (42,3%), seguido dos filogrupos A (26,9%), D (15,4%) e B2 (11,5%). As cepas de *E. coli* diarreiogênicas são distribuídas principalmente nos grupos A, B1 e E, enquanto os filogrupos B2 e D incluem geralmente as cepas de *E. coli* de origem extraintestinal e as cepas comensais são mais relacionadas aos filogrupos A e B1 (CLERMONT et al., 2013; RUSSO;JOHNSON, 2001).

A pesquisa de genes que codificam outras SPATEs, além de *sepA*, foi realizada na coleção de EAEC na etapa de seleção de uma cepa protótipo para o estudo de SepA no contexto de uma EAEC. Isso decorre do fato de que as serino proteases dessa família apresentam massas moleculares e atividades biológicas semelhantes (RUIZ-PEREZ; NATARO, 2014). Portanto, a presença de outros genes de SPATEs na mesma cepa poderia gerar dificuldades na etapa de purificação de SepA, com decorrente interferência nas análises de interação com células epiteliais *in vitro*.

Nenhuma das cepas da coleção de EAEC estudada se encaixou no perfil genético ideal para o estudo, ou seja, uma cepa de EAEC típica (albergando *aggR*) que apresentasse padrão de adesão AA e produzisse

somente a proteína SepA. Com isso, duas cepas de EAEC típicas (BA198 e BA732) foram selecionadas para a continuidade do estudo. Entretanto, além de *sepA* essas cepas albergavam *pic* e a produção da serino protease Pic foi detectada por *immunoblotting* em ambas.

Dessa forma, houve a necessidade da obtenção de um mutante isogênico em *pic.* A primeira técnica utilizada para a tentativa de obtenção desse mutante foi a mutagênese sítio dirigida com o sistema de recombinases codificadas pelo fago λ, de acordo com a metodologia descrita por Datsenko et al. (2000). Entretanto, o mutante em *pic* não foi obtido usando essa metodologia, devido a problemas na inserção ou retirada dos vetores. Na cepa BA198 não foi possível inserir os vetores pKOBEGapra ou pKD46, disponíveis para esse tipo de mutagênese (SAMPAIO et al., 2009; DATSENKO et al., 2000), e por esse motivo a cepa foi excluída do estudo. Foi possível inserir o vetor pKOBEGapra na cepa BA732, mas não retirá-lo, o que levaria à ocorrência de mutações não controladas no genoma da BA732 (DATSENKO et al., 2000).

Sendo assim, uma nova estratégia de mutação foi utilizada, com base na técnica de recombinação homóloga mediada pelo vetor suicida pJP5603 (PENFOLD; PEMERTON,1992, RIEDEL et al., 2013). O mutante em *pic* (BA732::pic) foi assim obtido e a correta inserção foi confirmada por sequenciamento, bem como a perda da produção de Pic confirmada por *immunoblotting*.

Uma vez de posse da cepa protótipo de EAEC típica para produção de SepA apenas (BA732::pic), foi iniciada a etapa de obtenção de um mutante em *sepA*, ou seja um duplo mutante ::pic/::sepA na BA732. Esse duplo mutante seria empregado em comparação com a cepa produtora de SepA (BA732::pic) nos ensaios de interação com células epiteliais cultivadas. Para isso, foi novamente utilizada a técnica de deleção por recombinação pelo sistema λ Red (DATSENKO et al., 2000) utilizando os vetores pKOBEGapra e pKD3, porém com algumas alterações de protocolo (Fernando Navarro-Garcia, CINVESTAV – comunicação pessoal). Uma das alterações empregadas proporcionou maior eficiência na eletrocompetência das bactérias (GONZALES et al., 2013). A segunda alteração referiu-se à concentração de 12,5 µg/mL de cloranfenicol para a seleção dos mutantes carreadores de pKD3 e a terceira

consistiu na adição de 1 mM de L-arabinose às placas de cloranfenicol, com a intenção de continuar induzindo a expressão das recombinases do pKD3. Entretanto, mesmo com estas modificações o duplo mutante não foi obtido. A experiência do nosso grupo com a técnica de mutação pelo sistema λ Red mostra que características do *background* genético de algumas cepas não permitem a mutação por essa técnica.

A análise *in silico* do sequenciamento do genoma completo da cepa BA732 permitiu determinar a presença de um plasmídeo que apresenta 99% de identidade e 96% de cobertura com o plasmídeo pO86A1 (número de acesso no GenBank: AB255435.1), que é semelhante ao pAA. Além disso, o plasmídeo presente na cepa BA732 também apresentou identidade de 94% com o plasmídeo pAA2 (número de acesso no GenBank: FN554767.1) com 58% de cobertura. A presença deste plasmídeo na cepa BA732 foi provavelmente o impedimento para que a mutação utilizando o sistema λ Red fosse bem sucedida.

Embora a mutação em *pic* na cepa BA732 tenha ocorrido, a produção de proteínas com mobilidade eletroforética similares ao predito para SepA em sobrenadante de cultura de BA732::pic mostrou-se muito discreta, mesmo alterando alguns parâmetros do cultivo. A purificação de SepA nativa era um dos objetivos iniciais do presente estudo, mas as tentativas com a cepa de EAEC não se mostraram promissoras.

Com isso, a cepa de *S. flexneri* M90T foi utilizada como alternativa para a purificação de SepA. Essa cepa alberga apenas o gene *sepA* dentre as SPATEs e secreta essa protease em sobrenadante de cultura em alta concentração (BENJELLOUN-TOUIMI; SANSONETTI; PARSOT, 1995).

Para justificar o emprego da purificação de SepA a partir da M90T foi necessário a realização do sequenciamento completo do gene *sepA* das cepas de EAEC BA198 e BA732, a fim de comparar as sequências preditas de aminoácidos dessas cepas (**Apêndice C**). As análises do sequenciamento mostraram algumas diferenças nas sequências de aminoácidos de SepA das cepas de EAEC e de *S. flexneri* M90T, entretanto a identidade das sequências de aminoácidos foi de 97%. A maioria das trocas de aminoácidos ocorreu na porção da sequência que corresponde ao domínio passageiro, mas correspondem a trocas entre aminoácidos do mesmo grupo. O motivo Gly-Asp-

Ser-Gly-Ser, característico de serino protease, e os resíduos His/Asp/Ser, envolvidos na formação da tríade catalítica (RUIZ-PEREZ; NATARO, 2014), mostraram-se conservados entre as três cepas. Além disso, a análise das estruturas terciarias preditas das proteínas SepA produzidas pelas três cepas mostrou-se altamente similar. Esses achados permitiram a continuidade do estudo usando SepA purificada da cepa M90T.

Para a purificação de SepA foram utilizadas três estratégias. Na primeira estratégia, utilizando a técnica de exclusão molecular, não foi possível purificar a proteína. Em nenhuma das frações obtidas observou-se a presença de fração proteica com massa molecular relativa de 110 kDa, correspondente à proteína SepA.

Na segunda estratégia houve agregação da proteína após a purificação, o que foi observado nos ensaios de interação de SepA com células epiteliais visualizados por imunofluorescência, realizados no CINVESTAV (México). A atividade de serino protease após essa purificação foi previamente evidenciada por FRET (clivagem de peptídeos específicos), mas a agregação no momento da interação com as linhagens celulares poderia induzir respostas alteradas frente à SepA.

Alguns fatores como temperatura, força iônica e exposição à mudança de estado da matéria podem gerar agregação proteíca (BERRIL et al., 2011). A alteração química mais comum que gera agregação de proteínas é a formação ou mudança de pontes dissulfeto (FINKE et al., 2000), tais modificações podem resultar em exposição de resíduos hidrofóbicos da proteína causando a subsequente agregação (PATRO; FREUND; CHANG, 2002; WAMG, 1999).

A agregação de proteínas recombinante purificadas é um problema comum em sistemas biológicos, na pesquisa experimental, industrial e médica (BONDOS; BICKNELL, 2002). Como solução para esse problema, alguns co-solventes como a glicina, são utilizados para evitar a agregação proteica no processo de purificação, principalmente se a proteína está em corpúsculos de inclusão (BONDOS; BICKNELL, 2003; LU et al., 2001). A segunda estratégia de purificação de SepA na forma nativa e na presença de glicina não inibiram a formação de agregados.

Com isso, foi aplicada a terceira estratégia de purificação, baseada na construção da cepa M90T transformada com o clone mínimo de expressão de

SepA, denominado pZK15 (BENJELLOUN-TOUIMI; SANSONETTI; PARSOT, 1995). Essa construção permitiu a superprodução de SepA em sobrenadantes de cultura e, além do alto rendimento, não houve a formação de agregados. Dessa forma, o estudo progrediu para a caracterização da interação de SepA com células epitelias *in vitro*.

Seis linhagens de células epiteliais cultiváveis foram utilizadas (HEp-2, HeLa, Caco-2, HT-29, Y-1 e MDCK), sendo que alterações morfológicas após a interação com SepA foram observadas em HeLa, HT-29 e Y-1. Cabe salientar que a linhagem MDCK foi utilizada como controle negativo de ligação de SPATEs (NAVA-ACOSTA; NAVARRO-GARCIA, 2013). Em resumo as alterações morfológicas observadas quando as culturas celulares foram coradas com May-Grünwald/Giemsa foram: o descolamento celular, em graus distintos dependendo da linhagem celular e alteração na morfologia com arredondamento celular. As concentrações de SepA utilizadas foram 20 µg/mL e 40 µg/mL, sendo que os efeitos relatados foram avaliados na concentração de 40 µg/mL. Essa concentração foi escolhida tendo por base outros estudos com SPATEs (DUTTA et al., 2002; BETANCOURT-SANCHEZ; NAVARRO-GARCIA, 2009).

Na literatura existe o relato de análises de SepA apenas com células HEp-2 e nessa linhagem nenhuma alteração foi observada (DUTTA et al., 2002). Os resultados aqui obtidos confirmaram que SepA não tem atividade em células HEp-2.

Devido ao efeito observado em Y-1 após 18 h (descolamento e arredondamemto celular) ter sido semelhante ao observado no controle negativo, essas análises não puderam ser consideradas. Outros estudos quanto à concentração e o tempo de incubação de SepA com essa linhagem são necessários para confirmação deste dado.

As células HeLa apresentam morfologia alongadas e na mitose são esféricas (BOATMAN; CARTWRIGHT; KENNY, 1976). Isolada de uma paciente com câncer de colo de útero, essa linhagem é amplamente utilizada na pesquisa científica (MASTERS et al., 2002). As células HeLa frequentemente geram contaminação em outras células em cultura. Existem diversas linhagens contaminadas com HeLa que são utilizadas com frequência

em pesquisa científica, como as células HEp-2 (FJELDE et al., 1955) que também foram utilizadas no presente estudo.

HT-29 é uma célula epitelial intestinal originária de uma paciente com câncer no colón (FOGH; TREMPE, 1975), que apresentam morfologia arredondada e quando diferenciada apresenta a morfologia normal de células epteliais intestinais com microvilos e junções intercelulares (MARTÍNEZ-MAQUEDA et al., 2015). Essa linhagem celular manteve algumas características da célula normal do colón, como receptores de hormônios (ROSSELIN, 1989), a capacidade de polimerização e de secreção de muco (FANTINI et al., 1986; ROUSSET, 1986).

As células HT-29 têm sido utilizadas em estudos sobre absorção de nutrientes (GURI; LI; CORREDING, 2017; MARESCA et al., 2002; FERRARETTO et al., 2001; WIREN et al., 1998), multiresistência à drogas (KHALEEL et al., 2016; IOVINE et al., 2016; TAO et al., 2016; LAVIE et al., 1998), expressão de integrinas (SHAO et al., 2018; BOUDJADI et al., 2016; GOUT et al., 2001), fator de crescimento semelhante à insulina (KIM; NAM, 2018; ZHANG et al., 2015; CORKINS et al., 2002; KIM et al., 2003) e de metabolismo de lipídeos (YAP et al., 2018; MADESH et al., 1996; FIUCCI et al., 2000; PACHA; LISA; MIKSIK, 2002).

Os ensaios de interação de SepA com as células HeLa e HT-29 foram também analisados por imunofluorescência, podendo analisar de forma mais detalhada as estruturas celulares. As mesmas alterações morfológicas foram observadas, mas pôde-se verificar que SepA se liga à membrana citoplasmática dessas células e não é internalizada.

Conforme abordado acima, as alterações morfológicas observadas na interação das linhagens celulares HeLa e HT-29 incubadas com 40 µg/mL de SepA durante 5 h indicaram indução de efeito morfológico devido à ligação dessa protease à membrana citoplasmática das células epiteliais.

Um estudo recente sobre a ação de SepA utilizando *S. flexneri* (M90T) interagindo com linhagens celulares T84 (célula humana de câncer do cólon) ou HCT8 (célula humana de câncer ileocecal coloretal) polarizadas e em modelo de epintestino, verificou que esta serino protease é essencial para a disruptura do epitélio intestinal. Nesse estudo os autores observaram que o mutante deletado em *sepA* (M90T∆sepA) tem menor capacidade de causar a

ruptura da barreira intestinal, já que M90T selvagem é recuperada em grande número da porção basolateral do epitélio, enquanto a cepa M90T∆*sepA* teve diminuição no trânsito da porção apical para a basolateral. (MALDONADO-CONTRERAS et al., 2017).

Esses autores mostraram também que a protease SepA age indiretamente na ativação de cofilina por meio dos ensaios de epintestino analisados por imunoflourescência, demonstrando a co-localização de cofilina com a cepa M90T, o mesmo não ocorreu com o mutante M90T∆*sepA* (MALDONADO-CONTRERAS et al., 2017). A cofilina é uma proteína eucariótica que em sua forma desfosforilada despolimeriza filamentos de actina, desarranjando o citoesqueleto (MIZUNO, 2013). Promove a abertura das junções oclusivas rompendo os filamentos de actina resultando no aumento da permeabilidade da barreira do epitélio intestinal. (IVANOV et al., 2004; SHIOBARA et al., 2013).

As proteínas LIM quinases (LIMK1 e 2) (MIZUNO, 2013; YANG et al., 1998) inativam a cofilina por fosforilação da molécula, há outro grupo de proteínas denominadas *related testicular protein kinases* (TESK) que também participam da inativação de cofilina (MIZUNO, 2013). Quando fosforilada a cofilina é incapaz de se ligar aos filamentos de actina (MALDONADO-CONTRERAS et al., 2017). A ativação de cofilina é dada pela desfosforilação a partir da ação das proteínas da família das *sligthshot* fosfatases (SSH) (MIZUNO, 2013).

A dinâmica da actina pela via cofilina/LIMK durante a disruptura do epitélio, divisão celular, motilidade e morfogênese é bem conhecida na literatura (NAGUMO et al., 2008; SHIOBARA et al., 2013; NISHITA et al., 2015; YANG et al., 1998).

A ativação da cofilina por SepA se dá por intermédio da diminuição no níveis de LIMK1 que como mencionado anteriormente inativa a cofilina (MIZUNO, 2013). Algumas moléculas exógenas, assim como SepA, agem na diminuição dos níveis de LIMK1. Uma delas é o dialil dissulfeto, uma molécula anticancerígena que inibe a expressão e fosforilação de LIMK1 (SU, et al., 2017; ZHOU et al., 2013). Outro exemplo é um serquiterpeno (hidrocarboneto geralmente produzido por vegetais) de *Chloranthus serratus*, que é uma planta de uso medicinal. Este serquiterpeno inibe a expressão de LIMK1 em células

de câncer de mama (FU, et al., 2018). Dentre os inibidores endógenos de LIMK1 há o supressor de tumor LATS1 (*large tumor supressor* 1), a niscarina e a arrestina β ou ARRB1 (CHEN; MACHARA, 2006; ZOUDILOVA et al., 2007).

Além de SepA, não há descrição na literatura de outra serino protease que esteja envolvida com a regulação da expressão ou inativação de LIMK1.

Tendo em vista que SepA ativa a cofilina de forma indireta, as alterações morfológicas observadas no presente estudo em células HeLa e HT-29 podem ter sido ocasionadas pela despolimerização de actina nessas células, a partir da ligação de SepA à membrana celular.

Resumidamente, as alterações morfológicas induzidas por SepA foram: em células HeLa células foram observadas em formato esférico, após 5 h de interação e essa alteração foi mais evidente após 10 h e permaneceu no período de 18 h. E nas células HT-29 foi observado um maior arredondamento celular com aparente acúmulo de actina na incubação com SepA por 5 h, sendo que após 18 h essa alteração morfológica permaneceu.

Os efeitos celulares de SepA em períodos muito prolongados de incubação (18 h) poderiam ter sido decorrentes da pinocitose de SepA pelas células, entretanto, os ensaios de imunofluorescência detectando SepA nesse período de incubação não mostraram SepA internalizada.

Nos ensaios de viabilidade celular foi observado que após 5 h de incubação SepA-HeLa não houve morte celular, que ocorreu em baixas porcentagens após 18 h de incubação. Já na linhagem HT-29, os resultados foram diferentes, sendo que no período de 5 h houve ~33% de morte celular e no período de 18 h não houve morte. Esse dado pode ser relacionado com a mesma forma de ação da toxina termo-lábil (LT) de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), onde após 16 ou 24 h de interação a toxina deixa de causar alteração morfológica em células Y-1 (DONTA; MOON; WHIPP, 1974). Isso sugere que SepA age de maneira semelhante a LT em relação ao tempo de ação em HT-29, sendo considerada assim uma proteína com efeito citopático.

Em um estudo verificando a capacidade de dialil dissulfeto como inibidor de proliferação de HT-29, foi observado resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo quanto à porcentagem de morte celular analisada por MTT. Após o período de 24 h de interação do dialil dissulfeto com HT-29 os autores observaram 68,3% de morte celular (HUANG et al., 2011),

porcentagem semelhante a verificada nesse estudo após a interação com 40 µg/mL de SepA por 5 h com HT-29 (67,29%).

É importante mencionar que SepA se ligou à membrana das células HEp-2 (linhagem contaninada com HeLa), mas não causou dano morfológico, indicando a possibibilidade de SepA estar se ligando ao mesmo receptor que aquele no qual se liga à membrana das células HeLa, porém por alguma característica de HEp-2 a cascata de ativação de cofilina não ocorreu.

Em resumo, SepA provocou efeitos citopáticos observados em células HeLa e HT-29, e esses efeitos foram neutralizados pela incubação de SepA com PMSF (inibidor de serino protease) e o soro anti-SepA policlonal. Além disso, a protease não foi internalizada nas células eucarióticas, tanto nos ensaios de incubação com a proteína purificada como na secreção de SepA no momento da adesão bacteriana.

Estes dados indicam que SepA é uma proteína que altera o metabolismo celular agindo indiretamente no citoesqueleto via ativação da cofilina. Mais estudos são necessários para que se entendam os detalhes do mecanismo de ação dessa SPATE de classe 2 sobre às células epitelias, iniciando pela identificação do receptor eucariótico e a identificação das vias de ativação da cofilina a partir da ligação de SepA ao seu receptor.

