

JULIANA SUYAMA HIGA

**PARTICIPAÇÃO DO MENSAGEIRO SECUNDÁRIO C-di-
GMP NA REGULAÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA DE
Escherichia Coli enteropatogênica**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidade em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia.

São Paulo

2019

JULIANA SUYAMA HIGA

PARTICIPAÇÃO DO MENSAGEIRO SECUNDÁRIO C-di-GMP NA REGULAÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Escherichia Coli* enteropatogênica

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Palma Sircili

Versão Original

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)

Suyama Higa, Juliana

Participação do mensageiro secundário c-di-GMP na regulação de fatores de virulência de *Escherichia coli* enteropatogênica / Juliana Suyama Higa; orientador Marcerlo Palma Sircili. -- São Paulo, 2019.

66 p.

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

1. *Escherichia coli*. 2. c-di-GMP. 3. Biofilme.
4. Regulação Gênica. I. Palma Sircili, Marcerlo, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Juliana Suyama Higa

Titulo da Tese: Participação do mensageiro secundário c-di-GMP na regulação de fatores de virulência de *Escherichia coli* enteropatogênica.

Orientador: Profº Dr. Marcelo Palma Sircili

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

São Paulo, 12 de dezembro de 2018
CEUAx N 5803101218

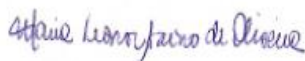
Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Marcelo Palma Sircili
Área: Biotecnologia
Equipe envolvida: Juliana Suyama Higa - [executor](#) (instituto Butantan);

Título do projeto: "Participação do mensageiro secundário c-di-GMP na regulação de fatores de virulência de Escherichia coli Enteropatogênica".

Parecer Consubstanciado da CEUA IB

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan, na reunião de 12/12/2018, **ANALISOU** e **APROVOU** o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.



Maria Leonor Sarno de Oliveira
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan



Nancy Oguiura
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

Dedico este trabalho aos meus amados pais e ao meu amado Marco Vinícios. Por estarem sempre ao meu lado, dando suporte, carinho e amor.

Agradecimentos

Ao Dr. Marcelo Palma Sircili, por todos esses anos acreditando (ou não) que podia dar conta de tudo isso. Pela amizade, ensinamentos e compreensão. Se cada um tem o orientador que merece, sou extremamente grata por todos os anos de orientação que tive até hoje.

Ao Dr. Hebert Fabricio Culler, pelos ensinamentos, por ter sido meu parceiro de bancada por tanto tempo, pela amizade e risadas. Sem dúvida alguma, muito do que aprendi foi com você.

À Dra. Vanessa Bueris, pela amizade e ensinamentos.

À Min, pela amizade, pelos doces, pelas caronas e principalmente por toda ajuda de bancada que você me deu. Esse trabalho jamais teria terminado se não fosse por toda sua ajuda. Você talvez seja a pessoa mais solícita que encontrei na minha vida. Não deixe as pessoas abusarem dessa sua qualidade!

À Nathalia (Cabeçudinha) por toda amizade, pela ajuda lá no começo do doutorado, por ter sido a pessoa que me aguentou como (des)orientadora por 2 anos. Por ser minha companheira de luta e manifestações, mesmo que a gente só se encontre por acaso!

Ao Dr. Samuel (amor), pela amizade, parceria em shows (sim, eu li seu agradecimento), risadas e conselhos mais sem pé nem cabeça na minha vida amorosa! Se meu coração é peludo, você é um dos poucos que conhece a versão depilada dele!

Às novas amigas de bancada Tamires e Ana Paula, pelo apoio moral e ajuda nessa reta final.

À Larissa (neguinha) pela mais sincera amizade, nos bons e maus momentos. Por ser a pessoa mais crítica, sincera e carinhosa que cruzou meu caminho nos últimos tempos. Um coração gelado e um coração peludo foram feitos para se complementar.

Às “bacfriends” Ludmila, Cláudia Trigo, Fernanda e Lídia, pela amizade, conversas jogadas fora, conselhos e bons drinks.

À Matilde, por ser essa pessoa que irradia alegria e felicidade, que faz qualquer pessoa querer sorrir mesmo nos momentos mais tensos.

À Dra. Marcia Franzolin, por toda ajuda nesses longos anos de Butantan

Aos funcionários do Laboratório de Genética, Youko pela amizade, meios de cultura e cafés necessários para existência de um ser humano (Youko, estou indo para o Lab, pode fazer café hoje!) Rose, pela amizade e pelos rolinhos de papel para minhas filhas ratinhas e Ivone, pela ajuda prestada.

Ao Alexander Seixas de Souza, pela captura das imagens de Microscopia Confocal

À Luciana Almeida Sato, pela captura das imagens com a lupa

Às minhas lindas, queridas e amadas Aline, Karina, Mônica, Fernanda e Rafaela por serem as melhores amigas que uma pessoa pode ter nessa vida.

Às lindas da SME, Pamela, Roberta, Letícia e Gabriele, pela amizade e por terem sido as maiores incentivadoras desse doutorado nessa loucura que foram os dois últimos anos.

À gestão da EMEF Professor Antonio Prudente. Meu diretor João, as ADs Flávia e Margo, a Coordenadora Isabela pelo apoio todo que me deram. É maravilhoso trabalhar com pessoas como vocês.

Aos meus alunos da EMEF Professor Antonio Prudente. Mesmo me estressando, sempre foi reconfortante chegar em sala de aula e ver os olhinhos curiosos em saber “o que é esse tal de doutorado que você faz de manhã cedo”. Vocês me fizeram entender qual é o meu propósito como profissional nessa vida.

Aos médicos do Hospital Universitário da USP, que conseguiram me ajudar nessa barra que é ter duas das ocupações que mais afastam pessoas por conta da saúde mental. Pós-graduação e professora de escola pública.

Aos meus pais, simplesmente por serem os pais mais fantásticos e compreensíveis do mundo

Ao meu companheiro Marco, por ser a pessoa mais iluminada, paciente, compreensível e parceira que poderia ter entrado na minha vida. Te amo

À minha família querida

À Capes, pelo apoio financeiro

E a todos que direta ou indiretamente colaboraram nessa jornada louca que é o doutorado,

Muito obrigada =)

“Ninguém educa ninguém, ninguém educa a si mesmo, os homens se educam entre si”.

Paulo Freire

RESUMO

HIGA, J.S. Participação do mensageiro secundário c-di-GMP na regulação de fatores de virulência de *Escherichia coli* enteropatogênica, 2019, 66f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Diarreia continua sendo uma das principais causas de morte de crianças em todo mundo. *Escherichia coli* (*E.coli*) enteropatogênica (EPEC) é um dos principais patótipos de *E.coli* envolvidos em surtos de diarreia em crianças com idade inferior à 5 anos. A transcrição de fatores que participam da virulência dessas amostras, além de genes envolvidos na formação de biofilme e motilidade estão sob regulação mediada por sinalização química. Uma importante molécula sinalizadora é o mensageiro secundário Bis-(3'-5')-monofosfato de guanosina cíclico (c-di-GMP), que regula uma diversidade de processos celulares nas células. C-di-GMP é sintetizada a partir de duas moléculas de GTP pela diguanilato ciclase (DGCs) e degradada por fosfodiesterases (PDEs) sendo que para ser efetivo, c-di-GMP deve estar ligada a uma molécula efetora. YhjH (PdeH) é a principal PDE de *E.coli* e *YcgR*, um receptor de c-di-GMP, juntos estas duas proteínas fazem parte da regulação da motilidade e formação de biofilme de *E.coli*. Diversos estudos demonstram a importância de C-di-GMP na regulação de fatores de virulência em diversas espécies todavia, poucos estudos para entender o papel desta molécula em *E.coli* patogênicas foram realizados até o presente momento. Deste modo, o objetivo deste trabalho é analisar a possível influência de C-di-GMP na regulação de mecanismos de virulência em amostras de EPEC. Para este trabalho foram construídos mutantes *ycgR* e *yhjH* das amostras de aEPEC O55:H7 e ONT:H25 através da técnica de recombinação homóloga mediada pelo sistema *Lambda Red*. Ensaio fenotípicos e de transcrição gênica mostram que estes dois genes estão envolvidos diretamente na regulação da motilidade, e nos componentes da matriz extracelular do biofilme. Todavia, embora ambas as amostras pertençam ao mesmo patótipo os resultados se apresentam de maneira bastante divergente, demonstrando a grande heterogenidade dentro deste grupo.

Palavras Chave: *Escherichia coli*, c-di-GMP, Biofilme, Regulação gênica

ABSTRACT

HIGA, J.S. Role of c-di-GMP second messenger on the virulence factors of enteropathogenic *Escherichia coli*. 2019, 66p. Ph.D. Thesis (Doctor in Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Diarrhea is still one of the leading causes of death for children worldwide. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is one of the main pathotypes of *E. coli* involved in outbreaks of diarrhea in children under the age of five. The transcription of factors that participate in the virulence of these samples, in addition to genes involved in biofilm formation and motility, is under regulation mediated by chemical signaling. An important signaling molecule is bis-(3'-5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate (c-di-GMP), a secondary messenger that regulates a variety of cellular processes in cells. C-di-GMP is synthesized from two GTP molecules by diguanylate cyclases (DGCs) and degraded by phosphodiesterases (PDEs), and to be effective, c-di-GMP must be linked to an effector molecule. YhjH (PdeH) is the main PDE of *E. coli* and YcgR, a c-di-GMP receptor; together, these two proteins form a part of the regulation of motility and biofilm formation in *E. coli*. The importance of c-di-GMP in the regulation of virulence factors in several species has been demonstrated in several studies; however, few studies have been conducted to date in order to understand the role of this molecule in pathogenic *E. coli*. Thus, the objective of this work is to analyze the possible influence of c-di-GMP on the regulation of virulence mechanisms in EPEC samples. For this work, *ycgR* and *yhjH* mutants of aEPEC O55: H7 and ONT: H25 samples were constructed using a homologous recombination technique mediated by the Lambda Red system. Phenotypic and gene transcription assays show that these two genes are directly involved in the regulation of motility and in the components of the extracellular matrix of the biofilm. However, although both samples belong to the same pathotype, the results are quite divergent, demonstrating the great heterogeneity within this group.

Keywords: *Escherichia coli*, c-di-GMP, Biofilm, Gene Regulation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Detecção dos genes <i>ycgR</i> e <i>yhjH</i> por eletroforese em gel de agarose 1,5%	24
Figura 2 Detecção da deleção dos genes <i>ycgR</i> e <i>yhjH</i> na amostra O55:H7 por eletroforese em gel de agarose 1,5%.....	25
Figura 3. Detecção da deleção dos genes <i>ycgR</i> e <i>yhjH</i> na amostra ONT:H25 por eletroforese em gel de agarose 1,5%.....	25
Figura 4 Curva de crescimento das amostras O55:H5 e dos mutantes O55:H7 Δ <i>ycgR</i> O55:H7 Δ <i>yhjH</i>	26
Figura 5 Curva de crescimento das amostras ONT:H25 e dos mutantes ONT:H25 Δ <i>ycgR</i> ONT:H25 Δ <i>yhjH</i>	26
Figura 6 Teste de motilidade em ágar semi-sólido	27
Figura 7 Visualização da celulose produzida pelas amostras sob luz de fluorescência.	28
Figura 8 Ensaio de expressão de fimbria curli amostra O55:H7, O55: Δ <i>ycgR</i> e O55:H7 Δ <i>yhjH</i>	30
Figura 9 Ensaio de expressão de fimbria curli amostras ONT:25, ONT:H25 Δ <i>ycgR</i> ONT:H25 Δ <i>yhjH</i>	31
Figura 10 Análise da formação de biofilme em superfície abiótica através de Cristal Violeta pelos períodos de 24 horas e 48 horas à 26°C.	32
Figura 11 Análise de formação de biofilme em superfície abiótica através de Cristal Violeta pelos períodos de 24 horas 48 horas à 37°C.	33
Figura 12 Visualização de formação de biofilme em superfície abiótica por Microscopia Confocal a laser. Incubação à 26°C Amostras O55:H7, O55:H7 Δ <i>ycgR</i> e O55:H7 Δ <i>yhjH</i>	35
Figura 13 Visualização de formação de biofilme em superfície abiótica por Microscopia Confocal a laser. Incubação à 37°C Amostras O55:H7, O55:H7 Δ <i>ycgR</i> e O55:H7 Δ <i>yhjH</i>	36

Figura 14 Visualização de formação de biofilme em superfície abiótica por Microscopia Confocal a laser. Incubação à 26°C Amostras ONT:H25, ONT:H25 $\Delta ycgR$ e ONT:H25 $\Delta yhjH$	37
Figura 15 Visualização de formação de biofilme em superfície abiótica por Microscopia Confocal a laser. Incubação à 37°C Amostras ONT:H25, ONT:H25 $\Delta ycgR$ e ONT:H2.....	38
Figura 16 Visualização de formação de biofilme em superfície biótica por Microscopia Confocal a laser. Incubação à 37°C Amostras O55:H7, O55:H7 $\Delta ycgR$ e O55:H7 $\Delta yhjH$	40
Figura 17 Visualização de formação de biofilme em superfície biótica por Microscopia Confocal a laser. Incubação à 37°C Amostras ONT:H25, ONT:H25 $\Delta ycgR$ e ONT:H25 $\Delta yhjH$	41
Figura 18 Ensaio de adesão em célula HeLa observadas em microscopia óptica e.....	42
Figura 19 Ensaio de adesão em célula HeLa observadas em microscopia óptica.....	43
Figura 20 Teste de FAS observadas em microscopia confocal.....	44
Figura 21 Análise transcricional dos genes envolvidos na formação de biofilme.	45
Figura 22 Análise transcricional ler, regulador da região LEE	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Amostras bacterianas e plasmídeos utilizados neste estudo	14
Tabela 2 Iniciadores utilizados na detecção dos genes <i>ycgR</i> e <i>yhjH</i> na deleção através do sistema de recombinação λ red.	16
Tabela 3 Iniciadores utilizados nos ensaios de qRT-PCR	19

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. <i>Escherichia coli</i>	1
1.2. <i>Escherichia coli</i> diarreio gênicas	1
1.3. <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica	2
1.3.1 <i>Escherichia coli</i> Enteropatogênica atípica (aEPEC)	3
1.4. Lesão A/E e a região LEE	4
1.5. Biofilme	5
1.6 c-di-GMP	8
1.7. C-di-GMP e o controle da motilidade e formação de biofilme.....	10
2. OBJETIVO	13
3. Material e Métodos.....	14
3.1. Meios de cultura e soluções	14
3.2 Amostras bacterianas e plasmídeos.....	14
3.3. Técnicas de manipulação e análise de DNA	15
3.3.1 Obtenção de DNA genômico, purificação e extração de plasmídeos .	15
3.3.2 Desenho dos iniciadores para detecção e deleção dos genes <i>ycgR</i> e <i>yhjH</i>	15
3.3.3. Técnica da Reação da Polimerase em cadeia (PCR) – detecção dos genes <i>ycgR</i> e <i>yhjH</i> e obtenção do cassete de resistência	16
3.3.4. Indução do estado de competência e transformação das amostras O55:H7 e ONT:H25 com plasmídeo pKD46.....	17
3.3.5 Preparo de células competentes da amostra O55:H7(pKD46) e ONT:H25 (pKD46) para eletroporação com os cassetes de resistência.....	17
3.4. Análises transcricionais	18
3.4.1. Extração de RNA	18
3.4.2. PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR).....	18
3.5 Ensaio Fenotípicos	19
3.5.1 Curva de crescimento	19
3.5.2. Teste de motilidade em ágar semi-sólido.....	19

3.5.3	Produção de celulose – Calcofluor	20
3.5.4.	Expressão da fimbria Curli – Vermelho Congo	20
3.5.5.	Ensaio de formação de biofilme em superfície abiótica.....	20
3.5.5.1	Técnica de Cristal Violeta	20
3.5.5.2.	Visualização de formação de biofilme em Microscopia Confocal a laser	21
3.5.6.	Ensaio de adesão e de formação de biofilme em células epiteliais <i>in vitro</i>	21
3.5.6.1.	Cultivo e preparo da linhagem celular HeLa.....	21
3.5.6.2.	Teste de adesão em células HeLa	22
3.5.6.3	Teste de formação de biofilme em células epiteliais HeLa	22
3.5.6.4.	Teste de FAS (“Fluorescent actin staining”).....	23
4.	RESULTADOS.....	24
4.1.	Obtenção dos mutantes <i>ycgR</i> e <i>yhjH</i>	24
4.2.	Curva de crescimento	25
4.3.	Teste de motilidade em Ágar semi-sólido.....	27
4.4.	Produção de celulose – Calcofluor.....	28
4.5.	Expressão de fímbria Curli -Vermelho Congo.....	29
4.6.	Formação de biofilme em superfície abiótica- Técnica Cristal Violeta ...	32
4.7.	Visualização de formação de biofilme em Microscopia Confocal a laser	33
4.8.	Teste de formação de biofilme em células epiteliais HeLa	39
4.9	Ensaio de adesão em célula epitelial <i>in vitro</i>	42
4.10.	Teste de FAS	43
4.11.	Análise transcricional por qRT-PCR	44
5.	Discussão	47
6.	CONCLUSÕES.....	56
7.	REFERENCIAS	57

1. INTRODUÇÃO

1. *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E.coli*) é um bacilo facultativo, gram negativo, pertencente à família Enterobacteriaceae, componente da microbiota gastrointestinal de animais e humanos. Todavia, devido a um alto grau de diversidade genética, decorrente de mutações, recombinações e transferência horizontal de genes, incluindo genes de resistência e virulência, determinadas cepas podem se tornar patogênicas (BALDY-CHUDZIK; STOSIK, 2007). Quando estas cepas patogênicas colonizam outros nichos que não o intestino são denominadas *E. coli* extraintestinais (ExPEC) e podem levar a patologias tais como infecções do trato urinário, sepse, meningite e bacteremia. As cepas patogênicas de *E. coli* são causadoras de infecção intestinal e são chamadas *E. coli* diarreio gênicas (DEC) (NATARO; KAPER, 1998).

1.2. *Escherichia coli* diarreio gênicas

Diarreia continua sendo uma das maiores causas de morbidade e mortalidade no mundo, principalmente em países em desenvolvimento e a segunda principal causa de morte em crianças com idade inferior a cinco anos (LANATA et al., 2013). Em 2016, aproximadamente 8% das mortes de crianças com idade inferior a 5 anos de idade foi em decorrência de doença diarreica (UNICEF, 2018). Todos os anos cerca de 525.000 crianças com menos de 5 anos morrem em decorrência da diarreia. Rotavirus e *E. coli* são os dois agentes etiológicos mais comuns em países em desenvolvimento (WHO, 2017).

As cepas de DEC associadas à diarreia estão divididas em 6 patótipos, considerando seus mecanismos de virulência específicos, as síndromes clínicas que causam, os sorotipos O:H, os aspectos epidemiológicos e/ou os tipos de interação com linhagens celulares *in vitro*. Esses patótipos de *E. coli* diarreio gênicas são: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* que adere difusamente a células epiteliais (DAEC). Como alguns desses patótipos incluem micro-organismos bastante distintos, convencionou-se subdividir EAEC e EPEC em típicas e atípicas e as EHEC passaram a constituir uma subcategoria de *E.coli* produtora da Toxina de Shiga (STEC) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

1.3. *Escherichia coli* enteropatogênica

EPEC foi o primeiro patótipo de *E.coli* descrito (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). A Organização Mundial de Saúde reconhece que existem 12 sorogrupos clássicos de EPEC: O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 e O158 (WHO, 1987; HERNANDES *et al.*, 2009). EPEC é geneticamente semelhante à EHEC em muitos aspectos epidemiológicos e patogênicos e causa diarreia aquosa em crianças com idade inferior a 2 anos de idade, principalmente em países em desenvolvimento (MELLIES; BARRON; CARMONA, 2007) principal característica de EPEC é a formação de uma lesão histopatológica característica denominada “*attaching and effacing*”(Lesão A/E) que pode ser observada tanto em biópsias de intestino de pacientes ou animais infectados quanto em culturas celulares (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Outra importante característica de EPEC é o padrão de adesão das bactérias em culturas celulares. (SCALETSKY; SILVA; TRABULSI, 1984). Este padrão, denominado padrão de adesão localizado (LA) é caracterizado pela formação de microcolônias compactas em áreas localizadas na superfície celular e pode ser visualizado em microscopia óptica após 3 horas de interação bactéria – célula *in vitro* (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002). Os genes que regulam a formação deste padrão estão localizados em um plasmídeo de cerca de 60MDa denominado *EPEC “adherence factor”*(EAF) que contém os genes necessários para biogênese de uma adesina fimbrial denominada “*bundle forming pilus*”(BFP), responsável pela adesão localizada da bactérias à célula (GIRÔN; HO; SCHOOLNIK, 1991)

O plasmídeo EAF também alberga o operon *perABC* que codifica genes necessários para transcrição de *bfp* além de ser um ativador da ilha de patogenicidade denominada “Locus of Enterocyte Effacement” (LEE)(MELLIES *et al.*, 1999; TOBE *et al.*, 1999).

Em 1995, durante o Segundo Simpósio Internacional de EPEC, que ocorreu na cidade de São Paulo, ficou definido que as amostras de EPEC seriam classificadas em dois subtipos, EPEC típica e EPEC atípica. Amostras de EPEC que são capazes de formar a lesão A/E, não expressam a toxina de Shiga Stx e ainda possuem o plasmídeo EAF, que codifica a fímbria BFP seriam chamadas de EPEC típicas (tEPEC), enquanto as amostras que não apresentam o plasmídeo EAF chamadas de EPEC atípicas (aEPEC) (KAPER, 1996).

1.3.1 *Escherichia coli* Enteropatogênica atípica (aEPEC)

O termo EPEC atípica foi criado em 1995 para denominar amostras de *E.coli* que diferiam das EPEC típicas por não albergarem o plasmídeo EAF e das EHEC e por não produzirem a toxina de Shiga (KAPER, 1996) já que ambas possuem a região LEE. Em 2002, nova definição de EPEC atípica foi proposta por Trabulsi e colaboradores, na qual as amostras que além do gene *eae*, possuem o gene *bfpA*, mas desde que não expressem a fímbria BFP, presente no plasmídeo EAF, seriam consideradas EPEC atípicas

As amostras de aEPEC apresentam uma heterogeneidade em relação aos seus fatores de virulência que podem ser tanto codificados pela região LEE ou ainda apresentarem outros fatores de virulência de outros patótipos de DEC, além disso, a heterogeneidade também pode ser observada nos diversos padrões de adesão às células *in vitro* que as amostras de aEPEC apresentam. Enquanto tEPEC apresenta o padrão de adesão LA como característico, aEPEC apresenta como característico o padrão localizado-like (LAL). Diferentemente do padrão de adesão LA, onde as microcolônias formadas pela adesão das bactérias às células epiteliais são bastante compactas, no padrão LAL, as microcolonias formadas pelas bactérias aderidas se apresentam de maneira frouxa. Além disso, enquanto o padrão de adesão LA pode ser observado após três horas de contato da bactéria com a célula eucariótica, a formação do padrão LAL só é observada após seis horas de contato (SCALETSKY et al., 1999). Uma explicação para essa diferença nos padrões de adesão é justamente a presença ou ausência da fímbria BFP que promove as ligações de uma bactéria à outra levando a formação das microcolônias. Além disso, BFP está envolvida nos passos iniciais da colonização do epitélio intestinal (CLEARY et al., 2004; GIRÔN; HO; SCHOOLNIK, 1991). Outros padrões de adesão observados são o agregativo (AA) e difuso (DA). Algumas amostras ainda podem ser incapazes de se aderir às células epiteliais (NA) ou apresentar um padrão indeterminado (IND) (ABE et al., 2009; DULGUER et al., 2003; HERNANDES et al., 2009; ROBINS-BROWNE et al., 2004; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002; VIEIRA et al., 2001).

