



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**CARACTERIZAÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA DE  
*Escherichia coli* DE ADESÃO DIFUSA (DAEC)**

**MARINA HECKMANN BOVE**

**Orientadora: Prof. Dra. Cynthia Maria Kyaw**

**Brasília, março de 2010**

**MARINA HECKMANN BOVE**

**CARACTERIZAÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA DE  
*Escherichia coli* DE ADESÃO DIFUSA (DAEC)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular.

**Orientadora: Profa. Dra. Cynthia Maria Kyaw**

**Brasília, março de 2010**

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Microbiologia e no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, com o apoio financeiro do CNPq.

Dedico este trabalho

ao meu avô Miguel (*in memoriam*), que  
certamente está orgulhoso de mim.



## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, um MUITO obrigada à minha querida “chefa” pela oportunidade e pela orientação. Não tenho palavras para agradecer por todos esses anos de ensinamento! Mais que microbiologia e biologia molecular, você me ensinou sobre respeito, humildade, ética, caráter, perseverança e criatividade. Você é meu exemplo de educadora. Obrigada por todo o carinho, por sua confiança e paciência infinita, pela amizade, pelas risadas e pelas inúmeras vezes em que foi, além de orientadora, companheira de bancada.

Aos meus pais, pelo amor, incentivo e apoio incondicional. Obrigada pela infância no mato, que me transformou em amante da biologia enquanto eu ainda usava fraldas. Obrigada por me deixarem pisar descalça na grama, correr entre as melancias, alimentar o veado campeiro, subir em árvores, comer amora do pé, resgatar mico-estrela e amar os cachorros. Um muito obrigada aos meus irmãos, que fizeram tudo (ou quase tudo) isso comigo.

Às minhas queridas avós, meus grandes exemplos de mulheres batalhadoras! Minha admiração por vocês é incomensurável.

Ao meu amado avô Miguel (*in memoriam*), a maior prova de que a educação pode transformar profundamente a vida de uma pessoa e de todos à sua volta. Obrigada por ter sempre acreditado em mim, incentivado meus estudos e financiado muitos dos meus sonhos.

Ao Fabio, por tanto amor, carinho e companheirismo ao longo desses quatro anos. Obrigada pela dedicação, ajuda e paciência de Jó nessa reta final! Te amo!

À tia Patrícia, por adorar ouvir minhas histórias sobre bactérias incríveis.

Aos meus queridos amigos e companheiros de bancada Gustavo, Márcio, Elisa e Adryelle, por tantas idéias, sugestões, risadas e pelas milhares de vezes em que me compraram com chocolate durante a TPM. MUITÍSSIMO obrigada pela imensa ajuda nos meus experimentos sempre que precisei! Sem vocês o caminho até aqui teria sido bem mais árduo.

Aos alunos, professores, estagiários e técnicos da Micro, em especial aos colegas Alex, Heidi, Rosane, Ricardo, Liliam, Maria Inês e aos professores Loreny, César, Beatriz e Marlene, por terem sido sempre tão solícitos. Obrigada pelas contribuições e gentilezas, que tornaram meu trabalho possível e agradável.

Aos Sucupira Pedroza, por terem me recebido com enorme carinho em sua família e pelas centenas de almoços que adiantaram meus experimentos.

Aos colegas da BioMol por tantos empréstimos, doações e auxílios teóricos e técnicos. Sem sua ajuda certamente não teria chegado onde cheguei. Um muito obrigada especial aos professores Ildinete, Andréa e Marcelo, pelas sugestões e críticas que contribuíram imensamente para a minha aprendizagem, e aos colegas do Lab 4 Thiago, Eveline, Lorena e Marciano, que salvaram minha vida inúmeras vezes com seus favores, doações e ensinamentos.

Ao Marcus Teixeira, pelo precioso tempo que dedicou a me ajudar com os sequenciamentos e as árvores filogenéticas. Não tenho palavras para agradecer!

Aos pesquisadores Dr. Luciano Paulino da Silva e Dra. Ana Claudia Guerra Araujo (Cenargen) e Profa. Dra. Sônia Nair Bão (UnB) por terem gentilmente cedido o microscópio de força atômica, o microscópio eletrônico de varredura e o microscópio eletrônico de transmissão. À Ana Cristina Meneses Mendes Gomes, à Débora de Oliveira Cintra e Silva e ao Dr. Luciano Paulino da Silva, pelas imagens de microscopia utilizadas neste trabalho.

À Ana, por todas as informações e pela ajuda durante esses dois anos.

Aos dez mais, Antônio, Ayeska, Babi, Beto, Bruno, Catilanga, Daya, Elisa, Jaca e Ju, por infinitas risadas, discussões bio-filosóficas, tardes/manhãs/noites de estudo, viagens, abraços, conselhos, elogios e ensinamentos ao longo desses sete anos.

Aos queridos amigos de Goiânia Erika, Éricka, Fran, Luciana, Luciano e Thaísa, que mesmo longe estão sempre tão perto.

Às queridas companheiras de apartamento Aninha, Ingrid, Bruna, Isabel e Camila, por tantos bons momentos.

À eterna professora Carla, a quem devo muito do que sei sobre biologia e cuja voz ecoa em minha mente mesmo depois de tanto tempo. Era verdade!

“Não podemos compreender a maravilhosa complexidade de um ser orgânico (...). Cada ser vivo deve ser considerado um microcosmo - um pequeno universo formado por uma multidão de organismos que se autopropagam, inconcebivelmente diminutos e tão numerosos quanto as estrelas no céu.”

Charles Darwin, 1882.

## ÍNDICE

<b>Lista de abreviaturas</b>	<b>xii</b>
<b>Lista de figuras</b>	<b>xv</b>
<b>Lista de tabelas</b>	<b>xix</b>
<b>Resumo</b>	<b>xxi</b>
<b>Abstract</b>	<b>xxii</b>
<b>Introdução</b>	<b>1</b>
1. <i>Escherichia coli</i> diarreioagênicas	1
1.1. <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênicas (ETEC)	3
1.2. <i>Escherichia coli</i> enteroagregativas (EAEC)	3
1.3. <i>Escherichia coli</i> enteroinvasivas (EIEC)	3
1.4. <i>Escherichia coli</i> enteropatogênicas (EPEC)	4
1.5. <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágicas (EHEC)	4
1.6. <i>Escherichia coli</i> de adesão difusa (DAEC)	5
2. As <i>Escherichia coli</i> de adesão difusa (DAEC)	5
2.1. Epidemiologia	5
2.2. Adesinas Afa/Dr	6
2.3. Patogenicidade	7
3. Ilhas de patogenicidade	9
4. A ilha de patogenicidade LEE ( <i>locus of enterocyte effacement</i> )	11
5. O Sistema de Secreção do Tipo Três (TTSS)	13
6. A regulação da expressão dos genes do TTSS	19
7. Os genes LEE como indicadores de virulência	19
<b>Objetivos</b>	<b>21</b>
<b>Materiais e Métodos</b>	<b>22</b>
1. Linhagens bacterianas	22
1.1. Linhagens de <i>Escherichia coli</i> de adesão difusa	22
1.2. Linhagens controle	22
1.3. Linhagens transformantes	23
2. Plasmídeos	23
3. Meios de cultura	24
4. Soluções	25
4.1. Soluções de uso geral	25
4.2. Soluções para a extração de DNA total	25
4.3. Soluções para a extração e precipitação de RNA	26
4.4. Soluções para eletroforese em gel de agarose	26

4.5. Solução de dietilpirocarbonato	28
4.6. Antibióticos e soluções utilizadas na seleção de clones transformantes	28
4.7. Soluções para os testes de adesão e de infecção de células HeLa	28
4.8. Soluções para a Microscopia Eletrônica de Varredura	30
5. Enzimas	31
6. Marcadores de massa molecular (MM)	31
7. Kits utilizados	32
8. Manutenção da linhagens bacterianas	32
9. Extração de DNA para a realização de experimentos de PCR	33
9.1. Cultivo das linhagens bacterianas	33
9.2. Extração de DNA total	33
9.3. Extração de DNA plasmidial	34
10. Extração de RNA	35
10.1. Cultivo das linhagens bacterianas e indução da expressão dos genes TTSS	35
10.2. Extração	35
10.3. Tratamento dos RNAs extraídos com DNase I	35
11. Ensaio de PCR para a amplificação de prováveis genes TTSS de DAEC	36
12. PCR dos DNAs plasmidiais extraídos com os iniciadores Universal e Reverso	38
13. Transcrição reversa dos RNAs extraídos e PCRs empregando o cDNA gerado	39
13.1. Síntese da fita de cDNA	39
13.2. Ensaio de PCR para amplificação do cDNA produzido por RT-PCR	40
14. Análise dos produtos de PCR e das amostras extraídas de DNA total, RNA e DNA plasmidial por eletroforese em gel de agarose	40
15. Clonagem dos produtos amplificados por PCR no vetor pGEM <sup>®</sup> -T Easy	40
16. Transformação de <i>Escherichia coli</i> por choque térmico	41
16.1. Transformação de <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ <sup>™</sup>	41
16.2. Transformação de <i>Escherichia coli</i> XL-10 Gold <sup>™</sup>	41
17. Sequenciamento automático dos produtos obtidos por PCR utilizando como molde DNA total ou DNA plasmidial extraído dos clones transformados	41
18. Análises filogenéticas	42
19. Microscopia Eletrônica	43
19.1. Cultivo das linhagens bacterianas para Microscopia Eletrônica	43
19.2. Teste de adesão de células HeLa em meio abiótico	44
19.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	45
A. Infecção de células HeLa	45
B. Purificação dos filamentos de EspA	46
C. Processamento das amostras e análise ao microscópio	46
19.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	46