Nos estudos em que foi avaliada a resposta inflamatória causada por EAEC foi demonstrado que ocorre um aumento dos níveis de lactoferrina fecal, IL-8 e IL-1β. (SANCHEZ-VILLAMIL; NAVARRO-GARCIA, 2015) Por exemplo, em estudos utilizando células Caco-2 não polarizadas, foi confirmado que a infecção por EAEC induz IL-8 e que o plasmídeo pAA foi necessário para a ocorrência do efeito inflamatório (STEINER et al., 1998). Em outro estudo deste mesmo grupo, foi mostrado que a mutação no gene *fliC* diminuiu a liberação de IL-8, definindo assim a flagelina H18 com o principal estímulo pró-inflamatório (STEINER et al., 2000). Corroborando esses dados, AAF/II mostrou-se um potente indutor de IL-8, tanto em células polarizadas T84 como em células HEp-2 (EDWARDS et al., 2011; HARRINGTON et al., 2005). Deste modo, esses importantes fatores de virulência parecem ser determinantes na ativação da resposta inflamatória induzida por EAEC (SANCHEZ-VILLAMIL; NAVARRO-GARCIA, 2015), embora não sejam os únicos indutores desse processo.

Como já mencionado anteriormente, após a colonização de EAEC na mucosa intestinal há a secreção de diversas enterotoxinas e citotoxinas, dentre elas as várias SPATEs. Em relação à resposta inflamatória frente a essas serinoproteases, foi mostrado que Pic, uma SPATE de classe 2 ou imunomoduladora, tem como alvo uma variedade de proteínas de adesão de leucócitos humanos e sua especificidade está restrita a glicoproteínas ricas em ligações do tipo O, como CD43, CD44, CD45, CD93, CD162 e a quimiocina fractalquina, todas essas glicoproteínas estão envolvidas no tráfego e migração de leucócitos e inflamação. De fato, Pic prejudicou a quimiotaxia e a migração de leucócitos (RUIZ-PEREZ et al., 2011).

Neste contexto, sendo SepA também uma SPATE de classe 2 ou imunomoduladora, decidiu-se no presente estudo analisar a indução da produção das interleucinas IL-1β, TNFα e IL-8 por SepA. Para tanto, foram empregadas células HT-29, uma vez que foi a única de origem intestinal em que SepA induziu alteração morfológica, dentre as células aqui estudadas.

Vale ressaltar que IL-1β é uma interleucina pró-inflamatória do sistema imune inato, produzida por macrófagos, neutrófilos, células endoteliais e algumas células epiteliais, de ação parácrina e raramente endócrina, que participa da diferenciação de células T produtoras de IL-17 e é induzida por infecções bacterianas e fator de necrose tumoral (TNF) (ABBAS, 2015; BENT et al., 2018; PALOMINO; MARTI, 2015).

O fator de necrose tumoral, ou TNF, é um mediador da resposta inflamatória aguda a bactérias e outros microrganismos infecciosos. O nome desta interleucina deriva de sua identificação original como um fator que causava necrose tumoral. É produzido por macrófagos, células dendríticas e outros tipos celulares e muitos tipos celulares em apoptose (ABBAS, 2015; STEELAND et al., 2018).

IL-8 uma interleucina quimiotáxica produzida por macrófagos, células endotelais e epiteliais, que age na migração de neutrófilos, basófilos e linfócitos (BAGGIOLINI; WALZ; KUNKE, 1989; GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2002 ROSSI; ZLOTNIK, 2000). A sua produção é induzida por IL-1 β, TNF e flagelina (KOLIOS et al., 1996; STEINER et al., 2000). Devido as suas propriedades pró-inflamatórias é um importante fator em doenças inflamatórias e autoimune (HARADA et al., 1994; KOCH et al., 1992; SMYTH et al., 1991). Em ambiente

tumoral, IL-8 pode ser secretada por diversos tipos celulares presentes de forma intrínseca ao tumor, tais como células de defesa (macrófagos, linfócitos e neutrófilos), células da microglia, células endoteliais, neurônios e células neoplásicas (KLAFKE, 2015).

No presente estudo somente IL-8 foi induzida por SepA nos dois períodos de interação (5 e 18 h) com a célula HT-29. Por se tratar de uma quimiocina que recruta neutrófilos, SepA aparentemente tem importância na ativação da resposta imune do hospedeiro nas infecções por EAEC. Em geral, na resposta inicial a uma infecção há o recrutamento de células inflamatórias e IL-8 é a molécula efetora protótipo deste processo (SAVKOVIC et al., 1997). A transcrição do gene que codifica IL-8 é comandada principalmente por NF-kB (HOFFMANN et al., 2002) e MAP cinases (SAVKOVIC et al., 2001). Outra resposta inflamatória alternativa são os inflamassomas, que são plataformas moleculares multiméricas que desencadeiam a ativação de caspases e o processamento de pro-IL-1β (MARTINON; BURNS; TSCHOPP, 2002). A estrutura do inflamassoma é formada por receptores intracelulares do tipo NOD para iniciar a resposta imune inata contra patógenos pela ativação de caspase-1 (MARTINON; MAYOR; TSCHOPP, 2009). A ativação de caspase-1 resulta em um aumento da expressão de IL-1β e IL-18, recrutamento e ativação de células imune que desencadeia a piroptose, que é uma forma de morte celular dependente da inflamação por caspase-1 (FINK; COOKSON, 2005).

Nossos resultados sugerem que a interação de SepA com as células HT-29 parece utilizar NF-kB ou a via das MAP cinases, pois somente observou-se a indução de IL-8 em HT-29 na presença de SepA. Porém mais estudos são necessários para determinar o papel dessa SPATE na resposta inflamatória induzida por EAEC, como por exemplo a utilização de mutantes em *sepA*. Os dados aqui apresentados são resultantes de experimentos iniciais sobre a participação de SepA nesse processo.

Finalizando, é importante salientar que os dados obtidos no presente trabalho abrem perspectivas de estudos mais aprofundados com a proteína SepA, pois foi mostrado pela primeira vez que uma SPATE classificada como imunomoduladoras, ou pertencente a classe 2, também causa alterações morfológicas proeminentes em células epitelias, atuando provavelmente no citoesqueleto. Sendo assim, existe a possibilidade de que outras SPATEs do

mesmo grupo atuem da mesma forma, o que poderia ser uma próxima vertente de estudo em relação às funções desempenhadas pelas proteases autotransportadoras de classe-2, além da de imunomodulação já conhecida.

6. CONCLUSÕES

Em resumo, no presente estudo verificou-se que:

(a) *sepA* foi detectado nas cepas de EAEC isoladas do Brasil como sendo um dos genes mais frequentes entre as SPATEs estudadas e sua presença foi significantemente associada às EAEC atípicas.
(b) SepA de EAEC BA732 mostrou identidade de 98% com SepA da cepa M90T de *Shigella flexneri* 5a.
(c) SepA foi purificada na sua forma nativa e funcional, a partir de sobrenadante de cultura da cepa M90T, e provocou alterações morfológicas em células HeLa e HT-29, sugerindo efeito citopático, o qual foi neutralizado por inibidor de serino protease e antissoro específico.
(d) SepA ligou-se à membrana citoplasmática das células HeLa e HT-29, mas não foi internalizada. Esse tipo de interação ocorreu quando utilizou-se SepA purificada ou quando a mesma foi secretada por EAEC BA732 no momento da adesão bacteriana.
(e) SepA purificada mostrou atividade pró-inflamatória ao induzir a produção de IL-8 em células HT-29.

Dessa forma, conclui-se que SepA é um potencial fator de virulência em EAEC, que poderia atuar na mucosa intestinal causando efeitos citopáticos e pró-inflamatórios, aqui evidenciados em células HT-29, uma linhagem epitelial de origem intestinal. Estes efeitos estão associados à patogênese da diarreia causada por EAEC

REFERÊNCIAS*

ABBAS, A. K.; LICHTMAM, A. H.; PILLAI, S. **Imunidade Inata:** Resposta Inflamatória. **In:** ABBAS, A. K.; LICHTMAM, A. H.; PILLAI, S. Imunologia Celular e Molecular. Tradução da 8ª Ed. Elsivier Inc: Amsterdam. 2015, p. 1262.

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. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 79 p. 411-414. 2013.

ABREU, A.G.; FRAGA, T.R.; GRANADOS-MARTÍNEZ, A.P.; KONDO, M.Y.; JULIANO, M.A.; JULIANO, L. et al. The Serine Protease Pic From Enteroaggregative Escherichia coli Mediates Immune Evasion by the Direct Cleavage of Complement Proteins. **J. Infect. Dis.**, v. 212, p.106-115, 2015.

ABREU, A.G.; ABE, C.M.; NUNES, K.O.; MORAES, C.T.; CHAVEZ-DUEÑAS, L.; NAVARRO-GARCIA, F.; et al. The serine protease Pic as a virulence factor of atypical enteropathogenic *Escherichia coli.* **Gut. Microbes**, v. 7, p.115-125, 2016.

ADACHI, J.A.; JIANG, Z.D.; MATHEWSON, J.J.; VERENKAR, M.P.; THOMPSON, S.; MARTINEZ-SANDOVAL, F.; STEFFEN, R.; ERICSSON, C.D.; DUPONT, H.L. Enteroaggregative *Escherichia coli* as a major etiologic agent in traveler's diarrhea in 3 regions of the world. **Clin. Infect. Dis.**, v. 32, p. 1706-1709, 2001.

AL-HASANI, K.; RAJAKUMAR, K.; BULACH, D.; ROBINS-BROWNE, R.; ADLER, B.; SAKELLARIS, H. Genetic organization of the *she* pathogenicity island in *Shigella flexneri* 2a. **Microb. Pathog.**, v. 30 p. 1-8, 2000.

AL-HASANI, K.; NAVARRO-GARCIA, F.; HUERTA, J.; SAKELLARIS, H.; ADLER, B. The immunogenic SigA enterotoxin *Shigella flexneri* 2a binds HEp-2 cells and induces fodrin redistribution in intoxicated epithelial cells. **PLoS One**, v. 4, p. 1-5, 2009.

ALI, M. M.; AHMED, S. F.; KLENA, J. D.; MAHAMED, Z. K.; MOUSSA, T. A.; GHENGHESH, K.S. Enteroaggregative *Escherichia coli* in diarrheic children in Egypt: molecular characterization and antimicrobial susceptibility. **J. Infect. Dev. Ctries.**, v. 14, p. 589-596, 2014.

---

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2018.

ANDRADE, F. B.; GOMES, T. A. T. ; ELIAS, W. P. A sensitive and specific molecular tool for detection of both typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Microbiol. Methods.**, v. 106, p.16-18., 2014.

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.* **Infect. Genet. Evol.**, v. 50, p. 83-86, 2017.

ARAUJO, J. M.; TABARELLI, G. F.; ARANDA, K. R.; FABBRICOTTI, S. H.; FAGUNDES-NETO, U.; MENDES, C. M.; SCALETSKY, I. C. Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, p. 3396-3999, 2007.

BAGGIOLINI, M.; WALZ, A.; KUNKEL, S.L. Neutrophil-activating peptide1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. **J. Clin. Invest.**, v. 84, p. 1045 1049, 1989.

BÂRZU, S.; BENJELLOUN-TOUIMI, Z.; PHALIPON A, SANSONETTI P, PARSOT C. Functional analysis of the *Shigella flexneri* IpaC invasin by insertional mutagenesis. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 1599-1605, 1997.

BHAN, M. K.; BHATNAGAR, S. Persistent diarrhea in infants and young children. **Indian Pediatr.,** v. 30, p. 147-151, 1993.

BENEVIDES-MATOS, N; PIERI, F.A.; PENATTI, M.; ORLANDI, P.P. Adherence and virulence genes of *Escherichia coli* from children diarrhoea in the Brazilian Amazon**. Braz. J. Microbiol.,** v. 46, p. 131-137, 2015.

BENJELLOUN-TOUIMI, Z.; SANSONETTI, P.J.; PARSOT, C. SepA, the major extracellular protein of *Shigella flexneri* : autonomous secretion and involvement in tissue invasion. **Mol. Microbiol.**, v. 17, p.123–135, 1995.

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

BENT, R.; MOLL, L.; GRABBE, S.; BROS, M. Interleukin-1 Beta-A Friend or Foe in Malignancies? **Int. J. Mol. Sci.**, v. 19, p. pii: E2155, 2018.

BERRILL, A.; BIDDLECOMBE, J.; BRACEWELL, D. **Peptide and Protein Delivery Product Quality During Manufacture and Supply.** Amsterdam: Elsevier Inc., 2011.

BERNIER, C.; GOUNON, P.; LE BOUGUÉNEC, C. Identification of an aggregative adhesion fimbria (AAF) type III-enconding operon in

enteroaggregative *Escherichia coli* as a sensitive probe for detecting the AAF-enconding operon family. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 4302-4311, 2002.

BERTANI, G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli.* **J. Bacteriol.**, v. 62, p. 293-300, 1951.

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, p. 2895-2906, 2009.

BIELASZEWSKA, M.; MELLMANN, A.; ZHANG, W.; KÖCH, R.; FRUTH, A.; BAUWENS, A.; PETERS, G.; KARCH, H. Characterisation of the enteroaggregative *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. **Lancet Infect. Dis.**, v. 11, p. 671-676, 2011.

BOATMAN, E.; CARTWRIGHT, F.; KENNY, G.
Morphology, morphometry and electron microscopy of HeLa cells infected with bovine Mycoplasma. **Cell. Tissue Res.**, v. 170, p.1-16, 1976.

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

BOISEN, N.; SCHEUTZ, F.; RASKO, D. A.;REDMAN, J. C.; PERSSON, S.; SIMON, J.; KOTLOFF, K.L.; LEVINE, M.M.; SOW, S.; TAMBOURA, B.; TOURE, A.; MALLE, D.; PANCHALINGAM, S.; KROGFELT, K.A.; NATARO, J.P. Genomic characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* from children in Mali. **J. Infect. Dis.**, v. 205, p. 431-444, 2012.

BOISEN, N.; HANSEN, A.M.; MELTON-CELSA, A.R.; ZANGARI, T.; MORTENSEN, N.P.; KAPER, J.B.; O'BRIEN, A.D.; NATARO, J.P. The presence of the pAA plasmid in the German O104:H4 Shiga toxin (Stx) type 2a-producing enteroaggregative *Escherichia coli* strain promotes the translocation of Stx2a across an epithelial cell monolayer. **J. Infect. Dis.**, v. 210, p. 1909-1919, 2014.

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

BONDOS, S. E.; BICKNELL, A. Detection and prevention of protein aggregation before, during, and after purification. **Anal Biochem.**, v. 316, p. 223–231, 2003.

BOOP, C. A.; BRENNER, F. W.; WELLS, J. G.; STROCKBINE, N. A.; FIELDS, P. I. *Escherichia, Shigella* and *Salmonella.* In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**. 8th ed. Washington, D. C.: ASM Press, 2003. cap. 42, v. 1, p. 654-700.

BOUDJADI, S.; CARRIER, J. C.; GROULX, J. F.; BEAULIEU, J. F. Integrin α1β1 expression is controlled by c-MYC in colorectal cancer cells. **Oncogene.**, v. 31, p. 1671-1678, 2016.

BOUZARI, S.; JAFARI, A.; ZAREPOUR, M. Distribution of virulence related genes among enteroaggregative *Escherichia coli* isolates: using multiplex PCR and hybridization. **Infect. Genet. Evol.**, v. 5, p. 79-83, 2005.

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

CHAUDHURI, R. R.; SEBAIHIA, M.; HOBMAN, J. L.; WEBBER, M. A.; Leyton, D. L.; GOLDBERG, M. D.; CUNNINGHAM, A. F.; SCOTT-TUCKER, A.; FERGUSON, P. R.; THOMAS, C. M.; FRANKEL, G.; TANG, C. M.; DUDLEY, E. G.; ROBERTS, I. S.; RASKO, D. A.; PALLEN, M. J.; PARKHILL, J.; NATARO, J. P.; THOMSON, N. R.; HENDERSON, I. R. Complete genome sequence and comparative metabolic profiling of the prototypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain 042. **PLoS One**, v. 5, e8801, 2010.

CHEN, X.; MACARA, I. G. Par-3 mediates the inhibition of LIM kinase 2 to regulate cofilin phosphorylatio and tigth junction assembly. **J. Cell Biol.**, v. 172, p. 671-678, 2006.

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

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, p. 4555-4558, 2000.

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

COHEN, M. B.; NATARO, J. P.; BERNSTEIN, D. I.; HAWKINS, J.; ROBERTS, N.; STAAT, M. A. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in acute childhood enteritis: a prospective controlled study. **J. Pediatr.**, v. 146, p. 54-61, 2005.

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

CRAVIOTO, A.; TELLO, A.; NAVARRO, A.; RUIZ, J.; VILLAFÁN, H.; URIBE, F.; ESLAVA, C. Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhea. **Lancet**, v. 337, p. 262-264, 1991.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nat. Rev**. **Microbiol.**, v. 8, p. 26-38, 2010.

CZECZULIN, J. R.; WHITTAM, T. S.; HENDERSON, I. R.; NAVARRO-GARCIA, F.; NATARO, J. P. Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 2692-2699, 1999.

COBELJIĆ, M.; MILJKOVIĆ-SELIMOVIĆ, B.; PAUNOVIĆ-TODOSIJEVIĆ, D.; VELICKOVIĆ, Z.; LEPSANOVIĆ, Z.; ZEC, N.; SAVIĆ, D.; ILIĆ, R.; KONSTANTINOVIĆ, S.; JOVANOVIĆ, B.; KOSTIĆ, V. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with an outbreak of diarrhoea in a neonatalnursery ward. **Epidemiol. Infect.**, v. 117, p. 11-16, 1996.

CORKINS, M. R.; MCQUADE, J.; SCHAFFER, B. S.; MACDONALD, R. G. Insulin-like growth factor binding protein-4 expression is dependent on the carbohydrate in the media in HT-29 cells. **Growth. Horm. IGF Res.**, v. 12, p. 184-192, 2002.

DALLMAN, T. J.; CHATTAWAY, M. A.; COWLEY, L. A.; DOUMITH, M.; TEWOLDE, R.; WOOLDRIDGE, D. J.; UNDERWOOD, A.; READY, D.; WAIN, J.; FOSTER, K.; GRANT, K. A.; JENKINS, C. An investigation of the diversity of strains of enteroaggregative Escherichia coli isolated from cases associated with a large multi-pathogen foodborne outbreak in the UK. **PLoS One**, v. 20, p. 9(5):e98103, 2014.

DATSENKO, K.A.; WANNER, B.L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 6, p. 6640-6645, 2000.

DAUTIN, N.; BERNSTEIN, H.D. Protein secretion in gram-negative bacteria via the autotrasporter pathway. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 61, p. 89-112, 2007.

DAUTIN, N. Serine Protease Autotransporters of *Enterobacteriaceae* (SPATEs): Biogenesis and Function. **Toxins**, v. 2, p. 1179-1206, 2010.