Os sorotipos de aEPEC podem pertencer aos chamados sorogrupos clássicos ou ainda os chamados sorogrupos não clássicos de EPEC e a diferenciação de tEPEC de aEPEC dentro dos sorogrupos clássicos pode ser feita a partir dos antígenos flagelares (H) das amostras. Os sorotipos mais frequentemente isolados de aEPEC são O26:H11, O55:H7, O55:H34, O86:H8, O111:H8, O111:H9, O111:H25, O119:H2, O125ac:H6 e O128:H2 (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002).

Ainda assim, uma grande diversidade de sorotipos não pertencentes aos sorogrupos clássicos pode ser encontrada em aEPEC (DULGUER et al., 2003; GOMES et al., 2004; VIEIRA et al., 2001).

Diversos autores relacionam aEPEC com quadros de endemia, surtos e diarreia persistente em crianças em todo mundo (BUERIS et al., 2007; LOZER et al., 2013; NGUYEN; TAYLOR, 2006; YATSUYANAGI et al., 2003). Recentes estudos epidemiológicos indicam que aEPEC se tornaram mais prevalentes que tEPEC tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento e que aEPEC é um importante patógeno endêmico em diarreia em crianças (AFSET et al., 2004; ARAUJO et al., 2007; BUERIS et al., 2007; OCHOA et al., 2008; OCHOA; CONTRERAS, 2011).

1.4. Lesão A/E e a região LEE

Observada pela primeira vez por MOON e colaboradores (1983), a lesão A/E é caracterizada pela adesão íntima entre a bactéria a célula epitelial, que culmina na destruição das microvilosidades e rearranjo do citoesqueleto, através da polimerização e acúmulo de actina levando a formação de uma estrutura semelhante a pedestal no sítio onde a bactéria se adere.

Os determinantes gênicos necessários para a formação da lesão A/E estão localizados numa ilha de patogenicidade denominada “Locus of Enterocyte Effacement” (LEE). A região LEE possui 41 “open reading frames” (ORFs) organizadas em cinco operons principais (LEE 1 a LEE 5). LEE 1, LEE 2 e LEE 3 formam o maior domínio funcional que codifica o aparato do sistema de secreção do Tipo III (TTSS) e os reguladores da região LEE (LEE encoded regulator – Ler). LEE 5 codifica a íntima e Tir, responsáveis pela adesão íntima entre bactéria – célula e LEE 4 codifica as proteínas secretadas ESP (ELLIOTT et al., 2000).

A regulação de LEE é complexa e envolve diversas proteínas. Ler é o regulador principal de LEE, regulando positivamente tanto os genes da região quanto outros genes externos a LEE que participam na formação da lesão A/E como por exemplo non-LEE encoded effector A (*nleA*) e *espC*. (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Além desses fatores, em tEPEC o operon *perABC* participa da regulação de LEE. A proteína PerA ativa a expressão do operon *bfp* enquanto PerC induz a expressão de *ler* e consequente ativação de LEE, (CROXEN et al., 2013; WONG et al., 2011). Em aEPEC a ausência de proteínas Per seria responsável pelo retardo da progressão da lesão A/E nestas amostras (BUERIS et al., 2015).

1.5. Biofilme

No ambiente, os micro-organismos não se comportam como se estivessem em uma placa de Petri. Eles não vivem como culturas puras ou dispersas como células únicas. Frequentemente se juntam em aglomerados polimicrobianos, formando o que é conhecido como biofilme (FLEMMING; NEU; WOZNIAK, 2007).

Biofilmes são comunidades bacterianas envoltas por uma matriz extracelular de exopolissacarídeo (EPS) que se adere a superfícies sólidas ou semi- sólidas, bióticas como células e tecidos ou abióticas, podendo ainda ser formado na interface ar-líquido, líquido - líquido ou em flocos ou aglomerados flutuantes (COSTERTON, 1999; DONLAN, 2002).

A composição do biofilme pode ser derivada de apenas uma espécie bacteriana. Todavia, na maioria dos casos, a comunidade é formada por diversas espécies microbianas (DAVEY; GEORGE; TOOLE, 2000; ITO et al., 2009). Viver em biofilme confere diversas vantagens adaptativas para comunidade bacteriana como resistência a agentes antimicrobianos, proteção contra protozoários e contra o sistema imune do hospedeiro, (DAVEY; GEORGE; TOOLE, 2000; ITO et al., 2009).

A formação do biofilme é um processo bastante heterogêneo que envolve a transcrição e expressão coordenada de diferentes fenótipos e estruturas. Esse processo é resultado de vários processos químicos, físicos e biológicos tais como pH, osmolaridade, temperatura e a própria natureza da superfície de adesão (DAVEY; GEORGE; TOOLE, 2000; DONLAN, 2002) e incluem o transporte e absorção de moléculas orgânicas, crescimento bacteriano, produção de EPS e depressão do biofilme (TRULEAR; CHARACKLIS; TRULEAR, 2014)

Classicamente o processo de formação do biofilme é dividido em cinco etapas:

1- Adesão das bactérias planctônicas a uma superfície.

A adesão das bactérias a uma superfície ocorre de forma aleatória, mediada pelo movimento browniano e pela força gravitacional ou de modo dirigido, via quimiotaxia e motilidade (TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000). Esta primeira adesão é uma adesão fraca e reversível, mantida por interações físico- químicas que incluem forças hidrodinâmicas, interações eletrostáticas, força de Van der Waals e interações hidrofóbicas (KUMAR; ANAND, 1998). Se as forças de repulsão forem maiores que as de atração, as bactérias podem facilmente se desprender do substrato. Para que ocorra a adesão geralmente é necessário que a superfície apresente um alicerce onde o biofilme irá crescer, denominado filme condicionante que pode ser composto por muitas partículas tanto orgânicas quanto

inorgânicas. Este filme modifica o substrato, facilitando o acesso da bactéria ao mesmo (GARRETT; BHAKOO; ZHANG, 2008)

2- Transição do estágio reversível para irreversível

A segunda fase da adesão consiste na transição do estágio reversível para o irreversível. Durante esta fase as bactérias passam a secretar o EPS e adesinas que interagem com a superfície, contribuindo para a irreversibilidade da adesão (STOODLEY et al., 2002; VAN HOUTT; MICHIELS, 2005).

3 - Desenvolvimento da arquitetura do biofilme

Após aderir de forma irreversível, há o início do desenvolvimento da arquitetura do biofilme. Esta etapa do desenvolvimento é início do biofilme maduro. Nesta fase há produção de substâncias polímeras extracelulares que compõem a matriz de exopolissacarídeos que irão envolver as células e fornecer adesão e suporte estrutural para o biofilme. (STOODLEY et al., 2002; VAN HOUTT; MICHIELS, 2005)

4- Biofilme maduro

Os biofilmes maduros apresentam estrutura semelhante a cogumelos que são envoltos por EPS e rodeados por poros e canais de água que funcionam como um sistema de troca entre os nutrientes e oxigênio que precisam alcançar o interior do biofilme e a remoção de metabólitos excretados. Nesta etapa, as bactérias também desenvolvem padrões específicos de crescimento e diferenciação fisiológica e metabólica em relação às células planctônicas (DAVEY; GEORGE; TOOLE, 2000; DONLAN, 2002; STOODLEY et al., 2002).

5- Dispersão

O último estágio é o descolamento do biofilme maduro. O descolamento ocorre quando o ambiente não é mais favorável a manutenção do biofilme e pode se apresentar em forma de agregados celulares ou células planctônicas, ocorrendo de forma ativa (dispersão), induzida por um processo mecânico (passiva) ou químico quando são adicionadas substâncias que dissolvem o EPS. Após desprendidas, as bactérias livres podem colonizar novos nichos reiniciando a formação de novos biofilmes (HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004; STOODLEY et al., 2002)

A estrutura da comunidade bacteriana no biofilme é bastante heterogeneia e dinâmica. Durante os diferentes estágios de desenvolvimento do biofilme é possível observar a

repressão e ativação do controle da expressão gênica de diversos genes. Nos estágios iniciais a expressão de genes flagelares e fimbriais como fímbrias do tipo I e tipo IV, é maior uma vez que estas estruturas estão diretamente relacionadas com a capacidade da bactéria colonizar o nicho onde irá se instalar além, de contribuir com a aderência das bactérias às superfícies (PRATT; KOLTER, 1998).

À medida que o biofilme amadurece, a heterogeneidade é mantida. No biofilme maduro a expressão de genes relacionados com a produção dos componentes da matriz extracelular, composta por polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios é favorecida. Os genes flagelares são reprimidos uma vez que nesta fase de desenvolvimento as células bacterianas passam a se adaptar a uma vida séssil. Uma vez que não seja mais possível manter a estrutura do biofilme, como por exemplo, sob a influência do estresse ambiental há o descolamento (dispersão) do biofilme maduro e novas células bacterianas são liberadas no meio. Há novamente a expressão de genes flagelares e adesinas, que permitem a colonização de novos nichos (MCDUGALD et al., 2012). O flagelo tem importância fundamental nos estágios iniciais da adesão e na dispersão do biofilme, permitindo que a bactéria supere forças eletrostáticas que possam existir entre a superfície do filme condicionante e a superfície celular (PRATT; KOLTER, 1998)

A regulação desses genes parece ser exercida por pelo menos dois sistemas de sinalização. O primeiro é o *Quorum sensing*, sistema baseado na sinalização célula-célula, densidade dependente, onde bactérias respondem a moléculas sinalizadoras denominadas auto-indutoras, produzidas por indivíduos da mesma espécie, de outras espécies ou ainda de outros organismos, modulando uma resposta conjunta. O outro sistema é através do mensageiro secundário Bis-(3'-5')-monofosfato de guanosina cíclico (c-di-GMP), uma pequena molécula intracelular que responde a diversos estímulos sensoriais e que através de sua síntese e degradação regula diversos processos celulares.

Esses dois sistemas podem regular individualmente os genes envolvidos na formação do biofilme como também pode estar conectados (BOYD; O'TOOLE, 2012; CAMILLI; BASSLER, 2006; STANKOWSKA et al., 2012).

Recentes estudos descrevem que amostras de EPEC são capazes de formar biofilme em superfícies bióticas e abióticas, entretanto, ainda são poucos os estudos envolvendo a formação de biofilme por este patótipo (CULLER et al., 2014; MOREIRA et al., 2006; NASCIMENTO et al., 2014; WEISS-MUSZKAT et al., 2010a)

1.6 c-di-GMP

Bis-(3'-5')-monofosfato de guanosina cíclico (c-di-GMP) é uma pequena molécula intracelular que responde de maneira integrada a múltiplos estímulos sensoriais. Estudos recentes demonstram que c-di-GMP é o mensageiro secundário mais utilizado por bactérias (MILLS *et al.*, 2011). C-di-GMP foi descrito inicialmente como ativador alostérico da síntese de celulose em *Gluconacetobacter xylinus* (ROSS *et al.*, 1987). (ROSS *et al.*, 2003) É responsável pela regulação de uma grande variedade de processos enzimáticos, transcricionais e pós traducionais que fisiologicamente impactam na formação de biofilme, sinalização célula-célula, diferenciação, motilidade e virulência. Participa da sinalização entre reinos e é reconhecido pelo sistema imune de mamíferos sendo um promissor adjuvante vacinal. (POVOLOTSKY; HENGEE, 2011, RÖMLING; GALPERIN; GOMELSKY, 2013)

C-di-GMP é sintetizada a partir de duas moléculas de GTP pela diguanilato ciclase (DGCs). Proteínas com atividade DGC possuem um domínio de aminoácidos (Gly- Gly-Asp-Glu-Phe) conservado denominado GGDEF (RYJENKOV *et al.*, 2005) que é hidrolisado por fosfodiesterases (PDEs) específicas cuja atividade está associada com os domínios EAL (Glu-Ala-Leu) ou HD- GYP, em 5'fosfoguanilil(3'->5')guanosina (pGpG) que então é quebrada em duas moléculas de guanosina monofostato (GMP) (HENGGE, 2009; SCHIRMER; JENAL, 2009). As diguanilato ciclases são dímeros de duas subunidades contendo o domínio GGDEF. O sítio ativo denominado Sítio A está localizado na interface entre as duas subunidades que se ligam, cada uma, a uma molécula de GTP. Além do sítio A, muitas DGCs possuem também um segundo sítio de ligação denominado Sítio I, caracterizado por um motivo RxxD e que atua como um inibidor alostérico da atividade das DGCs prevenindo assim o consumo excessivo de GTP e limitando o acúmulo de c-di-GMP (CHRISTEN *et al.*, 2006; HENGGE, 2009; RYJENKOV *et al.*, 2005)

As PDEs por sua vez possuem o domínio conservado EAL e são enzimas monoméricas que são capazes de linearizar o c-di-GMP num processo catalítico que requer a presença dos íons Mg^{2+} e Mn^{2+} e são inibidas por Ca^{2+} e Zn^{2+} . Uma segunda PDE específica são enzimas com o domínio HD-GYP e não estão relacionadas com as EAL (CHRISTEN *et al.*, 2006; HENGGE, 2009)

Em uma única proteína, é possível encontrar os domínios EAL /HD-GYP e GGDEF juntos ou apenas um dos domínios e é comum a presença de EAL e GGDEF com outros

domínios regulatórios e sensoriais tais como o sistema de dois componentes REC, PAS, GAF e BLUF entre outros. (SCHIRMER; JENAL, 2009; WEBER et al., 2006).

Em *E. coli* K12 são encontrados 29 genes que codificam os domínios GGDEF e/ou EAL, sendo 12 com função de DGCs, 13 com função PDE e 4 proteínas “degeneradas”, enzimaticamente inativas que atuam diretamente em interações macromoleculares. Entretanto, a análise do genoma de 61 amostras de *E. coli* comensais e patogênicas demonstrou que o pangenoma de *E. coli* contém pelo menos 35 domínios GGDEF/EAL e um set de pelo menos 8 proteínas altamente conservadas em todas as amostras analisadas: DgcC (YaiC), DgcI (YliF), PdeB (YlaB), PdeH (YhjH), PdeK (YhjK), PdeN (Rtn), e as proteínas degeneradas CsrD e CdgI (YeaI). (Povolotsky, Hengge, 2016). Com base neste estudo, Hengge e colaboradores (2016) propuseram uma nova nomenclatura, específica para nomear as proteínas com domínio GGDEF/EAL em *E. coli*. Neste sistema os genes que codificam estas proteínas recebem a nomenclatura *dgc* ou *pde*, dependendo se sua função enzimática. Deste modo, a proteína YhjH, cuja função é de um fosfodiesterase, passaria a se chamar PdeH.

Para exercer sua função, c-di-GMP precisa se ligar e alterar alostericamente a estrutura de uma molécula efetora. A variedade de moléculas efetoras permite que o controle de diferentes vias regulatórias através da regulação pós-traducional, como quando estão ligadas a proteínas que possuem o domínio PilZ, traducional, através da interação com domínios de mRNA (riboswitches) e transcricional, através da ligação de c-di-GMP com fatores de transcricional como FleQ em *Pseudomonas aeruginosa*. (MILLS et al., 2011).

A rápida sinalização do mensageiro secundário permite uma resposta celular quase imediata a mudanças ambientais. Isso ocorre porque a energia dispensada na regulação alostérica e pós traducional pelo segundo mensageiro é menor e mais rápida quando comparada com o processo de síntese ou degradação de constituintes complexos. Um exemplo dessa adaptação às condições ambientais frequentemente envolve mudanças na atividade de proteínas complexas como as do aparato flagelar (MILLS et al., 2011). Em *E. coli* e *Salmonella enterica* a regulação da maquinaria flagelar através da mudança na rotação do flagelo é pós traducional e feita através da interação de c-di-GMP com a proteína de domínio Pilz, *YcgR* (BOEHM et al., 2010; FANG; GOMELSKY, 2010; PAUL et al., 2010).

1.7. C-di-GMP e o controle da motilidade e formação de biofilme

O gene *ycgR* foi identificado a primeira vez em um estudo no qual era analisada a ação da proteína H-NS na função flagelar em *E. coli* (KO; PARK, 2000) H-NS regula de forma positiva o regulon flagelar (BERTIN et al., 1994) interagindo com FliG na modulação da velocidade rotacional do flagelo (DONATO; KAWULA, 1998). No trabalho de Ko e Park (2000), mutantes de *E. coli* com deleção no gene *hns* apresentaram redução na expressão do operon *flhDC* com o que leva a falha na produção do flagelo. Em mutantes com superexpressão de *flhDC*, observou-se a restauração da formação do flagelo porém as amostras continuavam imóveis. Na amostra com deleção *hns*, a velocidades de "swimming" foi quase totalmente restaurada com a inserção de *ycgR* e parcialmente recuperada pela inserção de *yjhH*. Ao serem analisados, os promotores de *ycgR* e *yjhH* indicaram que ambos estão presentes na composição do regulon flagelar, mas quanto à regulação do motor flagelar, sua participação era incerta. Os autores sugeriram que as proteínas do estator não eram capazes de se associar corretamente aos componentes do rotor no mutante *hns*, resultando em um motor defectivo.

O primeiro receptor de c-di-GMP, designado domínio PilZ, foi predito por bioinformática como parte de uma proteína do complexo glicosiltransferase celulose sintase de *G. xylinus* por Amikan e Galperin em 2006. Os autores observaram que aproximadamente 100 aminoácidos da região C-terminal da subunidade BcsA glicosiltransferase formam um domínio proteico, também presente "downstream" em algumas proteínas EAL ou GGDEF/EAL e, por isso, foi considerado um candidato a receptor de c-diGMP. Esse domínio foi identificado em diversas espécies bacterianas. O nome PilZ é decorrente da proteína PilZ, que em *Pseudomonas aeruginosa* está envolvida exclusivamente na síntese de fímbria do tipo IV (ALM et al., 1996). Após a descrição do domínio PilZ, diversos trabalhos experimentais comprovaram a teoria de Amikam e Galperin, descrevendo uma grande variedade de receptores contendo esse domínio em diferentes espécies bacterianas, como a proteína *YcgR* de *E. coli* (RYJENKOV et al., 2006), *DgrA* de *Caulobacter crescentus* (CHRISTEN et al., 2007), *PlzC* e *PlzD* de *Vibrio cholerae* (PRATT et al., 2007).

A compreensão de como *YcgR* participa do controle da maquinaria flagelar se inicia com trabalho de Ryjenkov e colaboradores (2006), que testaram a hipótese de que *YcgR* se ligaria ao c-di-GMP através do domínio PilZ. Através da obtenção de mutantes duplos

yhjH/ycgR, esses autores observaram que houve um aumento no “swimming” e “swarming” no mutantate, quando comparado a mutantes com deleção apenas em *yhjH*. Além disso, a mutação pontual de *ycgR* não restaurou completamente a motilidade no mutante duplo, sugerindo que *ycgR* regula a motilidade de maneira dependente de c-di-GMP.

A composição do flagelo bacteriano se dá a partir de uma estrutura central ancorada à membrana interna e externa da célula que se denomina corpo basal, um filamento proteico externo composto por subunidades repetidas de flagelina, responsável pela antigenicidade bacteriana, e também por um gancho que se localiza na parte externa da célula, permitindo que corpo basal e filamento se juntem (MACNAB, 1992). O motor do flagelo é composto de proteínas estatoras MotA e MotB, enquanto o rotor flagelar, que se localiza no lado citoplasmático do flagelo, compõe-se de 3 subunidades, FliG, FliM e FliN. O estímulo da interação eletroestática entre motA e FliG, assim como o torque responsável por dirigir a rotação do flagelo, se dão por meio do fluxo de prótons que transitam por meio dos canais iônicos do complexo MotAB, que se liga aos resíduos Asp de MotB e altera de forma conformacional de MotA. Proteínas quimiostáticas respondem aos estímulos ambientais, e transmitem sinais para o motor. O estado fosforilado do regulador de resposta CheY, influencia sua capacidade de interação com os componentes do rotor flagelar. Quando CheY-P fosforilado interage com FliM, há uma alteração da interação entre FliM e a porção C-terminal de FliG, que induz à mudança na interface rotor- estator entre FliG e MotA, e resulta na mudança de rotação do flagelar (TERASHIMA; KOJIMA; HOMMA, 2009)

A motilidade flagelar é controlada pelos níveis de c-di-GMP por meio da interação entre o complexo *YcgR/c-di-GMP* com os componentes citoplasmáticos do complexo flagelar. Diferentes grupos sobre divergem sobre a forma de ocorrência deste mecanismo. Paul e colaboradores (2010) propõem um modelo denominado “Backstop brake”, que considera que *YcgR/c-di-GMP* atua nas proteínas do rotor flagelar e se liga a FliM, causando a interrupção no processo de interação FliG-FliM, resultando na redução da eficiência da geração do torque, induzindo rotatividade anti-horária do flagelo, ou se ligando a FliG, proporcionando a sua reorientação e provocando interrupção no processo de interação FliG-MotA, havendo então a redução da geração do torque. Fang e Gomelsky (2010), sugerem que *YcgR/c-di-GMP* se une a FliG, aumentando rotatividade anti-horária do flagelo por meio da quebra da interatividade entre FliG e FliM. Boehn e colaboradores (2010), sugerem a interação entre *YcgR/c-di-GMP* e a proteína MotA, reduzindo a função do motor flagelar. Em

oposição ao que propõem Paul e colaboradores (2010) e Fang e Gomelsky (2010), este modelo não abrange modificação no sentido rotatório do flagelo. A interatividade entre YcgR/c-di-GMP apresenta interferência no repasse de energia entre o rotor e o estator, agindo como um “freio” e causando a redução na rotatividade do flagelo.

YcgR regula o flagelo através de sua ligação ao c-di-GMP, consequentemente, a atividade de YcgR tal qual a motilidade bacteriana, permanecem sob controle pós-traducional por meio da síntese e degradação de c-di-GMP (MILLS et al., 2011). A enzima regulatória flagelar YhjH, uma PDE, é necessária para manter os níveis de c-di-GMP baixos o suficiente para prevenir que YcgR iniba a motilidade (KO; PARK, 2000). Mudanças ambientais modulam a expressão das DGCs levando ao aumento da concentração de c-di-GMP e/ou YhjH, facilitando a interação YcgR/c-di-GMP modulando a motilidade (KULASEKARA et al., 2010)

2. OBJETIVO

O presente estudo tem como objetivo analisar a papel de c-di-GMP na regulação de fatores de virulência em amostras de *Escherichia coli* enteropatogênica através da deleção do gene *yhjH*, que codifica uma fosfodiesterase e do gene *ycgR*, que codifica o receptor de c-di-GMP

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Meios de cultura e soluções

Os meios de cultura e soluções utilizados neste estudo foram preparados de acordo com a especificação dos fabricantes ou conforme descrito por Sambrook *et al.* (1989).

3.2 Amostras bacterianas e plasmídeos

As amostras bacterianas e plasmídeos utilizados neste estudo estão descritas na **Tabela 01**. As amostras de aEPEC 320, sorotipo O55:H7 e aEPEC 4157, ONT:H25 pertencem à coleção do laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan. O plasmídeo pKD46 foi utilizado para expressar os genes do sistema recombinase red e o plasmídeo pKD3 como molde para obtenção do cassete de resistência ao antibiótico cloranfenicol.

Tabela 1 Amostras bacterianas e plasmídeos utilizados neste estudo

Amostra	Característica	Origem ou referência
320	aEPEC O55:H7	Bueris <i>et al.</i> , 2007
4157	aEPEC ONT:H25	Bueris <i>et al.</i> , 2007
JH01	O55:H7 $\Delta ycgR::cat$	Dados não publicados
JH03	O55:H7 $\Delta yhjH::cat$	Este estudo
JH05	ONT:H25 $\Delta ycgR::cat$	Este estudo
JH07	ONT:H25 $\Delta yhjH::cat$	Este estudo
<u>Plasmídeos</u>		
pKD46	Plasmídeo auxiliar contendo os genes das enzimas de recombinação (sistema λ -Red), AMP ^r	Datsenko e Warnner, 2000
pKD3	Molde para a amplificação do cassete de recombinação (sistema λ - Red),CAT ^r	Datsenko e Warnner, 2000

3.3. Técnicas de manipulação e análise de DNA

3.3.1 Obtenção de DNA genômico, purificação e extração de plasmídeos

Para a extração dos plasmídeos, necessários para deleção dos genes *ycgR* e *yhjH* através da técnica da recombinação homóloga, amostras albergando o plasmídeo pKD46, sensível a temperaturas superiores a 30 °C, foram cultivadas em meio Luria-Bertani, Miller (LB), (Difco, EUA) com 10 µg/mL de ampicilina a 30 °C por 18 h. As amostras com plasmídeo pKD3 foram crescidas à 37 °C por 18 h também em meio LB com 20 µg/mL de cloranfenicol. Todos os plasmídeos foram extraídos e purificados através do kit *PureYield™ Plasmid midiprep System* (Promega Co. EUA).