A. Infecção de células HeLa	46
B. Processamento das amostras e análise ao microscópio	47
20. Microscopia de Força Atômica	47
20.1. Cultivo das linhagens bacterianas	47
20.2. Preparação das amostras	48
20.3. Análise ao microscópio de força atômica	48
<b>Resultados e Discussão</b>	<b>49</b>
1. Detecção de prováveis genes TTSS de DAEC	49
1.1. Definição dos genes a serem amplificados	49
1.2. Síntese dos iniciadores	50
1.3. Identificação e caracterização do provável gene <i>escD</i> de DAEC	51
1.4. Identificação e caracterização de prováveis genes <i>espA</i> de DAEC	53
1.4.1. Provável <i>espA</i> do isolado C39	55
1.4.2. Provável <i>espA</i> do isolado C40	56
1.4.3. Provável <i>espA</i> do isolado C74	57
1.5. Identificação e caracterização de prováveis genes <i>espD</i> de DAEC	62
1.5.1. Provável <i>espD</i> do isolado C39	65
1.5.2. Provável <i>espD</i> do isolado C40	65
1.6. Identificação e caracterização de prováveis genes <i>espB</i> de DAEC	68
1.6.1. Provável <i>espB</i> do isolado C39	70
1.6.2. Provável <i>espB</i> do isolado C74	71
1.7. Identificação e caracterização de prováveis genes <i>cesD2</i> de DAEC	74
1.7.1. Provável <i>cesD2</i> do isolado C39	74
1.7.2. Provável <i>cesD2</i> do isolado C74	75
1.8. Identificação e caracterização de prováveis genes <i>escF</i> de DAEC	76
1.8.1. Provável <i>escF</i> do isolado C39	78
1.8.2. Provável <i>escF</i> do isolado C74	79
1.9. Identificação e caracterização de um provável gene <i>cesA2</i> de DAEC	81
1.10. Investigação da região entre os prováveis <i>sepQ</i> e <i>escD</i> de DAEC – busca pelos possíveis efetores de DAEC	82
1.11. Análise comparativa das identidades entre os prováveis genes TTSS identificados em DAEC e os homólogos depositados no GenBank	84
2. Construção de árvores filogenéticas empregando as sequências dos prováveis genes TTSS de DAEC	86
2.1. Árvore filogenética com o provável <i>escD</i> da DAEC C39	86
2.2. Árvore filogenética com o provável <i>espA</i> das DAEC C39, C40 e C74	87
2.3. Árvores filogenéticas com os prováveis <i>espD</i> da DAEC C39 e <i>espB</i> das DAEC C39 e C74	88

2.4. Árvore filogenética com os prováveis <i>escF</i> das DAEC C39 e C74	90
2.5. Árvores filogenéticas com os prováveis <i>cesD2</i> e <i>cesA2</i> da DAEC C39	91
2.6. Árvore filogenética consenso, com os prováveis genes TTSS das DAEC C39, C40 e C74	92
3. Análise da expressão dos prováveis genes TTSS de DAEC por meio de experimentos de transcrição reversa	93
3.1. Análise da expressão dos prováveis genes TTSS de DAEC sob condições de indução	93
3.2. Análise da expressão dos prováveis genes TTSS de DAEC na ausência de condições de indução	99
4. Análise da montagem do suposto complexo-agulha de DAEC por microscopia eletrônica e microscopia de força atômica	100
4.1. Busca por aparatos de secreção do tipo três na superfície de DAEC por meio de microscopia eletrônica de varredura	101
4.2. Busca por aparatos de secreção do tipo três na superfície de DAEC por meio de microscopia eletrônica de transmissão	103
4.3. Busca por aparatos de secreção do tipo três na superfície de DAEC por meio de microscopia de força atômica	105
<b>Conclusões</b>	<b>107</b>
<b>Perspectivas</b>	<b>108</b>
<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>109</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

- °C - Graus Celsius
- µg - Micrograma
- µL - Microlitro
- µM - Micromolar
- µm - Micrômetro
- ηg - Nanograma
- ηm - Nanômetro
- λ - Comprimento de onda
- A/E - Do inglês attaching and effacing
- AA - Adesão agregativa
- AAF - Do inglês aggregative adherence fimbriae
- Abs<sub>660</sub> - Absorbância a 660 ηm
- atm - Atmosfera
- BFP - Do inglês bundle-forming pilus
- CEACAM - Do inglês carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule
- CF - Fator de colonização fimbrial (do inglês *colonization factor*)
- CFA - Do inglês colonization factor antigen
- DAEC - *Escherichia coli* de adesão difusa
- DAF - Do inglês decay-accelerating factor
- DEPC - Dietilpirocarbonato
- DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium
- DNA - Ácido desoxirribonucléico
- DR - Repetição direta (do inglês *direct repeat*)
- cDNA - DNA complementar
- dNTP - Desoxinucleotídeos 5'-trifosfato
- EAEC - *Escherichia coli* enteroagregativa
- EAF - Do inglês EPEC *adherence factor*
- EAST1 - Do inglês enteroaggregative E. coli ST1
- EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético
- EHEC - *Escherichia coli* enterohemorrágica
- EIEC - *Escherichia coli* enteroinvasiva
- EPEC - *Escherichia coli* enteropatogênica
- ETEC - *Escherichia coli* enterotoxigênica
- g - Força gravitacional
- HC - Colite hemorrágica
- HM - High DNA Mass Ladder
- HUS - Síndrome urêmica hemolítica



Hz - Hertz  
IPTG - Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo  
IS - Sequencia de inserção (do inglês *insertion sequence*)  
kb - Kilobases  
kV - Kilovolts  
kHz - KiloHertz  
L - Litro  
LA - Meio de cultura Luria Bertani ágar  
LB - Meio de cultura Luria Bertani  
LEE - Do inglês locus of enterocyte effacement  
LT - Enterotoxina termolábil (do inglês *heat-labile enterotoxin*)  
M - Molar  
mL - Mililitro  
MM - Marcador de massa molecular  
mM - Milimolar  
NC - Complexo-agulha (do inglês *needle complex*)  
*orf* - Quadro de leitura aberta (do inglês *open reading frame*)  
p/v - Peso/volume  
P.A. - Pureza absoluta  
PAI - Ilha de patogenicidade (do inglês *pathogenicity island*)  
pb - Pares de bases  
PBS - Solução salina fosfato tamponada  
PCR - Reação de polimerização em cadeia (do inglês *Polymerase Chain Reaction*)  
pH - Potencial hidrogeniônico  
PMNL - Leucócitos polimorfonucleares  
RNA - Ácido ribonucléico  
tRNA - RNA de transferência  
RNase - Ribonuclease  
rpm - Rotações por minuto  
RT - Transcrição reversa (do inglês *reverse transcription*)  
ShET1 - Do inglês Shigella enterotoxin 1  
ST - Enterotoxina termoestável (do inglês *heat-stable enterotoxin*)  
Stx - Toxina Shiga  
STEC - *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga  
Tris - Trihidroximetilaminometano  
TTSA - Aparato de Secreção do Tipo Três (do inglês *Type Three Secretion Apparatus*)  
TTSS - Sistema de Secreção do Tipo Três (do inglês *Type Three Secretion System*)  
U - Unidade enzimática  
UnB - Universidade de Brasília