DELICATO, E.R.; DE BRITO, B.G.; KONOPATZKI, A.P.; GAZIRI, L.C.; VIDOTTO, M.C. Occurrence of the temperature-sensitive hemagglutinin among avian *Escherichia coli*. **Avian Dis.**, v.46, p.713-716, 2002.

DESVAUX, M.; HÉBRAUD, M.; TALON, R.; HENDERSON, I.R. Outer membrane translocation: numerical protein secretion nomenclature in question in mycobacteria. **Trends Microbiol.**, v. 17, p. 338-340, 2009.

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

DONTA, S. T.; MOON, H. W.; WHIPP, S. C. Detection of heat-labile Escherichia coli enterotoxin with the use of adrenal cells in tissue culture. **Science.**, v. 183, p. 334-336, 1974.

DURAND, D.; CONTRERAS, C. A.; MOSQUITO, S.; RUIZ, F.; CLEARY, T. G.; OCHOA, T. J. *pic* gene of enteroaggregative *Escherichia coli* and its association with diarrhea in Peruvian children. **Pathog. Dis.**, v. 74 : pii:ftw054, 2016.

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

EDWARDS, L. A.; BAJAJ-ELLIOTT, M.; KLEIN, N. J.; MURCH, S. H.; PHILLIPS, A. D. Bacterial-epithelial contact is a key determinant of host innate immune responses to enteropathogenic and enteroaggregative *Escherichia coli*. **PLoS One**, v. 6, p. e27030, 2011.

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

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

EVANS, D.G.; SILVER, R.P.; EVANS, D.J. JR.; CHASE, D.G.; GORBACH, S.L. Plasmid-controlled colonization factor associated with virulence in *Esherichia coli* enterotoxigenic for humans. **Infect. Immun.**, v. 12, p.656-667.1987.

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

FANG, G. D.; LIMA, A.; MARTINS, C. V; NATARO, J. P.; GUERRANT, R. L. Etiology and epidemiology of persistent diarrhea in northeastern Brazil: a hospital-based, prospective, case-control study. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 21, p. 137-144, 1995.

FANTINI, J.; ABADIE, B.; TIRARD A.; REMY, L.; RIPERT, J. P.; EL BATTARI, A.; MARVALDI, J. Spontaneous and induced dome formation by two clonal cell populations derived from a human adenocarcinoma cell line. HT29. **J. Cell Sci.**, v. S3, p. 235-249, 1986.

FERRARETTO, A.; SIGNORILE, A.; GRAVAGHI, C.; FIORILLI, A.; TETTAMANTI, G. CASEIN. Phosphopeptides Influence Calcium Uptake by Cultured Human Intestinal HT-29 Tumor Cells. **J. Nutr.**, v.131, p. 1655-1661, 2001.

FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. **Infect. Immun.** v. 73, p. 1907–1916, 2005.

FINKE, J. M.; ROY, M.; ZIMM, B. H.; JENNINGS, P. A. Aggregation events occur prior to stable intermediate formation during refolding of interleukin 1beta. **Biochemistry**, v. 39, p. 575-583, 2000.

FIUCCI, G.; CZARNY, M.; LAVIE, Y.; ZHAO, D.; BERSE, B.; BLUSZTAJN, K.; LISCOVITCH, M. Changes in phospholipase D isoforn~ activity and expression in muhidrug-resistant human cancer cells. **Int. J. Cancer**, v. 85, p. 882-888, 2000.

FISCHER WALKER, C.L.; LAMBERTI, L.; ADAIR, L.; GUERRANT, R.L.; LESCANO, A.G.; MARTORELL, R.; PINKERTON, R.C.; BLACK, R.E. Does childhood diarrhea influence cognition beyond the diarrhea-stunting pathway? **PLoS One**, v 10 p. e47908, 2012.

FJELDE, A. Human tumor cells in tissue culture. **Cancer**, v. 8, p. 845–851, 1955.

FOGH, J.; TREMPE, G. New human tumor cell lines. In: **J. Fogh (ed.). Human Tumor Cells in Vitro**, p. 115-141. New York: Plenum Press, 1975.

FRANÇA, F. L.; WELLS, T. J.; BROWNING, D. F.; NOGUEIRA, R. T.; SARGES, F. S. ; PEREIRA, A. C.; CUNNINGHAM, A. F.; LUCHEZE, K.; ROSA, A. C.; HENDERSON, I. R.; DE LUNA, MD. Genotypic and phenotypic characterisation of enteroaggregative *Escherichia col i* from children in Rio de Janeiro, Brazil. **PLoS One**, v. 30, p. 8(7):e69971, 2013.

FU, J.; YU, J.; CHEN, J.; XU, H.; LUO, Y.; LU, H. *In vitro* inhibitory properties of sesquiterpenes from Chloranthus serratus on cell motility via down-regulation of LIMK1 activation in human breast cancer. **Phytomedicine**. v. 49, p. 23-31, 2018.

GARCIA, P. G.; SILVA, V. L.; DINIZ, C. G. Occurrence and antimicrobial drug susceptibility patterns of commensal and diarrheagenic *Escherichia coli* in fecal microbiota from children with and without acute diarrhea. **J. Microbiol.**, v. 49, p. 46-52, 2011.

GARTLER, S. M. Apparent HeLa cell contamination of human heteroploid cell lines. **Nature.**, v. 217, p. 750–751, 1968.

GEY, G. O.; COFFMAN, W. D.; KUBICEK, M. T. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. **Cancer Res.**, v. 12, p. 264–265, 1952.

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

GLOBAL BURDEN OF DIARRHOEAL DISEASES COLLABORATORS. Estimates of global, regional, national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoeal diseases: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **Lancet. Infect. Dis.**, v. 17, p. 909–948, 2017.

GOMES, T. A.; VIEIRA, M. A.; ABE, C. M.; RODRIGUES, D.; GRIFFIN, P. M.; RAMOS, S. R. Adherence patterns and adherence-related DNA sequences in *Escherichia coli* isolates from children with and without diarrhea in São Paulo city, Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 3609-3613, 1998.

GOMES, T.A.; ELIAS, W.P.; SCALETSKY, I.C.A.; GUTH, B.E.C.; RODRIGUES, J.F.; PIAZZA, R.M.F; FERREIRA, L.C.S.; MARTINEZ, M.B. Diarrheagenic *Esherichia coli.* **Braz. J. Microb.**, v.47, p. 3-30, 2016.

GONZALES, M. F.; BROOKS, T.; PUKATZKI, S. U.; PROVENZANO, D. Rapid protocol for preparation of electrocompetent *Escherichia coli* and Vibrio cholerae. **J. Vis. Exp.**, v. 80, p. e50684, 2013.

GOUT, S. P.; JACQUIER-SARLIN, M. R.; ROUARD-TALBOT, L.; ROUSSELLE, P.; BLOCK, M. R. Rho-dependent switch between c-2131 and c-3J31 integrins is induced by laminin-5 during early stage of HT-29 cell differentiation. **Mol. Biol. Cell.**, v. 12, p. 3268-3281, 2001.

GOLD, M. **A Conspiracy of Cells. One Woman's Immortal Legacy-And the Medical Scandal It Caused.** New York Press: New York, 1986. p. 170.

GOLDSBY, R. A.; KINDT, T. J.; OSBORNE, B. A. **Citocinas:** Propriedades das citocinas. **In:** GOLDSBY, R. A.; KINDT, T. J.; OSBORNE, B. A. Kuby Imonologia. 4ª ed. Editor Revinter: Rio de Janeiro, 2002. p. 662.

GREENBERG, D.E.; JIANG, Z.D.; STEFFEN, R.; VERENKER, M.P.; DUPONT, H.L. Markers of inflammation in bacterial diarrhea among travelers, with a focus on enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenicity. **J. Infect. Dis.**, v. 185, p.944 –949, 2002.

GRIPSTRA, J.; ARENA, J.; RUTTEN, L.; TOMMASSEN, J. Autrotransporter secretion varying on a theme. **Res. Microbiol.**, v. 164, p. 562-582, 2013.

GUERRANT, R. L.; ORIÁ, R.B.; MOORE, S. R.; ORIÁ, M. O.; LIMA, A. A. Malnutrition as an enteric infectious disease with long-term effects on child development. **Nutr Rev.**, v. 66, p. 487-505, 2008.

GURI, A.; LI, Y.; CORREDIG, M. Interfacial dilational properties of tea polyphenols and milk proteins with gut epithelia and the role of mucus in nutrient adsorption. **Food Funct.**, v. 6, p.3642-3651, 2015.

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

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

HARADA, A.; SEKIDO, N.; AKAHOSHI, T.; WADA, T.; MUKAIDA, N.; MATSUSHIMA, K. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. **J. Leukoc. Biol.**, v. 56, p. 559-564, 1994.

HARADA, T.; HIROI, M.; KAWAMORI, F.; FURUSAWA, A.; OHATA, K.; SUGIYAMA, K.; MASUDA, T. A food poisoning diarrhea outbreak caused by enteroaggregative *Escherichia coli* serogroup O126:H27 in Shizuoka, Japan. **Jpn. J. Infect. Dis.**, v. 60, p. 154-155, 2007.

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

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

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

HAVT, A.; LIMA, I. F.; MEDEIROS, P. H.; CLEMENTINO, M. A.; SANTOS, A. K.; AMARAL, M. S.; VERAS, H. N.; PRATA, M. M.; LIMA, N. L.; DI MOURA, A.; LEITE, Á. M.; SOARES, A. M.; FILHO, J. Q.; HOUPT, E. R.; NATARO, J. P.; GUERRANT, R. L.; LIMA, A. A. Prevalence and virulence gene profiling of enteroaggregative *Escherichia coli* in malnourished and nourished Brazilian children. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 89, p. 98-105, 2017.

HEBBELSTRUP JENSEN, B.; OLSEN, K. E.; STRUVE, C.; KROGFELT, K. A.; PETERSEN, A. M. Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli.* **Clin. Microbiol. Rev.**,v. 27, p. 614-30, 2014.

HEBBELSTRUP JENSEN B.; POULSEN, A.; HEBBELSTRUP, S.R.R.; CARSTEN, S.; JØRGEN H.E.; FRIIS-MØLLER, A.; BOISEN, N.; RIE JØNSSON RANDI. F. P.; PETERSEN, A.M.; KROGFELT, K. A. Genetic Virulence Profile of Enteroaggregative *Escherichia coli* Strains Isolated from Danish Children with Either Acute or Persistent Diarrhea. **Front. Cell Infect. Microbiol.**, v. 7, p. 1-15, 2017.

HEBBELSTRUP JENSEN, B.; ADLER SØRENSEN, C.; HEBBELSTRUP RYE RASMUSSEN, S.; REJKJÆR HOLM, D.; FRIIS-MØLLER, A.; ENGBERG, J.; MIRSEPASI-LAURIDSEN, H. C.; STRUVE, C.; HAMMERUM, A. M.; PORSBO, L. J.; PETERSEN, R. F.; PETERSEN, A. M.; KROGFELT, K.A. Characterization of diarrheagenic enteroaggregative *Escherichia coli* in danish adults-antibiotic treatment does not reduce duration of diarrhea. **Front. Cell Infect. Microbiol.**, v. 27, p. 306. eCollection, 2018.

HENDERSON, I.R.; NAVARRO-GARCIA, F.; NATARO, J.P. The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. **Trends Microbiol.**, v. 6, p.370-8, 1998.

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

HODGES, K.; GILL, R. Infectious diarrhea: cellular and molecular mechanisms. **Gut. Microbes.**, v. 1, p. 4-21, 2010.

HOFFMANN, E.; DITTRICH-BREIHOLZ, O.; HOLTMANN, H.; KRACHT, M. Multiple control of interleukin-8 gene expression. **J. Leuk. Biol.**, v. 72, p. 847–855, 2002.

HOSSEINI-NAVE, H.; SAMAREH, S. M.; LASHKARI, M.; RAVARI, M. A.; HASHEMIZADEH, Z.; SEYEDI, M. F.; MOHSENI, F. Distribution of genes encoding virulence factors and multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) of entero-aggregative *Escherichia coli* (EAEC) isolated in Iran from patients with diarrhoea. **J. Med. Microbiol.**, v. 67, p. 1334-1339, 2018.

HUANG, D. B.; DUPONT, H. L. Enteroaggregative *Escherichia coli:* an emerging pathogen in children. **Semin. Pediatr. Infect. Dis.**, v. 15, p. 266-271, 2004.

HUANG, D. B.; NATARO, J. P.; DuPONT, H. L.; KAMAT, P. P.; MHATRE, A. D.; OKHUYSEN, P. C.; CHIANG T. Enteroaggregative *Escherichia coli* as a cause of diarrheal illness: a meta-analysis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 43, p. 556-563, 2006.

HUANG, Y.S.; XIE, N.; SU, Q.; SU, J.; HUANG, C.; LIAO, Q. J. Diallyl disulfide inhibits the proliferation of HT-19 human colon cancer cells by inducing differenctially expressed genes. **Mol. Med. Rep.**, v. 4, p. 553-559, 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa nacional por amostra de domicílios.** v. 31, p. 1-135, 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Munic: mais da metade dos municípios brasileiros não tinha plano de saneamento básico em 2017. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/22611-munic-mais-da-metade-dos-municipios-brasileiros-nao-tinha-plano-de-saneamento-basico-em-2017> Acesso em: 09 dez de 2018.

IOVINE, B.; GUARDIA, F.; IRACE, C.; BEVILACQUA, M. A. l-carnosine dipeptide overcomes acquired resistance to 5-fluorouracil in HT29 human colon cancer cells via downregulation of HIF1-alpha and induction of apoptosis. **Biochimie.**, v. 127, p. 196-204, 2016.

IKUMAPAYI, U.N.; BOISEN, N.; HOSSAIN, M.J.; BETTS, M.; LAMIN, M; SAHA, D.; KWAMBANA-ADAMS, B.; DIONE, M.; ADEGBOLA, R.A.; ROCA, A.; NATARO, J.P.; ANTONIO, M. Identification of Subsets of Enteroaggregative *Escherichia coli* Associated with Diarrheal Disease among Under 5 Years of Age Children from Rural Gambia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**,v. 97, p. 997-1004, 2017.

ITOH, Y.; NAGANO, I.; KUNISHIMA, M.; EZAKI, T. Laboratory investigation of enteroaggregative *Escherichia coli* O untypeable:H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, p. 2546-2550, 1997.

IVANOV, A. I.; MCCALL, I. C.; ÁRKOS, C. A.; NUSRAT, A. Role fo actin filament turnover and a myosin II motor in cytoskeleton-driven diasaddembly od the epithelial monolayer by *Shigella flexneri*. **J. Clin. Invest.**, v. 15, p. 2639-2651, 2004.

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

JENKINS, C.; CHART, H.; WILLSHAW, A.G.; CHEASTY, T.; SMITH, H.R. Genotyping of enteroaggregative *Escherichia coli* and identification of target genes for the detection of both typical and atypical strains. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 55, p.13-19, 2006.

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

KARMALI, M. A.; STEELE, B. T.; PETRIC, M.; LIM, C. Sporadiccases of haemolytic–uraemic syndrome associated with faecal cytotoxinand cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. **Lancet**., p.619–620, 1983.

KLAFKE, K. **Determinação do papel das citocinas inflamatórias e IL-8 na proliferação, resistência quimioterápica e invasão celular em glioblastoma humano.** 2015. 60 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Biotecnologia) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

KHALIL, U.; YOUNUS, M.; ASGHAR, N.; SIDDIQUI, F.; GÓMEZ-DUARTE, O. G.; WREN, B. W.; BOKHAR, H. Phenotypic and genotypic characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from pediatric population in Pakistan. **APMIS.**, v. 124, p. 872-880, 2016.

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

KHALEEL, S. A.; AL-ABD, A. M.; ALI, A. A.; ABDEL-NAIM, A. B. Didox and resveratrol sensitize colorectal cancer cells to doxorubicin via activating apoptosis and ameliorating P-glycoprotein activity. **Sci. Rep.**,v. 14, p. 36855, 2016.

KIM, E. J.; KANG, I.; CHO, H. J.; KIM, W. K.; HA, Y.; PARK, J. H. Y. Conjugated linoleic acid downregulates insulin-like growth factor-1 receptor levels in HT-29 human colon cancer cells. **J. Nutr.**,v. 133, p. 2675-2681, 2003.

KIM, I. H.; NAM, T. J. Fucoidan downregulates insulin-like growth factor-I receptor levels in HT-29 human colon cancer cells.
Oncol. Rep.,v. 39, p. 1516-1522, 2018.

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

KOCH, A.E.; POLVERINI, P. J.; KUNKEL, S. L.; HARLOW, L. A.; DIPIETRO, L. A.; ELNER, V. M.; ELNER, S. G.; STRIETER, R. M. Interleukin-8 as a macrophagederived mediator of angiogenesis. **Science**., v. 258, p. 1798–1801, 1992.

KOLIOS, G.; ROBERTSPN D.A.F.; JORDAN, N. J.; MINTY A.; CAPUT, P.F.; WESTWICK, J. Interleukin-8 production by the human colon epithelial cell line HT-29: modulation by interleukin-13. **Br. J. Pharmacol.**, v. p. 351-559, 1996.

KOSTAKIOTI, M.; STATHOPOULOS, C. Functional analysis of the Tsh autotransporter from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. **Infect. Immun.**,v. 72, p. 5548-5554, 2004.

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

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-85, 1970.

LAVIE, Y.; FIUCCI, G.; LISCOVITCH, M. Up-regulation of caveolae and caveolar constituents in muhidrug-resistant cancer cells. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 32380-32383, 1998.

LIMA, A. A.; FANG, G.; SHORLING, J. B.; DE ALBUQUERQUE, L.; MCAULIFFE, J. J.; MOTA, S.; LEITE, R.; GUERRANT, R. L. Persistent diarrhea in northeast Brazil: etiologies and interactions with malnutrition. **Acta Pediatr. Suppl.**, v. 381, p. 37-44, 1992.

LIMA, A. A.; MOORE, S. R.; BARBOZA, M. S. JR; SOARES, A. M.; SCHLEUPNER, M. A.; NEWMAN, R. D.; SEARS, C. L.; NATARO, J. P.; FEDORKO, D. P.; WUHIB, T.; SCHORLING, J. B.; GUERRANT, R. L.Persistent diarrhea signals a critical period of increased diarrhea burdens and nutritional shortfalls: a prospective cohort study among children in northeastern Brazil. **J. Infect. Dis.**, v. 181, p.1643–1651, 2000.

LIMA, A. A. M.; MEDEIROS, P. H. Q. S.; HAVT, A. Enteroaggregative *Escherichia coli* subclinical and clinical infections. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 31, p. 433-439, 2018.