Para obtenção do DNA genômico, as amostras O55:H7 e ONT:H25 foram crescidas em meio LB 37 °C por 18 h. Após este período, uma alíquota foi transferida para um tubo de 1,5 mL e centrifugado durante 5 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e a massa bacteriana foi homogeneizada em 500 µL de água ultra pura e então fervida em banho-maria por 10 min, seguido de um banho de gelo por mais 10 min e mais uma etapa de centrifugação.

3.3.2 Desenho dos iniciadores para detecção e deleção dos genes *ycgR* e *yhjH*

Os iniciadores para detecção dos genes *ycgR* e *yhjH* foram confeccionados com base na sequência da amostra de *E.coli* K-12 substr.MG 1655 (**Tabela 2**) Estes iniciadores foram utilizados tanto na detecção dos genes como para confirmação da deleção dos mesmos após a recombinação homóloga, e foram confeccionados flanqueando as regiões onde foi inserido o cassete de resistência no cromossomo da bactéria. Os iniciadores para deleção dos genes *ycgR* e *yhjH* foram confeccionados conforme Datsenko e Wanner (2000). Estes iniciadores contêm 50 pb de homologia com a região flanqueadora do gene a ser deletado e 40 pb de homologia com a região referente ao gene de resistência ao antibiótico cloranfenicol contido no plasmídeo pKD3.

Tabela 2. Iniciadores utilizados na detecção dos genes *ycgR* e *yhjH* na deleção através do sistema de recombinação λ red.

Iniciadores	Sequência 5'-3'	Tamanho (pb)	Referência
<i>ycgR</i> _DT	F-AACTTGAGCAGGCACTGG R- ACAGTTTGTTCAGTCAGGAG	793	Dados não publicados
<i>ycgR</i> _MUT	F- GGCTCCGCGCTATATCTACAACTTGAGCAGGCACTGGACGCGA TGTAAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC R- AACTGTGACCGATAAACCAAAGACAGTTTGTTCAGTCAGGAGTTT TTCCGCATGGGAATTAGCCATGGTCC	1094	Dados não publicados
<i>yhjH</i> _DT	F-CACGACAATCAACAACAAGA R-GTGTGGTGGTTTGCTGGTC	1090	Este trabalho
<i>yhjH</i> _MUT	F- TTCCTGTGCCAGTCCTAAAGATAGTCCAGCCAGGCGAAAATGAGGCAGCGTGTAGGCTG GAGCTGCTTC R- AATCTTTGTGCGAGTCTGGGCTGCATCACTTTAAACACAGGACATCTTTGATGGGAATTAG CCATGGTCC	1225	Este trabalho

3.3.3. Técnica da Reação da Polimerase em cadeia (PCR) – detecção dos genes *ycgR* e *yhjH* e obtenção do cassete de resistência

Para cada reação de PCR foram utilizados 40 pmol de cada um dos iniciadores, 1,0 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, EUA), 1,5 mM de MgCl₂, 200 mM da mistura de dNTPS (Invitrogen, EUA) e tampão de reação (200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl) 10X concentrado. Foram utilizadas 100 ng do DNA molde para a detecção de ambos os genes obtidos de acordo com o item 3.2.1. Para a obtenção do cassete de resistência utilizou-se como DNA molde 50 ng do plasmídeo pKD3 previamente extraído conforme o item 3.2.1.. Os amplicons obtidos na reação foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1,5% (Invitrogen, EUA) em tampão TAE 1x (10 mM Tris-acetato, 2 mM ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)). Após o fim da corrida eletroforética, os géis foram corados em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL). Os amplicons obtidos correspondentes ao cassete de resistência foram posteriormente purificados do gel de agarose com o kit GFX PCR DNA and gel Band Purification Kit (GE Healthcare, EUA), conforme recomendações do fabricante e o DNA quantificado.

3.3.4. Indução do estado de competência e transformação das amostras O55:H7 e ONT:H25 com plasmídeo pKD46

Para a indução do estado de competência, as amostras O55:H7 e ONT:H25 foram crescidas em meio LB sob agitação a 37 °C até atingir DO600 de 0,6. Após este período, o crescimento bacteriano foi resfriado em banho de gelo por cerca de 10 min. Em seguida, o volume total de cultura foi centrifugado a 6000 rpm por 10 min a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. O sedimento obtido foi homogeneizado em 20 mL de água ultrapura gelada, estéril e centrifugado novamente. O mesmo procedimento foi repetido por 4 vezes. Após a última lavagem, o sedimento foi ressuspensionado em 1 mL de água ultrapura e uma alíquota de 50 µL foi transferida para um tubo de 0,6 mL, onde 10 µL do plasmídeo pKD46 extraído foi adicionado à alíquota de células competentes para ser eletroporada em cubetas de eletroporação (0,1 cm – BIORAD) previamente resfriadas. Para eletroporação foi utilizado o eletroporador *GenePulser* (BIORAD) a 1,5 kV, 25 µF e 200 Ω. Imediatamente após a eletroporação, o conteúdo da cubeta foi transferido para um tubo com 1 mL de meio SOC (0,5% de Extrato de Levedura, 2% de Triptona, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de MgSO₄ e 20 mM de glicose) e em seguida incubado a 30 °C durante 3 h. Após esse período, os cultivos foram plaqueados em ágar LB contendo 100 µg/ml de ampicilina (Sigma-Aldrich, MO, EUA) e novamente incubados a 30 °C por 24 h. As colônias obtidas foram selecionadas e crescidas em 3 mL de meio LB para verificar a presença do plasmídeo pKD46 após extração com o Kit *PureYield™ Plasmid Miniprep System* (Promega Co. EUA). Amostras contendo o plasmídeo foram estocadas em glicerol 80% a -20 °C e -80°C.

3.3.5 Preparo de células competentes da amostra O55:H7(pKD46) e ONT:H25 (pKD46) para eletroporação com os cassetes de resistência

As amostras transformantes O55:H7 e ONT:H25 contendo o plasmídeo pKD46 foram crescidas a 30 °C por 18 h em meio LB acrescido de 100 µL/mL de ampicilina. Uma alíquota de 400 µL de pré-inóculo foi transferida para um frasco contendo 40 mL de meio LB acrescido de 100 µL/mL de ampicilina e 1 mM de L- arabinose (Sigma-Aldrich, MO, EUA), mantido sob agitação de 200 rpm a 30 °C. Após 1 h de incubação, foi adicionado mais 1 mM de L- arabinose e a cultura foi mantida nas mesmas condições até atingir DO600 de 0,6. Em seguida, a amostra foi submetida ao protocolo de competência, conforme descrito no item

3.3.4. A uma alíquota de 100 μ L de células competentes foram adicionados 50 ng do cassete de resistência e as células foram transformadas por eletroporação como descrito no item 3.3.4. Imediatamente após a eletroporação, o conteúdo da cubeta foi transferido para um tubo contendo 3 mL de meio SOC e incubado a 37 °C por 18 h. O cultivo foi plaqueado em ágar LB contendo 20 μ g/ml de cloranfenicol (Sigma-Aldrich, MO, EUA) e incubado novamente a 37 °C por 24 h. Após esse período, as colônias obtidas foram testadas através de PCR com os iniciadores específicos para confirmar a deleção do gene de interesse. As colônias que apresentaram a deleção dos genes *ycgR* e *yhjH* foram estocadas em glicerol 80% a -20°C e -80 °C.

3.4. Análises transcricionais

3.4.1. Extração de RNA

Pré-inóculos das amostras selvagens O55:H7 e ONT:H25 e dos mutantes O55:H7 Δ *ycgR*, O55:H7 Δ *yhjH*, ONT:H25 Δ *ycgRe* ONT:H25 Δ *yhjH* foram crescidos em 3 mL de meio LB por 18 h. Uma alíquota de 200 μ L foi transferida para 20 mL de meio LB para posterior incubação sob agitação de 200 rpm a 37 °C até atingir a DO_{600} de 0,5. O crescimento bacteriano foi centrifugado a 6000 rpm a 4 °C por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspendido em água ultra pura para posterior extração com o kit RNeasy (Qiagen). O RNA obtido foi quantificado.

3.4.2. PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

Análises transcricionais foram feitas com a utilização do sistema de etapa única *Sybr Fast One- Step qRT-PCR kit* (Thermofisher, EUA). As reações foram realizadas de acordo com a indicação do fabricante. Para o controle endógeno da transcrição de foi utilizado o gene *rpoA* (subunidade A da RNA polimerase). Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os níveis de transcrição foram analisados utilizando o software 7500 Fast Real- Time PCR v.2.0.5 (Applied biosystems) através da quantificação relativa. Os iniciadores utilizados estão descritos na **Tabela 3**.

Tabela 3. Iniciadores utilizados nos ensaios de qRT-PCR

Iniciadores	Sequência (5´-3´)	Referência
ler_RT	F- CGACCAGGTCTGCCCTTCT R- GCGCGGAACTCATCGAAA	Walters; Sperandio, 2006
csgD_RT	R – TGCCCAGGAAACCGCTTG F - GGTA ACTATCGTTATAACAGCA	Culler, 2015
fimA_RT	F – TGTCCCTCAGTTCTACAGCG R – TCCTAACTGAACGGTTTGATC	Sharma, Bearson, Bearson, 2010
bscA_RT	F – AGCTCGGCTTCCGTGGC R – TCATTGTTGAGCCAAAGCCT	Culler, 2015
rpoA_RT	F- GCGCTCATCTTCTTCCGAAT R- CGCGGTCGTGGTTATGTG	Walters; Sperandio, 2006

3.5 Ensaios Fenotípicos

3.5.1 Curva de crescimento

As amostras O55:H7, O55:H7 $\Delta ycgR$, O55:H7 $\Delta yhjH$, ONT: H25, ONT:H25 $\Delta ycgR$ e ONT:H25 $\Delta yhjH$ foram incubadas por 18 h em 3 mL de meio LB a 37 °C. Uma alíquota de 250 μ L foi transferida para um volume de 25 mL de meio LB. Todos os crescimentos foram incubados a 37 °C sob agitação de 200 rpm. A cada 1 hora, uma alíquota de 1 mL foi retirada de cada um dos cultivos para ser mensurada a densidade óptica (D.O.) a 600nm. Este procedimento foi repetido por 9 horas.

3.5.2. Teste de motilidade em ágar semi-sólido

As amostras O55:H7, O55:H7 $\Delta ycgR$, O55:H7 $\Delta yhjH$, ONT: H25, ONT:H25 $\Delta ycgR$ e ONT:H25 $\Delta yhjH$ foram incubadas por 18 h em 3 mL de meio LB a 37 °C. Com o auxílio de uma agulha, as amostras foram inoculadas em placa de ágar semi-sólido 0,3% (1% tripton, 0,25% NaCl e 0,3% ágar bacteriológico) e incubadas por 7 horas. Após este período os halos de crescimentos observados foram medidos e mensurados.

3.5.3 Produção de celulose – Calcofluor

Para verificar qualitativamente a produção de celulose as amostras O55:H7, O55:H7 $\Delta ycgR$, O55:H7 $\Delta yhjH$, ONT: H25, ONT:H25 $\Delta ycgR$ e ONT:H25 $\Delta yhjH$ foram cultivadas em meio LB ágar sem sal suplementado com 100 $\mu\text{g/ml}$ de Calcofluor (Sigma-Aldrich Co, EUA) por 24 h de incubação à 37 °C e 26 °C. A produção de celulose foi identificada em luz UV com comprimento de onda 366nm.

3.5.4. Expressão da fimbria Curli – Vermelho Congo

As amostras O55:H7, O55:H7 $\Delta ycgR$, O55:H7 $\Delta yhjH$, ONT: H25, ONT:H25 $\Delta ycgR$ e ONT:H25 $\Delta yhjH$ foram cultivadas em placas de ágar a 2% (1% ácido casamino; 0,15% extrato de levedura e 0,005% sulfato de magnésio), suplementadas com 40 $\mu\text{g/ml}$ de Vermelho Congo e 20 $\mu\text{g/ml}$ de *Coomassie Brilliant Blue* G250 (Merck, Alemanha) por períodos de 24 e 48 h a 26 °C e 37 °C. Após os períodos de incubação a expressão da fimbria curli foi observada em Estereomicroscópio Olympus SZX7, acoplado a câmera digital Olympus UC30 com o software de imagem cellSens.

3.5.5. Ensaio de formação de biofilme em superfície abiótica

3.5.5.1 Técnica de Cristal Violeta

A análise quantitativa da formação de biofilme em placas de poliestireno foi realizada seguindo a metodologia descrita por CHRISTENSEN et al., 1989 e SHEIKH et al., 2001. Os pré-inóculos bacterianos das amostras O55:H7, O55:H7 $\Delta ycgR$, O55:H7 $\Delta yhjH$, ONT: H25, ONT:H25 $\Delta ycgR$ e ONT:H25 $\Delta yhjH$ foram incubadas por 18 horas a 37 °C em meio LB. Em seguida os cultivos bacterianos foram inoculados em meio LB na diluição 1:100 em placas de poliestireno de 96 poços (Nunc, Dinamarca) em volume final de 200 μL . Após 24hs e 48hs de incubação à 26°C e 37°C foram feitas 4 lavagens com tampão fosfato (PBS) (NaCl 136,9 mM, KCl 2,7 mM, KH_2PO_4 1,5 mM, Na_2HPO_4 8,1 mM; pH 7,4) para remoção das bactérias planctônicas. Após a retirada do excesso do PBS, as bactérias foram fixadas com 200 μl de etanol a 75% por 10 min. O fixador foi retirado e as bactérias coradas com 200 μl de solução de cristal violeta a 0,5%, durante 5 min. Após 4 lavagens com PBS, as placa foram secas e 200 μl de etanol 95% adicionado em cada poço, deixando solubilizar o cristal violeta por 2 min à temperatura ambiente. Após a solubilização, foi determinada a absorbância em

comprimento de onda de 595 nanômetros (nm) em leitor de ELISA Multiskan®EX (Thermo Fisher Scientific, EUA).

3.5.5.2. Visualização de formação de biofilme em Microscopia Confocal a laser

Para a verificação qualitativa da formação de biofilme através de Microscopia Confocal a laser 960µL de meio LB foram acrescidos em cada poço de uma placa de 24 poços com fundo chato contendo uma lamínula de vidro previamente esterilizada. Em seguida 40µL de pré-inóculos bacterianos das amostras O55:H7, O55:H7 $\Delta ycgR$, O55:H7 $\Delta yhjH$, ONT:H25, ONT:H25 $\Delta ycgR$ e ONT:H25 $\Delta yhjH$ incubadas por 18 h a 37 °C em meio LB foram semeados. As placas foram incubadas por períodos de 24 horas e 48 horas à 26°C e 37°C. Após esses períodos as placas foram lavadas 3 vezes com PBS 1X para remoção das bactérias planctônicas. Em seguida as lamínulas foram fixadas em lâminas para microscopia com Mowiol (Calbiochem, EUA) acrescido de iodeto de propídio (Molecular Probes, EUA) 1:1000 para posterior observação em Microscopia Confocal no laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan.

3.5.6. Ensaio de adesão e de formação de biofilme em células epiteliais *in vitro*

3.5.6.1. Cultivo e preparo da linhagem celular HeLa

A linhagem celular HeLa foi cultivada em garrafas de 25 ml (Biofil, China) em Meio DMEM suplementado com 0,4% de glicose e contendo L-glutamina (Cultilab, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco) e incubadas em estufa a 37 °C contendo 5% de CO₂ e 95% de O₂, durante três a quatro dias. Após esse período, o meio de cultivo foi descartado e a monocamada celular foi lavada 4 vezes com 10 ml de PBS estéril. Após este processo, 2 mL de solução tripsina estéril (Cultilab, Brasil) foi adicionado para o descolamento da monocamada celular. A solução ficou em contato com a monocamada celular por 3 min, em estufa de CO₂. Em seguida foram adicionados 5 ml de DMEM-SFB a 10% na garrafa e a suspensão celular foi então ajustada através de contagem em câmara de Neubauer (Glastécnica) e diluída em DMEM-SFB a 10% de maneira a obter uma concentração final de 5×10^4 células/mL. Volumes de 1 mL foram transferidos para placas de poliestireno de 24 poços com lamínulas de vidro esterilizadas. As placas foram mantidas à 37°C em estufa de CO₂ por 48 horas, até atingirem semi-confluência de crescimento celular.

3.5.6.2. Teste de adesão em células HeLa

O teste de adesão foi realizado segundo a metodologia descrita por CRAVIOTO *et al.*, 1991 utilizando-se monocamada semi-confluyente de células dispostas em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro, conforme descrito no item anterior. Após atingirem semi-confluência, as monocamadas celulares foram lavadas 4 vezes com PBS estéril pH 7,4 e adicionado 960µL de meio DMEM suplementado com 2% de SFB e 1% de D-manose. Para o teste de adesão 40 µl de cultura bacteriana das amostras O55:H7, O55:H7 $\Delta ycgR$, O55:H7 $\Delta yhjH$, ONT: H25, ONT:H25 $\Delta ycgR$ e ONT:H25 $\Delta yhjH$ previamente cultivadas por 18 h em meio LB, foram inoculadas e mantidas por um período de 3 horas e 6 horas à temperatura de 37°C. Para o teste de 6 horas, após as 3 primeiras horas de incubação a placa foi lavada por 3 vezes com PBS 1X e 1 ml de DMEM suplementado com 2% de SFB e 1% de D-manose foram adicionados. Alcançado o tempo final do ensaio, os poços foram lavados 4 vezes com PBS1X estéril e as células fixadas com metanol 100% por 30 min. As lamínulas foram coradas com solução May – Grünwald 0,2% (Merk, Alemanha) por 5 min seguida por coloração com Giemsa (Merk, Alemanha) por 20 min e lavadas em água corrente até a retirada do excesso do corante. Após a secagem em temperatura ambiente, as lamínulas de vidro foram fixadas em lâminas para microscopia com Entellan (Merk, Alemanha) e observadas em microscópio óptico, em aumento de 1000 vezes.

3.5.6.3 Teste de formação de biofilme em células epiteliais HeLa

A formação de biofilme em superfície celular fixada foi verificada através de testes de interação com células HeLa, realizados segundo metodologia descrita previamente para adesão de *E. coli* diarreio gênicas (CORTHESEY-THEULAZ *et al.*, 1996; CRAVIOTO *et al.*, 1991). As células HeLa foram cultivadas como descrito no item 3.5.4.2. Após a formação da monocamada semi-confluyente, a placa de 24 poços foi lavada 4 vezes com PBS 1X estéril com seguida adição de 500 µL de metanol 100% a 4°C, por no mínimo 20 min, para fixar as células aderidas nas lamínulas. As células pré-fixadas foram então lavadas 4 vezes com PBS estéril para retirar totalmente o metanol utilizado na fixação. Após as lavagens, em cada poço foi adicionado meio DMEM, seguido de inoculação de cada uma das amostras O55:H7, O55:H7 $\Delta ycgR$, O55:H7 $\Delta yhjH$, ONT: H25, ONT:H25 $\Delta ycgR$ e ONT:H25 $\Delta yhjH$ na proporção de 1:100, previamente crescidas por 18 h a 37 °C, em meio LB. Estas foram então incubadas por 24 e 48 horas à 37°C, após esse período foram feitas 4 lavagens com PBS para remoção das bactérias planctônicas e as células e as bactérias fixadas com *p*-Formaldeído 4%

em PBS 1X, por 18 horas à 4 °C. As células foram novamente lavadas com PBS 1X e, em seguida, permeabilizadas pela adição de Triton X-100 a 0,1% em PBS 1X, por 4 min. Após novas lavagens, as células foram bloqueadas com solução de BSA 0,2% acrescido de RNase na proporção 1:500 em PBS 1X por 30 min. Em seguida, 20 µl de uma solução contendo 3 U de Alexa Fluor 488 - Phalloidin (Molecular Probes) em BSA 0,2% foi adicionado. As lamínulas foram incubadas por 45 minutos sob abrigo da luz e novamente lavadas com PBS 1X, por 4 vezes de 5 min em seguida foram fixadas sobre lâminas de vidro com Mowiol acrescido de iodeto de propídio em uma concentração final de 1:1000. As lâminas foram secas em temperatura ambiente, protegidas de luz por aproximadamente 18 horas. Em seguida mantidas à 4°C até serem observadas através de microscopia confocal de fluorescência (CONFOCAL TCS SP8, Leica, Alemanha) no Laboratório Biologia Celular do Instituto Butantan.

3.5.6.4. Teste de FAS (“Fluorescent actin staining”)

As amostras O55:H7, O55:H7 Δ *ycgR*, O55:H7 Δ *yhjH*, ONT: H25, ONT:H25 Δ *ycgR* e ONT:H25 Δ *yhjH* foram submetidas ao ensaio de polimerização de actina seguindo protocolo descrito por KNUTTON et al. (1989), utilizando as células HeLa. O cultivo das células, bem como os ensaios de adesão em células epiteliais *in vitro*, foram realizados como descrito nos itens 3.4.4.1. e 3.4.4.2. Após as lavagens, as células foram bloqueadas com solução de BSA 0,2% acrescido de RNase 1:500 em PBS 1X por 30 min. Em seguida, foram adicionados 20 µl de uma solução contendo 3 U de Alexa Fluor 488 - Phalloidin em BSA 0,2%. As lamínulas foram incubadas por 45 min sob abrigo da luz e novamente lavadas com PBS 1X, por 4 vezes de 5 min. As lamínulas foram fixadas sobre lâminas de vidro com Mowiol e iodeto de propídio na concentração final de 1:1000. As lâminas foram secas em temperatura ambiente, protegidas de luz por aproximadamente 18 horas em seguida mantidas a 4°C até serem observadas através de microscopia confocal de fluorescência.

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção dos mutantes *ycgR* e *yhjH*

Inicialmente, a presença dos genes *ycgR* e *yhjH* foram confirmadas nas amostras selvagens O55:H7 e ONT:H25 com a realização de PCR com iniciadores específicos, gerando um fragmentos de 793 pares de base e 1090 pares de base, respectivamente (**Figura 1**)

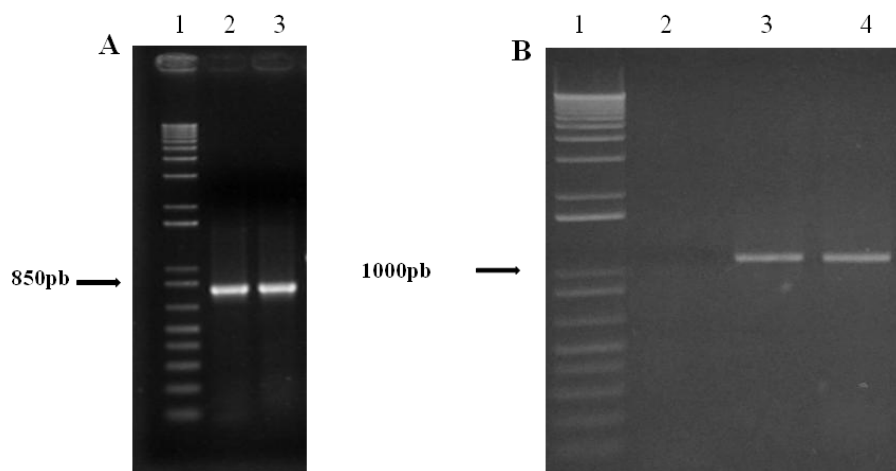


Figura 1 Detecção dos genes *ycgR* e *yhjH* por eletroforese em gel de agarose 1,5% . 1A. visualização dos amplicons obtidos após realização da reação de PCR para detecção do gene *ycgR* nas amostras O55:H7 e ONT:H25. Canaleta 1. Peso molecular (1Kb DNA ladder plus), Canaleta 2. O55:H7 Δ *ycgR*. Canaleta 3. ONT:H25 Δ *ycgR*. Os amplicons possuem aproximadamente 793pb. 1B. Visualização dos amplicons obtidos após realização da reação de PCR para detecção do gene *yhjH* nas amostras O55:H7 e ONT:H25. Canaleta 1. Peso molecular (1Kb DNA ladder plus). Canaleta 2. Branco. Canaleta 3. O55:H7 Δ *yhjH*, Canaleta 4 ONT:H25 Δ *yhjH*. Os amplicons possuem aproximadamente 1090pb.