UPEC - *Escherichia coli* uropatogênica

v - Volume

v/v - Volume/volume

X-gal - 5-bromo-4cloro-3indolil- $\beta$ -D galactopiranosídeo

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Interação dos seis patotipos de <i>Escherichia coli</i> diarreio gênicas com a célula-alvo.	2
<b>Figura 2.</b> Lesão A/E causada por EPEC e EHEC.	4
<b>Figura 3.</b> Interação de DAEC com células do epitélio intestinal.	8
<b>Figura 4.</b> Estrutura de uma PAI típica.	10
<b>Figura 5.</b> Diagrama do LEE de E2348/69 e de EDL933.	12
<b>Figura 6.</b> O aparato de secreção do tipo três de EPEC e EHEC.	14
<b>Figura 7.</b> Aparato de secreção do tipo três de <i>Shigella flexneri</i> .	15
<b>Figura 8.</b> Micrografias eletrônicas mostrando a adesão de EPEC a células HEL.	17
<b>Figura 9.</b> Esquema do LEE de EPEC E2348/69, utilizado como molde na síntese dos iniciadores.	37
<b>Figura 10.</b> Representação esquemática da PAI LEE da EPEC prototípica E2348/69, utilizada como modelo para a identificação de regiões e genes correspondentes em DAEC.	50
<b>Figura 11.</b> Local de anelamento dos iniciadores escD FOR e escD REV no LEE da EPEC E2348/69.	51
<b>Figura 12.</b> Perfis eletroforéticos dos produtos de PCR obtidos com o par de iniciadores escD FOR e escD REV.	51
<b>Figura 13.</b> Local de anelamento dos iniciadores AD3 e espA REV no LEE de EPEC.	53
<b>Figura 14.</b> Perfis eletroforéticos dos produtos de PCR obtidos com o par de iniciadores AD3 e espA REV.	54
<b>Figura 15.</b> Perfil eletroforético dos produtos de amplificação com os iniciadores Universal e Reverso.	55
<b>Figura 16.</b> Alinhamento dos prováveis genes <i>espA</i> das DAEC C39, C40 e C74	

com os homólogos da EPEC E2348/69, EHEC EDL933 e de <i>Citrobacter rodentium</i> DBS100.	60
<b>Figura 17.</b> Alinhamento das proteínas EspA preditas de C39, C40, C74, e EspA da EPEC humana E2348/69, da EHEC bovina EDL933 e de <i>C. rodentium</i> DBS100.	61
<b>Figura 18.</b> Região de anelamento dos iniciadores espD FOR e AD4 no LEE de EPEC.	63
<b>Figura 19.</b> Perfis eletroforéticos dos fragmentos de PCR obtidos empregando os iniciadores espD FOR e AD4.	63
<b>Figura 20.</b> Perfil eletroforético dos produtos de amplificação com os iniciadores Universal e Reverso.	64
<b>Figura 21.</b> Alinhamento entre os prováveis genes <i>espD</i> parciais de C39 e C40 e os homólogos das linhagens prototípicas EPEC E2348/69, EHEC EDL933 e <i>Citrobacter rodentium</i> DBS100.	67
<b>Figura 22.</b> Regiões de anelamento dos iniciadores espB FOR e espB REV no LEE de EPEC.	68
<b>Figura 23.</b> Perfis eletroforéticos dos produtos de PCR obtidos com os iniciadores espB FOR e espB REV.	69
<b>Figura 24.</b> Perfil eletroforético dos produtos de amplificação obtidos com os iniciadores Universal e Reverso, empregando os DNAs plasmidiais extraídos das células transformadas.	70
<b>Figura 25.</b> Alinhamento dos prováveis <i>espB</i> das DAEC C39 e C74 com os genes homólogos das linhagens prototípicas EPEC E2348/69, EHEC EDL933 e <i>Citrobacter rodentium</i> DBS100.	73
<b>Figura 26.</b> Região de anelamento dos iniciadores escF FOR e escF REV no LEE de EPEC.	77
<b>Figura 27.</b> Perfis eletroforéticos dos produtos de PCR obtidos com os iniciadores escF FOR e escF REV.	77
<b>Figura 28.</b> Perfil eletroforético dos produtos de amplificação com os iniciadores Universal e Reverso, empregando DNAs plasmidiais extraídos das células transformadas.	78

<b>Figura 29.</b> Alinhamento das proteínas EscF previstas das DAEC C39 e C74 e EscF de EPEC E2348/69, EHEC EDL933 e <i>Citrobacter rodentium</i> DBS100.	81
<b>Figura 30.</b> Região de anelamento dos iniciadores sepQ FOR e escD REV no LEE de EPEC.	83
<b>Figura 31.</b> Perfil eletroforético dos produtos de PCR obtidos empregando DNA das amostras C39 e C74 de DAEC e do controle positivo EPEC 2348/69, com os iniciadores sepQ FOR e escD REV e a enzima Elongase <sup>®</sup> .	83
<b>Figura 32.</b> Árvore filogenética construída a partir da sequência do provável <i>escD</i> da DAEC C39 e alguns homólogos depositados no GenBank.	87
<b>Figura 33.</b> Árvore filogenética construída a partir das sequências dos prováveis <i>espA</i> dos isolados C39, C40 e C74 de DAEC e alguns homólogos depositados no GenBank.	88
<b>Figura 34.</b> Árvore filogenética construída a partir do provável <i>espD</i> da DAEC C39 e alguns homólogos depositados no GenBank.	89
<b>Figura 35.</b> Árvore filogenética construída a partir dos prováveis <i>espB</i> das DAEC C39 e C74 e de alguns de seus homólogos depositados no GenBank.	89
<b>Figura 36.</b> Árvore filogenética construída a partir das sequências dos prováveis <i>escF</i> dos isolados C39 e C74 de DAEC e alguns homólogos depositados no GenBank.	90
<b>Figura 37.</b> Árvore filogenética construída a partir da sequência do provável <i>cesD2</i> do isolado C39 de DAEC e alguns homólogos depositados no GenBank.	91
<b>Figura 38.</b> Árvore filogenética construída a partir da sequência do provável <i>cesA2</i> do isolado C39 de DAEC e alguns homólogos depositados no GenBank.	91
<b>Figura 39.</b> Árvore filogenética construída a partir das sequências dos prováveis genes TTSS das DAEC C39, C40 e C74 utilizadas nas árvores anteriores e de alguns de seus homólogos depositados GenBank.	92
<b>Figura 40.</b> Perfis eletroforéticos dos RNAs dos isolados C39 e C74 de DAEC e do controle positivo EPEC E2348/69, extraídos após 30 minutos, uma hora, duas horas, três horas e trinta minutos e cinco horas de indução da expressão dos genes TTSS.	94
<b>Figura 41.</b> Perfil eletroforético dos produtos da PCR confirmatória do tratamento com DNase.	94

<b>Figura 42.</b> Perfis eletroforéticos dos produtos amplificados por PCR com o par de iniciadores GAP F e GAP R, empregando como molde cDNA gerado a partir da transcrição reversa dos RNAs da EPEC E2348/69 e dos isolados C39 e C74 de DAEC.	95
<b>Figura 43.</b> Perfis eletroforéticos dos produtos amplificados por PCR com o par de iniciadores GAP F e GAP R, empregando como molde os RNAs extraídos da EPEC E2348/69 e dos isolados C39 e C74 de DAEC.	96
<b>Figura 44.</b> Perfis eletroforéticos dos produtos amplificados por PCR com o par de iniciadores escF FOR e escF REV, empregando cDNA da EPEC E2348/69 e dos isolados C39 e C74 de DAEC.	96
<b>Figura 45.</b> Perfis eletroforéticos dos produtos amplificados por PCR com o par de iniciadores AD3 e espA REV, empregando cDNA da EPEC E2348/69 e dos isolados C39 e C74 de DAEC.	97
<b>Figura 46.</b> Perfis eletroforéticos dos produtos amplificados por PCR com o par de iniciadores espD FOR e AD4, empregando como molde cDNA da EPEC E2348/69 e dos isolados C39 e C74 de DAEC.	98
<b>Figura 47.</b> Perfis eletroforéticos dos produtos amplificados por PCR, empregando como moldes os cDNAs obtidos a partir dos RNAs extraídos no tempo zero.	100
<b>Figura 48.</b> Micrografias eletrônicas de varredura de DAEC C39 e C74 (B e C) e do controle positivo EPEC E2348/69 (A) trinta minutos após a infecção de células HeLa.	102
<b>Figura 49.</b> Micrografias eletrônicas de transmissão da DAEC C39 (A).	104
<b>Figura 50.</b> Estruturas semelhantes a apêndices se projetando a partir da superfície da <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica E2348/69.	106
<b>Figura 51.</b> Imagens de microscopia de força atômica mostrando flagelos da DAEC C39.	106

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Características dos isolados de DAEC utilizados neste estudo.	22
<b>Tabela 2.</b> Iniciadores utilizados nos experimentos de PCR.	36
<b>Tabela 3.</b> Componentes utilizados nos ensaios de PCR com a <i>Taq</i> DNA polimerase.	37
<b>Tabela 4.</b> Componentes utilizados nos ensaios de PCR com a enzima Elongase <sup>®</sup> .	38
<b>Tabela 5.</b> Componentes utilizados nos ensaios de PCR com os DNAs plasmidiais.	39
<b>Tabela 6.</b> Componentes utilizados nos ensaios de RT-PCR.	39
<b>Tabela 7.</b> Linhagens bacterianas cujos genes TTSS foram coletados do banco de dados GenBank para análises de identidade e construção de árvores.	43
<b>Tabela 8.</b> Análise de identidade do provável gene <i>escD</i> do isolado C39 de DAEC.	53
<b>Tabela 9.</b> Análise de identidade do provável gene <i>espA</i> do isolado C39 de DAEC.	56
<b>Tabela 10.</b> Análise de identidade do provável gene <i>espA</i> do isolado C40 de DAEC.	57
<b>Tabela 11.</b> Análise de identidade do provável gene <i>espA</i> do isolado C74 de DAEC.	58
<b>Tabela 12.</b> Análise de identidade do provável gene <i>espD</i> do isolado C39 de DAEC.	65
<b>Tabela 13.</b> Análise de identidade do provável gene <i>espD</i> do isolado C40 de DAEC.	66
<b>Tabela 14.</b> Análise de identidade do provável gene <i>espB</i> do isolado C39 de DAEC.	71
<b>Tabela 15.</b> Análise de identidade do provável gene <i>espB</i> do isolado C74 de DAEC.	72
<b>Tabela 16.</b> Análise de identidade da porção 5' do provável gene <i>cesD2</i> da DAEC C39.	74
<b>Tabela 17.</b> Análise de identidade da porção 3' do provável gene <i>cesD2</i> do isolado C39 de DAEC.	75
<b>Tabela 18.</b> Análise de identidade da porção 3' do provável gene <i>cesD2</i> do isolado C74 de DAEC.	76