LIMA, A. A. M.; SOARES, A. M.; FILHO, J. Q. S.; HAVT, A.; LIMA, I. F. N.; LIMA, N. L.; ABREU, C. B.; JUNIOR, F. S.; MOTA, R. M. S.; PAN, W. K.; TROEGER, C.; MEDEIROS, P. H. Q. S.; VERAS, H. N.; PRATA, M.A.; MCCORMICK, B. J.J.; MCGRATH, M.; ROGAWSKI, E. T.; HOUPT, E. R.; PLATTS-MILLS, J. A.; GRATZ, J.; SAMIE, A.; BESSONG, P.; BABJI, S.; KANG, G.; QURESHI, S.; SHAKOOR, S.; BHUTTA, Z. A.; HAQUE, R.; AHMED, T.; MDUMA, E. R.; SVENSEN, E.; KOSEK, M.; YORI, P. P.; BODHIDATTA, L.; JASMIN, S.; MASON, C. J. ; LANG, D.; GOTTLIEB, M.; GUERRANT, R. L. Enteroaggregative *Escherichia coli* subclinical infection and coinfections and impaired child growth in the MAL-ED cohort study. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 66, p. 325-333, 2018.

LIMA, I. F.; BOISEN, N.; QUETZ, J. S.; HAVT, A.; DE CARVALHO, E. B.; SOARES, A. M.; LIMA, N. L.; MOTA, R. M.; NATARO, J. P.; GUERRANT, R. L.; LIMA, A. A. Prevalence of enteroaggregative *Escherichia coli* and its virulence-related genes in a case-control study among children from north-eastern Brazil. **J. Med. Microbiol.,** v. 62, p. 683-6, 2013.

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

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

LESUFFLEUR, T.; BARBAT, A.; LUCCIONI, C., BEAUMATIN, J.; CLAIR, M.; KORNOWSKI, A.; DUSSAULX, E.; DUTRILLAUX, B.; ZWEIBAUM, A. Dihydrofolate reductase gene amplification-associated shift of differentiation in methotrexate-adapted HT-29 cells. **J. Cell Biol.**, v. 115, p. 1409-1418, 1991.

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

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

LU, H.; ZHANG, H.; WANG, Q.; YUAN, H.; HE, W.; ZHAO, Z.; LI, Y. Purification, refolding of hybrid hIFNc-Kringle 5 expressed in *Eschericia coli*, **Curr. Microbiol.**, v. 42, p. 211–216, 2011.

MACRINA, F.L.; KOPECKO, D.J.; JONES, K.R.; AYERS, D.J.; MCCOWEN, S.M. A multiple plasmid-containing *Escherichia coli* strain: convenient source of size reference plasmid molecules. **Plasmid.**, v. 1 p. 417-420, 1978.

MADESH, M.; BERNARD, O.; BALASUBRUAMAIAN, K. A. Butyrate-induced alteration in lipid composition of human colon cell line HT-29. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, v. 38, 6 p. 659-664, 1996.

MALDONADO-CONTRERAS, A.; BIRTLEY, J.R.; BOLL, E.; ZHAO, Y.; MUMY, K. L.; TOSCANO, J.; AYEHUNIE, S.; REINECKER, H. C.; STERN, L. J.; MCCORMICK, B. A. Shigella depends on SepA to destabilize the intestinal epithelial integrity via cofilin activation. **Gut. Microbes.**, v. 2, p. 544 560, 2017.

MASTERS, R. J. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 2, p. 315-319, 2002.

MARESCA, M; MAHFOUD, R.; GARMY, N.; FANTINI, J. The Mycotoxin Deoxynivalenol Affects Nutrient Absorption in Human Intestinal Epithelial Cells. **J. Nutr.**, v. 139, p. 2723-2731, 2002.

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

MARTÍNEZ-MAQUEDA, D.; MIRALLES, B.; RECIO, I. **HT29 Cell Line**. **In:** VERHOECKX**,** K.; COTTER, P.; LÓPEZ-EXPÓSITO, I.; KLEIVELAND**,** C.; LEA, T.; MACKIE, A.; REQUENA, T., SWIATECKA; D., WICHERS, H. **The Impact of Food Bio-Actives on Gut Health.** Springer International Publishing: Switzerland, 2015. p. 338.

MARTINON, F.; BURNS, K.; TSCHOPP, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. **Mol. Cell**, v. 10, p. 417–426, 2002.

MARTINON, F.; MAYOR, A.; TSCHOPP, J. The inflammasomes: guardians of the body. **Annu. Rev. Immunol.** v. 27, p. 229–265, 2009.

MATHEWSON, J. J.; JOHNSON, P. C.; DUPONT, H. L.; MORGAN, D. R.; THORNTON, S. A.; WOOD, L. V.; ERICSSON, C. D. A newly recognized cause of traveler's diarrhea: enteroadherent *Escherichia coli.* **J. Infect. Dis.**, v. 151, p. 471–475, 1985.

MATHEWSON, J. J.; JIANG, Z. D.; ZUMLA, A.; CHINTU, C.; LUO, N.; CALAMARI, S. R.; GENTA, R. M.; STEEPHEN, A.; SCHWARTZ, P.; DUPONT, H. L. HEp-2 cell-adherent *Escherichia coli* in patients with human immunodeficiency virus-associated diarrhea. **J. Infect. Dis.**, v. 171, p. 1636-1639, 1995.

MEDEIROS, P.; LIMA A. A. M.; GUEDES, M. M.; HAVT, A.; BONA M. D.; REY, L. C.; SOARES, A . M.; GUERRANTM R. L.; WEIGL, B. H.; LIMA, I. F. N. molecular characterization of virulence and antimicrobial resistance profile of *Shigella* species isolated from children with moderate to severe diarrhea in northeastern Brazil. **Diagn. Microbio. Infect. Dis.**, v. 90, p. 198-205, 2017.

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

MIZUNO, K. Signaling mechanisms and functional roles of cofilin phosphorylation and desphosphorylation. **Cell Signal.**, v. 25, p. 457-469, 2013.

MOHAMED, J. A.; HUANG, D. B.; JIANG, Z. D.; DUPONT, H. L.; NATARO, J. P.; BELKIND-GERSON, J.; OKHUYSEN, P. C. Association of putative enteroaggregative *Escherichia coli* virulence genes and biofilm production in isolates from travelers to developing countries. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, p. 121-126, 2007.

MONFARDINI, M. V. **Caracterização Genotípica e Fenotípica de Amostras de *Escherichia coli* Enteroagregativa (EAEC) e com Padrão *Chain-like adhesion* (CLA) de Crianças com e sem Diarreia.** 2012. 96f. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas). Universidade Federal do Espírito Santo. UFES.

MORIN, N.; SANTIAGO, A. E.; ERNST, R. K.; GUILLOT S. J.; NATARO, J. P. Characterization of the AggR Regulon in enteroaggregative *E. coli*. **Infect. Immun.**, v. 81, p. 122-132, 2012.

MORAIS, T. B.; GOMES, T. A.; SIGULEM, D. M. Enteroaggregative *Escherichia coli* in infant feeding bottles. **Lancet**., v. 349 p. 1448-1449, 1997.

MORENO, A. C. R.; FERNANDES-FILHO, A.; GOMES, T. A. T.; RAMOS, S. T. S.; MONTEMOR, L. P. G.; TAVARES, V. C.; SANTOS-FILHO, L.; IRINO, K.; MARTINEZ, M. B. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 66, p. 50-57, 2010.

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

MUNIESA, M.; HAMMERL, J. A.; HERTWIG, S.; APPEL, B.; BRÜSSOW, H. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: a new challenge for microbiology. **Appl. Environ. Microbiol.,** v. 78, p. 4065-4073, 2012.

NAGUMO, Y.; HAN, J.; BELLILA, A.; ISODA, H.; TANAKA, T. Cofilin mediates tight-junction opening by redistributing actin and tight-junction proteins. **Biochem. Biophys Res. Commun.**, v. 377, p. 921-925, 2008.

NATARO, J. P.; BALDINI, M. M.; KAPER, J. B.; BLACK, R. E.; BRAVO, N.; LEVINE, M. M. Detection of an adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli* with a DNA probe. **J. Infect. Dis.**, v. 152, p. 560-565, 1985.

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

NATARO, J. P.; DENG, Y.; COOKSON, S.; CRAVIOTO, A.; SAVARINO, S. J.; GUERS, L. D.; LEVINE, M. M.; TACKET, C. O. Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated in volunteers. **J. Infect. Dis.**, v. 171, p. 465-468, 1995.

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

NATARO, J. P.; STEINER, T.; GUERRANT, R. L. Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Emerg Infect Dis.**, v. 4, p. 251–261, 1998.

NATARO, J. P. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 21, p. 4-8, 2005.

NATARO, J. P. Outbreak of hemolytic-uremic syndrome linked to Shiga toxin-producing enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4. **Pediatr. Res.**,v. 70, p. 221, 2011.

NAVA-ACOSTA, R.; NAVARRO-GARCIA, F. Cytokeratin 8 is an epithelial cell receptor fo Pet a cytotoxic protease autotransporter of Enterobacteriaceae. **mBio**, v. 4, p. e00838-13, 2013.

NAVARRO-GARCIA, F.; GUTIERREZ-JIMENEZ, J.; GARCIA-TOVAR, C.; CASTRO, L.A.; SALAZAR-GONZALEZ, H.; CORDOVA, V. Pic, an autotransporter protein secreted by different pathogens in the Enterobacteriaceae family, is a potent mucus secretagogue. **Infect. Immun.**, v. 78 p. 4101-4119, 2010.

NAVARRO-GARCIA, F.; ELIAS, W. P. Autotransporters and virulence of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Gut. Microbes**, v. 2, p. 13-24, 2011.

NEZARIEH, R. ; SHAKIBAIE, M. R.; NAVE, H. H.; NOROUZI, A.; SALAJEGHEH, G.; HAYATBAKHSH, M. Distribution of Virulence Genes, Enterotoxin and Biofilm Formation Among Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) Strains Isolated From Stools of Children With Diarrhea in South East Iran. **Arch. Pediatr. Infect. Dis.**, v. 3, p. e29745, 2015.

NISHITA, M.; TOMIZAWA, C.; YAMAMOTO, M.; HORITA, Y.; OHASHI, K.; MIZUNO, K. Spatial and temporal regulation of cofilin activity by LIM kinase and Slingshot is critical for directional cell migration . **J. Cell Biol.**,v. 171, p. 349-59, 2015.

NGUYEN, T. V.; VAN, P. L.; HUY, C. L.; NGUYEN-GIA, K.; WEINTRAUB, A. Detection and characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* from young children in Hanoi, Vietnam. **J. Clin. Microbiol.**, v.43, p. 755–760, 2005.

NISHIMURA, K.; YOON, Y. H.; KURIHARA, A.; UNZAI, S.; LUIRINK, J.; PARK, S. Y.; TAME, J. R. Role of domains within the autotransporter Hbp/Tsh. **Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.**, v. 66, p. 1295-1300, 2010.

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

OKEKE, I. N.; OJO, O.; LAMOKANRA, A.; KAPER, J. B. Etiology of acute diarrhea in adults in southwestern Nigeria. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 4525-4230, 2003.

OPINTAN, J. A.; NEWMAN, M. J.; AYEH-KUMI, P. F.; AFFRIM, R.; GEPI-ATTEE, R.; SEVILLEJA, J. E.; ROCHE, J. K.; NATARO, J. P.; WARREN, C. A.; GUERRANT, R. L. Pediatric diarrhea in southern Ghana: etiology and association with intestinal inflammation and malnutrition. **Am. J. Trop. MedHyg.**, v. 83, p.936–943, 2010.

OTTO, B. R.; VAN DOOREN, S. J.; NUIJENS, J. H.; LUIRI004EK, J.; OUDEGA, B. Characterization of a hemoglobin protease secreted by the pathogenic Escherichia coli strainEB1. **J. Exp. Med.**,v. 188, p.1091-1103, 1998.

OTTO, B. R.; SIJBRANDI, R.; LUIRINK, J.; OUDEGA, B.; HEDDLE, J. G.; MIZUTANI, K.; PARK, S. Y.; TAME, J. R.
Crystal structure of hemoglobin protease, a heme binding autotransporter protein from pathogenic *Escherichia coli.* **J. Biol. Chem.** ,v. 280, p. 17339-17345, 2005.

PABALAN, N.; SINGIAN, E.; JARJANAZI, H.; STEINER, T. S. Enteroaggregative *Escherichia coli* and acute diarrhea inchildren: a meta-analysis of South Asian populations. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 32, p. 597–607, 2013.

PACHA, J.; LISA, E; MIKSIK, I. Effect of cellular differentiation of 1 ll3-hydroxysteroid dehydrogenase activity in the intestine. **Steroids.**, v. 67, p. 119-126, 2002.

PALOMINO, D. C.; MARTI, L. C. Chemokines and immunity. **Einstein (São Paulo).** , v. 13, p. 469-473, 2015.

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

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

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

PATRO, S. Y.; FREUND, E.; CHANG, B. S. Protein formulation and fill-finish operations, **Biotechnol. Annu. Rev.** ,v. 8, p. 55-84, 2002.

PENFOLD, R. J.; PEMBERTON, J. M. Sequencing, chromosomal inactivation, and functional expression in *Escherichia coli* of *ppsR*, a gene which represses carotenoid and bacteriochlorophyll synthesis in *Rhodobacter sphaeroides*. **J. Bacteriol.**,v. 176, p. 2869-2876, 1992.

PEREIRA, A.L.; FERRAZ, L.R.; SILVA, R.S.; GIUGLIANO, L.G. Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence markers: positive association with distinct clinical characteristics and segregation into 3 enteropathogenic E. coli serogroups. **J. Infect. Dis.**, v. 195, p. 366 –374, 2007.

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 enteroagregative *Escherichia coli* from children and adults with diarrhea in Brasília, Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 1827-1832, 2003.

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

PROTEIN HOMOLOGY/ANALOGY RECOGNITION ENGINE V 2.0 (PHYRE2), disponível em:< htpp://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>. Acesso em: 20 ago de 2015.

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

REGUA-MANGIA, A. H.; GOMES, T. A. T.; VIEIRA, M. A. M.; ANDRADE, J. R.; IRINO, K.; TEIXEIRA, L. M. Frequency and characteristics of diarrhoeagenic *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhoea in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Infect.**, v. 48, p. 161–167, 2004.

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

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

RIEDEL, T.; ROHLFS, M.; BUCHHOLZ, I.; WAGNER-DÖBLER, I.; RECK, M. Complete sequence of the suicide vector pJP5603. **Plasmid.**, v. 69, p.104-107, 2013.

ROCHE, J. K.; CABEL, A.; SEVILLEJA, J.; NATARO, J. P.; GUERRANT, R. L. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) impairs growthwhile malnutrition worsens EAEC infection: a novel murine model of the infection malnutrition cycle. **J. Infect. Dis.**, v. 202, p. 506–514, 2010.

ROGAWSKI, E.; GUERRANT, R.; HAVT, A.; LIMA, I. F. N.; MEDEIROS, P. H. Q. S. ; SEIDMAN, J.C.; MCCORMICK, B. J. J.; BABJI, S.; HARIRAJU, D.; BODHIDATTA, L.; SHRESTHA, J.; ANANIA, J.; MARO, A.; SAMIE, A.; YORI, P. P.; QURESHI, S.; MAHFUZ, M.; BESSONG, P. O.; KOSEK, M. N.; AHMED, T.; BHUTTA, Z. A.; LANG, D. R.; GOTTLIEB, M.; HOUPT, E. R.; LIMA, A. A.

M.; MAL-ED NETWORK INVESTIGATORS. Epidemiology of enteroaggregative *Escherichia coli* infections and associated outcomes in the MAL-ED birth cohort. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 11, p. (7):e0005798, 2017.

ROSSELIN, G. Les récepteurs de l´epithélium digestif . **Médecine/Sciences.**,v. 5, p. 287-297, 1989.

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

RODRIGUES, J.; ACOSTA, V. C.; CANDEIAS, J. M.; SOUZA, L. O.; FILHO, F. J. Prevalence of diarrheogenic *Escherichia coli* and rotavirus among children from Botucatu. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 35, p. 1311-1318, 2002.

ROSSI, D.; ZLOTNIK, A. The biology of chemokines and their receptors. **Annu. Rev. Immunol.**, v.18, p. 217-242, 2000.

ROUSSET, M. The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation. **Biochimie.**, v. 68, p. 1035-1040, 1986.

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

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

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

RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **J. Infect. Dis.**, v. 181, p. 1753-1754, 2000.

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

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. **Molecular Cloning*: a* Laboratory Manual.** New York: Cold Spring Harbor, 1989.

SAMIE, A.; OBI, C. L.; DILLINGHAM, R.; PINKERTON, R. C.; GUERRANT, R. L. Enteroaggregative *Escherichia coli* in Venda, South Africa: distribution of virulence-related genes by multiplex polymerase chain reaction in stool samples of human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative individuals and primary school children. **Am. J. Trop. Med. Hyg.,** v. 77, p. 142-150, 2007.

SAMPAIO, S. C.; GOMES, T. A.; PICHON, C.; DU MERLE, L.; GUADAGNINI, S.; ABE, C. M. ; SAMPAIO, J. L.; LE BOUGUÉNEC, C. The flagella of an atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strain are required for efficient interaction with and stimulation of interleukin-8 production by enterocytes *in vitro*. **Infect. Immun.**, v. 77, p. 4406-4413, 2009.

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

dos SANTOS, L.R.; IRINO, K.; VAZ, T.M.L.; GUTH, B.E.C. Set of virulence gens and genetic relatedness of O113:H21 *Escherichia coli* strains isolated from the animal reservoir and human infections in Brazil. **J. Med. Microbiol**., v. 59, p. 634-640, 2010

SARANTUYA, J.; NISHI, J.; WAKIMOTO, N.; ERDENE, S.; NATARO, J. P.; SHEIKH, J.; IWASHITA, M.; MANAGO, K.; TOKUDA, K.; YOSHINAGA, M.; MIYATA, K.; KAWANO, Y. Typical enteroaggregative *Escherichia coli* is the most prevalent pathotype among *E. coli* strains causing diarrhea in Mongolian children. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 133-139, 2004.

SAVKOVIC, S.D.; KOUTSOURIS, A.; HECHT, G. Activation of NF-kappaB in intestinal epithelial cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. **Am. J. Physiol.**, v. 273, p. C1160–C1167, 1997.

SAVKOVIC, S. D.; RAMASWAMY, A.; KOUTSOURIS, A.; HECHT, G. EPEC-activated ERK1/2 participate in inflammatory response but not tight junction barrier disruption. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 281, p. G890–G898, 2001.

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

SCALETSKY, I. C. A.; FABBRICOTI, S. H.; SILVA, S. O.; MORAIS, M. B.; FAGUNDES-NETO, U. HEp-2-adherent *Escherichia coli* strains associated with acute diarrhea, São Paulo, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, p. 855-858, 2002.