Após a confirmação da presença dos genes de interesse nas amostras O55:H7 e ONT:H25, ambas foram transformadas com o plasmídeo acessório pkD46, necessário para recombinação homóloga. As amostras selvagens albergando o plasmídeo pkD46 foram então novamente transformadas com o cassete de resistência ao antibiótico cloranfenicol e as colônias obtidas foram selecionadas e submetidas a PCR com os iniciadores de detecção. Os fragmentos obtidos podem ser observados nas **Figuras 2 e 3**.

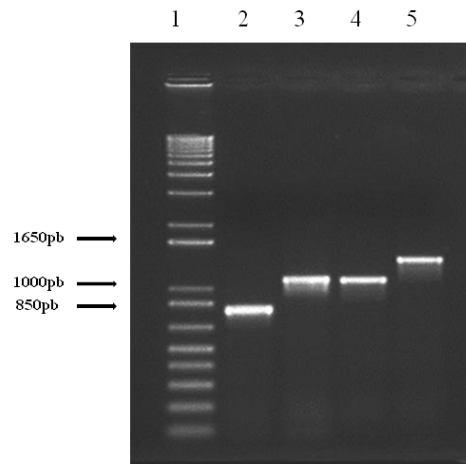


Figura 2. Detecção da deleção dos genes *ycgR* e *yhjH* na amostra O55:H7 por eletroforese em gel de agarose 1,5%. Visualização dos amplicons obtidos após realização da reação de PCR para detecção dos mutantes $\Delta ycgR$ e $\Delta yhjH$ na amostra O55:H7. Canaleta 1. Peso molecular (1Kb DNA *ladder plus*). Canaleta 2. O55:H7wt (aproximadamente 793 pb) Canaleta 3. O55:H7 $\Delta ycgR$ (aproximadamente 1094 pb) Canaleta 4 O55:H7 wt (aproximadamente 1094 pb) Canaleta 5. O55:H7 $\Delta yhjH$ (aproximadamente 1225 pb).

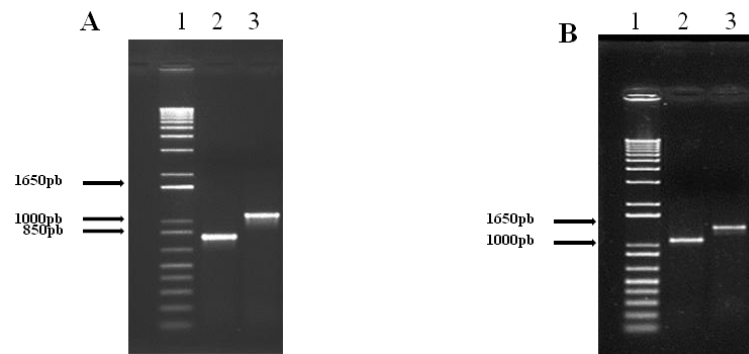


Figura3. Detecção da deleção dos genes *ycgR* e *yhjH* na amostra ONT:H25 por eletroforese em gel de agarose 1,5%. 1,5% 3A. Visualização dos amplicons obtidos após realização da reação de PCR para detecção dos mutantes $\Delta ycgR$ e $\Delta yhjH$ na amostra ONT:H25 Figura4.A. Canaleta 1. Peso molecular (1Kb DNA *ladder plus*). Canaleta 2. ONT:H25 wt (aproximadamente 793 pb) Canaleta 3. ONT55:H25 $\Delta ycgR$ (aproximadamente 1094 pb). 3B. Caneleta 1. Peso molecular (1Kb DNA *ladder plus*). Canaleta 2. ONT:H25 wt (aproximadamente 1094 pb). Canaleta 3. ONT55:H25 $\Delta yhjH$ (aproximadamente 1225 pb).

Após o PCR, os fragmentos amplificados de O55:H7 $\Delta ycgR$, O55:H7 $\Delta yhjH$ ONT:H25 $\Delta ycgR$ e ONT:H25 $\Delta yhjH$ com os iniciadores de detecção foram purificados e enviados para sequenciamento. Os sequenciamentos apresentaram 96% a 98% de identidade com a sequência do plasmídeo pKD3 depositado no banco GenBank, confirmando a obtenção destes mutantes.

4.2. Curva de crescimento

Para verificar se as mutações são responsáveis pelas alterações fenotípicas que poderiam ser observadas, a curva de crescimento bacteriano foi realizada antes dos ensaios, a fim de assegurar que os fenótipos não estão sendo alterados por modificações no crescimento das mesmas. O resultado observado demonstra que o crescimento bacteriano não parece ser alterado significativamente.

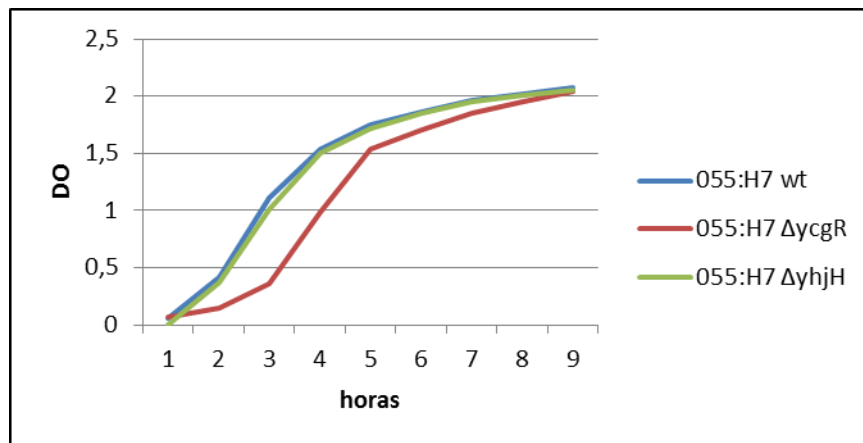


Figura 4. Curva de crescimento das amostras O55:H5 e dos mutantes O55:H7 $\Delta ycgR$ e O55:H7 $\Delta yhjH$.

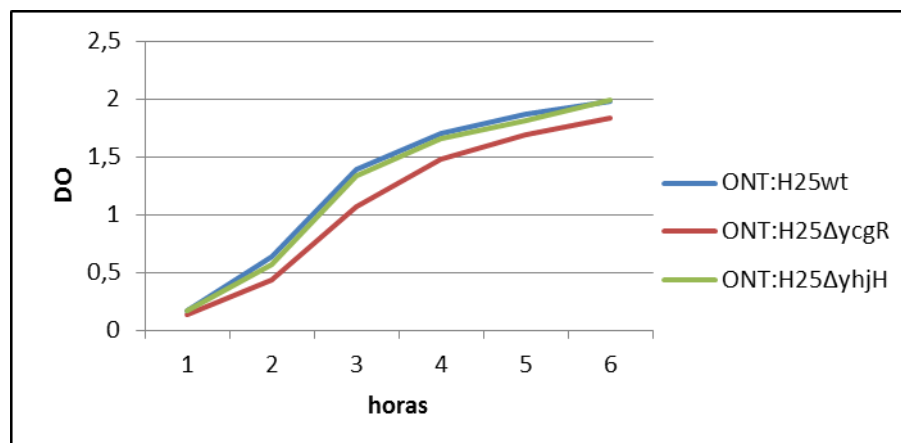


Figura 5. Curva de crescimento das amostras ONT:H25 e dos mutantes ONT:H25 $\Delta ycgR$ e ONT:H25 $\Delta yhjH$.

4.3. Teste de motilidade em Ágar semi-sólido.

O teste de motilidade em Ágar semi-sólido foi realizado a fim de se verificar se as mutações nos genes *ycgR* e *yhjH* tem influência na motilidade das amostras O55:H7 e ONT:H25. Os resultados demonstram que a deleção do gene *ycgR* reduz parcialmente motilidade das amostras O55:H7 $\Delta ycgR$ e ONT:H25 $\Delta ycgR$. A deleção do gene *yhjH*, em contrapartida, parece cessar a motilidade nas amostras O55:H7 $\Delta yhjH$ e ONT:H25 $\Delta yhjH$, demonstrando a importância desses genes na regulação da motilidade. (Figuras 6A e B).

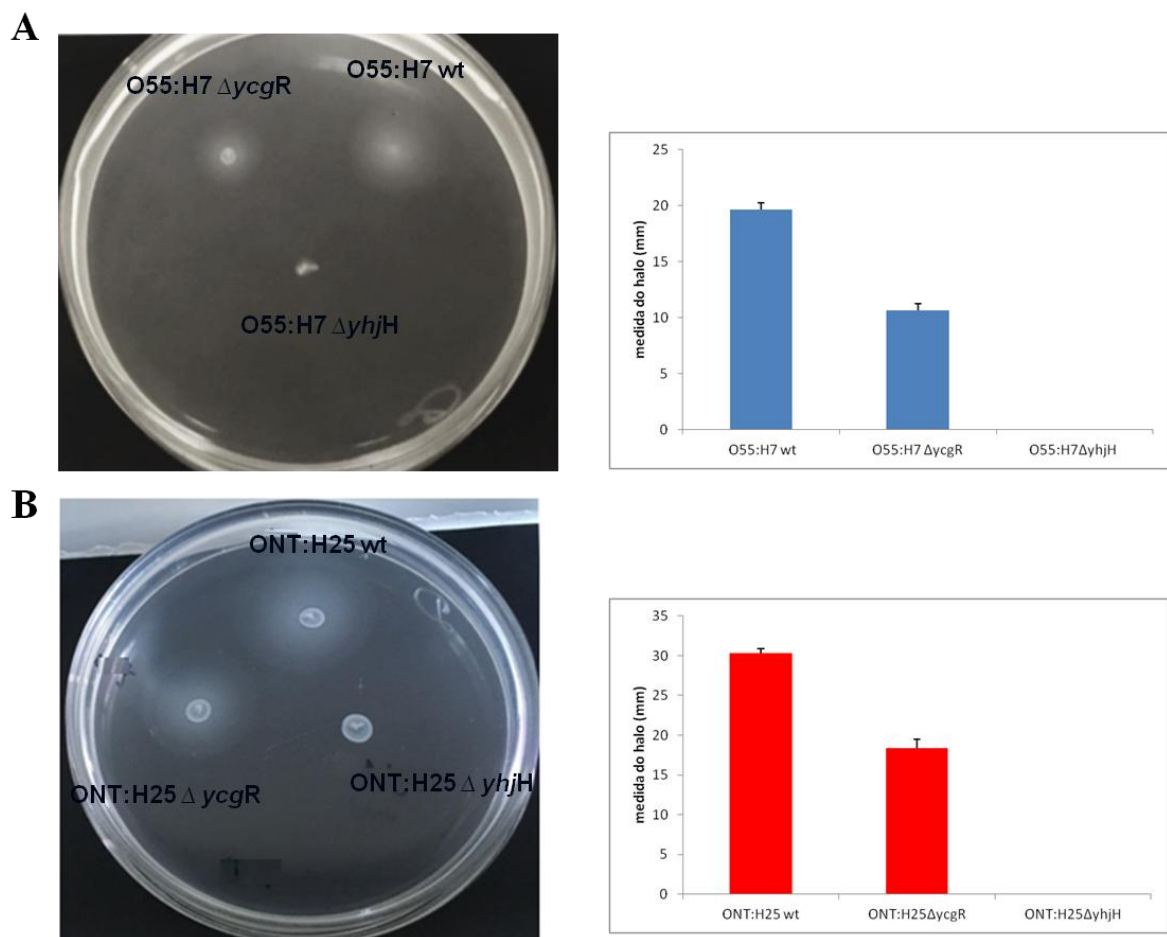


Figura 6 Teste de motilidade em ágar semi-sólido Formação dos halos de crescimento após 7 horas de incubação e representação gráfica do tamanho aproximado dos halos observados. A. Amostras O55:H7, O55:H7 $\Delta ycgR$ e O55:H7 $\Delta yhjH$. Observa-se a redução na motilidade da amostra mutante O55:H7 $\Delta ycgR$ e perda da motilidade na amostra mutante O55:H7 $\Delta yhjH$. B. Amostras ONT:H25, ONT:H25 $\Delta ycgR$ e ONT:H25 $\Delta yhjH$. Também é possível observar a redução da motilidade no mutante ONT:H25 $\Delta ycgR$ e a perda da motilidade no mutante O55:H7 $\Delta yhjH$.

4.4. Produção de celulose – Calcofluor

Para o ensaio de produção de celulose as amostras foram semeadas em placas de ágar contendo o corante calcofluor que detecta as ligações glicosídicas β -1,4 de moléculas de celulose, permitindo a visualização desta estrutura sob fluorescência a 366nm (ZOGAJ et al., 2001). O ensaio foi realizado nas temperaturas de 26°C e 37°C, por 24 horas e 48 horas. Os resultados podem ser observados nas **Figuras 7A e B** e são apenas qualitativos.

As amostras O55:H7, O55:H7 $\Delta ycgR$, O55:H7 $\Delta yhjH$, produzem celulose, ainda que em pouca quantidade tanto à 26°C (**Figura 7A**, 1, 2, 3, respectivamente) quanto à 37°C a partir de 24 horas. (**Figura 7B**, 1, 2, 3, respectivamente). Em contrapartida, as amostras ONT:H25, ONT:H25 $\Delta ycgR$ e ONT:H25 $\Delta yhjH$ só expressam celulose à 26°C após 48 horas de incubação. (**Figura 7A1**, 4,5 e 6, respectivamente). Desta forma, a deleção dos genes *ycgR* e *yhjH* parece não envolver diretamente a expressão de celulose em ambas as amostra.

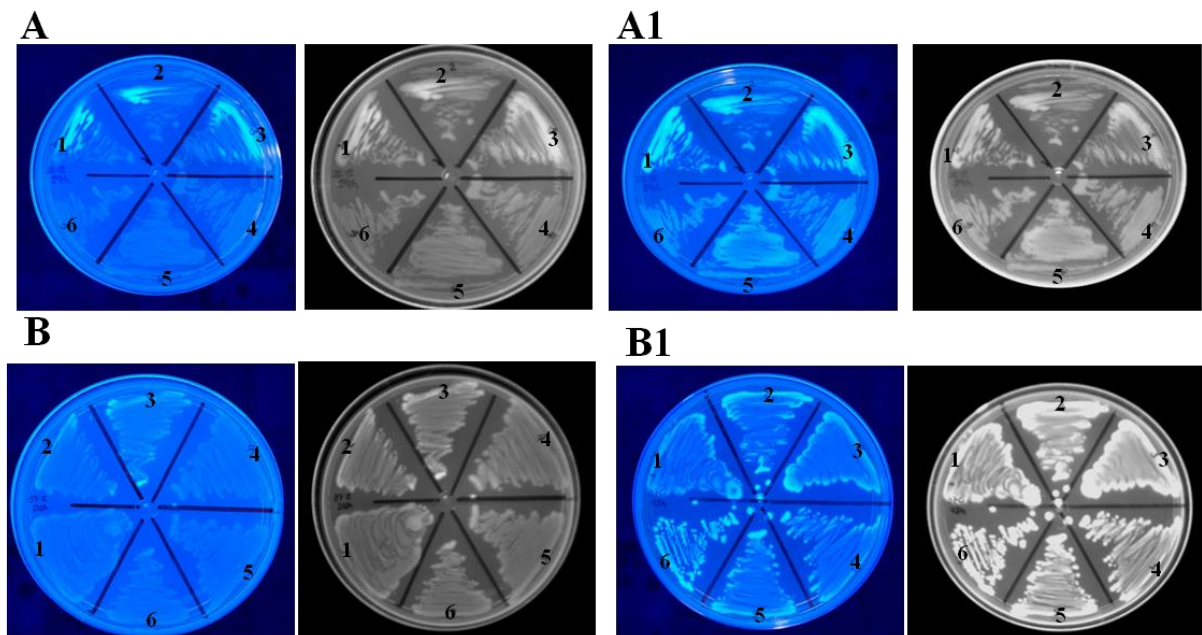


Figura 7 Visualização da celulose produzida pelas amostras sob luz de fluorescência. **A.** Temperatura de incubação à 26°C por 24 horas **A1.** Temperatura de incubação à 26°C por 48 horas. Aparentemente não há alteração na intensidade de fluorescência emitida por ambos os mutantes das amostras O55:H7 e ONT:H25, quando comparados com seus respectivos selvagens. **B.** Temperatura de incubação à 37°C por 24 horas. **B1.** Temperatura de incubação à 37°C por 48 horas. Não há aparente mudança na produção de celulose. Em todas as Figuras: 1.O55:H7, 2. O55:H7 $\Delta ycgR$, 3.O55:H7 $\Delta yhjH$, 4.ONT:H25, ONT:H25 $\Delta ycgR$, ONT:H25 $\Delta yhjH$.

4.5. Expressão de fímbria Curli -Vermelho Congo

Para verificar a expressão da fímbria curli as amostras deste estudo foram semeadas em placas de ágar contendo o corante vermelho congo. A fímbria curli é uma proteína filamentosa, de estrutura amilóide que contém um alto número de folhas beta-pregueadas que permitem a ligação ao corante vermelho congo. Neste ensaio, as amostras que expressam a fímbria crescem com coloração vermelha no ágar em um fenótipo denominado *rdar* (*Red, Dry and Rough*,) em temperatura inferior a 30°C. O ensaio foi realizado à 26°C e 37°C, no período de 48 horas.

A amostra O55:H7, quando incubada à 26°C, apresenta a expressão de fímbrias curli. Tanto o mutante O55:H7 Δ *ycgR* quanto o mutante O55:H7 Δ *yhjH* demonstram que não há alteração na expressão da fímbria. Na amostra O55:H7 a região mais externa da macrocolônia é caracterizada por uma zona estreita de crescimento, lisa, seguida de uma zona onde as rugosidades começam a aparecer e novamente um zona mais lisa de crescimento, marcando um próximo anel a ser formado. (**Figura 8A e 8A1**). O mutante O55:H7 Δ *ycgR* apresenta a mesma zona de crescimento mais externa lisa, seguida por uma zona de rugosidade e uma região mais lisa (**Figura 8B e 8B1**). O mutante O55:H7 Δ *yhjH* apresenta as mesmas regiões externas mais lisas, seguida de uma região de rugosidade ligeiramente maior e pouca definição de um novo anel após esta região. (**Figura 8 C e 81**). Quando incubada à 37°C, não há expressão de fímbria curli, e todas as amostras parecem ter crescimento parecido, embora a amostra O55:H7 Δ *ycgR* apresente a região mais externa a macrocolônia mais irregular (**Figura 8E e 981**), corroborando a teoria de que curli é melhor expressa em temperaturas inferiores a 30°C (BARNHART; CHAPMAN, 2006; SERRA et al., 2013) (**Figura 8D a F**).

A amostra ONT:H25 do mesmo modo, apresenta a expressão da fímbria curli na temperatura de 26°C e os mutantes ONT:H25 Δ *ycgR* e ONT:H25 Δ *yhjH* apresentam diferenças na parte mais interna da macrocolônia, com o surgimento de anéis mais definidos. Na amostra ONT:H25 é possível notar uma maior rugosidade, quando comparada com a amostra O55:H7. (**Figura 9 A e 91**). O mutante ONT:H25 Δ *ycgR* apresenta característica semelhante ao mutante ONT:H25 Δ *yhjH* (**Figura 9B e C**). Em incubação com temperatura à 37°C fica bem evidente a pouca expressão de curli, uma vez que todas as macrocolônias apresentam aparência lisa (**Figura D a F**).

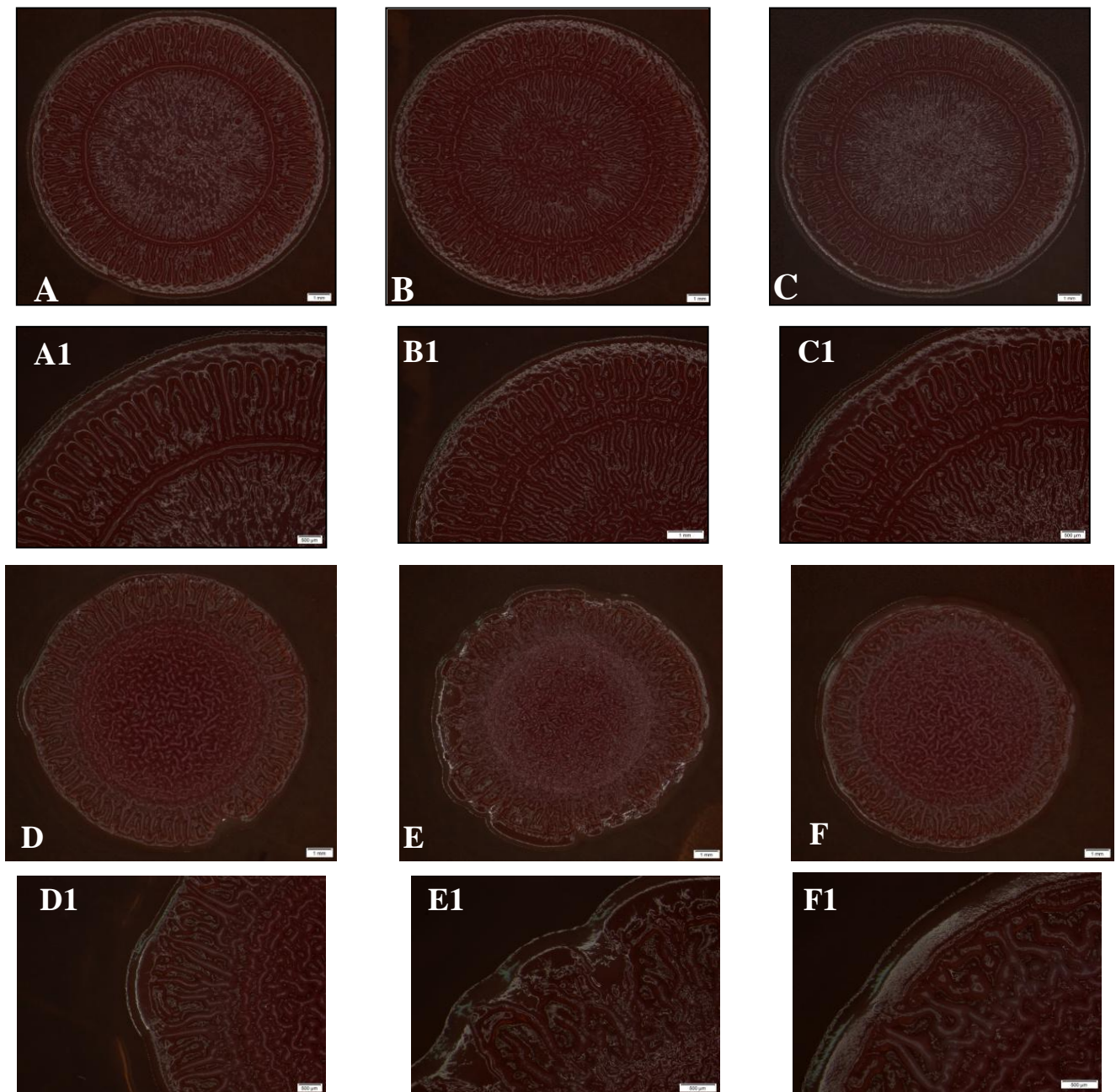


Figura 8. Ensaio de expressão de fimbria curli amostra O55:H7, O55:ΔycgR e O55:H7ΔyhjH. Os halos centrais indicam o local onde foi inoculado o pré-inóculo A, B e C respectivamente amostra O55:H7, O55:ΔycgR e O55:H7ΔyhjH. Incubação à 26°C. Macrocolônias observadas na placa de ágar contendo corante vermelho congo. É possível observar a rugosidade das macrocolônias, que fica evidenciada na observação em lupa de aumento. A1. Borda O55:H7 B1. Borda O55:H7ΔycgR C1. bordaO55:H7ΔyhjH D, E e F O55:H7, O55:ΔycgR e O55:H7ΔyhjH. Incubação à 37°C. As macrocolônias observadas em placa contendo o corante vermelho congo apresentam coloração mais esbranquiçada e pouco produção de fimbria. D1. borda O55:H7. E1.borda O55:H7ΔycgR, F1 Borda O55:H7ΔyhjH