<b>Tabela 19.</b> Análise de identidade do provável gene <i>escF</i> do isolado C39 de DAEC.	79
<b>Tabela 20.</b> Análise de identidade do provável gene <i>escF</i> do isolado C74 de DAEC.	80
<b>Tabela 21.</b> Análise de identidade da região 5' do provável gene <i>cesA2</i> do isolado C39 de DAEC.	82
<b>Tabela 22.</b> Média aritmética das identidades dos prováveis genes TTSS dos isolados C39, C40 e C74 de DAEC em relação aos homólogos depositados no GenBank.	85



## RESUMO

Embora as *Escherichia coli* de adesão difusa (DAEC) sejam classificadas como um dos seis grupos de *E. coli* diarreio gênicas, sua patogenicidade ainda é controversa. Diversas linhagens de bactérias intestinais, incluindo *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella flexneri* e *Salmonella enterica*, possuem em seu genoma uma ilha de patogenicidade (PAI) contendo genes que codificam um Sistema de Secreção do Tipo III (TTSS), responsável pela transferência de proteínas efetoras do citoplasma da bactéria diretamente para o citoplasma da célula hospedeira. A presença de genes TTSS é, portanto, um forte indicativo de virulência. Tendo em vista tais informações, este trabalho teve como objetivos a identificação e caracterização de potenciais genes TTSS de isolados de DAEC recuperados de crianças diarreicas. Experimentos de PCR utilizando iniciadores direcionados aos genes TTSS *escD*, *espA*, *espD*, *espB* e *escF* resultaram na detecção de sete prováveis genes em três isolados de DAEC. Dentre as sequências obtidas, detectou-se a presença dos genes *espA*, *espB* e *escF* completos em dois desses isolados de DAEC. Análises de identidade desses genes em relação aos homólogos de diversas linhagens de enteropatógenos sugerem que os isolados de DAEC são bastante heterogêneos. Além disso, as identidades dos genes TTSS de DAEC em relação aos homólogos de diferentes linhagens de *E. coli* enteropatógenas e enterohemorrágicas são bastante elevadas, podendo atingir 100%. A construção de árvores filogenéticas empregando as sequências desses genes confirmou tais resultados e demonstrou que os isolados C39 e C74 são evolutivamente mais próximos entre si que em relação à DAEC C40, agrupada no mesmo clado da EPEC prototípica E2348/69. Ensaios de transcrição reversa utilizando RNA dos isolados C39 e C74 revelaram ainda que alguns dos possíveis genes consistem em genes de fato, uma vez que são transcritos sob indução. Com a finalidade de verificar a expressão dos genes TTSS de DAEC foram também realizados experimentos de microscopia eletrônica e de microscopia de força atômica, porém, as imagens obtidas por meio dessas técnicas foram inconclusivas. Conjuntamente, os resultados apresentados neste trabalho sugerem fortemente a presença de uma PAI contendo genes TTSS em DAEC, e constituem evidências a favor da patogenicidade desse grupo de *E. coli*.

Palavras-chave: *Escherichia coli* diarreio gênicas; *Escherichia coli* de adesão difusa; Virulência; Ilhas de Patogenicidade; Sistema de Secreção do Tipo Três.

## ABSTRACT

Although diffusely adhering *Escherichia coli* (DAEC) are classified as one of the six pathotypes of diarrheogenic *E. coli*, their pathogenicity is still controversial. Several strains of bacteria, including *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella flexneri* and *Salmonella enterica*, possess a pathogenicity island (PAI), containing genes that code for a Type III Secretion System (TTSS), dedicated to inject effector proteins directly from the bacterial cytoplasm into the host cell cytoplasm. Therefore, the presence of TTSS genes is considered a strong evidence of virulence of a given microorganism. This work describes the identification and characterization of potential TTSS genes in DAEC isolates recovered from diarrheic children. PCR experiments using primers targeted to the TTSS genes *escD*, *espA*, *espD*, *espB* and *escF* resulted in the detection of seven putative genes in three isolates of DAEC. Among the sequences obtained, it was possible to detect the presence of the complete *espA*, *espB* and *escF* genes in two of the DAEC isolates. Identity analyses of these genes with different strains suggest that DAEC isolates are quite heterogeneous. Moreover, the identities of TTSS genes of DAEC compared to enteropathogenic and enterohaemorrhagic *E. coli* are very high, sometimes reaching 100%. The construction of phylogenetic trees using the sequences of these genes confirmed these findings and showed that the isolates C39 and C74 are evolutionarily closer to each other than to the C40 DAEC isolate, which was grouped in the same clade of the prototypical EPEC E2348/69. Tests using reverse transcription of RNA isolated from C39 and C74 also revealed that some of the putative genes consist of true genes, since they were transcribed under induction conditions. In order to analyze the expression of TTSS genes in DAEC, electron microscopy and atomic force microscopy experiments were also carried out, however, the images obtained by these techniques were inconclusive. Together, the results obtained in this work strongly suggest the presence of a PAI containing TTSS genes in DAEC, and constitute evidence for the pathogenicity of this group of *E. coli*.

Key-words: Diarrheogenic *Escherichia coli*; Diffusely adherent *Escherichia coli*; Virulence; Pathogenicity Islands; Type Three Secretion System.

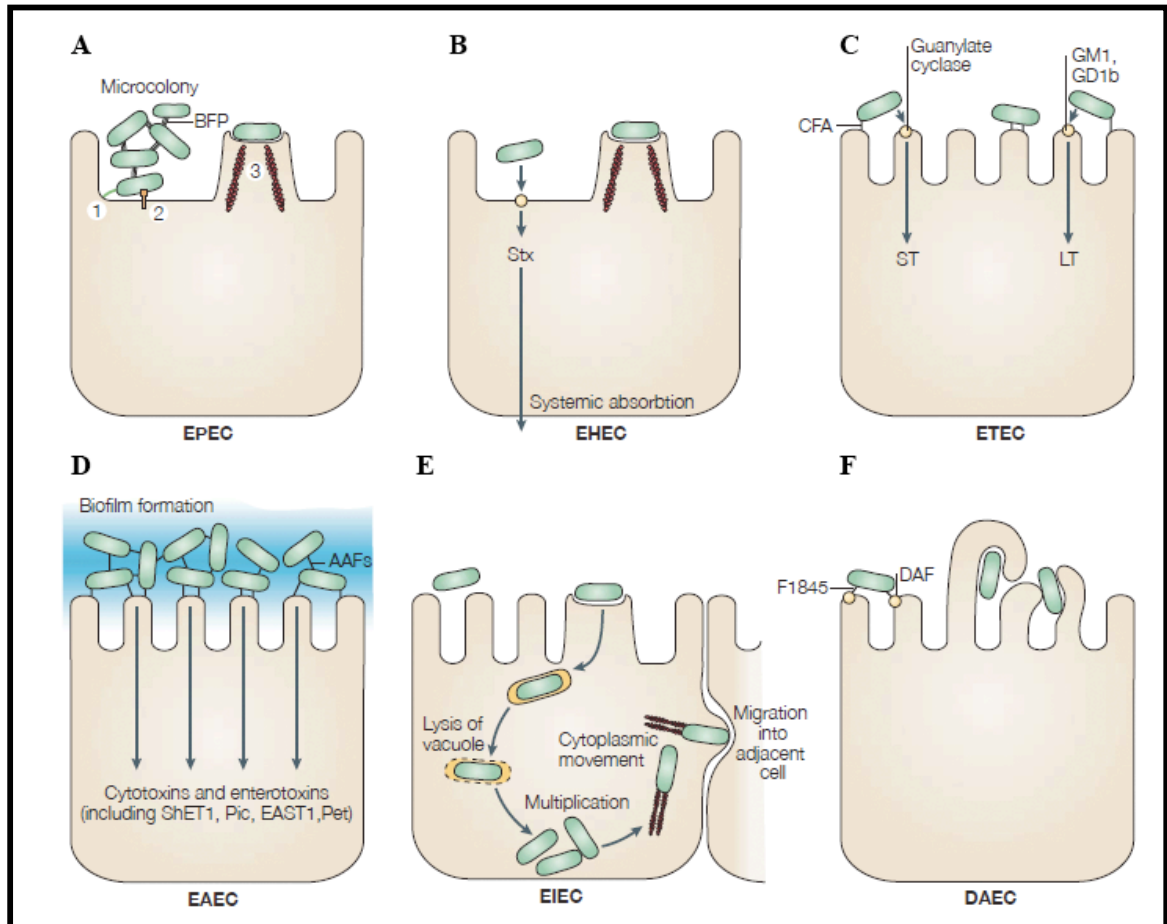
# INTRODUÇÃO

## 1. *Escherichia coli* diarrreio gênicas

*Escherichia coli* é o organismo anaeróbio facultativo predominante da microbiota do cólon humano (Nataro e Kaper, 1998). Essa bactéria é encontrada na camada de muco sobre o epitélio intestinal e geralmente vive em simbiose com o hospedeiro. No entanto, a enorme plasticidade do seu genoma, principalmente associada a processos de transferência horizontal de genes, permite o surgimento de linhagens patogênicas a partir de linhagens comensais. As linhagens patogênicas podem causar infecções do trato urinário, diarréia, septicemia e meningite, devido à presença de fatores de virulência específicos não encontrados nas linhagens comensais (Kaper *et al.*, 1999).