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

SHAO, S.; ZHU, Y.; MENG, T.; LIU, Y.; HONG, Y.; YUAN, M.; YUAN, H.; HU, F. Targeting High Expressed $\alpha_5\beta_1$ Integrin in Liver Metastatic Lesions To Resist Metastasis of Colorectal Cancer by RPM Peptide-Modified Chitosan-Stearic Micelles. **Mol. Pharm.**, v. 2, p. 1653-1663, 2018.

SHAZBERG, G.; WOLK, M.; SCHMIDT, H.; SECHTER, I.; GOTTESMAN, G.; MIRON, D. Enteroaggregative *Escherichia coli* serotype O126:H27, **Israel. Emerg. Infect. Dis.**, v. 9, p. 1170 –1173, 2003.

SHIOBARA, T.; USUI, T.; HAN, J.; ISODA, H.; NAGUMO, Y. The reversible increase in tight junction permeability induced by capsaicin is mediated via cofilin-actin cytoskeletal dynamics and decreased level of occludin. **PLoS One**, v. 8, p. e79954, 2013.

SCHERER, W. F.; SYVERTON, J. T.; GEY, G. O. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses**. J. Exp. Med.**, v. 97, p. 695–709, 1953.

SHAH, N.; DUPONT, H. L.; RAMSEY, D. J. Global etiology of travelers' diarrhea: systematic review from 1973 to the present. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 80, p. 609-614, 2009.

SHIN, J.; OH, S. S.; OH, K. H.; PARK, J. H.; JANG, E. J.; CHUNG, G. T.; YOO, C. K.; BAE, G. R.; CHO, S. H. An Outbreak of Foodborne Illness Caused by Enteroaggregative *Escherichia coli* in a High School in South Korea. **Jpn. J. Infect. Dis.**, v. 68, p. 514-519, 2015.

SIDOTI, F.; RITTÀ, M.; COSTA, C.; CAVALLO, R. Diagnosis of viral gastroenteritis: limits and potential of currently available proce dures. **J. Infect. Dev. Ctries**., v. 6, p. 551-561, 2015.

SILVER, R. P.; AARONSON, W.; SUTTON, A.; SCHNEERSON, R. Comparative analysis of plasmids and some metabolic characteristics of Escherichia coli K1 from diseased and healthy individuals. **Infect. Immun.**, v. 29, p. 200 –206, 1980.

SMITH, H. R.; CHEASTY, T.; ROWE, B. Enteroaggregative *Escherichia coli* and outbreaks of gastroenteritis in UK. **Lancet.**, v. 350, p. 814-815, 1997.

SMYTH, M. J.; ZACHARIAE, C.O.; NORIHISA, Y.; ORTALDO, J. R.; HISHINUMA, A.; MATSUSHIMA, K. IL-8 gene expression and production in human peripheral blood lymphocyte subsets. **J. Immunol.**, v. 146, p. 3815-3823, 1991.

SPANO, L.C.; DA CUNHA, K.F.; MONFARDINI, M.V.; DE CÁSSIA, BERGAMASCHI F.R.; SCALETSKY, I.C.A. High prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* carrying toxin-encoding genes isolated from children and adults in southeastern Brazil. **BMC Infect. Dis.**, v. 18, p.17:773, 2017.

SOBIESZCZAŃSKA, B.; DUDA, A.K.; TURNIAK, M.; DUDA-MADEJ, A.; FRANICZEK, R.; KASPRZYKOWSKA, U. Characterization of genes with iternalization of enteroaggregative *Escherichia coli* .**Microb. Pathog.**, v. 50, p. 141-147, 2011.

SOUZA, E. C.; MARTINEZ, M. B.; TADDEI, C. R.; MUKAI, L.; GILIO, A. E.; RACZ, M. L.; SILVA, L.; EJZENBERG, B.; OKAY, Y. Perfil etiológico das diarréias agudas de crianças atendidas em São Paulo**. J. Pediatr.**, v. 78, p. 31-38, 2002.

STEELAND, S.; LIBERT, C.; VANDENBROUCKE, R. E. A New Venue of TNF Targeting. **Int. J. Mol. Sci**., v. 11, p: E1442, 2018.

STEINER, T. S.; LIMA, A. A.; NATARO, J. P.; GUERRANT, R. L. Enteroaggregative *Escherichia coli* produce intestinal inflammation and growth impairment and cause interleukin-8 release from intestinal epithelial cells. **J. Infect. Dis.** v. 177, p. 88–96, 1998.

STEINER, T. S.; NATARO, J. P.; POTEET-SMITH, C. E.; SMITH, J. A.; GUERRANT, R. L. Enteroaggregative *Escherichia coli* expresses a novel flagellin that causes IL-8 release from intestinal epithelial cells. **J. Clin. Invest.**, v. 105, p. 1769–1777, 2000.

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

SU, J.; ZHOU, Y.; PAN, Z.; SHI, L.; YANG, J.; LIAO, A.; LIAO, Q.; SU, Q. Downregulation of LIMK1–ADF/cofilin by DADS inhibits the migration and invasion of colon cancer. **Sci. Rep.**, p. 7:45624, 2017.

TADDEI, C.R.; MORENO, A.C.; FERNANDES-FILHO, A.; MONTEMOR, L.P.; MARTINEZ, M.B. Prevalence of secreted autotransporter toxin gene among diffusely adhering *Escherichia coli* isolated from stools of children**. FEMS Microbiol. Lett.**, v. 227, p.249 –253, 2005.

TAO, H.; ZHEN, L.; CHUN-YING, G.; CHI, H. C. Mechanisms of drug resistance in colon cancer and its therapeutic strategies. **World J. Gastroenterol.**, v. 22. p. 6876-6889, 2016.

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

TAPIA-PASTRANA, G.; CHAVEZ-DUEÑAS, L.; LANZ-MENDOZA, H.; TETER, K.; NAVARRO-GARCI, F. VirL is a periplasm protein required Fo efficient secretio of plasmid-enconded toxin from enteroaggregative *Escherichia coli.* **Infect. Immun.**, v. 80, p. 2276-2285, 2012.

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

VERNACCHIO, L.; VEZINA, R. M.; MITCHELL, A. A.; LESKO, S.M.; PLAUNT, A .G.; ACHESON, D. W. Diarrhea in American infants and young children in the community setting. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v 25**,** p 2-7, 2006

WAMG, W. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. **Int. J. Pharm.**, v. 185, p. 129-188, 1999.

WIREN, M.; MAGNUSSON, K. E.; LARSSON, J. The role of glutamine, serum and energy factors in growth of enterocyte-like cell lines. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 30, p. 1331-1336, 1998.

WORLD HEATH ORGANIZATION disponível em: <https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/> Acesso em: 09 dez. 2018.

YANG, N.; HIGUCHI, O.; OHASHI, K.; NAGATA, K.; WADA, A.; KANGAWA, K.; NISHIDA, E.; MIZUNO, K. Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. **Nature**, v. 25, p. 809-812, 1998.

YAP, W. H.; PHANG, S. W.; AHMED, N.; LIM, Y. M. Differential effects of $sPLA_2$-GV and GX on cellular proliferation and lipid accumulation in HT29colon cancer cells. **Mol. Cell Biochem.**, v. 447, p. 93-101, 2018.

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

YEN, Y. T.; KOSTAKIOTI, M.; HENDERSON, I. R.; STATHOPOULOS, C. Common themes and variations in serine protease autotransporters. **Trends Microbiol.**, v. 16, p. 370-390, 2008.

ZAMBONI, A.; FABRICOTTI S. H.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I. C. A. Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors are found to be associated with infantile diarrhea in Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 1058-1063, 2004.

ZHANG, Q. Y.; WANG, L.; SONG, Z. Y.; QU, X. J. Knockdown of type I insulin-like growth factor receptor inhibits human colorectal cancer cell growth and downstream PI3K/Akt, WNT/β-catenin signal pathways. **Biomed. Pharmacother.**, v. 73, p. 12-8, 2015.

ZHOU, Y.; SU, J.; SHI, L.; LIAO, Q.; SU, Q. DADS downregulates the Rac1-ROCK1/PAK1-LIMK1-ADF/cofilin signaling pathway, inhibiting cell migration and invasion. **Oncol Rep.**,v. 29, p. 605–612, 2013.

ZOUDILOVA, M.; KUMAR, P.; GE, L.; WANG, P.; BOKOCH, G. M.; DEFEA, K.A. Beta-arrestin-dependent regulation fo cofilin pathwy downstream of protease-activated receptor-2. **J. Biol. Chem.**, v. 282, p. 20634-20646, 2007.

ZUDE, I.; LEIMBACH, A.; DOBRINDT, U.; Prevalence of autotransporters in *Escherichia coli:* what is the impact of phylogeny and pathotype? **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 304, p. 243–256, 2014.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Infection, Genetics and Evolution 50 (2017) 83–86

Contents lists available at ScienceDirect

Infection, Genetics and Evolution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/meegid

Short communication

Distribution of serine protease autotransporters of *Enterobacteriaceae* in typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli*

Fernanda B. Andrade [a], Afonso G. Abreu [b,c], Kamila O. Nunes [a], Tânia A.T. Gomes [d], Roxane M.F. Piazza [a], Waldir P. Elias [a,*]

[a] Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil
[b] Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária, Universidade CEUMA, São Luís, Brazil
[c] Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Brazil
[d] Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 10 August 2016
Received in revised form 23 February 2017
Accepted 25 February 2017
Available online 28 February 2017

Keywords:
Enteroaggregative *Escherichia coli*
Autotransporters
SPATE
Virulence factors

ABSTRACT

Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) is an agent of acute and persistent diarrhea worldwide, categorized in typical or atypical subgroups. Some EAEC virulence factors are members of the serine protease autotransporters of *Enterobacteriaceae* (SPATE). The presence of SPATE-encoding genes of different *E. coli* pathotypes was searched in a large collection of EAEC strains, and a possible association between SPATEs and *E. coli* phylogroups was investigated. Among 108 typical and 85 atypical EAEC, *pic* was the most prevalent gene, detected in 47.1% of the strains, followed by *sat* (24.3%), *espI* (21.2%), *pet* (19.2%), *sepA* (13.5%), *sigA* (4.1%), *eatA* (4.1%), *vat* (1.0%), *espP* and *tsh*, detected in one strain (0.5%) each; while *epeA* and *espC* were not detected. Phylogenetic analysis demonstrated that 39.9% of the strains belonged to group A, 23.3% to B1, 10.9% to B2, 7.8% to D, 8.8% to E and 1.5% to F. The majority of the SPATE genes were distributed in typical and atypical strains without association with any phylogroup. In addition, *pic* and *pet* were strongly associated with typical EAEC and *sepA* was detected in close association with atypical EAEC. Our data indicate that SPATEs may represent important virulence traits in both subgroups of EAEC.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

Infections caused by enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) have a great impact in public health considering the wide range of susceptible patients and global distribution. This pathotype is recognized as agent of acute and persistent diarrhea in children and adults, foodborne outbreaks of diarrhea and for its association with growth impairment in malnourished children in developing countries (Hebblstrup Jensen et al., 2014; Elias and Navarro-Garcia, 2016).

EAEC is classified in typical and atypical groups, based on the presence or absence of the transcriptional regulator *aggR*, respectively. Since the *aggR* regulon includes several virulence factors (Morin et al., 2013), typical EAEC are considered more virulent than the atypical EAEC strains (Navarro-Garcia and Elias, 2011). However, atypical EAEC strains may also carry several virulence factors, are commonly isolated from cases of diarrhea and are even more frequent than typical strains in some epidemiological studies (Jiang et al., 2002; Huang et al., 2003; Huang et al., 2006). Outbreaks of diarrhea caused by atypical EAEC have also been reported in a nursery in Serbia (Cobeljić et al., 1996) and in Japan where 2697 children were affected (Itoh et al., 1997).

While typical EAEC strains have been thoroughly characterized, studies with atypical EAEC are scarce. Thus, the aim of this study was to evaluate the presence of genes encoding serine protease autotransporters of *Enterobacteriaceae* (SPATEs) in typical and atypical EAEC strains, and investigate the distribution of these genes into phylogenetic groups of *E. coli*.

SPATEs comprise a large group of trypsin-like serine proteases secreted by enteropathogens such as *Shigella* spp. and *E. coli* (Yen et al., 2008). These proteins, also known as autotransporters, are secreted through type V secretion system, which is one of the secretion pathways for the transport of molecules across the outer membrane in Gram-negative bacteria (Pallen et al., 2003). SPATEs have been associated with virulence functions such as bacterial adherence, cytotoxicity, enterotoxicity, serum resistance, mucinase activity and biofilm formation. Members of this family are classified into class I and II, according to phylogeny and biological activities. Class I harbors the cytotoxic proteins, including Pet, Sat, SigA, EspC and EspP. Class II harbors the immunomodulators proteins, such as Pic, Tsh, Vat, SepA, EatA, EpeA and EspI (Ruiz-Perez and Nataro, 2014). Some SPATEs are important virulence

* Corresponding author at: Laboratory of Bacteriology, Instituto Butantan, Avenida Vital Brazil 1500, São Paulo, SP 05503-900, Brazil.
E-mail address: waldir.elias@butantan.gov.br (W.P. Elias).

http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2017.02.018
1567-1348/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

factors found in EAEC strains (Navarro-Garcia and Elias, 2011). Despite of that, only a few studies have searched for the presence of their encoding genes in large EAEC collections (Boisen et al., 2009; Boisen et al., 2012; Lima et al., 2013).

Our collection included 193 EAEC (108 typical and 85 atypical) of several serotypes, isolated during two epidemiological studies on the etiology of acute diarrhea in children. In the first study, the population analyzed consisted of children between 12 and 59 months of age visiting the emergency room of a public hospital in the city of São Paulo (Brazil). Feces were collected from 200 children with acute diarrhea (cases) and 200 asymptomatic controls. The *E. coli* strains isolated from each case or control were screened for adherence in HeLa cells and reactivity with specific DNA probes for the diarrheagenic *E. coli* pathotypes. Ninety-three *E. coli* classified as EAEC, *i.e.* presenting AA, reacting or not with *aatA*, but negative for other probes, were selected (Blake et al., 1993; Gomes et al., 1998). In the second study, the population analyzed consisted of children between 1 and 10 years of age visiting five outpatient clinics from various areas of the city of Salvador (Brazil). Feces were collected from 1020 children with acute diarrhea (cases) and 187 asymptomatic controls. The *E. coli* strains isolated from each case or control were screened by PCR to detect specific genes for the diarrheagenic *E. coli* pathotypes. One hundred *E. coli* classified as EAEC, *i.e.* presenting AA, reacting with *aatA*, but lacking the other virulence genes, were selected (Barreto et al., 2006; Bueris et al., 2007).

Bacterial DNA samples were obtained from overnight cultures in Luria-Bertani agar at 37 °C, from which single colonies were resuspended in 300 μL of MilliQ water and boiled for 10 min. The polymerase chain reaction (PCR) was used to detect the presence of 12 genes encoding SPATE proteins: *eatA*, *epeA*, *espC*, *espI*, *espP*, *pet*, *pic*, *sat*, *sepA*, *sigA*, *tsh* and *vat*. Amplification was performed in a total volume of 25 μL containing: 20 pmol of each primer; 1.0 U *Taq* DNA polymerase; 5.0 μL 10× PCR buffer (200 mM $MgCl_2$ [pH 8.4], 500 mM KCl); 1.0 μL of DNA template. The sequences of each primer, sizes of amplified products, and annealing temperatures for most of the genes were described previously (Boisen et al., 2012; Abreu et al., 2013). Primers for *eatA* (forward: 5′-TTGGCGTTCTGTCATCAGGA-3′; reverse: 5′-CCTTACCAGAGAGTGGATG-3′) and *espC* (forward: 5′-GACAGTTTTACGTTAGCTGG-3′; reverse: 5′-TCCTGCCGAAAACCGAAGC-3′) were designed in this study, based on their corresponding sequences (GenBank accession numbers: AY163491.2 and FM180568.1, respectively). For these two genes the annealing temperatures were 57 °C (*eatA*) and 55 °C (*espC*) and amplified products were 1068 bp (*eatA*) and 1099 bp (*espC*). Amplified fragments of some randomly chosen strains were checked for specificity by DNA sequencing. Phylogrouping was performed by the quadriplex PCR with primers for *chuA*, *yjaA*, TSPE4.C2 and *arpA*, according to the methodology recently described by Clermont et al. (2013). Statistical analyses were performed using Fisher's exact and χ^2 tests.

When strains of the two EAEC groups (typical and atypical) were analyzed together (Table 1), the most frequent gene was *pic*, detected in 47.1%, followed by *sat* (24.3%), *espI* (21.2%), *pet* (19.2%) and *sepA* (13.5%). Except for *espC* and *epeA* that were not detected, the other genes were found in frequencies lower than 5%. The gene frequencies found in our strains are slightly different from other studies that searched for SPATE-encoding genes in EAEC. Although different gene frequencies were seen among these studies, *sat* was consistently detected as the most frequent, followed by *pic* and *sepA* (Boisen et al., 2009; Boisen et al., 2012; Durand et al., 2016; Lima et al., 2013). In addition, *pet* was more frequent in our collection in comparison to those previous reports, while *sepA* and *sat* were less frequent. Distinct frequencies of virulence genes among EAEC collections from countries around the world is a well-supported characteristic of this pathotype (Navarro-Garcia and Elias, 2011; Hebblstrup Jensen et al., 2014). It is worth to mention that the distribution of SPATE genes in our collection was similar when strains were evaluated separately based on the two geographical sites of isolation (data not shown).

In addition, this is the first report on the prevalence of *espI* and *epeA* in a large collection of EAEC. These genes encode proteins of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) that are SPATEs of class II (Schmidt et al., 2001; Leyton et al., 2003). While *epeA* was not detected in our strains, *espI* was the third most frequent gene, demonstrating the spread of a SPATE gene originally detected in STEC strains in EAEC. This is in accordance to another study that found two *espI*-positive strains among ten EAEC (Schmidt et al., 2001).

EspI (*E. coli secreted protease, island-encoded*) is a serine protease described in Shiga-toxin producing *E. coli* that causes degradation of plasma proteins, but is unable to induce cytopathic effects in HeLa cells. The role of EspI in pathogenesis remains to be elucidated in both STEC and EAEC.

The majority of the strains in both typical (80%) and atypical (60%) groups harbored at least one SPATE-encoding gene (Supplementary Table 1). The gene frequency profile observed in the typical and atypical groups were similar to what was found in the whole collection, *i.e. pic*, *sat*, *espI*, *pet* and *sepA* were the most frequent.

When each gene frequency was compared between the two EAEC groups, *pic* ($P < 0.0001$) and *pet* ($P = 0.0029$) were statistically associated with the typical EAEC group and *sepA* ($P = 0.0431$) with atypical EAEC. Pet and Pic were originally described in typical EAEC, while SepA was described in *S. flexneri* (Benjelloun-Touimi et al., 1995; Eslava et al., 1998; Henderson et al., 1999). Pic is involved in mucus secretion and cleavage, immune evasion and intestinal colonization (Henderson et al., 1999; Harrington et al., 2009; Abreu et al., 2015; Abreu et al., 2016). Pet is a cytoskeleton-altering toxin that binds and cleaves epithelial fodrin *in vitro* and *in vivo*, causing fodrin redistribution within the cells (Eslava et al., 1998; Navarro-Garcia and Elias, 2011). SepA is involved in tissue invasion by *S. flexneri* strains (Benjelloun-

Table 1
Distribution of SPATEs virulence genes among typical and atypical EAEC strains.