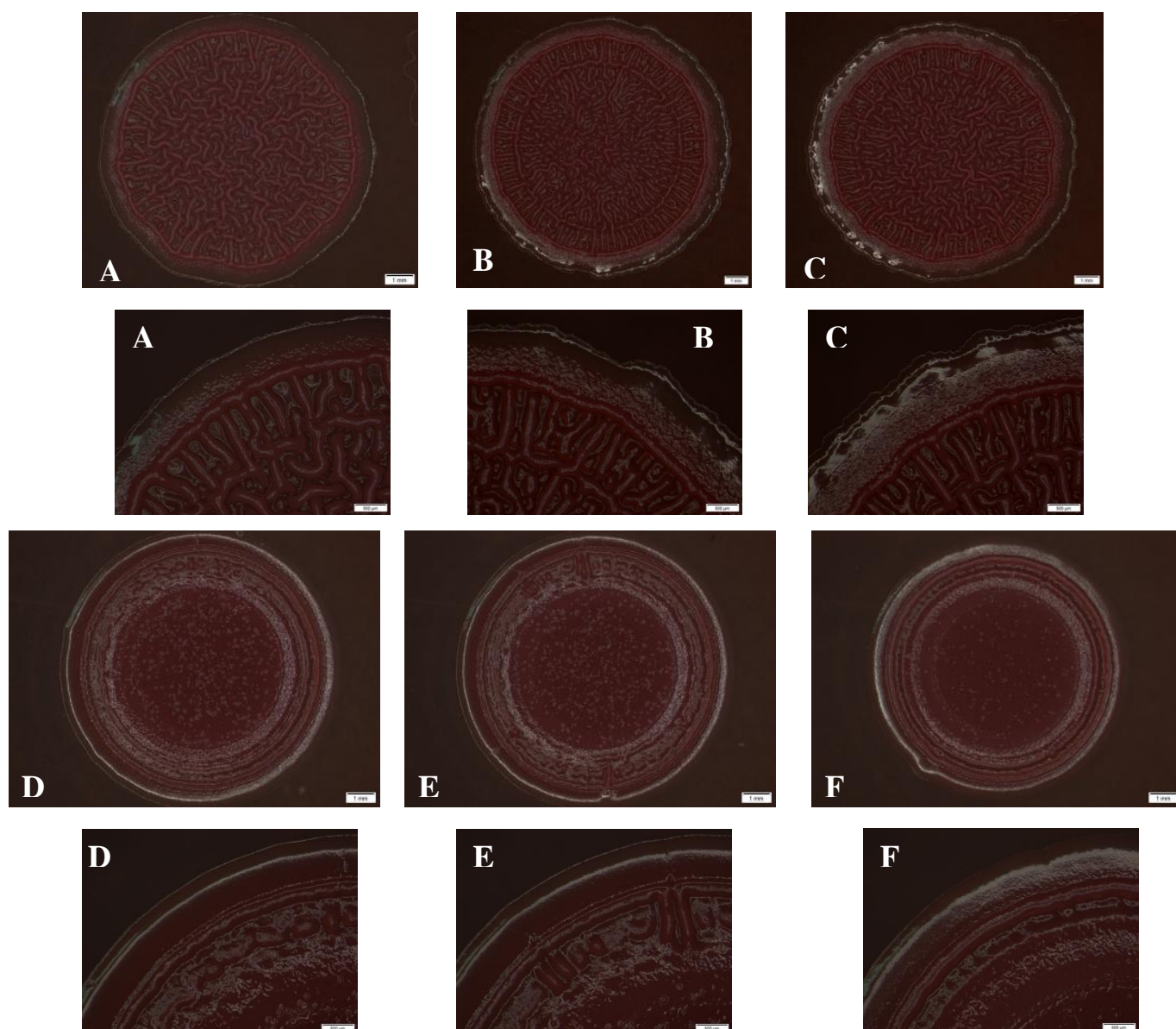


Figura 9. Ensaio de expressão de fímbria curli amostras ONT:25, ONT:H257 Δ ycgR e ONT:H25 Δ yhjH. Os halos centrais indicam o local onde foi inoculado o pré-inóculo A, B e C ONT:25, ONT:H257 Δ ycgR e ONT:H25 Δ yhjH respectivamente. Incubação à 26°C. Macrocolônias observadas na placa de ágar contendo corante vermelho congo. É possível observar a rugosidade das macrocolônias, que fica evidenciada na observação em lupa de aumento. A1. borda ONT:25 B1. Borda ONT:H257 Δ ycgR C1. ONT:H25 Δ yhjH. D, E e F O55:H7, ONT:H257 Δ ycgR e ONT:H25 Δ yhjH. Incubação à 37°C. Macrocolônias observadas em placa contendo o corante vermelho congo. Diferentemente das macrocolônias observadas à 26°C, nesta temperatura não há a expressão de fímbria curli, sendo observadas colônias lisas e de coloração esbranquiçada D1. borda ONT:25. E1.borda ONT:H257 Δ ycgR, F1. Borda ONT:H25 Δ yhjH

4.6. Formação de biofilme em superfície abiótica- Técnica Cristal Violeta

A formação de biofilme em superfície abiótica foi avaliada através do ensaio colorimétrico com cristal violeta, que consiste em medir indiretamente o número de células bacterianas aderidas em uma superfície com base na coloração da camada de peptidoglicano.

O ensaio foi realizado à 26°C e 37°C nos períodos de 24 e 48 horas. Os resultados demonstram que a amostra O55:H7 produz muito mais biofilme à 26°C quando comparado com os seus respectivos mutantes O55:H7 Δ cgR e O55:H7 Δ yhjH tanto no período de 24 quanto de 48 horas. (**Figura 10A**). Quando incubadas à 37°C, as todas as amostras apresentam redução no biofilme observado no período de 48 horas as amostras O55:H7 Δ cgR e O55:H7 Δ yhjH formam menos biofilme quando comparadas com a amostra selvagem O55:H7 (**Figura10 B**).

Em relação as amostras ONT:H25 e seus mutantes foi observado que a variação da formação de biofilme à 37°C entre elas foi pouco relevante (**Figura 11B**) tanto nos período de 24 quanto 48 horas. Em contrapartida, à 26°C, há uma redução no biofilme no período de 48 horas. O mutante ONT:H25 Δ yhjH parece produzir menos biofilme quando comparado com a amostra selvagem ONT:H25 e ao mutante ONT:H25 Δ ycgR, que aparanta ter uma pequena porem não significava produção quando comparada com a amostra selvagem (**Figura 11A**).

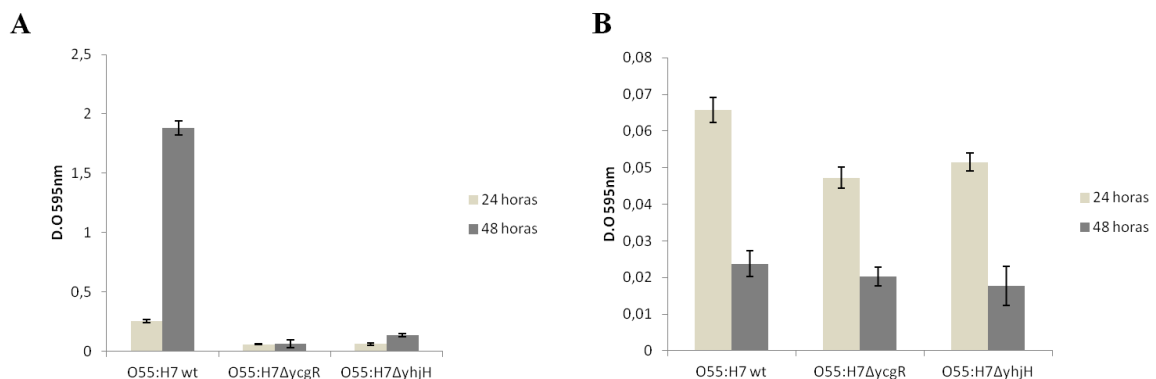


Figura 10 Análise da formação de biofilme em superfície abiótica através de Cristal Violeta pelos períodos de 24 horas e 48 horas à 26°C. A. Amostras O55:H5, O55:H7 Δ ycgR e O55:H7 Δ yhjH. B. Amostra ONT:H25, ONT:H25 Δ ycgR e ONT:H25 Δ yhjH. O teste foi repetido 3 vezes e as barras indicam o desvio padrão obtido

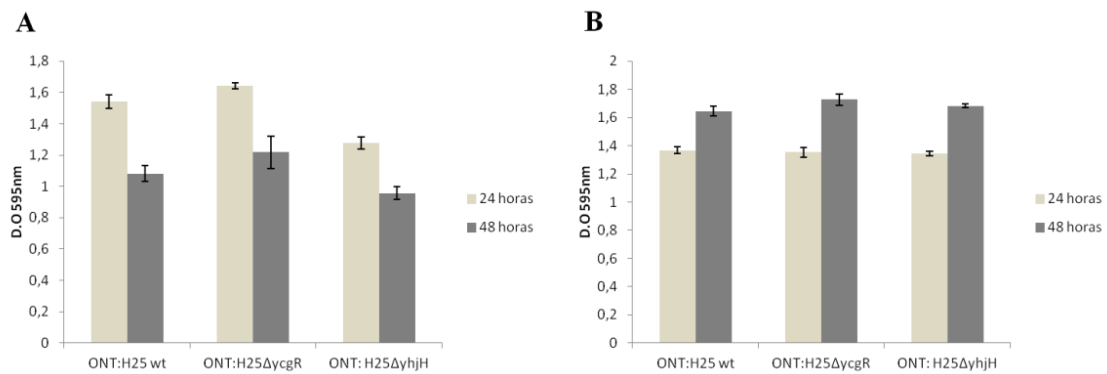


Figura 11 Análise da formação de biofilme em superfície abiótica através de Cristal Violeta pelos períodos de 24 horas e 48 horas à 37°C. **A.** Amostras O55:H5, O55:H7 $\Delta ycgR$ e O55:H7 $\Delta yhjH$. **B.** Amostra ONT:H25, ONT:H25 $\Delta ycgR$ e ONT:H25 $\Delta yhjH$. O teste foi repetido 3 vezes e as barras indicam o desvio padrão obtido

4.7. Visualização de formação de biofilme em Microscopia Confocal a laser

Embora o ensaio colorimétrico com cristal violeta seja utilizado para medir a intensidade do biofilme formado, seus resultados são muito inespecíficos e passíveis de variação. Adicionalmente foi então realizado o ensaio de formação de biofilme em lamínula de vidro para posterior observação em microscopia confocal a laser. Pré inóculos das amostras O55:H7, O55:H7 $\Delta ycgR$, O55:H7 $\Delta yhjH$, ONT:H25, ONT:H25 $\Delta ycgR$ e ONT:H25 $\Delta yhjH$ foram semeadas à 26°C e 37°C em placas de poliestireno contendo apenas lamínula e meio LB por 24 e 48 horas, conforme descrito no item 3.5.5.2.

A observação das lâminas demonstra aparentemente uma melhor formação de biofilme a temperatura de 26°C, tanto pela amostra O55:H7 e seus respectivos mutantes (**Figura 12**) quanto pela amostra ONT:H25 e seus respectivos mutantes (**Figura 14**). A diferença de temperatura parece não alterar significativamente o fenótipo observado no ensaio envolvendo a amostra O55:H7. Resultado contraditório quando comparado com o ensaio colorimétrico com cristal violeta. Esperava-se uma produção significativa de biofilme pela amostra selvagem O55:H7 à 26°C, fato que não pode ser comprovado (**Figura 12A**).

Em relação à amostra ONT:H25, observou-se que o mutante ONT:H25 $\Delta yhjH$, à 26°C apresenta uma pequena redução na quantidade de biofilme, quando comparado com o respectivo selvagem e o mutante ONT:H25 $\Delta ycgR$ (**Figura 14C**) em

contrapartida, à 37°C, com 24 horas de incubação, o mutante ONT:H25 $\Delta yhjH$ parece produzir mais biofilme, comparado com o selvagem ONT:H25 e ONT:H25 $\Delta ycgR$ (**Figuras 15C e C1**) após 48 horas entretanto, a quantidade observada é semelhante aos da outras amostras. (**Figuras 15 C2 e C3**).

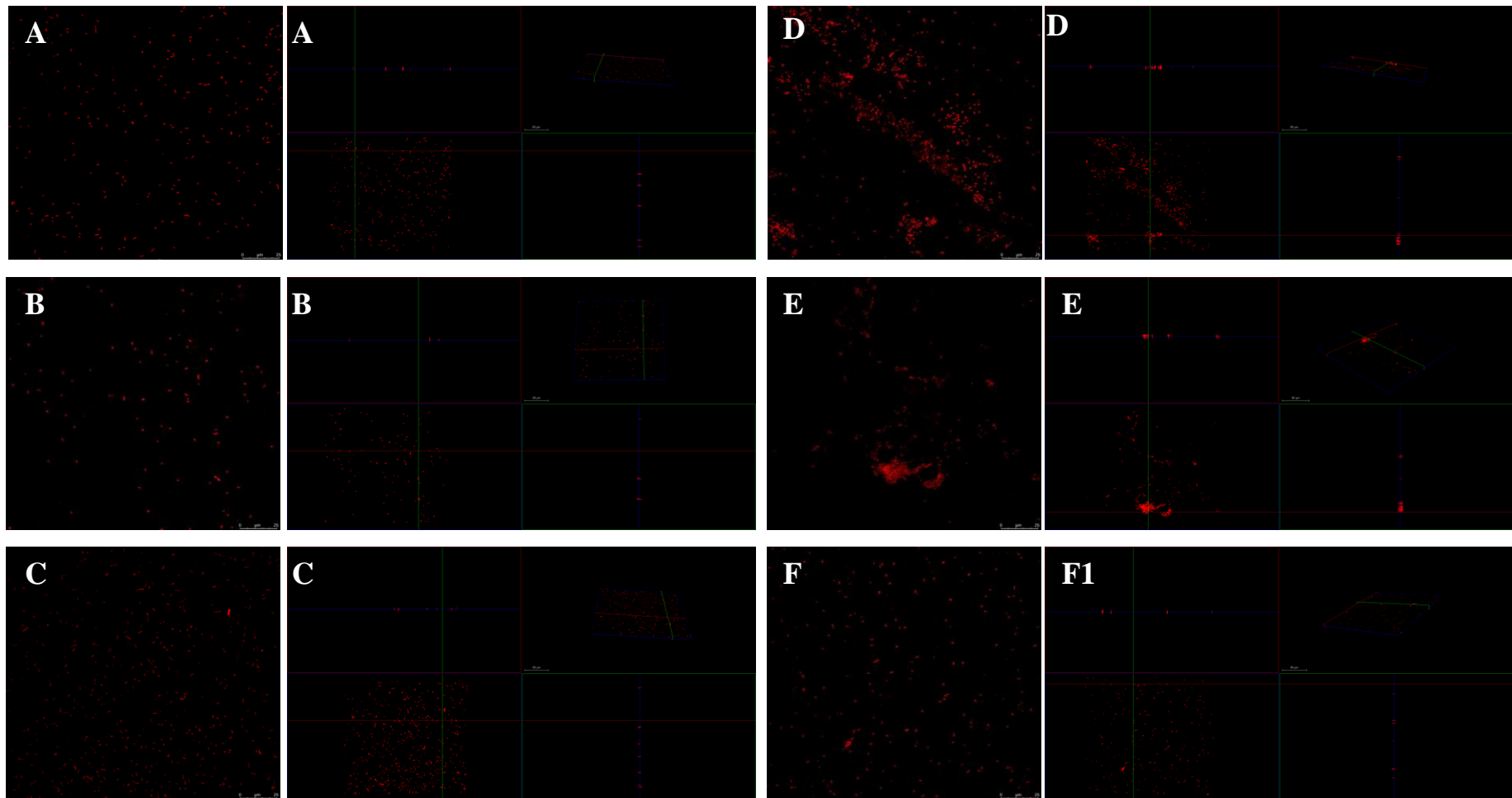


Figura 12 Visualização de formação de biofilme em superfície abiótica por Microscopia Confocal a laser. Incubação à 26°C Amostras O55:H7, O55:H7 Δ ycgR e O55:H7 Δ yhjH. A. O55:H7 B. O55:H7 Δ ycgR C.O55:H7 Δ yhjH eixo XY. A1. O55:H7 B1. O55:H7 Δ ycgR C1.O55:H7 Δ yhjH representação ortogonal e 3D. (24 horas) D. O55: H7 E. O55:H7 Δ ycgR F.O55:H7 Δ yhjH. eixo XY D1. O55: H7 E1. O55:H7 Δ ycgR F1.O55:H7 Δ yhjH (48 horas) representação ortogonal e 3D.

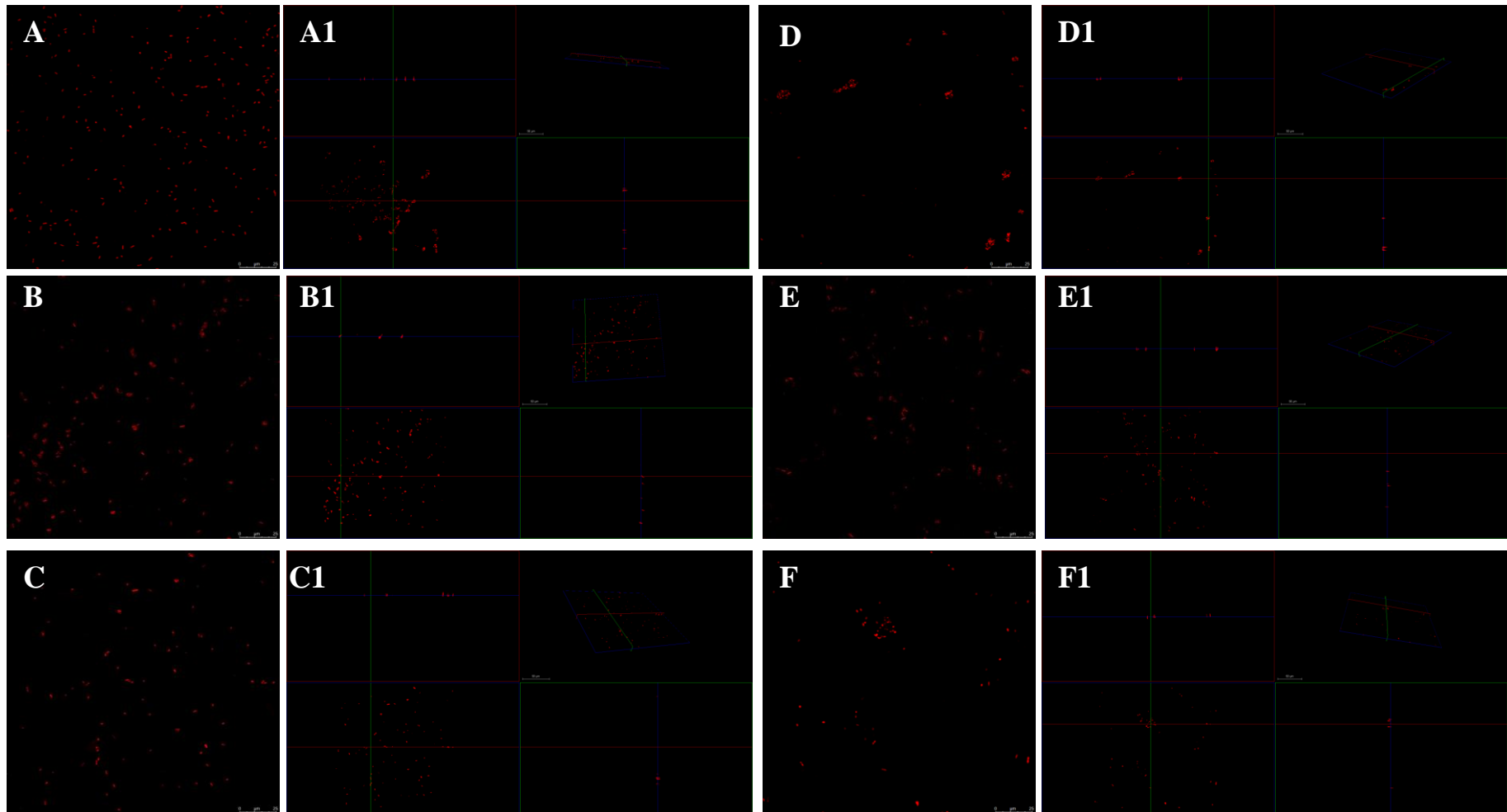


Figura 13 Visualização de formação de biofilme em superfície abiótica por Microscopia Confocal a laser. Incubação à 37°C Amostras O55:H7, O55:H7 Δ ycgR e O55:H7 Δ yhjH A. O55:H7 B. O55:H7 Δ ycgR C.O55:H7 Δ yhjH eixo XY. A1. O55:H7 B1. O55:H7 Δ ycgR C1.O55:H7 Δ yhjH representação ortogonal e 3D. (24 horas) D. O55: H7 E. O55:H7 Δ ycgR F.O55:H7 Δ yhjH. Eixo XY D1. O55: H7 E1. O55:H7 Δ ycgR F1.O55:H7 Δ yhjH (48 horas) representação ortogonal e 3D.