Antes da identificação de tais fatores de virulência, análises sorotípicas consistiam na forma predominante de identificação de linhagens patogênicas (Nataro and Kaper, 1998). A sorotipagem é realizada com base nos antígenos de superfície O (lipopolissacarídico), H (flagelar) e K (capsular). No entanto, como a sensibilidade e a especificidade da sorotipagem são limitadas e esse método é dispendioso, outros ensaios para o diagnóstico de *E. coli* diarrreio gênicas se mostraram mais viáveis. Um deles consiste no teste de adesão a células eucarióticas, que permite distinguir os três padrões de adesão observados em *E. coli* diarrreio gênicas: localizado, difuso e agregativo (Scaletsky *et al.*, 1984; Cravioto *et al.*, 1991). Atualmente, técnicas de biologia molecular, tais como hibridização de colônias e PCR, consistem em uma das principais ferramentas utilizadas para identificar fatores de virulência específicos de cada patotipo.

Conforme pode ser observado na Figura 1, as *E. coli* diarrreio gênicas são divididas em seis grupos de patogenicidade ou patotipos: *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC), *E. coli* enteroagregativas (EAEC), *E. coli* enteroinvasivas (EIEC), *E. coli* enteropatogênicas (EPEC), *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) e *E. coli* de adesão difusa (DAEC) (revisado por Nataro e Kaper, 1998; Kaper *et al.*, 1999; Kaper *et al.*, 2004 e Schmidt *et al.*, 2004). Essa classificação é baseada nos determinantes de virulência e no fenótipo de adesão a culturas de células eucarióticas (Scaletsky *et al.*, 1984).



**Figura 1.** Interação dos seis patótipos de *Escherichia coli* diarreio gênicas com a célula-alvo. **(A)** EPEC aderem a enterócitos do intestino delgado, destroem as microvilosidades e induzem a formação de lesões do tipo *attaching and effacing* (A/E). 1. Adesão inicial; 2. Translocação de proteínas pelo sistema de secreção do tipo três; 3. Formação do pedestal de actina. **(B)** EHEC também induzem a formação de lesões A/E, porém, no cólon. Esse patótipo produz a toxina Shiga (Stx), que é liberada na corrente sanguínea podendo causar falência renal. **(C)** ETEC aderem a enterócitos do intestino delgado e provocam diarreia pela liberação de enterotoxinas termolábeis (LT) e/ou termoestáveis (ST). **(D)** EAEC aderem ao epitélio do intestino grosso e delgado, formam um espesso biofilme e secretam citotoxinas e enterotoxinas. **(E)** EIEC invadem a célula epitelial do cólon, lisam o fagossoma e se movimentam pela célula por meio da nucleação de microfilamentos de actina. **(F)** As DAEC ativam cascatas de sinalização em enterócitos do intestino delgado, resultando na formação de longas projeções celulares que envolvem a bactéria. AAF: *aggregative adherence fimbriae*; BFP: *bundle-forming pilus*; CFA: *colonization factor antigen*; DAF: *decay-accelerating factor*; EAST1: *enteroaggregative E. coli ST1*; LT: *heat-labile enterotoxin*; ShET1: *Shigella enterotoxin 1*; ST: *heat-stable enterotoxin*. Adaptado de Kaper *et al.*, 2004.

### **1.1. *Escherichia coli* enterotoxigênicas (ETEC)**

Linhagens de *Escherichia coli* enterotoxigênicas (ETEC) são a principal causa de diarreia em crianças em processo de desmame e da “diarreia do viajante”. A colonização da mucosa do intestino delgado por essas bactérias é mediada por uma ou mais estruturas de superfície denominadas fatores de colonização fimbrial (CFs), e bactérias desse patotipo produzem pelo menos um membro dos dois grupos definidos de enterotoxinas: termoestável (ST) e termolábil (LT).

### **1.2. *Escherichia coli* enteroagregativas (EAEC)**

*Escherichia coli* enteroagregativas (EAEC) são definidas como linhagens que não secretam enterotoxinas LT ou ST e que aderem a células HEp-2 em um padrão conhecido como adesão agregativa (AA), em que as bactérias se aglutinam umas às outras em uma configuração semelhante a uma pilha de tijolos (revisado por Nataro *et al.*, 1998; Kaper *et al.*, 1999 e Schmidt *et al.*, 2004). Esse fenótipo é mediado pelas fímbrias AAF/I e AAF/II, codificadas pelo plasmídeo pAA e relacionadas à classe Dr de adesinas de DAEC. O plasmídeo pAA também codifica a enterotoxina Pet e o homólogo de ST EAST1. A maioria das linhagens de EAEC produz ainda o sideróforo yersiniabactina. As EAEC aumentam a secreção de muco pela mucosa intestinal, o qual aprisiona a bactéria em uma espécie de biofilme. Essas bactérias têm sido associadas a casos de diarreia persistente, de duração igual ou superior a 14 dias.

### **1.3. *Escherichia coli* enteroinvasivas (EIEC)**

*Escherichia coli* enteroinvasivas (EIEC) são bioquímica, genética e patogenicamente relacionadas a *Shigella* spp. Tanto EIEC quanto *Shigella* spp. secretam enterotoxinas e invadem o epitélio do cólon, onde são capazes de se multiplicar. Além disso, ambas produzem aerobactina, uma proteína de ligação a ferro associada à virulência. Os genes de virulência de origem plasmidial de EIEC e *Shigella* spp. incluem os que codificam um sistema de secreção do tipo três, cujos efetores estão envolvidos na invasão das células epiteliais e na lise do vacúolo fagocítico.

#### 1.4. *Escherichia coli* enteropatogênicas (EPEC)

Linhagens de EPEC são a principal causa de diarreia infantil nos países em desenvolvimento. Essas linhagens causam uma lesão intestinal conhecida como A/E (*attaching and effacing*), caracterizada por destruição das microvilosidades das células epiteliais intestinais e pelo contato íntimo entre a bactéria e a membrana da célula hospedeira (revisado por Nataro e Kaper, 1998; Kaper *et al.*, 1999 e Schmidt *et al.*, 2004). Imediatamente abaixo da bactéria aderida, observa-se o acúmulo de actina polimerizada, o que resulta na formação dos pedestais característicos das lesões A/E (Figura 2). A maioria das linhagens de EPEC associadas à diarreia, conhecidas como EPEC típicas, possui um plasmídeo denominado EAF (*EPEC adherence factor*); as linhagens que não possuem esse plasmídeo constituem as EPEC atípicas. O plasmídeo EAF possui genes que codificam a proteína BFP, responsável pela agregação intercelular das EPEC, resultando na formação de microcolônias características do padrão de adesão localizada. As EPEC atípicas, que não expressam essa proteína, apresentam padrão difuso de adesão a células eucarióticas.



**Figura 2.** Lesão A/E causada por EPEC e EHEC. Essa lesão caracteriza-se por contato íntimo entre a bactéria e a membrana da célula-alvo, destruição das microvilosidades dos enterócitos e formação de pedestais de actina. Fonte: Kaper *et al.*, 2004.

#### 1.5. *Escherichia coli* enterohemorrágicas (EHEC)

O patotipo EHEC engloba linhagens que causam um tipo de diarreia sanguinolenta, denominado colite hemorrágica (HC), e a síndrome urêmica hemolítica (HUS), que leva à insuficiência renal aguda e pode resultar em morte. O principal fator de virulência desse patotipo é a toxina Stx, que inibe a síntese proteica. As EHEC também causam lesões do tipo A/E em células epiteliais (Figura 2) mas, ao invés do plasmídeo EAF, possuem um

plasmídeo de 93 kb, denominado pO157. Os sorotipos que produzem apenas a toxina Stx como fator de virulência e não causam lesões A/E recebem a denominação geral de STEC (*E. coli* produtoras de toxina Shiga).