SPATEs	Gene	No. (%) of EAEC strains				No. (%) of strains in each phylo-group						
		Typical (n = 108)	Atypical (n = 85)	Total (n = 193)	*P* value [a]	A	B1	B2	D	E	F	Unknown
Class I	*sat*	29 (26.8)	18 (21.2)	47 (24.3)	0.22293	20 (42.5)	10 (21.3)	6 (12.8)	2 (4.2)	3 (6.4)	1 (2.1)	5 (10.6)
	pet	29 (26.8)	8 (9.4)	37 (19.2)	0.0016	14 (37.8)	12 (32.4)	0	1 (2.7)	5 (13.5)	0	5 (13.5)
	sigA	7 (6.5)	1 (1.2)	8 (4.1)	0.0660	3 (37.5)	2 (25.0)	1 (12.5)	1 (12.5)	1 (12.5)	0	0
	espP	1 (0.9)	0	1 (0.5)	0.5596	1 (100)	0	0	0	0	0	0
	espC	0	0	0	1.0000	0	0	0	0	0	0	0
Class II	*pic*	72 (66.7)	19 (22.3)	91 (47.1)	<0.0001	29 (31.9)	24 (26.4)	10 (11.0)	7 (7.7)	9 (9.9)	2 (2.2)	10 (11.0)
	espI	26 (24.1)	15 (17.6)	41 (21.2)	0.1826	16 (39.0)	12 (29.3)	4 (9.7)	1 (2.4)	1 (2.4)	1 (2.4)	6 (14.6)
	sepA	10 (9.2)	16 (18.8)	26 (13.5)	0.0431	7 (26.9)	11 (42.3)	3 (11.5)	4 (15.4)	0	0	1 (3.8)
	eatA	3 (2.8)	5 (5.9)	8 (4.1)	0.2379	4 (50.0)	1 (12.5)	1 (12.5)	2 (25.0)	0	0	0
	vat	0	2 (2.3)	2 (1.0)	0.1927	0	0	2 (100)	0	0	0	0
	tsh	0	1 (1.2)	1 (0.5)	0.4404	1 (100)	0	0	0	0	0	0
	epeA	0	0	0	1.0000	0	0	0	0	0	0	0

[a] *P* value by Fisher's exact test (typical EAEC *versus* atypical EAEC).

Touimi et al., 1995) and was later found in association with cases of demonstrated heterogeneity among EAEC strains, since they are not

Durand, D., Contreras, C.A., Mosquito, S., Ruíz, J., Cleary, T.G., Ochoa, T.J., 2016. *pic* gene of enteroaggregative *Escherichia coli* and its association with diarrhea in Peruvian children. Pathog. Dis. 74 (pii: ftw054).

Elias, W.P., Navarro-Garcia, F., 2016. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC). In: Torres, A.G. (Ed.), *Escherichia coli* in the Americas. Springer International Publishing, Cham, pp. 27–57.

Elias, W.P., Uber, A.P., Tomita, S.K., Trabulsi, L.R., Gomes, T.A., 2002. Combinations of putative virulence markers in typical and variant enteroaggregative *Escherichia coli* strains from children with and without diarrhoea. Epidemiol. Infect. 129, 49–55.

Eslava, C., Navarro-Garcia, F., Czeczulin, J.R., Henderson, I.R., Cravioto, A., Nataro, J.P., 1998. Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. Infect. Immun. 66, 3155–3163.

Gomes, T.A., Vieira, M.A., Abe, C.M., Rodrigues, D., Griffin, P.M., Ramos, S.R., 1998. Adherence patterns and adherence-related DNA sequences in *Escherichia coli* isolates from children with and without diarrhea in Sao Paulo city, Brazil. J. Clin. Microbiol. 36, 3609–3613.

Harrington, S.M., Sheikh, J., Henderson, I.R., Ruiz-Perez, F., Cohen, P.S., Nataro, J.P., 2009. The Pic protease of enteroaggregative *Escherichia coli* promotes intestinal colonization and growth in the presence of mucin. Infect. Immun. 77, 2465–2473.

Hebblstrup Jensen, B., Olsen, K.E., Struve, C., Krogfelt, K.A., Petersen, A.M., 2014. Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 27, 614–630.

Henderson, I.R., Czeczulin, J., Eslava, C., Noriega, F., Nataro, J.P., 1999. Characterization of Pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. Infect. Immun. 67, 5587–5596.

Huang, D.B., Jiang, Z.D., Dupont, H.L., 2003. Association of virulence factor-positive and -negative enteroaggregative *Escherichia coli* and occurrence of clinical illness in travelers from the United States to Mexico. Am. J. Trop. Med. Hyg. 69, 506–508.

Huang, D.B., Nataro, J.P., Dupont, H.L., Kamat, P.P., Mhatre, A.D., Okhuysen, P.C., Chiang, T., 2006. Enteroaggregative *Escherichia coli* is a cause of acute diarrheal illness: a meta-analysis. Clin. Infect. Dis. 43, 556–563.

Itoh, Y., Nagano, I., Kunishima, M., Ezaki, T., 1997. Laboratory investigation of enteroaggregative *Escherichia coli* O untypeable:H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness. J. Clin. Microbiol. 35, 2546–2550.

Jiang, Z.D., Lowe, B., Verenkar, M.P., Ashley, D., Steffen, R., Tornieporth, N., von Sonnenburg, F., Waiyaki, P., DuPont, H.L., 2002. Prevalence of enteric pathogens among international travelers with diarrhea acquired in Kenya (Mombasa), India (Goa), or Jamaica (Montego Bay). J. Infect. Dis. 185, 497–502.

Leyton, D.L., Sloan, J., Hill, R.E., Doughty, S., Hartland, E.L., 2003. Transfer region of pO113 from enterohemorrhagic *Escherichia coli*: similarity with R64 and identification of a novel plasmid-encoded autotransporter, EpeA. Infect. Immun. 71, 6307–6319.

Lima, I.F., Boisen, N., Quetz, Jda S., Havt, A., de Carvalho, E.B., Soares, A.M., Lima, N.L., Mota, R.M., Nataro, J.P., Guerrant, R.L., Lima, A.Â., 2013. Prevalence of enteroaggregative *Escherichia coli* and its virulence-related genes in a case-control study among children from north-eastern Brazil. J. Med. Microbiol. 62, 683–693.

Morin, N., Santiago, A.E., Ernst, R.K., Guillot, S.J., Nataro, J.P., 2013. Characterization of the AggR regulon in enteroaggregative *Escherichia coli*. Infect. Immun. 81, 122–132.

Navarro-Garcia, F., Elias, W.P., 2011. Autotransporters and virulence of enteroaggregative *Escherichia coli*. Gut Microbes 2, 13–24.

Pallen, M.J., Chaudhuri, R.R., Henderson, I.R., 2003. Genomic analysis of secretion systems. Curr. Opin. Microbiol. 6, 519–527.

Ruiz-Perez, F., Nataro, J.P., 2014. Bacterial serine proteases secreted by the autotransporter pathway: classification, specificity, and role in virulence. Cell. Mol. Life Sci. 71, 745–770.

Schmidt, H., Zhang, W.L., Hemmrich, U., Jelacic, S., Brunder, W., Tarr, P.I., Dobrindt, U., Hacker, J., Karch, H., 2001. Identification and characterization of a novel genomic island integrated at *selC* in locus of enterocyte effacement-negative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Infect. Immun. 69, 6863–6873.

Sobieszczańska, B., Duda, A.K., Turniak, M., Duda-Madej, A., Franiczek, R., Kasprzykowska, U., 2011. Characterization of genes associated with internalization of enteroaggregative *Escherichia coli*. Microb. Pathog. 50, 141–147.

Yen, Y.T., Kostakioti, M., Henderson, I.R., Stathopoulos, C., 2008. Common themes and variations in serine protease autotransporters. Trends Microbiol. 16, 370–379.

Zude, I., Leimbach, A., Dobrindt, U., 2014. Prevalence of autotransporters in *Escherichia coli*: what is the impact of phylogeny and pathotype? Int. J. Med. Microbiol. 304, 243–256.