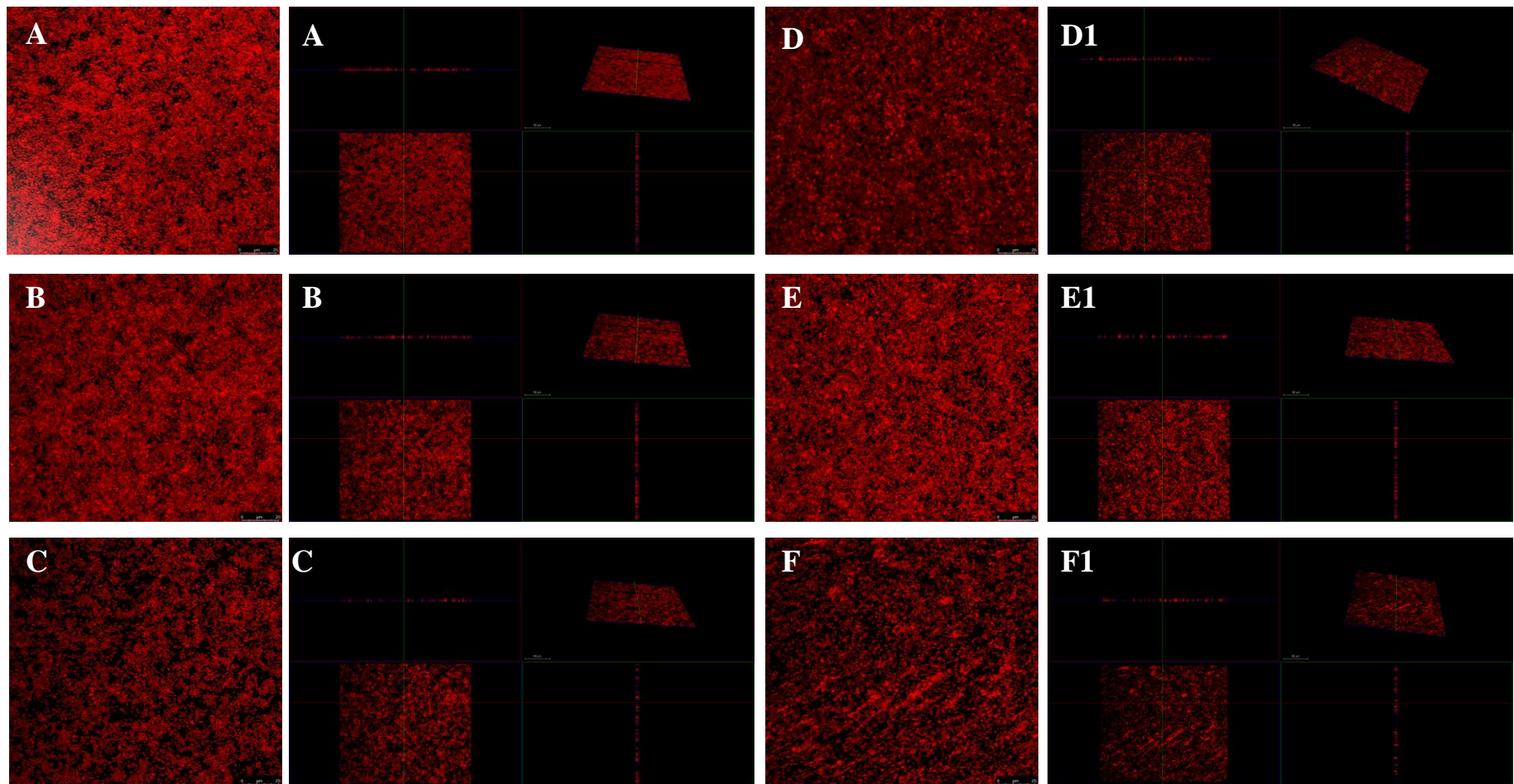


Figura 14 Visualização de formação de biofilme em superfície abiótica por Microscopia Confocal a laser. Incubação à 26°C Amostras ONT:H25, ONT:H25 $\Delta ycgR$ e ONT:H25 $\Delta yjhH$. A. ONT:H25 B. ONT:H25 $\Delta ycgR$ C. ONT:H25 $\Delta yjhH$ eixo XY. A1. ONT:H25 B1. ONT:H25 $\Delta ycgR$ C1 ONT:H25 $\Delta yjhH$ representação ortogonal e 3D. (24 horas) D. ONT:H25 E. ONT:H25 $\Delta ycgR$ F. ONT:H25 $\Delta yjhH$. Eixo XY D1. ONT:H25 E1. ONT:H25 $\Delta ycgR$ F1. ONT:H25 $\Delta yjhH$ representação ortogonal e 3D (48 horas)

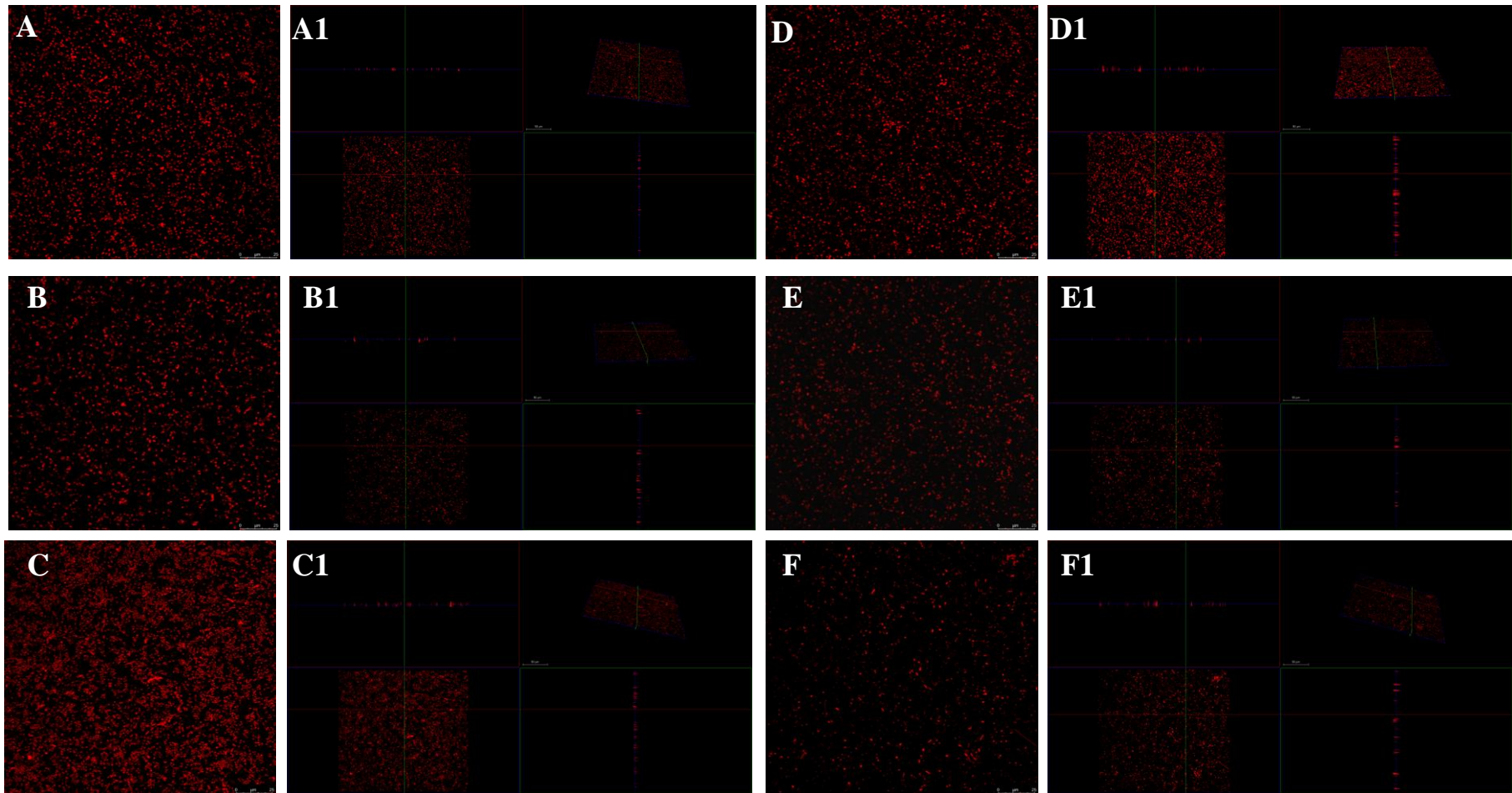


Figura 15 Visualização de formação de biofilme em superfície abiótica por Microscopia Confocal a laser. Incubação à 37°C Amostras ONT:H25, ONT:H25 $\Delta ycgR$ e ONT:H25 $\Delta yhjH$ A. ONT:H25 B. ONT:H25 $\Delta ycgR$ C. ONT:H25 $\Delta yhjH$ eixo XY. A1. ONT:H25 B1. ONT:H25 $\Delta ycgR$ C1 ONT:H25 $\Delta yhjH$ representação ortogonal e 3D. (24 horas) D. ONT:H25 E. ONT:H25 $\Delta ycgR$ F. ONT:H25 $\Delta yhjH$. Eixo XY D1. ONT:H25 E1. ONT:H25 $\Delta ycgR$ F1. ONT:H25 $\Delta yhjH$ representação ortogonal e 3D (48 horas)

4.8. Teste de formação de biofilme em células epiteliais HeLa

Uma vez que biofilmes são comunidades bacterianas que podem se aderir tanto em superfícies abióticas quanto bióticas, foi investigado a capacidade de formação de biofilme em células epiteliais HeLa. Pré inóculos das amostras O55:H7, O55:H7 $\Delta ycgR$, O55:H7 $\Delta yhjH$, ONT:H25, ONT:H25 $\Delta ycgR$ e ONT:H25 $\Delta yhjH$ foram semeadas à 37°C em placas de poliestireno de 24 poços com lamínulas com células HeLa previamente semeadas e fixadas com metanol. Após os períodos de 24 e 48 horas as lamínulas foram lavadas com PBS e tratadas conforme descrito no item 3.5.6.3 para posterior observação em microscopia confocal.

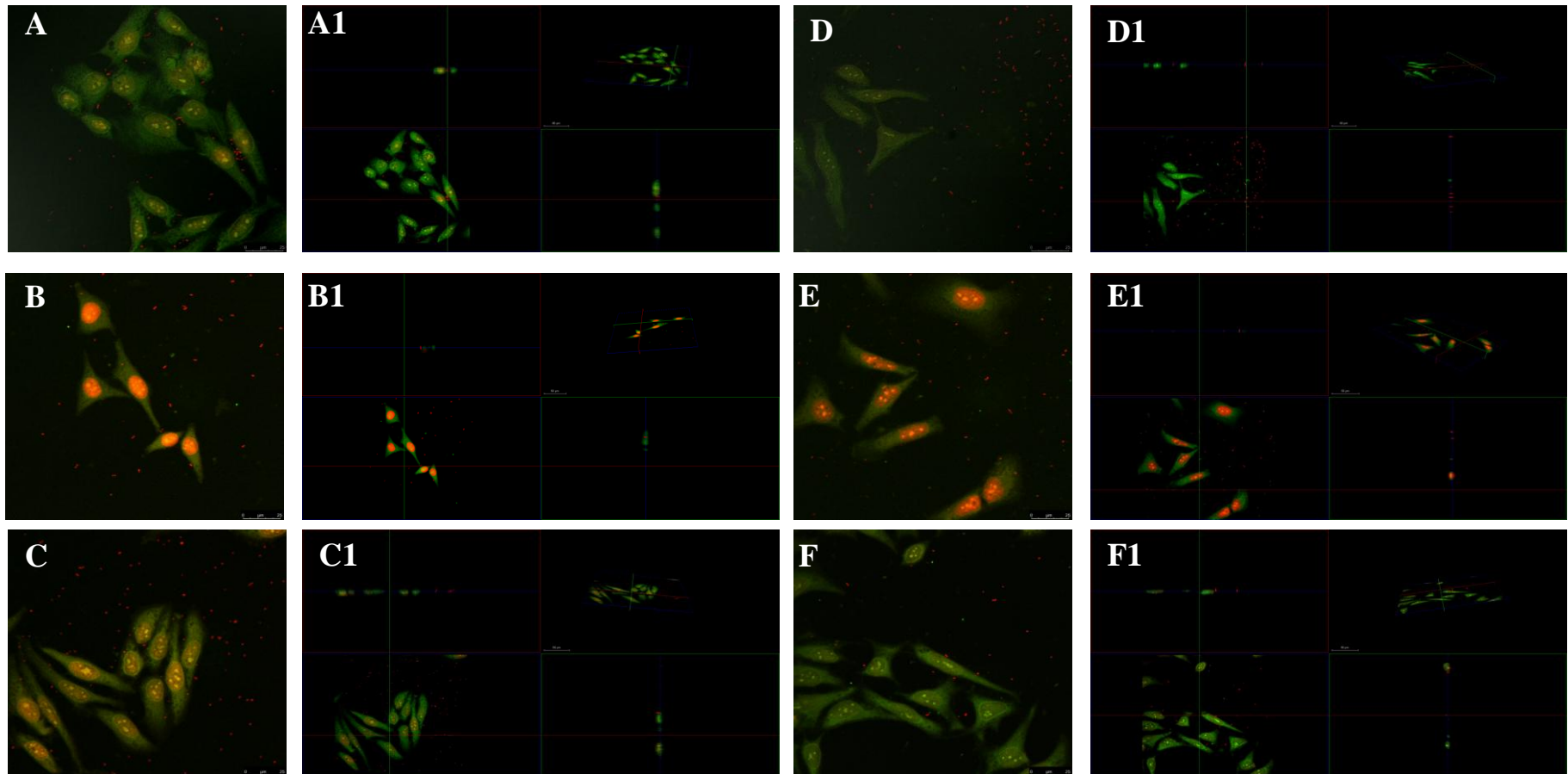


Figura 16 Visualização de formação de biofilme em superfície biótica por Microscopia Confocal a laser. Incubação à 37°C Amostras O55:H7, O55:H7ΔycgR e O55:H7ΔyjhH A. O55:H7 B. O55:H7ΔycgR C.O55:H7ΔyjhH eixo XY. A1. O55:H7 B1. O55:H7ΔycgR C1.O55:H7ΔyjhH representação ortogonal e 3D. (24 horas) D. O55: H7 E. O55:H7ΔycgR F.O55:H7ΔyjhH. Eixo XY D1. O55: H7 E1. O55:H7ΔycgR F1.O55:H7ΔyjhH (48 horas) representação ortogonal e 3D.

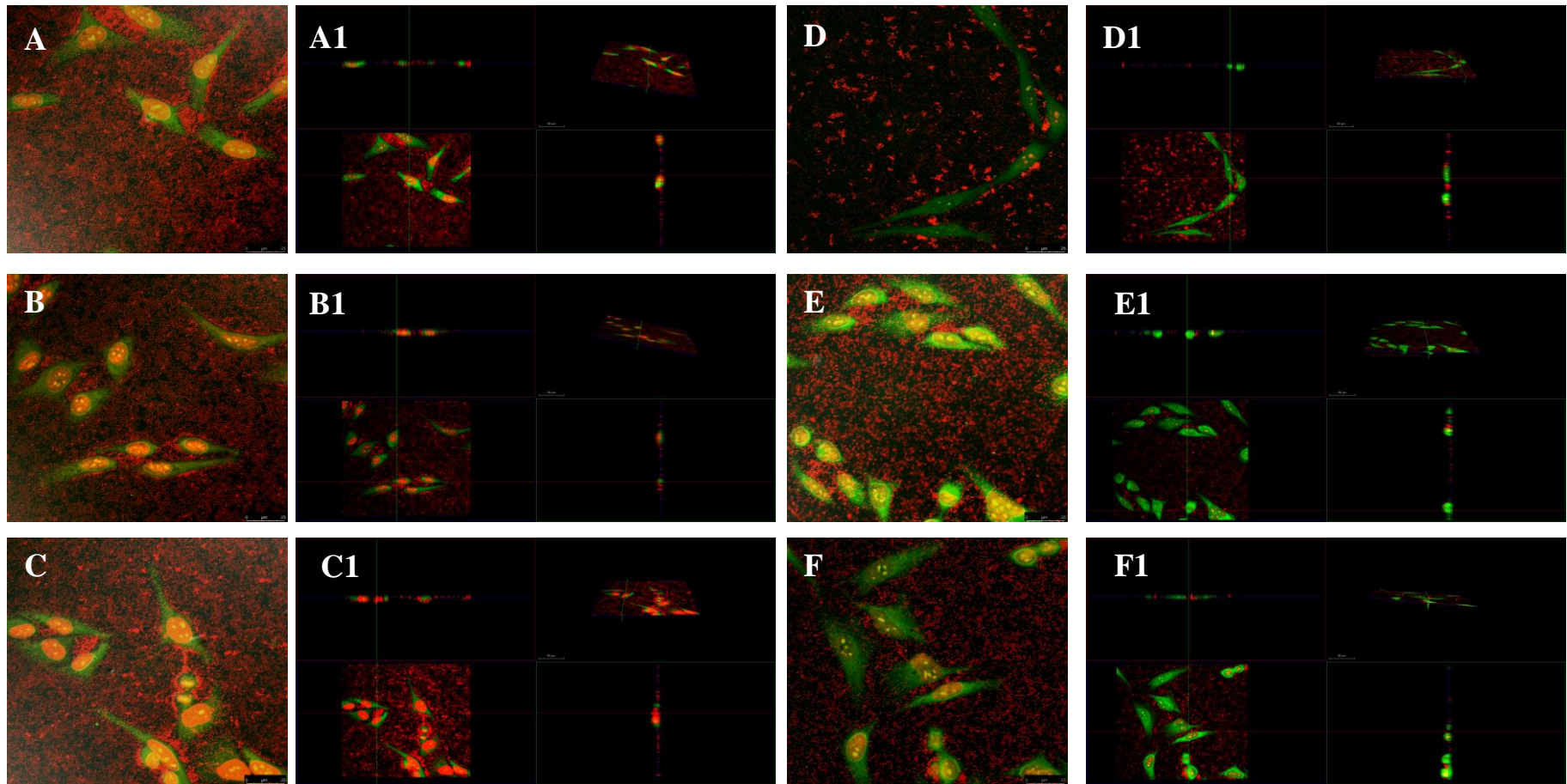


Figura 17 Visualização de formação de biofilme em superfície biótica por Microscopia Confocal a laser. Incubação à 37°C Amostras ONT:H25, ONT:H25 $\Delta ycgR$ e ONT:H25 $\Delta yhjH$ A. ONT:H25 B. ONT:H25 $\Delta ycgR$ C. ONT:H25 $\Delta yhjH$ eixo XY. A1. ONT:H25 B1. ONT:H25 $\Delta ycgR$ C1 ONT:H25 $\Delta yhjH$ representação ortogonal e 3D. (24 horas) D. ONT:H25 E. ONT:H25 $\Delta ycgR$ F. ONT:H25 $\Delta yhjH$. Eixo XY D1. ONT:H25 E1. ONT:H25 $\Delta ycgR$ F1. ONT:H25 $\Delta yhjH$ representação ortogonal e 3D (48 horas

4.9 Ensaio de adesão em célula epitelial *in vitro*

Para avaliar se os genes *ycgR* e *yhjH* desempenham algum papel na adesão das amostras O55:H7 e ONT:H25 foi realizado o ensaio de adesão em célula HeLa. Pré inóculos das amostras O55:H7, O55:H7 Δ *ycgR*, O55:H7 Δ *yhjH*, ONT: H25, ONT:H25 Δ *ycgR* e ONT:H25 Δ *yhjH* foram inoculadas em poços de placas de poliestireno com lamínulas com crescimento confluyente de célula HeLa e mantidas à 37° C por 3 e 6 horas (amostras O55:H7, O55:H7 Δ *ycgR* e O55:H7 Δ *yhjH*) ou 3 horas (amostras ONT:H25, ONT:H25 Δ *ycgR* e ONT:H25 Δ *yhjH*). Após estes períodos, as lamínulas foram lavadas com PBS e coradas com os corantes May – Grünwald 0,2% e Giemsa e então observadas em microscopia óptica em aumento de 1000X.

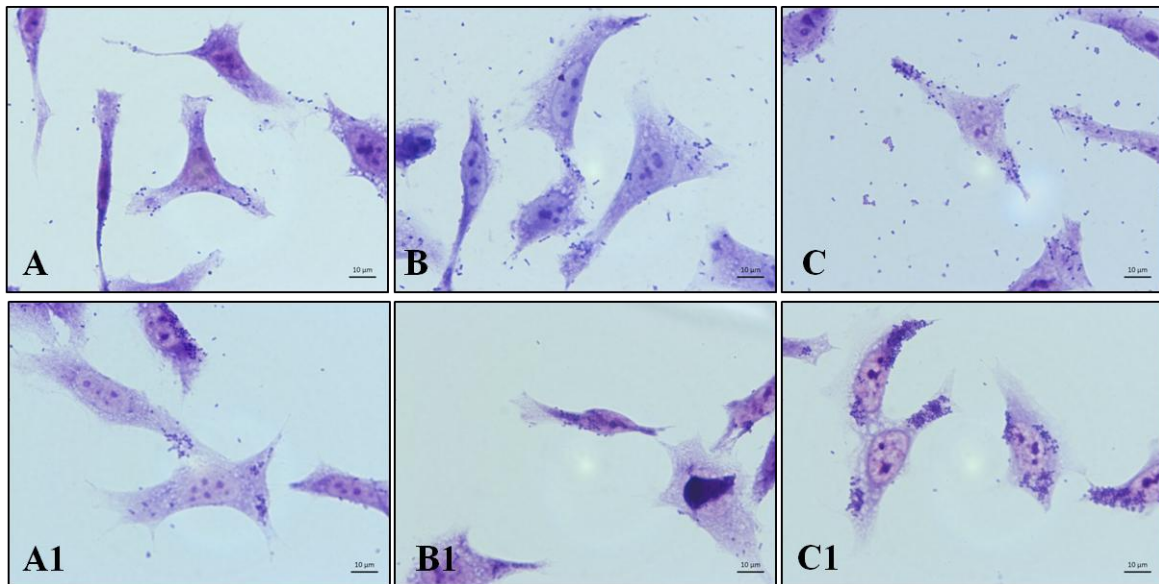


Figura 18 Ensaio de adesão em célula HeLa observadas em microscopia óptica em aumento de 100X, May – Grünwald 0,2% e Giemsa 3:1. Após 3 horas de incubação; A. Amostra O55:H7. B. Amostra O55:H7 Δ *ycgR*. C. Amostra O55:H7 Δ *yhjH*. Após 6 horas de incubação; A1. Amostra O55:H7. B.1 Amostra O55:H7 Δ *ycgR*. C1. Amostra O55:H7 Δ *yhjH*.

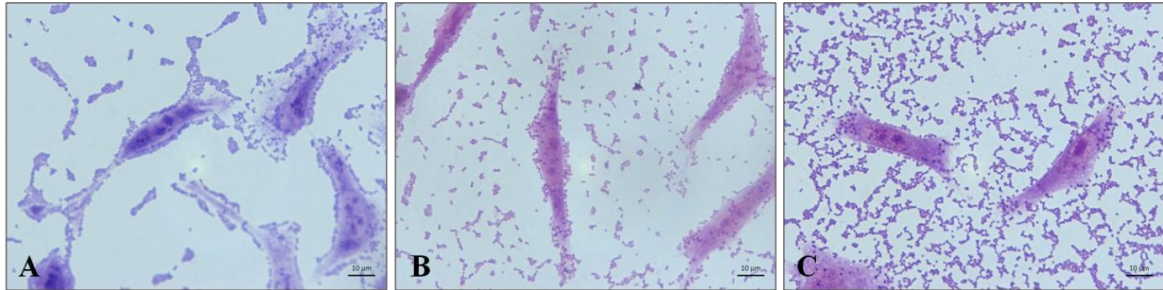


Figura 19 Ensaio de adesão em célula HeLa observadas em microscopia óptica em aumento de 100X, May – Grünwald 0,2% e Giemsa 3:1. Após 3 horas de incubação; A. Amostra ONT:H25. B. Amostra ONT:H25 Δ *ycgR*. C. Amostra ONT:H25 Δ *yhjH*.

4.10. Teste de FAS

A principal característica de EPEC é a formação da Lesão A/E. Em 1989, Knutton et al. descrevem a técnica de FAS que permite observar, em microscopia confocal, a polimerização da actina que ocorre durante a formação da lesão A/E. O ensaio foi realizado nos períodos de 3 horas e 6 horas de interação das amostras O55:H7, O55:H7 Δ *ycgR*, O55:H7 Δ *yhjH* com células HeLa. As amostras ONT: H25, ONT:H25 Δ *ycgR* e ONT:H25 Δ *yhjH* não foram testadas pois são FAS negativas.