### **1.6. Escherichia coli de adesão difusa (DAEC)**

O termo *Escherichia coli* de adesão difusa - DAEC - foi inicialmente empregado para designar qualquer linhagem de *E. coli* que não formasse microcolônias de adesão localizada semelhantes às de EPEC típicas (Scaletsky *et al.*, 1984). As DAEC aderem em um padrão em que as bactérias são homoganeamente distribuídas sobre a superfície da célula hospedeira, denominado adesão difusa. Com a descoberta das EAEC, passou-se a reconhecer as DAEC como uma categoria independente de *E. coli* potencialmente diarreiogênica (Nataro e Kaper, 1998). No entanto, vários estudos epidemiológicos apresentam resultados conflitantes e, por isso, o papel das DAEC como causadoras de diarreia ainda é controverso. Como esse patotipo é o objeto do presente estudo, será discutido com mais detalhes na próxima seção.

## **2. As Escherichia coli de adesão difusa (DAEC)**

### **2.1. Epidemiologia**

Estudos epidemiológicos realizados no México (Girón *et al.*, 1991), em Bangladesh (Baqui *et al.*, 1992), na França (Jallat *et al.*, 1993) e no Chile (Levine *et al.*, 1993) revelaram que *E. coli* de adesão difusa foram isoladas com uma frequência maior de indivíduos com diarreia que de indivíduos saudáveis. Por outro lado, estudos epidemiológicos realizados em hospitais da França (Poitrineau *et al.*, 1995; Forestier *et al.*, 1996), da Austrália (Gunzburg *et al.*, 1993) e do Brasil, nas cidades de São Paulo (Gomes *et al.*, 1989; Gomes *et al.* 1998; Scaletsky *et al.*, 2002b), Natal e São Luís (Scaletsky *et al.*, 2001; Scaletsky *et al.*, 2002a), não encontraram correlação entre a presença de DAEC e a diarreia, uma vez que esse patotipo foi isolado com a mesma frequência dos pacientes e dos grupos-controle.

Apesar desses resultados, o estudo realizado em São Luís e Natal por Scaletsky e colaboradores em 2002 demonstrou que, após a estratificação em faixas etárias, a correlação entre infecção por DAEC e diarreia em crianças maiores de 12 meses de idade era significativa. Resultado semelhante foi obtido no estudo realizado por Gunzburg e

colaboradores na Austrália, onde a correlação entre diarreia e a presença de DAEC foi observada apenas em crianças com 18 meses de idade ou mais. No estudo realizado por Levine e colaboradores no Chile, a frequência de isolamento desse patotipo aumentou com a idade. Em alguns dos estudos em que DAEC não foram associadas à diarreia, as crianças envolvidas possuíam menos de dois anos de idade (Forestier *et al.*, 1996; Scaletsky *et al.*, 2001). Um resultado distinto foi apresentado por Piva (1998), ao investigar a incidência dos patotipos de *E. coli* em crianças e adultos com diarreia em Brasília. Seus resultados revelaram que, embora DAEC tenha sido o patotipo mais frequentemente isolado de adultos com diarreia, estas foram isoladas com frequências semelhantes nas populações de adultos e crianças estudadas (18,6% e 20%, respectivamente), sendo sua incidência independente da idade.

Os resultados apresentados pelos estudos epidemiológicos sugerem que as *Escherichia coli* de adesão difusa não formam um grupo homogêneo. Em conformidade com essa hipótese, os estudos realizados por Girón e colaboradores no México e por Lopes e colaboradores no Brasil verificaram que as DAEC investigadas eram muito heterogêneas em relação ao conteúdo plasmidial e ao sorotipo. O estudo publicado por Lopes em 2005 relatou que metade das linhagens analisadas possuíam o gene do sideróforo aerobactina, e 7% produziam hemolisina, colicina ou apresentavam efeito citotóxico sobre células Vero. Diversas adesinas foram identificadas, incluindo membros da família Afa/Dr e as adesinas agregativas AAF/I e AAF/III. Em algumas linhagens foram encontrados ainda genes que codificam os fatores de virulência EAST1 de EAEC e SheT-1 de *Shigella*. A maioria das DAEC isoladas apresentou também resistência múltipla a antibióticos e, curiosamente, os genes de resistência e os de adesão difusa estavam localizados nos mesmos plasmídeos conjugativos. Essa heterogeneidade poderia explicar o porquê dos resultados divergentes obtidos nos estudos epidemiológicos, e sugere que nem todas as linhagens classificadas como DAEC são patogênicas, muito embora tal classe seja considerada um grupo de *E. coli* diarreio gênicas.

## **2.2. Adesinas Afa/Dr**

As DAEC possuem adesinas pertencentes a uma família denominada Afa/Dr, cujos receptores são proteínas da superfície de células eucarióticas, e todas atuam como fatores de virulência (Servin, 2005; Le Bouguéneq e Servin, 2006). Essa família inclui adesinas fimbriais e afimbriais. As adesinas fimbriais se estendem a partir da superfície bacteriana e



são expressas por linhagens uropatogênicas e diarreio gênicas. Estas incluem a adesina Dr, encontrada em linhagens uropatogênicas, e a fimbria F1845, encontrada em um isolado diarreio gênico denominado C1845. As adesinas afimbriais consistem em estruturas amorfas associadas à membrana externa.

As adesinas Afa/Dr são codificadas por operons compostos por pelo menos cinco genes, cuja organização é bastante similar entre os membros da família. Os genes que codificam proteínas acessórias (reguladores transcricionais, chaperonas, proteínas ancoradoras e invasinas) são altamente conservados, enquanto o gene que codifica a adesina propriamente dita é mais divergente. A proteína reguladora do sistema complemento DAF (*decay-accelerating factor*) e as proteínas de superfície CEACAM (*carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule*) são receptores das adesinas Afa/Dr, sendo recrutadas para os locais onde as bactérias estão aderidas.

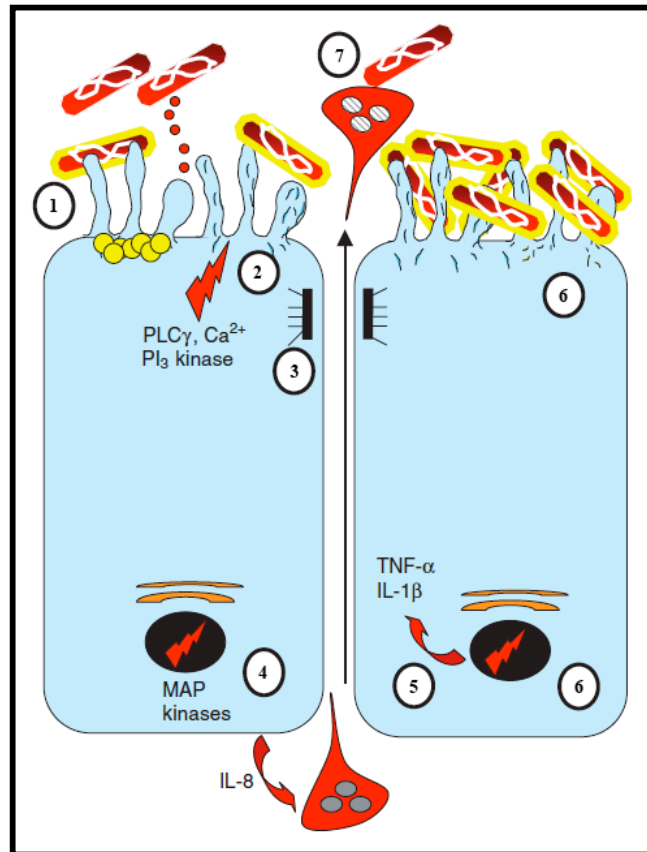
### **2.3. Patogenicidade**

Conforme mencionado anteriormente, as adesinas Afa/Dr são consideradas importantes fatores de virulência de DAEC (Figura 3). Essas adesinas induzem o alongamento das microvilosidades dos enterócitos em decorrência do rearranjo da rede de actina nos domínios apical e basal das células (Bernet-Camard *et al.*, 1996), por meio do recrutamento de moléculas de transdução de sinal (Peiffer *et al.*, 1998). A formação de longas projeções a partir da superfície de células HEp-2 também foi observada por Cookson e Nataro, em 1996. Com a progressão da infecção, ocorre a vesiculação das microvilosidades e o arredondamento do enterócito (Bernet-Camard *et al.*, 1996).

A infecção de células Caco-2 pela DAEC prototípica C1845 provoca também a alteração da distribuição das proteínas ocludina e ZO-1 associadas às junções compactas, resultando no aumento da permeabilidade paracelular (Peiffer *et al.*, 2000). Uma vez que essa alteração independe do rearranjo do citoesqueleto da célula induzido pela bactéria, possivelmente outros fatores de virulência além da adesina fimbrial F1845 existam nessa DAEC. Além disso, demonstrou-se que as DAEC C1845 e IH11128 prejudicam a atividade enzimática de proteínas associadas às microvilosidades e, paralelamente, diminuem sua biossíntese afetando a taxa de tradução dessas proteínas (Peiffer *et al.*, 2001). Entretanto, quando células Caco-2 são infectadas por linhagens recombinantes de *E. coli* expressando as adesinas Afa/Dr das DAEC selvagens, os resultados obtidos com C1845 e IH11128 não se repetem, sugerindo mais uma vez a existência de outros fatores de virulência envolvidos na

patogenicidade de DAEC.