APÊNDICE B

Alinhamento das sequências de nucleotídeos de *sepA* das cepas M90T, BA198 e BA732

```
                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                     5         15         25         35         45         55
M90T             ATGAACAAAA TTTATTATCT GAAATATTGC CATATTACCA AAAGCCTGAT TGCGGTGAGC
EAEC BA198       ATGAACAAAA TTTATTATCT GAAATATTGC CATATTACCA AAAGCCTGAT TGCGGTGAGC
EAEC BA732       ATGAACAAAA TTTATTATCT GAAATATTGC CATATTACCA AAAGCCTGAT TGCGGTGAGC

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    65         75         85         95        105        115
M90T             GAACTGGCGC GTCGTGTGAC CTGCAAAAGC CATCGTCGTC TGAGCCGTCG TGTGATTCTG
EAEC BA198       GAACTGGCGC GTCGTGTGAC CTGCAAAAGC CATCGTCGTC TGAGCCGTCG TGTGATTCTG
EAEC BA732       GAACTGGCGC GTCGTGTGAC CTGCAAAAGC CATCGTCGTC TGAGCCGTCG TGTGATTCTG

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   125        135        145        155        165        175
M90T             ACCAGCGTGG CGGCGCTGAG CCTGAGCAGC GCGTGGCCGG CGCTGAGCGC GACCGTGAGC
EAEC BA198       ACCAGCGTGG CGGCGCTGAG CCTGAGCAGC GCGTGGCCGG CGCTGAGCGC GACCGTGAGC
EAEC BA732       ACCAGCGTGG CGGCGCTGAG CCTGAGCAGC GCGTGGCCGG CGCTGAGCGC GACCGTGAGC

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   185        195        205        215        225        235
M90T             GCGGAAATTC CGTATCAGAT TTTTCGTGAT TTTGCGGAAA ACAAAGGCCA GTTTACCCCG
EAEC BA198       GCGGAAATTC CGTATCAGAT TTTTCGTGAT TTTGCGGAAA ACAAAGGCCA GTTTACCCCG
EAEC BA732       GCGGAAATTC CGTATCAGAT TTTTCGTGAT TTTGCGGAAA ACAAAGGCCA GTTTACCCCG

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   245        255        265        275        285        295
M90T             GGCACCACCA ACATTAGCAT TTATGATAAA CAGGGCAACC TGGTGGGCAA ACTGGATAAA
EAEC BA198       GGCACCACCA ACATTAGCAT TTATGATAAA CAGGGCAACC TGGTGGGCAA ACTGGATAAA
EAEC BA732       GGCACCACCA ACATTAGCAT TTATGATAAA CAGGGCAACC TGGTGGGCAA ACTGGATAAA

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   305        315        325        335        345        355
M90T             GCGCCGATGG CGGATTTTAG CAGCGCGACC ATTACCACCG GCAGCCTGCC GCCGGGCGAT
EAEC BA198       GCGCCGATGG CGGATTTTAG CAGCGCGACC ATTACCACCG GCAGCCTGCC GCCGGGCAAC
EAEC BA732       GCGCCGATGG CGGATTTTAG CAGCGCGACC ATTACCACCG GCAGCCTGCC GCCGGGCAAC

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   365        375        385        395        405        415
M90T             CATACCCTGT ATAGCCCGCA GTATGTGGTG ACCGCGAAAC ATGTGAGCGG CAGCGATACC
EAEC BA198       CATACCCTGT ATAGCCCGCA GTATGTGGTG ACCGCGAAAC ATGTGAGCGG CAGCGATACC
EAEC BA732       CATACCCTGT ATAGCCCGCA GTATGTGGTG ACCGCGAAAC ATGTGAGCGG CAGCGATACC
```

```
                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    425        435        445        455        465        475
M90T             atgAGCTTTG GCTATGCGAA AAACACCTAT ACCGCGGTGG GCACCAACAA CAACAGCGGC
EAEC  BA198      atgAGCTTTG GCTATGCGAA AAACACCTAT ACCGCGGTGG GCACCAACAA CAACAGCGGC
EAEC  BA732      atgAGCTTTG GCTATGCGAA AAACACCTAT ACCGCGGTGG GCACCAACAA CAACAGCGGC

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    485        495        505        515        525        535
M90T             CTGGATATTA AAACCCGTCG TCTGAGCAAA CTGGTGACCG AAGTGGCGCC GGCGGAAGTG
EAEC  BA198      CTGGATATTA AAACCCGTCG TCTGAGCAAA CTGGTGACCG AAGTGGCGCC GGCGGAAGTG
EAEC  BA732      CTGGATATTA AAACCCGTCG TCTGAGCAAA CTGGTGACCG AAGTGGCGCC GGCGGAAGTG

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    545        555        565        575        585        595
M90T             AGCGATATTG GCGCGGTGAG CGGCGCGTAT CAGGCGGGCG GCCGTTTTAC CGAATTTTAT
EAEC  BA198      AGCGATATTG GCGCGGTGAG CGGCGCGTAT CAGGCGGGCG GCCGTTTTAC CGCGTTTTAT
EAEC  BA732      AGCGATATTG GCGCGGTGAG CGGCGCGTAT CAGGCGGGCG GCCGTTTTAC CGCGTTTTAT

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    605        615        625        635        645        655
M90T             CGTCTGGGCG GCGGCATGCA GTATGTGAAA GATAAAAACG GCAACCGTAC CCAGGTGTAT
EAEC  BA198      CGTCTGGGCG GCGGCATGCA GTATGTGAAA GATAAAAACG GCAACCGTAC CCAGGTGTAT
EAEC  BA732      CGTCTGGGCG GCGGCATGCA GTATGTGAAA GATAAAAACG GCAACCGTAC CCAGGTGTAT

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    665        675        685        695        705        715
M90T             ACCAACGGCG GCTTTCTGGT GGGCGGCACC GTGAGCGCGC TGAACAGCTA TAACAACGGC
EAEC  BA198      ACCAACGGCG GCTTTCTGGT GGGCGGCACC GTGAGCGCGC TGAACAGCTA TAACAACGGC
EAEC  BA732      ACCAACGGCG GCTTTCTGGT GGGCGGCACC GTGAGCGCGC TGAACAGCTA TAACAACGGC

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    725        735        745        755        765        775
M90T             CAGatgATTA CCGCGCAGAC CGGCGATATT TTTCTGATTC CGCCGAACGG CCCGCTGGCG
EAEC  BA198      CAGatgATTA CCGCGCAGAC CGGCGATATT TTT~~~ATTC CG~~~AACGG CCCGCTGGCG
EAEC  BA732      CAGatgATTA CCGCGCAGAC CGGCGATATT TTT---ATTC CG---AACGG CCCGCTGGCG

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    785        795        805        815        825        835
M90T             AACTATCTGA ACatgGGCGA TAGCGGCAGC CCGCTGTTTG CGTATGATAG CCTGCAGAAA
EAEC  BA198      AACTATCTGA ACatgGGCGA TAGCGGCAGC CCGCTGTTTG CGTATGATAG CCTGCAGAAA
EAEC  BA732      AACTATCTGA ACatgGGCGA TAGCGGCAGC CCGCTGTTTG CGTATGATAG CCTGCAGAAA

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    845        855        865        875        885        895
M90T             AAATGGGTGC TGATTGGCGT GCTGAGCAGC GGCACCAACT ATGGCAACAA CTGGGTGGTG
EAEC  BA198      AAATGGGTGC TGATTGGCGT GCTGAGCAGC GGCACCAACT ATGGCAACAA CTGGGTGGTG
EAEC  BA732      AAATGGGTGC TGATTGGCGT GCTGAGCAGC GGCACCAACT ATGGCAACAA CTGGGTGGTG
```

```
                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   905        915        925        935        945        955
M90T            ACCACCCAGG ATTTTCTGGG CCAGCAGCCG CAGAACGATT TTGATAAAAC CATTGCGTAT
EAEC  BA198     ACCACCCAGG ATTTTCTGGG CCAGCAGCCG CAGAACGATT TTGATAAAAC CATTGCGTAT
EAEC  BA732     ACCACCCAGG ATTTTCTGGG CCAGCAGCCG CAGAACGATT TTGATAAAAC CATTGCGTAT

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   965        975        985        995       1005       1015
M90T            ACCAGCGGCG AAGGCGTGCT GCAGTGGAAA TATGATGCGG CGAACGGCAC CGGCACCCTG
EAEC  BA198     ACCAGCGGCG AAGGCGTGCT GCAGTGGAAA TATGATGCGG CGAACGGCAC CGGCACCCTG
EAEC  BA732     ACCAGCGGCG AAGGCGTGCT GCAGTGGAAA TATGATGCGG CGAACGGCAC CGGCACCCTG

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                  1025       1035       1045       1055       1065       1075
M90T            ACCCAGGGCA ACACCACCTG GGGCTATGCG TGGAAAGAAC GTAAACTGAT TCTGAACGCG
EAEC  BA198     ACCCAGGGCA ACACCACCTG G---TATGCG TGGAAAGAAC GTAAA---AT T---AACGCG
EAEC  BA732     ACCCAGGGCA ACACCACCTG G---TATGCG TGGAAAGAAC GTAAA---AT T---AACGCG

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                  1085       1095       1105       1115       1125       1135
M90T            GGCAAAAACC TGCTGTTTAC CGGCAACAAC GGCGAAGTGG TGCTGCAGAA CAGCGTGAAC
EAEC  BA198     GGCAAAAACC TGCTGTTTAC CGGCAACAAC GGCGAAGTGG TGCTGCAGAA CAGCGTGAAC
EAEC  BA732     GGCAAAAACC TGCTGTTTAC CGGCAACAAC GGCGAAGTGG TGCTGCAGAA CAGCGTGAAC

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                  1145       1155       1165       1175       1185       1195
M90T            CAGGGCGCGG GCTATCTGCA GTTTGCGGGC GATTATCGTG TGAGCGCGCT GAACGGCCAG
EAEC  BA198     CAGGGCGCGG GCTATCTGCA GTTTGCGGGC GATTATCGTG TGAGCGCGCT GAACGGCCAG
EAEC  BA732     CAGGGCGCGG GCTATCTGCA GTTTGCGGGC GATTATCGTG TGAGCGCGCT GAACGGCCAG

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                  1205       1215       1225       1235       1245       1255
M90T            ACCTGGatgG GCGGCGGCAT TATTACCGAT AAAGGCACCC ATGTGCTGTG GCAGGTGAAC
EAEC  BA198     ACCTGGatgG GCGGCGGCAT TATTACCGAT AAAGGCACCC ATGTGCTGTG GCAGGTGAAC
EAEC  BA732     ACCTGGatgG GCGGCGGCAT TATTACCGAT AAAGGCACCC ATGTGCTGTG GCAGGTGAAC

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                  1265       1275       1285       1295       1305       1315
M90T            GGCGTGGCGG GCGATAACCT GCATAAAACC GGCGAAGGCA CCCTGACCGT GAACGGCACC
EAEC  BA198     GGCGTGGCGG GCGATAACCT GCATAAAACC GGCGAAGGCA CCCTGACCGT GAACGGCACC
EAEC  BA732     GGCGTGGCGG GCGATAACCT GCATAAAACC GGCGAAGGCA CCCTGACCGT GAACGGCACC

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                  1325       1335       1345       1355       1365       1375
M90T            GGCGTGAACG CGGGCGGCCT GAAAGTGGGC GATGGCACCG TGATTCTGAA CCAGCAGGCG
EAEC  BA198     GGCGTGAACG CGGGCGGCCT GAAAGTGGGC GATGGCACCG TGATTCTGAA CCAGCAGGCG
EAEC  BA732     GGCGTGAACG CGGGCGGCCT GAAAGTGGGC GATGGCACCG TGATTCTGAA CCAGCAGGCG
```

```
                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    1385       1395       1405       1415       1425       1435
M90T             GATCGTGATG GCAAAGTGCA GGCGTTTAGC AGCGTGGGCA TTGCGAGCGG CCGTCCGACC
EAEC  BA198      GATGCGGATG GCAAAGTGCA GGCGTTTAGC AGCGTGGGCA TTGCGAGCGG CCGTCCGACC
EAEC  BA732      GATGCGGATG GCAAAGTGCA GGCGTTTAGC AGCGTGGGCA TTGCGAGCGG CCGTCCGACC

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    1445       1455       1465       1475       1485       1495
M90T             GTGGTGCTGA GCGATAGCCA GCAGGTGAAC CCGGATAACA TTAGCTGGGG CTATCGTGGC
EAEC  BA198      GTGGTGCTGA GCGATAGCCA GCAGGTGAAC CCGGATAACA TTAGCTGGGG CTATCGTGGC
EAEC  BA732      GTGGTGCTGA GCGATAGCCA GCAGGTGAAC CCGGATAACA TTAGCTGGGG CTATCGTGGC

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    1505       1515       1525       1535       1545       1555
M90T             GGCCGTCTGG AACTGAACGG CAACAACCTG ACCTTTACCC GTCTGCAGGC GGCGGATTAT
EAEC  BA198      GGCCGTCTGG AACTGAACGG CAACAACCTG ACCTTTACCC GTCTGCAGGC GGCGGATTAT
EAEC  BA732      GGCCGTCTGG AACTGAACGG CAACAACCTG ACCTTTACCC GTCTGCAGGC GGCGGATTAT

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    1565       1575       1585       1595       1605       1615
M90T             GGCGCGATTA TTACCAACAA CAGCGAAAAA AAAAGCACCG TGACCCTGGA TCTGCAGACC
EAEC  BA198      GGCGCGATTA TTACCAACAA CAGCGAAAAA AAAAGCACCG TGACCCTGGA TCTGCAGACC
EAEC  BA732      GGCGCGATTA TTACCAACAA CAGCGAAAAA AAAAGCACCG TGACCCTGGA TCTGCAGACC

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    1625       1635       1645       1655       1665       1675
M90T             CTGAAAGCGA GCGATATTAA CGTGCCGGTG AACACCGTGA GCATTTTTGG CGGCCGTGGC
EAEC  BA198      CTGAAAGCGA GCGATATTAA CGTGCCGGTG AACACCGTGA GCATTTTTGG CGGCCGTGGC
EAEC  BA732      CTGAAAGCGA GCGATATTAA CGTGCCGGTG AACACCGTGA GCATTTTTGG CGGCCGTGGC

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    1685       1695       1705       1715       1725       1735
M90T             GCGCCGGGCG ATCTGTATTA TGATAGCAGC ACCAAACAGT ATTTTATTCT GAAAGCGAGC
EAEC  BA198      GCGCCGGGCG ATCTGTATTA TGATAGCGCG ACCAAACAGT ATTTTATTCT GAAAGCGAGC
EAEC  BA732      GCGCCGGGCG ATCTGTATTA TGATAGCGCG ACCAAACAGT ATTTTATTCT GAAAGCGAGC

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    1745       1755       1765       1775       1785       1795
M90T             AGCTATAGCC CGTTTTTTAG CGATCTGAAC AACAGCAGCG TGTGGCAGAA CGTGGGCAAA
EAEC  BA198      AGCTATAGCC CGTTTTTTAG CGATCTGAGC AACAGCAGCG TGTGGCAGAA CGTGGGCAAA
EAEC  BA732      AGCTATAGCC CGTTTTTTAG CGATCTGAGC AACAGCAGCG TGTGGCAGAA CGTGGGCAAA

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    1805       1815       1825       1835       1845       1855
M90T             GATCATAACA AAGCGATTGA TACCGTGAAA CAGCAGAAAA TTGAAGCGAG CAGCCAGCCG
EAEC  BA198      GATCGTAACA AAGCGATTGA TACCGTGAAA CAGCAGAAAA TTGAAGCGAG CAGCCAGCCG
EAEC  BA732      GATCGTAACA AAGCGATTGA TACCGTGAAA CAGCAGAAAA TTGAAGCGAG CAGCCAGCCG
```

```
                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    1865       1875       1885       1895       1905       1915
M90T             TATatgTATC ATGGCCAGCT GAACGGCAAC atgGATGTGA ACATTCCGCA GCTGAGCGGC
EAEC  BA198      TATatgTATC ATGGCCAGCT GAACGGCAAC atgGATGTGA ACATTCCGCA GCTGAGCGGC
EAEC  BA732      TATatgTATC ATGGCCAGCT GAACGGCAAC atgGATGTGA ACATTCCGCA GCTGAGCGGC

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    1925       1935       1945       1955       1965       1975
M90T             AAAGATGTGC TGGCGCTGGA TGGCAGCGTG AACCTGCCGG AAGGCAGCAT TACCAAAAAA
EAEC  BA198      AAAGATGTGC TGGCGCTGGA TGGCAGCGTG AACCTGCCGG AAGGCAGCAT TACCAAAAAA
EAEC  BA732      AAAGATGTGC TGGCGCTGGA TGGCAGCGTG AACCTGCCGG AAGGCAGCAT TACCAAAAAA

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    1985       1995       2005       2015       2025       2035
M90T             AGCGGCACCC TGATTTTTCA GGGCCATCCG GTGATTCATG CGGGCACCAC CACCAGCAGC
EAEC  BA198      AGCGGCACCC TGATTTTTCA GGGCCATCCG GTGATTCATG CGGGCACCAC CACCAGCAGC
EAEC  BA732      AGCGGCACCC TGATTTTTCA GGGCCATCCG GTGATTCATG CGGGCACCAC CACCAGCAGC

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    2045       2055       2065       2075       2085       2095
M90T             AGCCAGAGCG ATTGGGAAAC CCGTCAGTTT ACCCTGGAAA AACTGAAACT GGATGCGGCG
EAEC  BA198      AGCCAGAGCG ATTGGGAAAC CCGTCAGTTT ACCCTGGAAA AACTGAAACT GGATGCGGCG
EAEC  BA732      AGCCAGAGCG ATTGGGAAAC CCGTCAGTTT ACCCTGGAAA AACTGAAACT GGATGCGGCG

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    2105       2115       2125       2135       2145       2155
M90T             ACCTTTCATC TGAGCCGTAA CGGCAAAatg CAGGGCGATA TTAACGCGAC CAACGGCAGC
EAEC  BA198      ACCTTTCATC TGAGCCGTAA CGGCAAAatg CAGGGCGATA TTAACGCGAC CAACGGCAGC
EAEC  BA732      ACCTTTCATC TGAGCCGTAA CGGCAAAatg CAGGGCGATA TTAACGCGAC CAACGGCAGC

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    2165       2175       2185       2195       2205       2215
M90T             ACCGTGATTC TGGGCAGCAG CCGTGTGTTT ACCGATCGTA GCGATGGCAC CGGCAACGCG
EAEC  BA198      ACCGTGATTC TGGGCAGCAG CCGTGTGTTT ACCGATCGTA GCGATGGCAC CGGCAACGCG
EAEC  BA732      ACCGTGATTC TGGGCAGCAG CCGTGTGTTT ACCGATCGTA GCGATGGCAC CGGCAACGCG

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    2225       2235       2245       2255       2265       2275
M90T             GTGAGCAGCG TGGAAGGCAG CGCGACCGCG ACCACCGTGG GCGATCAGAG CGATTATAGC
EAEC  BA198      GTGAGCAGCG TGGAAGGCAG CGCGACCGCG ACCACCGTGG GCGATCAGAG CGATTATAGC
EAEC  BA732      GTGAGCAGCG TGGAAGGCAG CGCGACCGCG ACCACCGTGG GCGATCAGAG CGATTATAGC

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    2285       2295       2305       2315       2325       2335
M90T             GGCAACGTGA CCCTGGAAAA CAAAAGCAGC CTGCAGATTa tgGAACGTTT TACCGGCGGC
EAEC  BA198      GGCAACGTGA CCCTGGAAAA CAAAAGCAGC CTGCAGATTa tgGAACGTTT TACCGGCGGC
EAEC  BA732      GGCAACGTGA CCCTGGAAAA CAAAAGCAGC CTGCAGATTa tgGAACGTTT TACCGGCGGC
```

```
                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   2345       2355       2365       2375       2385       2395
M90T            ATTGAAGCGT ATGATAGCAC CGTGAGCGTG ACCAGCCAGA ACGCGGTGTT TGATCGTGTG
EAEC  BA198     ATTGAAGCGT ATGATAGCAC CGTGAGCGTG ACCAGCCAGA ACGCGGTGTT TGATCGTGTG
EAEC  BA732     ATTGAAGCGT ATGATAGCAC CGTGAGCGTG ACCAGCCAGA ACGCGGTGTT TGATCGTGTG

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   2405       2415       2425       2435       2445       2455
M90T            GGCAGCTTTG TGAACAGCAG CCTGACCCTG GGCAAAGGCG CGAAACTGAC CGCGCAGAGC
EAEC  BA198     GGCAGCTTTG TGAACAGCAG CCTGACCCTG GGCAAAGGCG CGAAACTGAC CGCGCAGAGC
EAEC  BA732     GGCAGCTTTG TGAACAGCAG CCTGACCCTG GGCAAAGGCG CGAAACTGAC CGCGCAGAGC

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   2465       2475       2485       2495       2505       2515
M90T            GGCATTTTTA GCACCGGCGC GGTGGATGTG AAAGAAAACG CGAGCCTGAC CCTGACCGGC
EAEC  BA198     GGCATTTTTA GCACCGGCGC GGTGGATGTG AAAGAAAACG CGAGCCTGAC CCTGACCGGC
EAEC  BA732     GGCATTTTTA GCACCGGCGC GGTGGATGTG AAAGAAAACG CGAGCCTGAC CCTGACCGGC

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   2525       2535       2545       2555       2565       2575
M90T            atgCCGAGCG CGCAGAAACA GGGCTATTAT AGCCCGGTGA TTAGCACCAC CGAAGGCATT
EAEC  BA198     atgCCGAGCG CGCAGAAACA GGGCTATTAT AGCCCGGTGA TTAGCACCAC CGAAGGCATT
EAEC  BA732     atgCCGAGCG CGCAGAAACA GGGCTATTAT AGCCCGGTGA TTAGCACCAC CGAAGGCATT

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   2585       2595       2605       2615       2625       2635
M90T            AACCTGGAAG ATAACGCGAG CTTTAGCGTG AAAAACatgG GCTATCTGAG CAGCGATATT
EAEC  BA198     AACCTGGAAG ATAAAGCGAG CTTTAGCGTG AAAAACatgG GCTATCTGAG CAGCGATATT
EAEC  BA732     AACCTGGAAG ATAAAGCGAG CTTTAGCGTG AAAAACatgG GCTATCTGAG CAGCGATATT

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   2645       2655       2665       2675       2685       2695
M90T            CATGCGGGCA CCACCGCGGC GACCATTAAC CTGGGCGATA GCGATGCGGA TGCGGGCAAA
EAEC  BA198     CATGCGGGCA CCACCGCGGC GACCATTAAC CTGGGCGATA GCGATGCGGA TGCGGGCAAA
EAEC  BA732     CATGCGGGCA CCACCGCGGC GACCATTAAC CTGGGCGATA GCGATGCGGA TGCGGGCAAA

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   2705       2715       2725       2735       2745       2755
M90T            ACCGATAGCC CGCTGTTTAG CAGCCTGatg AAAGGCTATA ACGCGGTGCT GCGTGGCAGC
EAEC  BA198     ACCGATAGCC CGCTGTTTAG CAGCCTGatg AAAGGCTATA ACGCGGTGCT GCGTGGCAGC
EAEC  BA732     ACCGATAGCC CGCTGTTTAG CAGCCTGatg AAAGGCTATA ACGCGGTGCT GCGTGGCAGC

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   2765       2775       2785       2795       2805       2815
M90T            ATTACCGGCG CGCAGAGCAC CGTGAACatg ATTAACGCGC TGTGGTATAG CGATGGCAAA
EAEC  BA198     ATTACCGGCG CGCAGAGCAC CGTGAACatg ATTAACGCGC TGTGGTATAG CGATGGCAAA
EAEC  BA732     ATTACCGGCG CGCAGAGCAC CGTGAACatg ATTAACGCGC TGTGGTATAG CGATGGCAAA
```

```
                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   2825       2835       2845       2855       2865       2875
M90T            AGCGAAGCGG GCGCGCTGAA AGCGAAAGGC AGCCGTATTG AACTGGGCGA TGGCAAACAT
EAEC  BA198     AGCGAAGCGG GCGCGCTGAA AGCGAAAGGC AGCCGTATTG AACTGGGCGA TGGCAAACAT
EAEC  BA732     AGCGAAGCGG GCGCGCTGAA AGCGAAAGGC AGCCGTATTG AACTGGGCGA TGGCAAACAT

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   2885       2895       2905       2915       2925       2935
M90T            TTTGCGACCC TGCAGGTGAA AGAACTGAGC GCGGATAACA CCACCTTTCT GatgCATACC
EAEC  BA198     TTTGCGACCC TGCAGGTGAA AGAACTGAGC GCGGATAACA CCACCTTTCT GatgCATACC
EAEC  BA732     TTTGCGACCC TGCAGGTGAA AGAACTGAGC GCGGATAACA CCACCTTTCT GatgCATACC

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   2945       2955       2965       2975       2985       2995
M90T            AACAACAGCC GTGCGGATCA GCTGAACGTG ACCGATAAAC TGAGCGGCAG CAACAACAGC
EAEC  BA198     AACAACAGCT GGGCGGATCA GCTGAACGTG ACCGATAAAC TGAGCGATAG CAACAACAGC
EAEC  BA732     AACAACAGCT GGGCGGATCA GCTGAACGTG ACCGATAAAC TGAGCGGCAG CAACAACAGC

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   3005       3015       3025       3035       3045       3055
M90T            GTGCTGGTGG ATTTTCTGAA CAAACCGGCG AGCGAAatgA GCGTGACCCT GATTACCGCG
EAEC  BA198     GTGCTGGTGG ATTTTCTGAA CAAACCGGCG AGCGAAatgA GCGTGACCCT GATTACCGCG
EAEC  BA732     GTGCTGGTGG ATTTTCTGAA CAAACCGGCG AGCGAAatgA GCGTGACCCT GATTACCGCG

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   3065       3075       3085       3095       3105       3115
M90T            CCGAAAGGCA GCGATGAAAA AACCTTTACC GCGGGCACCC AGCAGATTGG CTTTAGCAAC
EAEC  BA198     CCGAAAGGCA GCGATGAAAA AACCTTTACC GCGGGCACCC AGCAGATTGG CTTTAGCAAC
EAEC  BA732     CCGAAAGGCA GCGATGAAAA AACCTTTACC GCGGGCACCC AGCAGATTGG CTTTAGCAAC

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   3125       3135       3145       3155       3165       3175
M90T            GTGACCCCGG TGATTAGCAC CGAAAAAACC GATGATGCGA CCAAATGGGT GCTGACCGGC
EAEC  BA198     GTGACCCCGG TGATTAGCAC CGAAAAAACC GATGATGCGA CCAAATGGGT GCTGACCGGC
EAEC  BA732     GTGACCCCGG TGATTAGCAC CGAAAAAACC GATGATGCGA CCAAATGGGT GCTGACCGGC

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   3185       3195       3205       3215       3225       3235
M90T            TATCAGACCA CCGCGGATGC GGGCGCGAGC AAAGCGGCGA AAGATTTTat gGCGAGCGGC
EAEC  BA198     TATCAGACCA CCGCGGATGC GGGCGCGAGC AAAGCGGCGA AAGATTTTat gGCGAGCGGC
EAEC  BA732     TATCAGACCA CCGCGGATGC GGGCGCGAGC AAAGCGGCGA AAGATTTTat gGCGAGCGGC

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   3245       3255       3265       3275       3285       3295
M90T            TATAAAAGCT TTCTGACCGA AGTGAACAAC CTGAACAAAC GTatgGGCGA TCTGCGTGAT
EAEC  BA198     TATAAAAGCT TTCTGACCGA AGTGAACAAC CTGAACAAAC GTatgGGCGA TCTGCGTGAT
EAEC  BA732     TATAAAAGCT TTCTGACCGA AGTGAACAAC CTGAACAAAC GTatgGGCGA TCTGCGTGAT
```

```
                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   3305       3315       3325       3335       3345       3355
M90T            ACCCAGGGCG ATGCGGGCGT GTGGGCGCGT ATTatgAACG GCACCGGCAG CGCGGATGGC
EAEC  BA198     ACCCAGGGCG ATGCGGGCGT GTGGGCGCGT ATTatgAACG GCACCGGCAG CGCGGATGGC
EAEC  BA732     ACCCAGGGCG ATGCGGGCGT GTGGGCGCGT ATTatgAACG GCACCGGCAG CGCGGATGGC

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   3365       3375       3385       3395       3405       3415
M90T            GATTATAGCG ATAACTATAC CCATGTGCAG ATTGGCGTGG ATCGTAAACA TGAACTGGAT
EAEC  BA198     GATTATAGCG ATAACTATAC CCATGTGCAG ATTGGCGTGG ATACCAAACA TGAACTGGAT
EAEC  BA732     GATTATAGCG ATAACTATAC CCATGTGCAG ATTGGCGTGG ATCGTAAACA TGAACTGGAT

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   3425       3435       3445       3455       3465       3475
M90T            GGCGTGGATC TGTTTACCGG CGCGCTGCTG ACCTATACCG ATAGCAACGC GAGCAGCCAT
EAEC  BA198     GGCGTGGATC TGTTTACCGG CGCGCTGCTG ACCTATACCG ATAGCAACGC GAGCAGCCAT
EAEC  BA732     GGCGTGGATC TGTTTACCGG CGCGCTGCTG ACCTATACCG ATAGCAACGC GAGCAGCCAT

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   3485       3495       3505       3515       3525       3535
M90T            GCGTTTAGCG GCAAAAACAA AAGCGTGGGC GGCGGCCTGT ATGCGAGCGC GCTGTTTAAC
EAEC  BA198     GCGTTTAGCG GCAAAACCAA AAGCGTGGGC GGCGGCCTGT ATGCGAGCGC GCTGTTTAAC
EAEC  BA732     GCGTTTAGCG GCAAAACCAA AAGCGTGGGC GGCGGCCTGT ATGCGAGCGC GCTGTTTAAC

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   3545       3555       3565       3575       3585       3595
M90T            AGCGGCGCGT ATTTTGATCT GATTGGCAAA TATCTGCATC ATGATAACCA GCATACCGCG
EAEC  BA198     AGCGGCGCGT ATTTTGATCT GATTGGCAAA TATCTGCATC ATGATAACCA GCATACCGCG
EAEC  BA732     AGCGGCGCGT ATTTTGATCT GATTGGCAAA TATCTGCATC ATGATAACCA GCATACCGCG

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   3605       3615       3625       3635       3645       3655
M90T            AACTTTGCGA GCCTGGGCAC CAAAGATTAT AGCAGCCATA GCTGGTATGC GGGCGCGGAA
EAEC  BA198     AACTTTGCGA GCCTGGGCAC CAAAGATTAT AGCAGCCATA GCTGGTATGC GGGCGCGGAA
EAEC  BA732     AACTTTGCGA GCCTGGGCAC CAAAGATTAT AGCAGCCATA GCTGGTATGC GGGCGCGGAA

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   3665       3675       3685       3695       3705       3715
M90T            GTGGGCTATC GTTATCATCT GACCAAAGAA AGCTGGGTGG AACCGCAGAT TGAACTGGTG
EAEC  BA198     GTGGGCTATC GTTATCATCT GACCAAAGAA AGCTGGGTGG AACCGCAGAT TGAACTGGTG
EAEC  BA732     GTGGGCTATC GTTATCATCT GACCAAAGAA AGCTGGGTGG AACCGCAGAT TGAACTGGTG

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   3725       3735       3745       3755       3765       3775
M90T            TATGGCAGCG TGAGCGGCAA AGCGTTTAGC TGGGAAGCGC GTGGCatgGC GCTGAGCatg
EAEC  BA198     TATGGCAGCG TGAGCGGCAA AGCGTTTAGC TGGGAAGATC GTGGCatgGC GCTGAGCatg
EAEC  BA732     TATGGCAGCG TGAGCGGCAA AGCGTTTAGC TGGGAAGATC GTGGCatgGC GCTGAGCatg
```

```
                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   3665       3675       3685       3695       3705       3715
M90T            GTGGGCTATC GTTATCATCT GACCAAAGAA AGCTGGGTGG AACCGCAGAT TGAACTGGTG
EAEC  BA198     GTGGGCTATC GTTATCATCT GACCAAAGAA AGCTGGGTGG AACCGCAGAT TGAACTGGTG
EAEC  BA732     GTGGGCTATC GTTATCATCT GACCAAAGAA AGCTGGGTGG AACCGCAGAT TGAACTGGTG

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   3725       3735       3745       3755       3765       3775
M90T            TATGGCAGCG TGAGCGGCAA AGCGTTTAGC TGGGAAGCGC GTGGCatgGC GCTGAGCatg
EAEC  BA198     TATGGCAGCG TGAGCGGCAA AGCGTTTAGC TGGGAAGATC GTGGCatgGC GCTGAGCatg
EAEC  BA732     TATGGCAGCG TGAGCGGCAA AGCGTTTAGC TGGGAAGATC GTGGCatgGC GCTGAGCatg

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   3785       3795       3805       3815       3825       3835
M90T            AAAGATAAAG ATTATAACCC GCTGATTGGC CGTACCGGCG TGGATGTGGG CCGTGCGTTT
EAEC  BA198     AAAGATAAAG ATTATAACCC GCTGATTGGC CGTACCGGCG TGGATGTGGG CCGTGTGTTT
EAEC  BA732     AAAGATAAAG ATTATAACCC GCTGATTGGC CGTACCGGCG TGGATGTGGG CCGTGTGTTT

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   3845       3855       3865       3875       3885       3895
M90T            AGCGGCGATG ATTGGAAAAT TACCGCGCGT GCGGGCCTGG GCTATCAGTT TGATCTGCTG
EAEC  BA198     AGCGGCGATG ATTGGAAAAT TACCGCGCGT GCGGGCCTGG GCTATCAGTT TGATCTGCTG
EAEC  BA732     AGCGGCGATG ATTGGAAAAT TACCGCGCGT GCGGGCCTGG GCTATCAGTT TGATCTGCTG

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   3905       3915       3925       3935       3945       3955
M90T            GCGAACGGCG AAACCGTGCT GCAGGATGCG AGCGGCGAAA AACGTTTTGA AGGCGAAAAA
EAEC  BA198     GCGAACGGCG AAACCGTGCT GCAGGATGCG AGCGGCGAAA AACGTTTTGA AGGCGAAAAA
EAEC  BA732     GCGAACGGCG AAACCGTGCT GCAGGATGCG AGCGGCGAAA AACGTTTTGA AGGCGAAAAA

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   3965       3975       3985       3995       4005       4015
M90T            GATAGCCGTa tgCTGatgAC CGTGGGCatg AACGCGGAAA TTAAAGATAA CatgCGTCTG
EAEC  BA198     GATAGCCGTa tgCTGatgAC CGTGGGCatg AACGCGGAAA TTAAAGATAA CatgCGTCTG
EAEC  BA732     GATAGCCGTa tgCTGatgAC CGTGGGCatg AACGCGGAAA TTAAAGATAA CatgCGTCTG

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   4025       4035       4045       4055       4065       4075
M90T            GGCCTGGAAC TGGAAAAAAG CGCGTTTGGC AAATATAACG TGGATAACGC GATTAACGCG
EAEC  BA198     GGCCTGGAAC TGGAAAAAAG CGCGTTTGGC AAATATAACG TGGATAACGC GATTAACGCG
EAEC  BA732     GGCCTGGAAC TGGAAAAAAG CGCGTTTGGC AAATATAACG TGGATAACGC GATTAACGCG

                ....|....| ....|....| .
                   4085       4095
M90T            AACTTTCGTT ATGTGTTTTA A
EAEC  BA198     AACTTTCGTT ATGTGTTTTA A
EAEC  BA732     AACTTTCGTT ATGTGTTTTA A
```