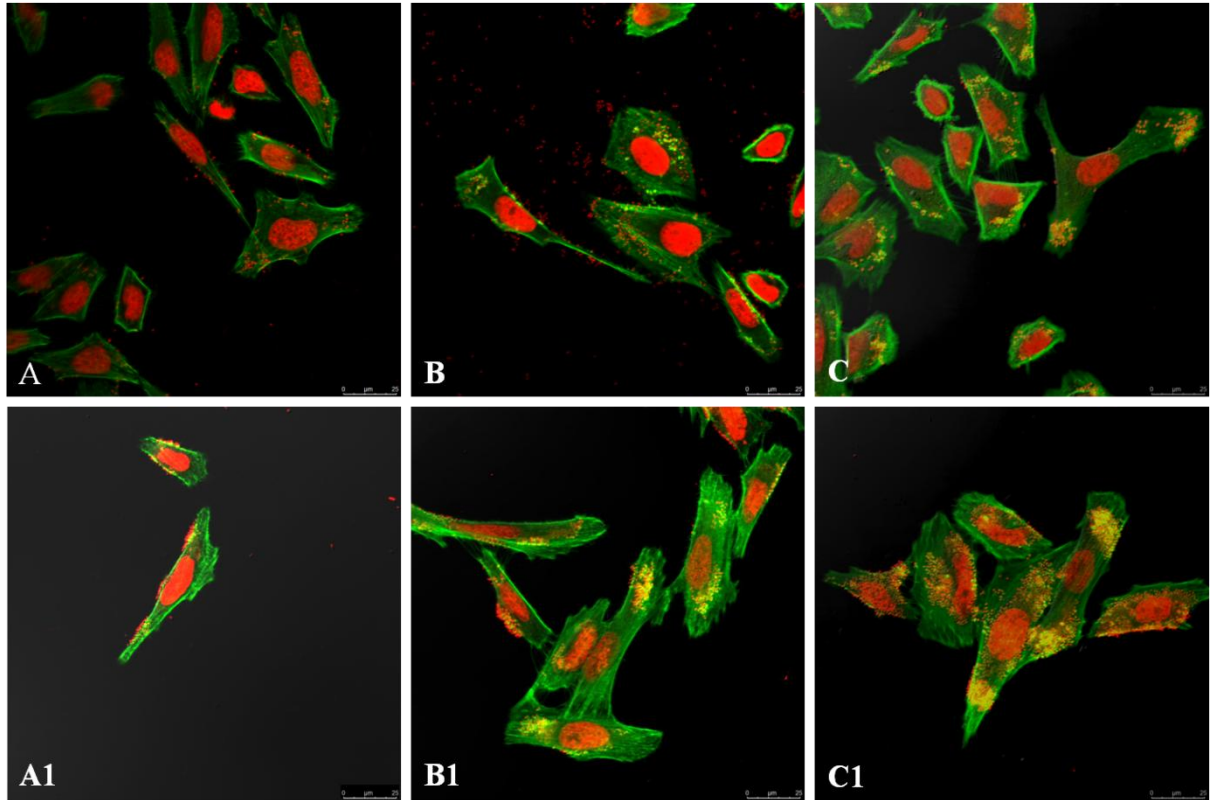


Figura 20. Teste de FAS observadas em microscopia confocal. Em vermelho, coradas com iodeto de propídeo, estão as bactérias. Em verde, coradas com Alexa 488, os filamentos de actina. Os pontos de coloração amarelada são os locais onde há rearranjo de citoesqueleto e sobreposição de cores, sendo um forte indício de lesão A/E. Após 3 horas de incubação; A. Amostra O55:H7. B. Amostra O55:H7 Δ ycgR. C. Amostra O55:H7 Δ yhjH. Após 6 horas de incubação; A1. Amostra O55:H7. B1. Amostra O55:H7 Δ ycgR. C1. Amostra O55:H7 Δ yhjH.

4.11. Análise transcricional por qRT-PCR

Para analisar se os fenótipos que foram observados estão relacionados com a transcrição dos genes relacionados à formação da lesão A/E e biofilme, foram realizados qRT-PCR para a análise de transcrição de genes que já foram descritos como participantes de processos envolvidos na regulação de fatores que estão envolvidos na adesão e na formação de biofilme.

Foram escolhidos os genes *ler*, que é codificado na região LEE e participa como um regulador global dos genes contidos nesta ilha de patogenicidade e os genes *csgD*, *bscA* e *fimA* que estão envolvidos na produção de fimbria curli, celulose e fimbria tipo I, respectivamente e estão relacionados com a formação de biofilme. Em todos os casos a análise dos níveis transcricionais foi feita comparando as amostras mutantes com suas

respectivas amostras selvagens. Os resultados obtidos podem ser observados nas **Figuras 21 e 22**.

Para a extração do RNA total, As amostras foram crescidas em meio LB até atingir a DO_{600nm} 0.6.

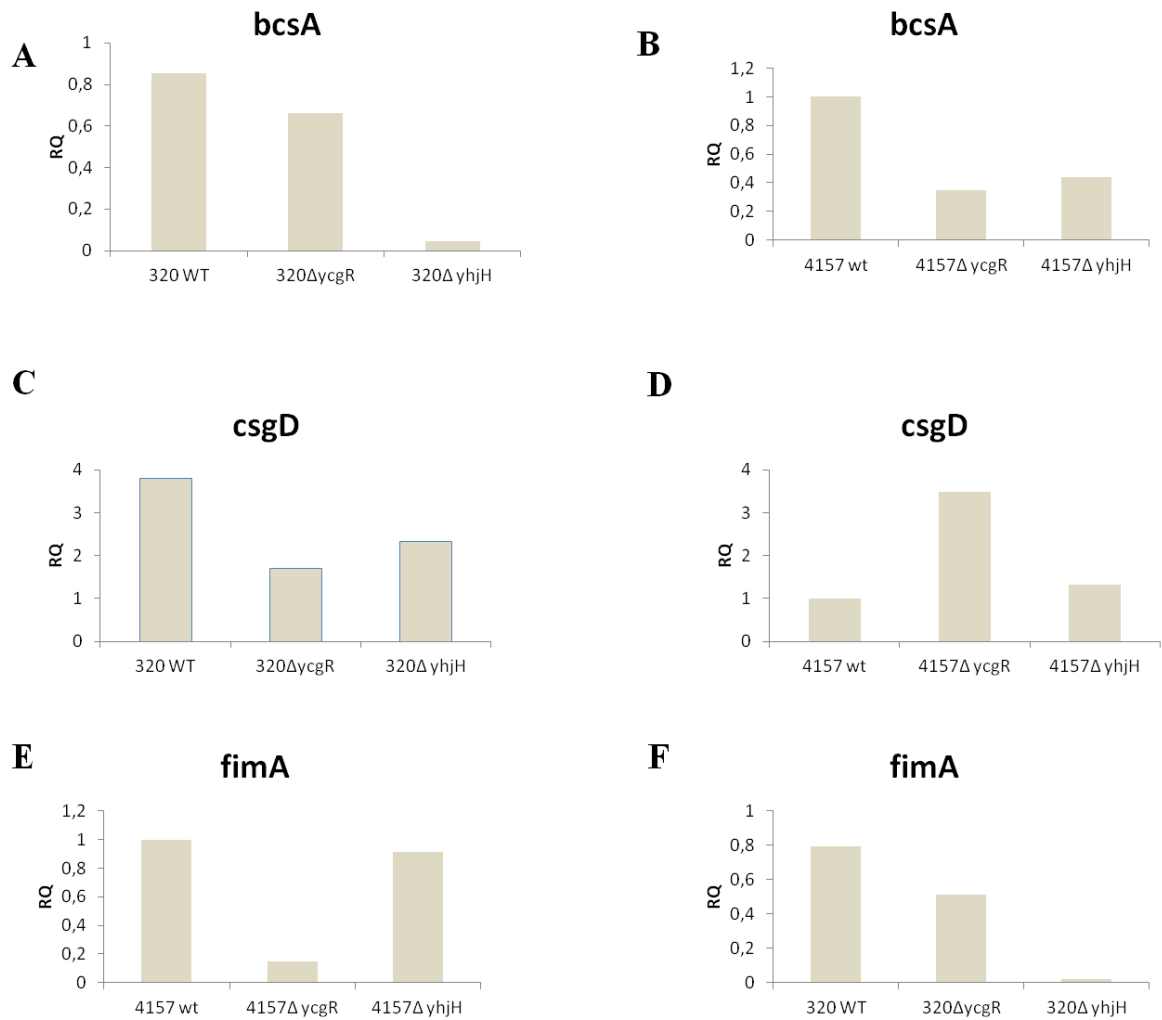


Figura 21. Análise transcricional dos genes envolvidos na formação de biofilme.

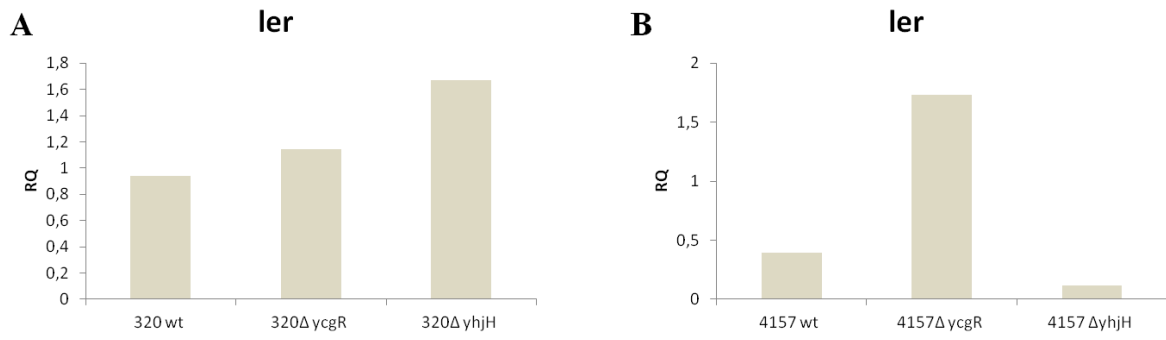


Figura 22. Análise transcricional de *ler*, regulador da região LEE

5. DISCUSSÃO

Bis-(3'-5')-monofosfato de guanosina cíclico (c-di-GMP) é um mensageiro secundário bacteriano onipresente. Está envolvido diretamente na decisão bacteriana de “nadar o ficar”, ou seja, na decisão de se manter em estado planctônico, móvel ou se fixar em determinado substrato e assumir uma forma de crescimento sésil. De maneira geral, altos níveis de c-di-GMP reduzem a expressão e/ou a atividade flagelar, estimulando a expressão de várias adesinas e de componentes do EPS. Estudos recentes tem demonstrado a importância de c-di-GMP na regulação de diversos processos, principalmente formação de biofilme, motilidade e virulência. (HENGEE, 2009).

O principal alvo de c-di-GMP em *E.coli* é produção de polímeros componentes da matriz extracelular durante a formação do biofilme (HENGEE, 2009). Dentre os componentes da matriz, tanto em macro colônias quanto em películas estão as fímbrias tipo amiloide curli e a celulose.

A produção da matriz ocorre quando as células entram na fase estacionária de crescimento e estão sob o controle de uma cascata de regulação que envolve o fator σ^S (RpoS) de transcrição e CsgD, que regula diretamente a expressão as subunidades CsgA e CsgB de curli e indiretamente a síntese de celulose. (PFIFFER et al., 2019).

aEPEC é um importante patógeno causador de diarreia em crianças principalmente em países em desenvolvimento e não existe na literatura nenhum trabalho que avalie a influência de c-di-GMP neste patótipo de DEC.

A proteína YcgR pertence à família das proteínas com domínio PilZ que se liga ao c-di-GMP, regulando a rotação do flagelo bacteriano através desta interação em *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* (ZORRAQUINO et al., 2013,). Os estudos com YcgR limitam-se somente ao seu papel nesta regulação do movimento flagelar e, ainda assim somente em amostras não patogênicas de *E.coli*, não existindo estudos que o relacione com outras possíveis funções ou papel em vias regulatórias.

Juntamente com YcgR, a PDE YhjH (PdeH) controla de maneira global os níveis de c-di-GMP em *E.coli*, sendo responsável principalmente pelo controle da motilidade (REINDERS et al., 2016)

Para verificar o papel de YgcR e YhjH na regulação da motilidade e possível papel do mesmo na adesão de aEPEC, amostras do sorotipo O55:H7 e ONT:H25 foram escolhidas para deleção dos genes *ycgR* e *yhjH*. O método utilizado para deleção dos genes foi o da recombinação homóloga proposto por DATSENKO e WANNER (2000) consiste basicamente em substituir o gene de interesse por um cassete de resistência a um antibiótico com o auxílio do sistema λ Red que é composto pelo plasmídeo pKD46 e por plasmídeos acessórios, (neste estudo, o pKD3) que são utilizados na construção do cassete de recombinação por PCR. Os resultados da mutação e confirmação dos mutantes foram confirmados por amplificação de fragmentos específicos em reações de PCR como mostram as figuras 1 a 3 e confirmados por sequenciamento de base dos fragmentos (dados não mostrados).

Para assegurar que os resultados observados eram decorrência da mutação, foi feita a curva de crescimento das amostras envolvidas no estudo e a análise da mesma demonstra que não há diferença no padrão da curva das três amostras, indicando que as alterações no fenótipo das amostras mutantes O55:H7 Δ *ycgR*, O55:H7: Δ *yhjH*, ONT:H25 Δ *ycgR* e ONT:H25 Δ *yhjH* não é decorrente de uma alteração no metabolismo bacteriano. (**Figuras 4 e 5**)

YcgR é uma proteína de ligação que pertence a família de proteínas PilZ. (RYJENKOV *et al.* 2006) A primeira proteína PilZ descrita é a de *Pseudomonas aeruginosa* e é responsável pela síntese de pili, surgindo daí o nome da família dessas proteínas. (ALM, *et al.*, 1996). Por muitos anos os estudos com c-di-GMP foram dedicados em entender como o processo de síntese e degradação deste mensageiro secundário participaria de diversos eventos no metabolismo bacteriano, pouco se sabia dos receptores do c-di-GMP. Em 2006 Amikam e Galperin predizem por bioinformática que uma proteína de domínio PilZ seria a proteína de ligação ao c-di-GMP. Neste mesmo ano, Ryjenkov e colaboradores relatam que *YcgR* participaria da regulação do movimento flagelar através de sua ligação com o c-di-GMP em *E.coli*. Estudos posteriores corroboraram este achado e os trabalhos que se seguiram foram em grande parte dedicados em entender como a interação de YcgR e c-di-GMP altera o movimento flagelar. Estes estudos, entretanto, foram feitos somente em cepas não patogênicas de *E.coli* e todos chegam a conclusão de que a interação do complexo YcgR-c-di-GMP atua na base do flagelo, interferindo na interação das proteínas do estator ou do rotor flagelar, alterando a rotação do flagelo e que essa interação é dependente de c-di-GMP de modo que em altas concentrações há a redução da motilidade bacteriana. (Boehm *et al.*, 2010; Fang, Gomelsky, 2010; Paul *et al.*, 2010). Recentemente, os mecanismos de como as proteínas

efetoras com domínio PilZ que afetam a maquinaria flagelar também foram descritas em *Vibrio cholerae* et al., (PRATT et.al, 2007) *Pseudomonas aeruginosa* (KUCHMA et al., 2015), *Bacillus subtilis* (SUBRAMANIAN et al., 2017) e *Vibrio alginolyticus* (KOJIMA et al., 2019), demonstrando a importância desta classe de proteínas e sua ligação com c-di-GMP no controle da maquinaria flagelar bacteriana.

Após a obtenção dos mutantes e verificação das curvas de crescimento, foi realizado o experimento para análise de motilidade bacteriana. As amostras foram inoculadas em ágar semi- sólido e incubadas à 26°C e 37°C por 7 horas e os halos formados pelo *swimming* das amostras medidos. Os resultados mostram que a deleção de *ycgR* reduz parcialmente motilidade em cerca de 2 vezes nas amostras O55:H7 $\Delta ycgR$ e ONT: H25 $\Delta ycgR$ quando comparado com a amostra selvagem. A deleção do gene *yhjH*, em contrapartida, parece cessar a motilidade nas amostras O55:H7 $\Delta yhjH$ e ONT:H25 $\Delta yhjH$ (**Figuras 6A e B**).

Os resultados observados na deleção de *ycgR* é diferente dos descrito na literatura uma vez que todos os dados disponíveis sugerem que a regulação de *ycgR* ocorre de maneira negativa e o controle da motilidade não parece ser feito somente com o por este gene.

A regulação do movimento flagelar mediado por *ycgR* é feito também com a participação de YhjH. Em mutantes com deleção de *yhjH* a redução da motilidade é suprimida quando também é deletado *ycgR*. Mutantes simples em *ycgR* não apresentam alteração significativa na motilidade (Boehm *et al.*, 2010; Fang, Gomelsky, 2010; Paul *et al.*, 2010) os resultados obtidos neste estudo, entretanto, demonstram que isso não ocorre nas amostra O55:H7 e ONT:H25. É possível, portanto, que em amostra de aEPEC a regulação da motilidade não seja feita somente por *ycgR*, e outros elementos podem estar envolvidos. Por outro lado, a deleção simples de *yhjH* é suficiente para cessar a motilidade (Boehm *et al.*, 2010; Fang, Gomelsky, 2010; Paul *et al.*, 2010). Deste modo, os resultados observados são corroborados pela literatura, demonstrando que, em aEPEC, YhjH participa efetivamente da regulação da motilidade.

C-di-GMP é descrito como uma importante molécula que participa de uma diversidade de vias regulatórias em bactérias, principalmente na formação de biofilme (HENGE, 2009). Diversos estudos destacam a importância de c-di-GMP na transição do estado planctônico para o estado sésil na formação do biofilme uma vez que níveis elevados de c-di-GMP inibem a motilidade e promovem a formação do biofilme (HENGE 2009).

Recentes estudos relatam que amostras de aEPEC são capazes de formar biofilme em superfícies abióticas e bióticas (CULLER et al., 2018; WEISS-MUSZKAT et al., 2010), desde modo, foi avaliada a capacidade de formação de biofilme da através da técnica colorimétrica de cristal violeta em placa de poliestireno para analisar um possível envolvimento de *ycgR* e *yhjH* na formação de biofilme.

Para o ensaio de produção de celulose as amostras foram semeadas em placas de ágar contendo o corante calcofluor que detecta as ligações glicosídicas β -1,4 de moléculas de celulose, permitindo a visualização desta estrutura sob fluorescência a 366nm (ZOGAJ et al., 2001). O ensaio foi realizado nas temperaturas de 26°C e 37°C, por 24 horas e 48 horas. Após o período de incubação foi possível observar que à 26°C a produção de celulose é mais evidenciada após 48 de incubação (**Figura 7 A1**) e a amostra O55:H7 e seus mutantes O55:H7 Δ *ycgR* e O55:H7 Δ *yhjH* produzem mais celulose que a amostra ONT:H25 e os seus respectivos mutantes. Não há diferença visual na intensidade de fluorescência produzida por todas as amostras à 37°C. Nesta temperatura todas amostras são produtoras de celulose (**Figura 7B e 7B1**). Deste modo, não é possível afirmar que as deleções dos genes *ycgR* e *yhjH* alteram este fenótipo. A celulose é composta por unidades de D-glicopiranoose, unidas umas às outras por ligações glicosídicas β -1 \rightarrow 4 (CZAJA et al., 2006) e é sintetizada e excretada por um complexo celulose-sintase inserido na membrana, consistindo de duas subunidades, BcsA e BcsB . BcsA é uma proteína de membrana interna com múltiplos domínios transmembrana e com um domínio citoplasmático 2 glicosiltransferase (WHITNEY; HOWELL, 2013). Assim como *YcgR*, possui um domínio PilZ que quando ligado ao c-di-GMP ativa a produção de celulose (RYJENKOV et al., 2006) esperava-se, portanto, que o aumento nos níveis de c-d-GMP disponível também aumentasse a produção de celulose. (ZORRAQUINO *et.al*, 2013), principalmente nos mutantes O55:H7 Δ *yhjH* e ONT:H25 Δ *yhjH* onde os níveis de c-di-GMP estariam mais elevados.

Outra importante estrutura relacionada com a formação do biofilme é fímbria curli, uma proteína filamentososa, amiloide que possui alto número de folhas beta-pregueadas que permitem a ligação ao corante vermelho congo. Neste ensaio, as amostras que expressam a fímbria crescem com coloração vermelha no ágar em um fenótipo denominado *rdar* (*Red, Dry and Rough*.) Fímbria curli, é considerada o principal componente proteico da matriz extracelular produzidos por bactérias da família Enterobacteriaceae, sendo as principais responsáveis pela adesão à superfícies, agregação celular e formação de biofilme (BARNHART; CHAPMAN, 2006) Em *E.coli* é descrito que está diretamente envolvida na

adesão e formação de biofilme em superfícies abióticas, facilitando as interações iniciais ao substrato e autoagregação celular (COOKSON; COOLEY; WOODWARD, 2002; UHLICH; COOKE; SOLOMON, 2006). A expressão de curli depende de dois operons distintos, *csgABC*, que codifica os componentes estruturais de curli e o operon *csgDEFG*. Os níveis de c-di-GMP regulam positivamente a expressão de curli, estimulando CsgD, regulador global que controla a transcrição de vários genes relacionados com a mudança de estado planctônico para sésil, além de regular o operon *csgABC* e os operons de biossíntese de celulose. (GERSTEL; RÖMLING, 2003). Em trabalho publicado em 2010, Weiss-Muszkat e colaboradores relatam que a fímbria curli parece ser importante na interação de outra cepa de aEPEC O55:H7. A deleção dos genes *csgFG* diminuiu a expressão de curli, reduzindo significativamente a capacidade da cepa de formar o biofilme maduro.

Serra e colaboradores (2013) descrevem a microanatomia das macrocolônias formadas por *E. coli* K12, e afirmam que os altos níveis de curli são necessários para a produção das rugosidades observadas e os resultados observados demonstram que o fenótipo *rdar*, como descrito em literatura é dependente de temperatura, sendo expresso preferencialmente em temperaturas inferiores a 30°C. A coloração avermelhada é um indicativo de presença de fímbrias curli em contrapartida, a coloração esbranquiçada, é um indicativo de não produção de curli.

As **figuras 8 e 9** apresentam os resultados obtidos nos ensaios realizados para a verificação da produção de fímbria curli e evidenciaram a produção de curli nas amostras selvagens e uma produção menor nas amostras mutantes independente da temperatura, porém um resultado mais evidenciado é obtido quando é feita uma incubação à 26°C, enquanto não é possível notar uma diferença significativa quando é feita a incubação à 37°C C. Os resultados obtidos corroboram os resultados constantes da literatura até o momento (RÖMLING, 2005; SERRA; RICHTER; KLAUCK, 2013; WEBER et al., 2006)

As **figuras de 10 e 11** apresentam os resultados obtidos nos ensaios de formação de biofilme em placas de poliestireno com 96 poços com a utilização da técnica de cristal violeta para a quantificação indireta da biomassa presente nos biofilmes formados. Além das diferenças encontradas nos testes realizados com as amostras diferentes, a formação de biofilme encontrada após a obtenção dos mutantes também apresentou resultados resultados consideravelmente diferentes e ficou bastante evidenciado que mesmo amostras que são peretencentes ao mesmo patótipo podem apresentar resultados divergentes. Apesar

do teste de cristal violeta ser muito útil para uma análise inicial comparativa de formação de biofilme e ser muito utilizada na literatura, existe uma grande dificuldade da reprodução dos resultados principalmete, quando realizados em ocasiões difrentes. A mutação do gene *ycgR* em amostras O55:H7 não apresentou resultados similares aos resultados obtidos com as mutações do gene *yhjH*. Provavelmente, esse fenomeno pode ocorrer por causa das características généticas das amostras que possuem diferentes fatores de virulência.

Como a técnica de cristal violeta possui muitas limitações, para uma análise mais elaborada da formação de biofilme, existem outras técnicas que ajudam a elucidar a formação desse fenótipo em amostras bacterianas. Uma das técnicas utilizadas para uma análise quantitativa da formação de biofilme é a técnica de microscopia confocal a laser que permite uma análise microscópica da formação deste fenomeno.(CULLER et al., 2014, 2018) Neste estudo analisamos a formação de biofilme em superfície abiótica como mostram as figuras **12** a **15**. Com esta metodologia, pudemos verificar a diferença de formação de biofilme entre as amostras testadas, com diferenças entre os mutantes e as amostras selvagens e também as diferentes temperaturas e tempos de incubação, corroborando os resultados obtidos nos experimentos anteriores.

A formação de biofilme por essas amostras pode ocorrer também em tecidos (MOREIRA et al., 2006; NASCIMENTO et al., 2014), e no interior do corpo humano. Apesar de não reproduzir exatamente as condições de cultivo celular, a análise da formação de biofilme em células pré fixadas ajuda a compreender melhor o mecanismo de interação bactéria com células epiteliais. A fixação do tecido com um solvente orgânico, como por exemplo metanol permite que seja realizado um teste com maior tempo de duração sem danificar muito as células epiteliais pré fixadas e as amostras bacterianas interagem com os receptores celulares, apesar de um pouco modificados após a fixação. As **figuras 16** e **17** mostram os resultados obtidos com os experimentos realizados com células pré fixadas durante 24 e 48 horas em diferentes temperaturas, 26°C C e 37° C.