Além dos efeitos sobre o epitélio intestinal, as adesinas Afa/Dr induzem a diminuição da fagocitose mediada pelos leucócitos polimorfonucleares (PMNLs) e provocam sua agregação e apoptose (Brest *et al.*, 2004), além de aglutinar eritrócitos (Servin, 2005).



**Figura 3.** Interação de DAEC com células do epitélio intestinal. Inicialmente, as bactérias expressando adesinas Afa/Dr são reconhecidas pelos receptores DAF e CEACAM (1). O reconhecimento recruta moléculas de sinalização celular, como tirosina-quinases, fosfolipase C $\gamma$ , fosfatidilinositol 3-quinase, proteína-quinase C e Ca<sup>2+</sup>, o que dispara vias de transdução de sinal, resultando no rearranjo dos filamentos de actina e na consequente destruição das microvilosidades (2). Alterações na distribuição de proteínas associadas às junções compactas levam ao aumento da permeabilidade paracelular (3). Uma via de sinalização celular dependente de MAP quinase induz a secreção de interleucina 8 (IL-8) pela região basolateral da célula, o que resulta na migração transepitelial de leucócitos polimorfonucleares (4). A migração dos PMNLs ativa a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  pelo epitélio (5), as quais provocam o aumento da expressão dos genes que codificam o receptor DAF e moléculas MHC de classe I (6). Após a migração, a taxa de apoptose dos PMNLs é aumentada (7). Adaptado de Le Bouguéne e Servin, 2006.

Embora várias alterações morfológicas dependentes do reconhecimento das adesinas Afa/Dr sejam conhecidas, as DAEC continuam pouco caracterizadas em nível molecular. Vários fatores de virulência de diferentes linhagens patogênicas de *E. coli*, como

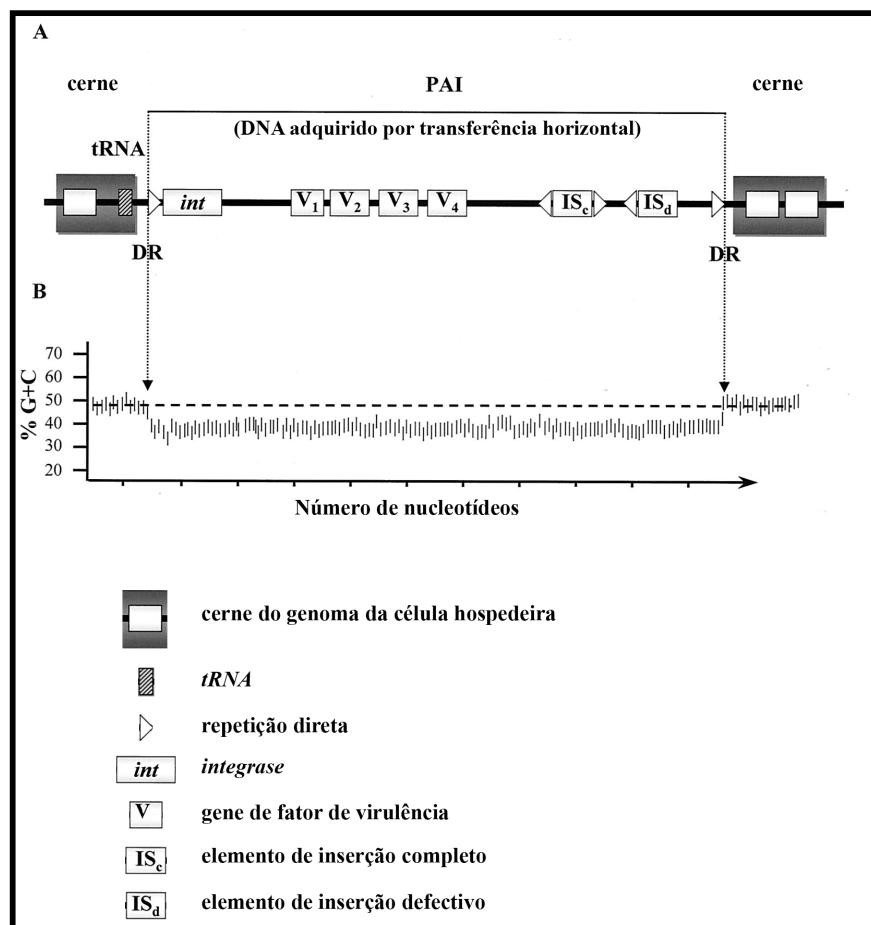
hemolisinas e sideróforos, foram observados em DAEC isoladas de pacientes com infecções intestinais e extra-intestinais, mas até recentemente ainda não haviam sido encontrados genes codificadores de sistemas de secreção (Blanc-Potard *et al.*, 2002). A presença de genes de um provável sistema de secreção do tipo três (TTSS) em isolados de DAEC foi inicialmente verificada por Kyaw (2004) e posteriormente por Lorenzoni (2009). O TTSS é encontrado em bactérias Gram-negativas patogênicas, sendo os genes que o codificam localizados em ilhas de patogenicidade, descritas na próxima seção.

### 3. Ilhas de patogenicidade

Os fatores de virulência e os sistemas responsáveis por sua secreção são frequentemente codificados por regiões do genoma denominadas ilhas de patogenicidade (PAIs) (Hacker e Kaper, 2000). PAIs foram inicialmente descritas como regiões cromossômicas, mas posteriormente descobriu-se que também são encontradas em plasmídeos e nos genomas de bacteriófagos. O conceito de PAI foi introduzido no final dos anos 80 por Jörg Hacker e colegas, na Universidade de Würzburg, Alemanha, durante uma investigação sobre a base genética da virulência de linhagens uropatogênicas de *E. coli* (UPEC). O grupo observou que havia ligação genética entre determinantes codificadores de fímbrias e hemolisinas nessas linhagens, e que esses genes ligados poderiam sofrer co-deleção. A observação de que um único evento de deleção resultava na perda de dois conjuntos de genes de virulência ligados, bem como de segmentos de DNA distantes mais de 30 kb, levou à definição do conceito de ilhas de patogenicidade. De acordo com Hacker e Kaper (1999 e 2000), Winstanley e Hart (2001) e Schmidt e Hensel (2004) e, conforme ilustrado na Figura 4, PAIs são regiões do genoma que apresentam as seguintes características em comum:

- Estão presentes no genoma de bactérias patogênicas e ausentes do genoma de membros não-patogênicos da mesma espécie ou de espécies proximalmente relacionadas.
- São relativamente grandes, apresentando de 10 a 200 kb ou mais.
- Contêm genes que codificam um ou mais fatores de virulência (Figura 4 A), como adesinas, invasinas, sistemas de captação de ferro, toxinas, e sistemas de secreção dos tipos III e IV.
- Diferem do restante do genoma em seu conteúdo G+C (Figura 4 B) e no uso de códons, uma vez que a PAI adquirida por transferência horizontal ainda possui a composição de bases da espécie doadora.

- São associadas a genes de RNA de transferência (tRNA) que, por serem altamente conservados entre as espécies de bactérias, atuam como sequências-alvo para a integração de DNA exógeno (Figura 4 A).
- São flanqueadas por pequenas repetições diretas (DR) de 16 a 20 pb, utilizadas em processos de inserção e deleção (Figura 4 A).
- Contêm genes crípticos ou funcionais que codificam fatores de mobilidade como integrases, transposases, ou sequências de inserção (IS) (Figura 4 A).
- Frequentemente representam regiões de DNA instáveis. Deleções de PAIs podem ocorrer por meio das sequências DR de suas extremidades ou via elementos IS e bacteriófagos.



**Figura 4.** Estrutura de uma PAI típica. **(A)** PAIs são inseridas em sítios específicos, frequentemente genes de tRNA. Elementos móveis como integrases (*int*) são encontrados no início da ilha, próximo ao locus de tRNA. PAIs possuem um ou mais genes associados à virulência (V1 a V4), que podem estar inter espaçados com outros elementos móveis, como IS (IS<sub>c</sub>, elemento de inserção completo) ou remanescentes de IS (IS<sub>d</sub>, elemento de inserção defeitivo). Os limites da PAI são determinados por repetições diretas (DRs). **(B)** O conteúdo G+C da PAI difere do conteúdo G+C do genoma do hospedeiro. Adaptado de Schmidt e Hensel, 2004.

O conteúdo G+C distinto do restante do genoma, a presença de DRs em suas extremidades, a associação com genes de tRNA, a presença de elementos móveis e a instabilidade genética das ilhas de patogenicidade sugerem a aquisição dessas regiões por

transferência horizontal de genes (Hacker e Kaper, 1999; Schmidt e Hensel, 2004). Coerente com essa hipótese, PAIs ocorrem em um amplo espectro de espécies, a maioria das quais é Gram-negativa.