Alinhamento da sequência de aminoácidos de SepA das cepas M90T, BA198 e BA732. Os retângulos pretos idicam as regiões de nucleotídeos alterados. Os retângulos cinzas indicam as regiões de aminoácidos alterados na cepa BA198 e o retângulo tracejado indicam as deleções.

APÊNDICE C

```
                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    5         15         25         35         45         55
M90T            MNKIYYLKYC HITKSLIAVS ELARRVTCKS HRRLSRRVIL TSVAALSLSS AWPALSATVS
EAEC BA198      MNKIYYLKYC HITKSLIAVS ELARRVTCKS HRRLSRRVIL TSVAALSLSS AWPALSATVS
EAEC BA732      MNKIYYLKYC HITKSLIAVS ELARRVTCKS HRRLSRRVIL TSVAALSLSS AWPALSATVS

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   65         75         85         95        105        115
M90T            AEIPYQIFRD FAENKGQFTP GTTNISIYDK QGNLVGKLDK APMADFSSAT ITTGSLPPGD
EAEC BA198      AEIPYQIFRD FAENKGQFTP GTTNISIYDK QGNLVGKLDK APMADFSSAT ITTGSLPPGN
EAEC BA732      AEIPYQIFRD FAENKGQFTP GTTNISIYDK QGNLVGKLDK APMADFSSAT ITTGSLPPGN

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                  125        135        145        155        165        175
M90T            HTLYSPQYVV TAKHVSGSDT MSFGYAKNTY TAVGTNNNSG LDIKTRRLSK LVTEVAPAEV
EAEC BA198      HTLYSPQYVV TAKHVSGSDT MSFGYAKNTY TAVGTNNNSG LDIKTRRLSK LVTEVAPAEV
EAEC BA732      HTLYSPQYVV TAKHVSGSDT MSFGYAKNTY TAVGTNNNSG LDIKTRRLSK LVTEVAPAEV

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                  185        195        205        215        225        235
M90T            SDIGAVSGAY QAGGRFTEFY RLGGGMQYVK DKNGNRTQVY TNGGFLVGGT VSALNSYNNG
EAEC BA198      SDIGAVSGAY QAGGRFTAFY RLGGGMQYVK DKNGNRTQVY TNGGFLVGGT VSALNSYNNG
EAEC BA732      SDIGAVSGAY QAGGRFTAFY RLGGGMQYVK DKNGNRTQVY TNGGFLVGGT VSALNSYNNG

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                  245        255        265        275        285        295
M90T            QMITAQTGDI FLIPPNGPLA NYLNMGDSGS PLFAYDSLQK KWVLIGVLSS GTNYGNNWVV
EAEC BA198      QMITAQTGDI F~IP~NGPLA NYLNMGDSGS PLFAYDSLQK KWVLIGVLSS GTNYGNNWVV
EAEC BA732      QMITAQTGDI F~IP~NGPLA NYLNMGDSGS PLFAYDSLQK KWVLIGVLSS GTNYGNNWVV

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                  305        315        325        335        345        355
M90T            TTQDFLGQQP QNDFDKTIAY TSGEGVLQWK YDAANGTGTL TQGNTTWGYA WKERKLILNA
EAEC BA198      TTQDFLGQQP QNDFDKTIAY TSGEGVLQWK YDAANGTGTL TQGNTTW~YA WKERK~I~NA
EAEC BA732      TTQDFLGQQP QNDFDKTIAY TSGEGVLQWK YDAANGTGTL TQGNTTW~YA WKERK~I~NA

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                  365        375        385        395        405        415
M90T            GKNLLFTGNN GEVVLQNSVN QGAGYLQFAG DYRVSALNGQ TWMGGGIITD KGTHVLWQVN
EAEC BA198      GKNLLFTGNN GEVVLQNSVN QGAGYLQFAG DYRVSALNGQ TWMGGGIITD KGTHVLWQVN
EAEC BA732      GKNLLFTGNN GEVVLQNSVN QGAGYLQFAG DYRVSALNGQ TWMGGGIITD KGTHVLWQVN
```

```
                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   425        435        445        455        465        475
M90T            GVAGDNLHKT GEGTLTVNGT GVNAGGLKVG DGTVILNQQA DRDGKVQAFS SVGIASGRPT
EAEC  BA198     GVAGDNLHKT GEGTLTVNGT GVNAGGLKVG DGTVILNQQA DADGKVQAFS SVGIASGRPT
EAEC  BA732     GVAGDNLHKT GEGTLTVNGT GVNAGGLKVG DGTVILNQQA DADGKVQAFS SVGIASGRPT

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   485        495        505        515        525        535
M90T            VVLSDSQQVN PDNISWGYRG GRLELNGNNL TFTRLQAADY GAIITNNSEK KSTVTLDLQT
EAEC  BA198     VVLSDSQQVN PDNISWGYRG GRLELNGNNL TFTRLQAADY GAIITNNSEK KSTVTLDLQT
EAEC  BA732     VVLSDSQQVN PDNISWGYRG GRLELNGNNL TFTRLQAADY GAIITNNSEK KSTVTLDLQT

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   545        555        565        575        585        595
M90T            LKASDINVPV NTVSIFGGRG APGDLYYDSS TKQYFILKAS SYSPFFSDLN NSSVWQNVGK
EAEC  BA198     LKASDINVPV NTVSIFGGRG APGDLYYDSA TKQYFILKAS SYSPFFSDLS NSSVWQNVGK
EAEC  BA732     LKASDINVPV NTVSIFGGRG APGDLYYDSA TKQYFILKAS SYSPFFSDLS NSSVWQNVGK

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   605        615        625        635        645        655
M90T            DHNKAIDTVK QQKIEASSQP YMYHGQLNGN MDVNIPQLSG KDVLALDGSV NLPEGSITKK
EAEC  BA198     DRNKAIDTVK QQKIEASSQP YMYHGQLNGN MDVNIPQLSG KDVLALDGSV NLPEGSITKK
EAEC  BA732     DRNKAIDTVK QQKIEASSQP YMYHGQLNGN MDVNIPQLSG KDVLALDGSV NLPEGSITKK

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   665        675        685        695        705        715
M90T            SGTLIFQGHP VIHAGTTTSS SQSDWETRQF TLEKLKLDAA TFHLSRNGKM QGDINATNGS
EAEC  BA198     SGTLIFQGHP VIHAGTTTSS SQSDWETRQF TLEKLKLDAA TFHLSRNGKM QGDINATNGS
EAEC  BA732     SGTLIFQGHP VIHAGTTTSS SQSDWETRQF TLEKLKLDAA TFHLSRNGKM QGDINATNGS

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   725        735        745        755        765        775
M90T            TVILGSSRVF TDRSDGTGNA VSSVEGSATA TTVGDQSDYS GNVTLENKSS LQIMERFTGG
EAEC  BA198     TVILGSSRVF TDRSDGTGNA VSSVEGSATA TTVGDQSDYS GNVTLENKSS LQIMERFTGG
EAEC  BA732     TVILGSSRVF TDRSDGTGNA VSSVEGSATA TTVGDQSDYS GNVTLENKSS LQIMERFTGG

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   785        795        805        815        825        835
M90T            IEAYDSTVSV TSQNAVFDRV GSFVNSSLTL GKGAKLTAQS GIFSTGAVDV KENASLTLTG
EAEC  BA198     IEAYDSTVSV TSQNAVFDRV GSFVNSSLTL GKGAKLTAQS GIFSTGAVDV KENASLTLTG
EAEC  BA732     IEAYDSTVSV TSQNAVFDRV GSFVNSSLTL GKGAKLTAQS GIFSTGAVDV KENASLTLTG

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   845        855        865        875        885        895
M90T            MPSAQKQGYY SPVISTTEGI NLEDNASFSV KNMGYLSSDI HAGTTAATIN LGDSDADAGK
EAEC  BA198     MPSAQKQGYY SPVISTTEGI NLEDKASFSV KNMGYLSSDI HAGTTAATIN LGDSDADAGK
EAEC  BA732     MPSAQKQGYY SPVISTTEGI NLEDKASFSV KNMGYLSSDI HAGTTAATIN LGDSDADAGK
```

```
                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   905        915        925        935        945        955
M90T            TDSPLFSSLM KGYNAVLRGS ITGAQSTVNM INALWYSDGK SEAGALKAKG SRIELGDGKH
EAEC  BA198     TDSPLFSSLM KGYNAVLRGS ITGAQSTVNM INALWYSDGK SEAGALKAKG SRIELGDGKH
EAEC  BA732     TDSPLFSSLM KGYNAVLRGS ITGAQSTVNM INALWYSDGK SEAGALKAKG SRIELGDGKH

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   965        975        985        995       1005       1015
M90T            FATLQVKELS ADNTTFLMHT NNSRADQLNV TDKLSGSNNS VLVDFLNKPA SEMSVTLITA
EAEC  BA198     FATLQVKELS ADNTTFLMHT NNSWADQLNV TDKLSDSNNS VLVDFLNKPA SEMSVTLITA
EAEC  BA732     FATLQVKELS ADNTTFLMHT NNSWADQLNV TDKLSGSNNS VLVDFLNKPA SEMSVTLITA

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                  1025       1035       1045       1055       1065       1075
M90T            PKGSDEKTFT AGTQQIGFSN VTPVISTEKT DDATKWVLTG YQTTADAGAS KAAKDFMASG
EAEC  BA198     PKGSDEKTFT AGTQQIGFSN VTPVISTEKT DDATKWVLTG YQTTADAGAS KAAKDFMASG
EAEC  BA732     PKGSDEKTFT AGTQQIGFSN VTPVISTEKT DDATKWVLTG YQTTADAGAS KAAKDFMASG

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                  1085       1095       1105       1115       1125       1135
M90T            YKSFLTEVNN LNKRMGDLRD TQGDAGVWAR IMNGTGSADG DYSDNYTHVQ IGVDRKHELD
EAEC  BA198     YKSFLTEVNN LNKRMGDLRD TQGDAGVWAR IMNGTGSADG DYSDNYTHVQ IGVDTKHELD
EAEC  BA732     YKSFLTEVNN LNKRMGDLRD TQGDAGVWAR IMNGTGSADG DYSDNYTHVQ IGVDRKHELD

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                  1145       1155       1165       1175       1185       1195
M90T            GVDLFTGALL TYTDSNASSH AFSGKNKSVG GGLYASALFN SGAYFDLIGK YLHHDNQHTA
EAEC  BA198     GVDLFTGALL TYTDSNASSH AFSGKTKSVG GGLYASALFN SGAYFDLIGK YLHHDNQHTA
EAEC  BA732     GVDLFTGALL TYTDSNASSH AFSGKTKSVG GGLYASALFN SGAYFDLIGK YLHHDNQHTA

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                  1205       1215       1225       1235       1245       1255
M90T            NFASLGTKDY SSHSWYAGAE VGYRYHLTKE SWVEPQIELV YGSVSGKAFS WEARGMALSM
EAEC  BA198     NFASLGTKDY SSHSWYAGAE VGYRYHLTKE SWVEPQIELV YGSVSGKAFS WEDRGMALSM
EAEC  BA732     NFASLGTKDY SSHSWYAGAE VGYRYHLTKE SWVEPQIELV YGSVSGKAFS WEDRGMALSM

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                  1265       1275       1285       1295       1305       1315
M90T            KDKDYNPLIG RTGVDVGRAF SGDDWKITAR AGLGYQFDLL ANGETVLQDA SGEKRFEGEK
EAEC  BA198     KDKDYNPLIG RTGVDVGRVF SGDDWKITAR AGLGYQFDLL ANGETVLQDA SGEKRFEGEK
EAEC  BA732     KDKDYNPLIG RTGVDVGRVF SGDDWKITAR AGLGYQFDLL ANGETVLQDA SGEKRFEGEK

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|..
                  1325       1335       1345       1355       1365
M90T            DSRMLMTVGM NAEIKDNMRL GLELEKSAFG KYNVDNAINA NFRYVF*
EAEC  BA198     DSRMLMTVGM NAEIKDNMRL GLELEKSAFG KYNVDNAINA NFRYVF*
EAEC  BA732     DSRMLMTVGM NAEIKDNMRL GLELEKSAFG KYNVDNAINA NFRYVF*
```

Alinhamento da sequência de aminoácidos de SepA das cepas M90T, BA198 e BA732. Os retângulos pretos representam as regiões de aminoácidos alterados. Os retângulos cinza claro indicam as deleções.Os retângulos cinza indicam as regiões de aminoácidos alterados na cepa BA198 e o retângulo tracejado indica a porção de serino protease da proteína sem alteração.