As **figuras 18** e **19** apresentam os resultados dos testes de adesão realizados em células HeLa. Através destes testes é possível avaliar o padrão de adesão das amostras estudadas (SCALETSKY; SILVA; TRABULSI, 1984). Com relação às amostras estudadas é possível realizar uma comparação das amostras selvagens e das amostras mutantes. Esse tipo de análise já foi utilizado em diversos estudos para a verificação da influência do gene

neste processo de interação inicial das amostras de *E.coli* com células epiteliais em cultura (BUERIS et al., 2015; SIRCILI et al., 2004; SPERANDIO et al., 1999, 2002).

Através dos resultados obtidos foi possível notar que as amostras mutantes na amostra O55:H7 apresentam um comportamento semelhante às amostras selvagens, porém as amostras mutantes do sorotipo ONT:H25 apresentaram um aumento na adesão. Essas amostras possuem um padrão diferente de adesão com células epiteliais e provavelmente as diferenças encontradas são decorrentes de diferentes mecanismos de adesão.

O teste de FAS permite a análise da formação da lesão attaching and effacing, foi desenvolvido em 1989 por Knutton e colaboradores. Com a coloração da actina é possível visualizar a formação de um pedestal com esta proteína do citoesqueleto próximo do sítio de ligação da bactéria com as células em cultura. Como as amostras do sorotipo ONT: H25 não possuem este padrão de adesão, os teste somente foram realizados com as amostras O55: H7 . Os resultados sugerem que os mutantes *ycgR* e *yhjH* apresentam um pequeno aumento na formação da lesão A/E. Esses resultados sugerem que *ycgR* e *yhjH* podem participar da regulação da lesão A/E. Poucos estudos descritos a literatura associam a participação desses genes na regulação deste tipo de lesão que envolve a participação de sistema de secreção tipo III com proteínas efetoras e envolvimento de mecanismos de sinalização celular e *quorum sensing*. HU e colaboradores (2013) descrevem que a superexpressão de *yhjH* e consequente redução nos níveis de c-di-GMP reduz a capacidade de aderência e os níveis transcricionais de genes do TTSS na amostra de EHEC EDL933(O157:H7). Em trabalho de CLARET e colaboradores(2007), a superexpressão de YcgR foi capaz de aumentar a adesão de LF82, uma cepa de AIEC (*Escherichia coli* aderente invasora). Deste modo, os resultados obtidos são conflitantes ao poucos dados disponíveis até o momento, destacando a importância da compreensão da influência c-di-GMP nos diferentes patótipos de DEC.

Para elucidar os mecanismos de regulação dos genes *ycgR* e *yhjH* na formação de biofilme, foi feita a análise da transcrição através da técnica de PCR em tempo real (qRT-PCR) de alguns genes que anteriormente foram descritos na literatura como importantes genes envolvidos nas etapas de formação desse processo. Com a utilização desta técnica é possível uma avaliação quantitativa da transcrição do gene. Foram escolhidos os genes *bcsA* (envolvido com a produção de celulose), *csgD* (envolvido com a produção de fimbria curli) e *fimA* (envolvido com a produção de fimbria tipo I).

BcsA é uma proteína de membrana interna com múltiplos domínios transmembrana e com um domínio citoplasmático 2 glicosiltransferase (WHITNEY; HOWELL, 2013)

A fímbria Tipo I é uma adesina fimbrial composta de duas unidades, *fimH* e *fimA*, que codifica a maior parte da fímbria (BELOIN; ROUX; GHIGO, 2008). Fímbrias do tipo I estão envolvidas no processo de formação de biofilme, principalmente nos estágios iniciais. (PRATT, KOLTER 1998).

Fímbrias curli são as principais responsáveis pela adesão à superfícies, agregação celular e formação de biofilme. A expressão de curli depende de dois operons distintos, *csgABC*, que codificam os componentes estruturais de curli e o operon *csgDEFG*, onde CsgD é o regulador global que controla a transcrição de vários genes relacionados com a mudança de estado planctônico para sésil, além de regular o operon *CsgABC* e os operons de biossíntese de celulose. CsgD também estimula a transcrição de *AdrA*, uma DGC que ativa a produção de celulose em nível pós-transcricional e que cuja superexpressão aumenta a formação do biofilme maduro (GERSTEL; RÖMLING, 2003)

Fímbria curli parece ser importante na interação de outra cepa de aEPEC O55:H7 estudada por Weiss-Muszkat (2010). A deleção dos genes *csgFG* diminuiu a expressão de curli, reduzindo significativamente a capacidade da cepa de formar o biofilme maduro.

Os resultados das análises de qRT-PCR apresentados na figura 21 sugerem que a transcrição dos genes estudados tem um comportamento diferente em cada uma das amostras estudadas e apesar de num primeiro momento parecerem um tanto contraditórios quando analisados em conjunto com os teste de formação de biofilme, eles sugerem que os genes *ycgR* e *yhjH* participam da regulação da transcrição de *bcsA*, *fimA* e *csgD* de formas distintas e que existe a possibilidade uma regulação pós transcricional atuar na regulação destes genes e proporcionar as diferenças encontradas nos teste fenotípicos.

A **figura 22** apresenta os resultados obtidos na análise de transcrição de *ler* que funciona como regulador global da região LEE e regula os genes que são responsáveis pela formação da lesão A/E. Os resultados obtidos corroboram os resultados obtidos nos testes de FAS da figura 20, já que os mutantes apresentam mais lesão A/E que as amostras selvagens e como a transcrição de *ler* está aumentada nas amostras mutantes esse fenótipo pode ocorrer pela participação dos genes *ycgR* e *yhjH* na regulação do genes envolvidos nesta ilha de patogenicidade.

A regulação dos fatores de virulência de amostras aEPEC, incluindo os genes responsáveis pela adesão e formação de biofilme é multifatorial, com a participação de diversas moléculas e mecanismos de sinalização intracelular (FRANZIN; SIRCILI, 2015). A descrição de novas moléculas e proteínas que participam desses fenômenos ainda está em fase de desenvolvimento e a cada ano surgem novos estudos que fazem associações entre fenótipos e características genéticas, incluindo mecanismos de regulação gênica. Nosso desafio é tentar elucidar as funções de genes e moléculas que já foram descritas e também daquelas que ainda serão descritas sem deixar de pensar que mesmo genes que possuem funções definidas até o momento podem de alguma maneira exercer influência na regulação de fenótipos distintos daqueles que foram descritos até o momento. Pensando dessa maneira, este trabalho demonstrou que genes que inicialmente estavam associados apenas a regulação do motor flagelar podem participar da regulação de passos iniciais da interação entre bactéria e hospedeiro e também da decisão da bactéria entre vida livre ou formação de biofilme.

6. CONCLUSÕES

- Assim como em amostras de *E.coli* não patogênicas, os genes *ycgR* e *yhjH* estão envolvidos na motilidade das amostras de aEPEC O55:H7 e ONT:H25.
- Embora as O55:H7 e ONT: H25 façam parte de aEPEC, os fenótipos de formação de biofilme, celulose e produção de fímbria curli são distintos entre si. Este fato pode ser devido a grande heterogenidade gênica que aEPEC apresenta.
- c-di- GMP parece estar envolvido na regulação da lesão A/E na amostra O55:H7, como observado no ensaio de FAS, corroborado pela transcrição de *ler*.

7. REFERÊNCIAS¹

- ABE, C. M. et al. Virulence features of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* identified by the eae(+) EAF-negative stx(-) genetic profile. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 64, n. 4, p. 357–65, ago. 2009.
- AFSET, J. E. et al. Association of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with prolonged diarrhoea. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, n. 11, p. 1137–1144, 2004.
- ALM, R. A. et al. Identification of a novel gene, pilZ, essential for type 4 fimbrial biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. Identification of a Novel Gene, pilZ, Essential for Type 4 Fimbrial Biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. v. 178, n. 1, 1996.
- AMIKAM, D.; GALPERIN, M. Y. Sequence analysis PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. v. 22, n. 1, p. 3–6, 2006.
- ARAÚJO, J. M. et al. Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 10, p. 3396–9, out. 2007.
- BALDY-CHUDZIK, K.; STOSIK, M. Diversity of fliC gene in commensal *Escherichia coli* derived from various mammals. **Folia Microbiologica**, v. 52, n. 3, p. 261–272, 2007.
- BARNHART, M. M.; CHAPMAN, M. R. Curli Biogenesis and Function. **Annual Review of Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 131–147, 2006.
- BELOIN, C.; ROUX, A.; GHIGO, J. HAL Archives Ouvertes – France Author Manuscript *Escherichia coli* biofilms HAL-AO Author Manuscript. 2008.
- BERTIN, P. et al. The H-NS protein is involved in the biogenesis of flagella in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 17, p. 5537–5540, 1994.
- BOEHM, A. et al. Second messenger-mediated adjustment of bacterial swimming velocity. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 107–16, 2 abr. 2010.
- BOYD, C. D.; O'TOOLE, G. A. Second messenger regulation of biofilm formation: breakthroughs in understanding c-di-GMP effector systems. **Annual review of cell and**

¹De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 14724: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2011.

developmental biology, v. 28, p. 439–62, jan. 2012.

BUERIS, V. et al. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 7, p. 839–44, nov. 2007.

BUERIS, V. et al. Late Establishment of the Attaching and Effacing Lesion Caused by Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Depends on Protein Expression Regulated by Per. v. 83, n. 1, p. 379–388, 2015.

CAMILI, A.; BASSLER, B. L. REVIEW Bacterial Small-Molecule Signaling Pathways. v. 311, n. February, p. 1113–1116, 2006.

CHRISTEN, B. et al. Allosteric control of cyclic di-GMP signaling. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 42, p. 32015–24, 20 out. 2006.

CHRISTEN, M. et al. DgrA is a member of a new family of cyclic diguanosine monophosphate receptors and controls flagellar motor function in *Caulobacter crescentus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 10, p. 4112–4117, 2007.

CHRISTENSEN, G. D. et al. Jcm00113-0126. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 22, n. 6, p. 996–1006, 1985.

CLARET, L. et al. The flagellar sigma factor FliA regulates adhesion and invasion of Crohn disease-associated *Escherichia coli* via a cyclic dimeric GMP-dependent pathway. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 46, p. 33275–83, 16 nov. 2007.

CLEARY, J. et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: Role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. **Microbiology**, v. 150, n. 3, p. 527–538, 2004.

COOKSON, A. L.; COOLEY, W. A.; WOODWARD, M. J. The role of type 1 and curli fimbriae of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in adherence to abiotic surfaces. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 292, n. 3–4, p. 195–205, 2002.

COSTERTON, J. W. Introduction to biofilm. **International journal of antimicrobial agents**, v. 11, n. 3–4, p. 217–21; discussion 237-9, maio 1999.

CRAVIOTO, A. et al. Association of *Escherichia coli* HEP-2 adherence patterns with type

and duration of diarrhoea. **The Lancet**, v. 337, n. 8736, p. 262–264, 1991.

CROXEN, M. A. et al. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. v. 26, n. 4, p. 822–880, 2013.

CULLER, H. F. et al. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains form biofilm on abiotic surfaces regardless of their adherence pattern on cultured epithelial cells. **BioMed research international**, v. 2014, p. 845147, jan. 2014.

CULLER, H. F. et al. Role of SdiA on biofilm formation by atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Genes**, v. 9, n. 5, 2018.

CZAJA, W. et al. Microbial cellulose - The natural power to heal wounds. **Biomaterials**, v. 27, n. 2, p. 145–151, 2006.

DATSENKO, K. A; WANNER, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 12, p. 6640–5, 6 jun. 2000.

DAVEY, M. E.; GEORGE, A. O.; TOOLE, G. A. O. Microbial Biofilms : from Ecology to Molecular Genetics *Microbial Biofilms : from Ecology to Molecular Genetics*. v. 64, n. 4, 2000.

DONATO, G. M.; KAWULA, T. H. Rotor Protein FliG Causes Increased Flagellar Rotational Speed and Hypermotility in *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 37, p. 24030–24036, 1998.

DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging infectious diseases**, v. 8, n. 9, p. 881–90, set. 2002.

DULGUER, M. V. et al. Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains: Phenotypic and Genetic Profiling Reveals a Strong Association between Enteroaggregative *E. coli* Heat-Stable Enterotoxin and Diarrhea . **The Journal of Infectious Diseases**, v. 188, n. 11, p. 1685–1694, 2003.

ELLIOTT, S. J. et al. The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infection and immunity**, v. 68, n. 11, p. 6115–26, nov. 2000.

- FANG, X.; GOMELSKY, M. A post-translational, c-di-GMP-dependent mechanism regulating flagellar motility. **Molecular microbiology**, v. 76, n. 5, p. 1295–305, 1 jun. 2010.
- FLEMMING, H.-C.; NEU, T. R.; WOZNIAK, D. J. The EPS matrix: the “house of biofilm cells”. **Journal of bacteriology**, v. 189, n. 22, p. 7945–7, nov. 2007.
- FRANZIN, F. M.; SIRCILI, M. P. Locus of Enterocyte Effacement: A Pathogenicity Island Involved in the Virulence of Enteropathogenic and Enterohemorrhagic Escherichia coli Subjected to a Complex Network of Gene Regulation . **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–10, 2015.
- GARRETT, T. R.; BHAKOO, M.; ZHANG, Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. **Progress in Natural Science**, v. 18, n. 9, p. 1049–1056, set. 2008.
- GERSTEL, U.; RÖMLING, U. The csgD promoter, a control unit for biofilm formation in Salmonella typhimurium. **Research in microbiology**, v. 154, n. 10, p. 659–67, dez. 2003.
- GIRÔN, J. A.; HO, A. S. Y.; SCHOOLNIK, G. K. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic Escherichia coli. **Science**, v. 254, n. 5032, p. 710–713, 1991.
- GOMES, T. A. T. et al. Escherichia coli Strains ? v. 10, n. 10, 2004.
- HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature reviews. Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 95–108, fev. 2004.
- HENGGE, R. Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. **Nature reviews. Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 263–73, abr. 2009.
- HERNANDES, R. T. et al. An overview of atypical enteropathogenic Escherichia coli. **FEMS microbiology letters**, v. 297, n. 2, p. 137–49, ago. 2009.
- HU, J. et al. c-di-GMP signaling regulates E . coli O157 : H7 adhesion to colonic epithelium. **Veterinary Microbiology**, v. 164, n. 3–4, p. 344–351, 2013.
- ITO, A. et al. Increased antibiotic resistance of Escherichia coli in mature biofilms. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 12, p. 4093–100, jun. 2009.
- KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic Escherichia coli. **Nature reviews. Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123–40, fev. 2004.

KNUTTON, S. et al. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: Basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 4, p. 1290–1298, 1989.

KO, M.; PARK, C. Two novel flagellar components and H-NS are involved in the motor function of Escherichia coli. **Journal of molecular biology**, v. 303, n. 3, p. 371–82, 27 out. 2000.

KOJIMA, S. et al. Effect of PlzD, a YcgR homologue of c-di-GMP-binding protein, on polar flagellar motility in *Vibrio alginolyticus*. **The Journal of Biochemistry**, 2019.

KUCHMA, S. L. et al. Cyclic Di-GMP-Mediated Repression of Swarming Motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14 Requires the MotAB Stator. **Journal of Bacteriology**, v. 197, n. 3, p. 420–430, 2015.

KULASEKARA, B. R. et al. Asymmetrical Distribution of the Second Messenger c-di-GMP upon Bacterial Cell Division. **Science**, v. 328, n. 5983, p. 1295–1297, 2010.

KUMAR, C. G.; ANAND, S. K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International journal of food microbiology**, v. 42, n. 1–2, p. 9–27, 30 jun. 1998.

LANATA, C. F. et al. Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: a systematic review. **PloS one**, v. 8, n. 9, p. e72788, jan. 2013.

LOZER, D. M. et al. Genotypic and phenotypic analysis of diarrheagenic Escherichia coli strains isolated from Brazilian children living in low socioeconomic level communities. **BMC infectious diseases**, v. 13, p. 418, jan. 2013.

MACNAB, R. M. Genetics and biogenesis of bacterial flagella. **Annual review of genetics**, v. 26, p. 131–58, jan. 1992.

MCDUGALD, D. et al. Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. **Nature reviews. Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 39–50, jan. 2012.

MELLIES, J. L. et al. The Per regulon of enteropathogenic Escherichia coli : identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler). v. 33, p. 296–306, 1999.

MELLIES, J. L.; BARRON, A. M. S.; CARMONA, A. M. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence gene regulation. **Infection and immunity**, v. 75, n. 9, p. 4199–210, set. 2007.

MILLS, E. et al. The bacterial second messenger c-di-GMP: mechanisms of signalling. **Cellular microbiology**, v. 13, n. 8, p. 1122–9, ago. 2011.

MOON, H. W. et al. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. **Infection and immunity**, v. 41, n. 3, p. 1340–51, set. 1983.

MOREIRA, C. G. et al. Bundle-forming pili and EspA are involved in biofilm formation by enteropathogenic *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, v. 188, n. 11, p. 3952–61, jun. 2006.

NASCIMENTO, H. H. et al. Phenotypic and genotypic characteristics associated with biofilm formation in clinical isolates of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) strains. **BMC microbiology**, v. 14, n. 1, p. 184, jan. 2014.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 1, p. 142–201, jan. 1998.

NGUYEN, R. N.; TAYLOR, L. S. Atypical Enteropathogenic. v. 12, n. 4, p. 597–603, 2006.

OCHOA, T. J. et al. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n. 9, p. 852–856, 2008.

OCHOA, T. J.; CONTRERAS, C. A. Enteropathogenic *Escherichia coli* infection in children. **Current opinion in infectious diseases**, v. 24, n. 5, p. 478–83, out. 2011.

PAUL, K. et al. The c-di-GMP binding protein YcgR controls flagellar motor direction and speed to affect chemotaxis by a “backstop brake” mechanism. **Molecular cell**, v. 38, n. 1, p. 128–39, 9 abr. 2010.

PFIFFER, V. et al. Genetic dissection of *Escherichia coli*'s master diguanylate cyclase DgcE: Role of the N-terminal MASE1 domain and direct signal input from a GTPase partner system. **PLOS Genetics**, v. 15, n. 4, p. e1008059, 2019.

- PRATT, J. T. et al. PilZ domain proteins bind cyclic diguanylate and regulate diverse processes in *Vibrio cholerae*. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 17, p. 12860–70, 27 abr. 2007.
- PRATT, L. A; KOLTER, R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. **Molecular microbiology**, v. 30, n. 2, p. 285–93, out. 1998.
- REINDERS, A. et al. Expression and Genetic Activation of Cyclic Di-GMP-Specific Phosphodiesterases in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 198, n. 3, p. 448–462, 2016.
- ROBINS-BROWNE, R. M. et al. *Escherichia coli* and community-acquired gastroenteritis, Melbourne, Australia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 10, p. 1797–1805, 2004.
- RÖMLING, U. Cellular and Molecular Life Sciences Characterization of the rdar morphotype, a multicellular behaviour in Enterobacteriaceae. v. 62, p. 1234–1246, 2005.
- RÖMLING, U.; GALPERIN, M. Y.; GOMELSKY, M. Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 77, n. 1, p. 1–52, mar. 2013.
- ROSS, P. et al. Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. **Nature**, v. 325, n. 6101, p. 279–281, 2003.
- RYJENKOV, D. A et al. Cyclic diguanylate is a ubiquitous signaling molecule in bacteria: insights into biochemistry of the GGDEF protein domain. **Journal of bacteriology**, v. 187, n. 5, p. 1792–8, mar. 2005.
- RYJENKOV, D. A et al. The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP: the PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 41, p. 30310–4, 13 out. 2006.
- SCALETISKY, I. C. et al. A localized adherence-like pattern as a second pattern of adherence of classic enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells that is associated with infantile diarrhea. **Infection and immunity**, v. 67, n. 7, p. 3410–5, jul. 1999.
- SCALETISKY, I. C.; SILVA, M. L.; TRABULSI, L. R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infection and immunity**, v. 45, n. 2, p. 534–

6, ago. 1984.

SCHIRMER, T.; JENAL, U. Structural and mechanistic determinants of c-di-GMP signalling. **Nature reviews. Microbiology**, v. 7, n. 10, p. 724–35, out. 2009.

SERRA, D. O. et al. Microanatomy at cellular resolution and spatial order of physiological differentiation in a bacterial biofilm. **mBio**, v. 4, n. 2, p. e00103-13, jan. 2013.

SERRA, D. O.; RICHTER, A. M.; KLAUCK, G. Microanatomy at Cellular Resolution and Spatial Order of. **mBio**, v. 4, n. 2, p. 1–12, 2013.

SHEIKH, J. et al. Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 983–997, 2001.

SIRCILI, M. P. et al. Modulation of Enteropathogenic *Escherichia coli* Virulence by Quorum Sensing. v. 72, n. 4, p. 2329–2337, 2004.

SPERANDIO, V. et al. Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 26, p. 15196–201, 1999.

SPERANDIO, V. et al. Quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QseBC): a novel two-component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by. **Wiley Online Library**, v. 43, p. 809–821, 2002.

STANKOWSKA, D. et al. Influence of quorum sensing signal molecules on biofilm formation in *Proteus mirabilis* O18. **Folia microbiologica**, v. 57, n. 1, p. 53–60, jan. 2012.

STOODLEY, P. et al. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual review of microbiology**, v. 56, p. 187–209, jan. 2002.

SUBRAMANIAN, S. et al. MotI (DgrA) acts as a molecular clutch on the flagellar stator protein MotA in *Bacillus subtilis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 51, p. 13537–13542, 2017.

TERASHIMA, H.; KOJIMA, S.; HOMMA, M. **Chapter 2 Flagellar Motility in Bacteria**. [s.l.] Elsevier Inc., 2009. v. 270

TOBE, T. et al. Complete DNA sequence and structural analysis of the enteropathogenic

Escherichia coli adherence factor plasmid. **Infection and immunity**, v. 67, n. 10, p. 5455–62, out. 1999.

TOOLE, G. O.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. B f m d. p. 49–79, 2000.

TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; GOMES, T. A. T. Typical and Atypical Enteropathogenic Escherichia coli. v. 8, n. 5, p. 508–513, 2002.

TRULEAR, M. G.; CHARACKLIS, W. G.; TRULEAR, G. Dynamics of biofilm processes. v. 54, n. 9, p. 1288–1301, 2014.

UHLICH, G. A.; COOKE, P. H.; SOLOMON, E. B. Analyses of the Red-Dry-Rough Phenotype of an. **Microscopy**, v. 72, n. 4, p. 2564–2572, 2006.

VAN HOUDT, R.; MICHIELS, C. W. Role of bacterial cell surface structures in Escherichia coli biofilm formation. **Research in microbiology**, v. 156, n. 5–6, p. 626–33, 2005.

VIEIRA, M. A et al. Phenotypic and genotypic characteristics of Escherichia coli strains of non-enteropathogenic E. coli (EPEC) serogroups that carry EAE and lack the EPEC adherence factor and Shiga toxin DNA probe sequences. **The Journal of infectious diseases**, v. 183, n. 5, p. 762–72, 1 mar. 2001.

WEBER, H. et al. Cyclic-di-GMP-mediated signalling within the sigma network of Escherichia coli. **Molecular microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1014–34, nov. 2006.

WEISS-MUSZKAT, M. et al. Biofilm formation by and multicellular behavior of Escherichia coli O55:H7, an atypical enteropathogenic strain. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 5, p. 1545–54, mar. 2010a.

WEISS-MUSZKAT, M. et al. Biofilm formation by and multicellular behavior of Escherichia coli O55:H7, an atypical enteropathogenic strain. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 5, p. 1545–54, mar. 2010b.

WHITNEY, J. C.; HOWELL, P. L. Synthase-dependent exopolysaccharide secretion in Gram-negative bacteria. **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 2, p. 63–72, 2013.

WONG, A. R. C. et al. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic Escherichia coli: even more subversive elements. **Molecular microbiology**, v. 80, n. 6, p. 1420–38, jun. 2011.

YATSUYANAGI, J. et al. Characterization of atypical enteropathogenic Escherichia coli

strains harboring the *astA* gene that were associated with a waterborne outbreak of diarrhea in Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 2033–2039, 2003.

ZOGAJ, X. et al. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. **Molecular Microbiology**, v. 39, n. 6, p. 1452–1463, 2001.