O surgimento de uma PAI é frequentemente iniciado pela integração de plasmídeos, fagos, transposons conjugativos ou combinações desses elementos em genes-alvo específicos, preferencialmente no cromossomo. A transferência de PAIs pode ocorrer por transformação natural, conjugação ou transdução. Um elemento integrado é denominado pré-PAI, pois tem potencial para se desenvolver em uma PAI ao longo do tempo. Pré-PAIs integradas em um determinado genoma podem ser imobilizadas e estabilizadas por deleção e/ou inativação dos genes que codificam integrases e excisases. As PAIs continuam a se desenvolver por mutações adicionais e passam a exibir características semelhantes às do cromossomo cerne, incluindo o conteúdo G+C e uso preferencial de códon.

#### **4. A ilha de patogenicidade LEE (*locus of enterocyte effacement*)**

Uma ilha de patogenicidade cromossomal de aproximadamente 35 kb, denominada LEE (*locus of enterocyte effacement*) por conter a maioria dos genes necessários à indução do fenótipo A/E em células epiteliais intestinais, foi descrita em 1995 por McDaniel e colaboradores. Essa PAI não está presente em linhagens avirulentas de *E. coli*, mas é encontrada nos patótipos EPEC (Elliott *et al.*, 1998) e EHEC (Perna *et al.*, 1998) e em outras espécies que produzem a lesão A/E, como o patógeno de camundongo *Citrobacter rodentium* (Deng *et al.*, 2004) e *Hafnia alvei* (McDaniel, 1995).

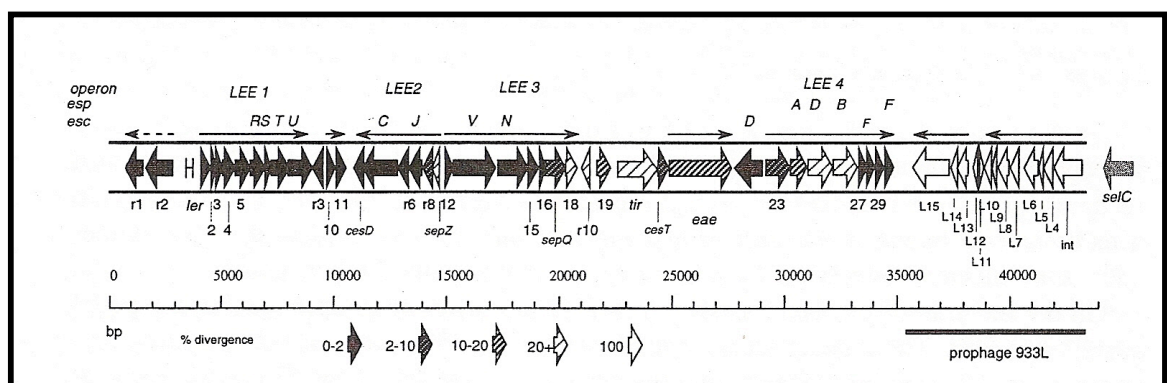
Repetições flanqueadoras e elementos semelhantes a transposons, fagos ou plasmídeos não foram encontrados no LEE de EPEC, sugerindo que a aquisição dessa PAI não é muito recente (McDaniel, 1995). Entretanto, observou-se que o conteúdo G+C de LEE (38,36%) difere significativamente dos 50,80% encontrados no genoma sequenciado da *E. coli* avirulenta K-12.

O sequenciamento completo do LEE da linhagem E2348/69 de EPEC revelou que esta ilha contém 41 *orfs* (quadros de leitura aberta) arranjadas em cinco operons policistrônicos (Elliott *et al.*, 1998), denominados LEE1, LEE2, LEE3, LEE4 e LEE5. LEE1, LEE2 e LEE3 codificam componentes de um aparato de secreção do tipo três (TTSA), o complexo macromolecular do TTSS. O operon LEE5 contém os genes *eae*, *tir* e *cesT*, os quais codificam as proteínas intimina, Tir e CesT, respectivamente. A intimina é uma proteína de membrana externa envolvida no processo de adesão ao enterócito, cujo receptor Tir

(*Translocated Intimin Receptor*) é translocado para a membrana da célula hospedeira e ativado por fosforilação. CesT corresponde à chaperona da Tir. O operon LEE4, por sua vez, engloba os genes das proteínas secretadas pelo TTSA denominadas Esp (*E. coli secreted protein*), algumas das quais são transferidas do citoplasma da bactéria para o citoplasma da célula-alvo (revisado por Wilson *et al.*, 2001).

Perna e colaboradores reportaram, também em 1998, o sequenciamento completo do LEE da linhagem EDL933 da EHEC prototípica O157:H7. Esse sequenciamento revelou que a PAI de EDL933 possui o mesmo ponto de integração cromossomal que o da EPEC E2348/69, e que seu conteúdo G+C (40,91%) também está abaixo da média, quando comparado ao conteúdo da linhagem não patogênica K-12; no entanto, algumas diferenças são observadas entre essas duas LEEs. A ilha LEE de EHEC apresenta 43.359 pb sendo, portanto, maior que LEE de EPEC, que apresenta 35.624 pb. A maior parte da diferença de tamanho é explicada pela presença de um provável prófago no LEE de EHEC (Figura 5), que foi denominado 933L e possui 51,72% de G+C. Das 54 *orfs* identificadas no LEE de EHEC, 13 correspondem ao provável prófago e 41 correspondem às *orfs* previamente descritas para o LEE de E2348/69.

Conforme pode ser observado na Figura 5, a ordem e o número dos genes LEE de EPEC e de EHEC são conservados, e o valor médio da identidade de nucleotídeos é 93,9% (Perna *et al.*, 1998). Os genes mais variáveis são os que codificam as proteínas secretadas; os que codificam componentes do aparato de secreção, por sua vez, são altamente conservados.



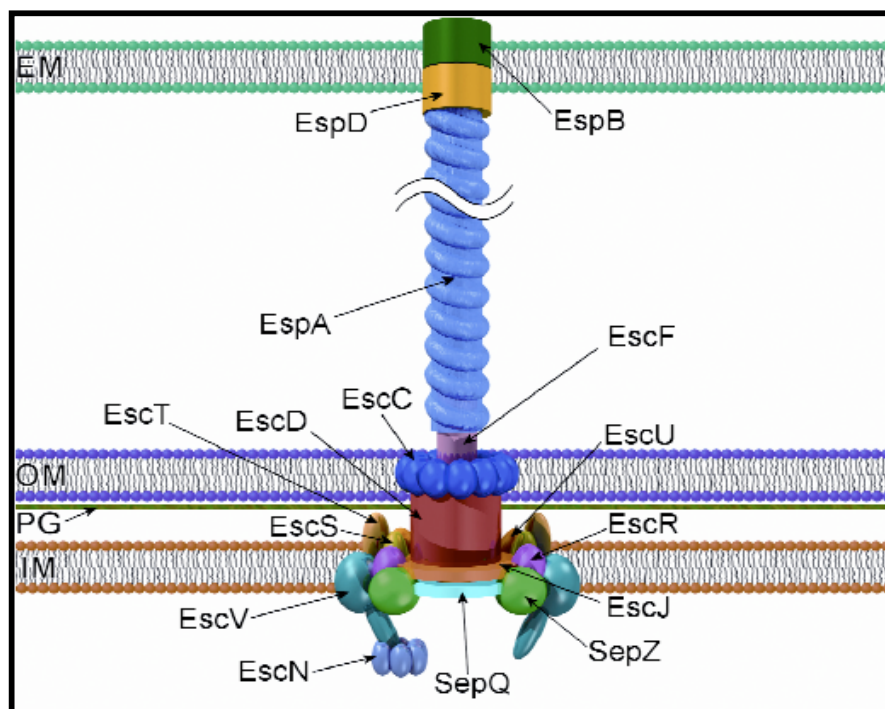
**Figura 5.** Diagrama do LEE de E2348/69 e de EDL933. Os diferentes padrões das setas grandes indicam a divergência de nucleotídeos entre os genes de EPEC e EHEC. As setas pequenas indicam os operons de LEE. O prófago 933L está presente em EHEC mas não em EPEC. Fonte: Kaper *et al.*, 1999.

TTSSs também são encontrados em outras bactérias patogênicas (revisado por Winstanley e Hart, 2001; Daniell *et al.*, 2003; Schmidt e Hensel, 2004; Sani *et al.*, 2006), incluindo membros dos gêneros *Pseudomonas*, *Bordetella*, *Burkholderia*, *Chlamydia*, *Erwinia*, *Ralstonia* e *Xanthomonas*; não há relatos da presença de TTSS em bactérias Gram-positivas. Os TTSSs podem ser plasmidiais, como em *Yersinia* e em *Shigella* spp., ou cromossomais, como em *Salmonella enterica* e em EPEC e EHEC. Algumas espécies apresentam mais de um TTSS, incluindo *S. enterica* e espécies de *Yersinia* altamente virulentas. Em muitos organismos, o conteúdo G+C dos genes TTSS é inferior ao do restante do genoma hospedeiro, sugerindo que os genes do TTSS ancestral evoluíram em um hospedeiro com menor conteúdo G+C. Um TTSS identificado em *Chlamydia psittaci* é um candidato potencial para tal papel.

## 5. O Sistema de Secreção do Tipo Três (TTSS)

A maquinaria codificada pelos genes do TTSS forma um complexo responsável pela translocação de proteínas efetoras diretamente para o citoplasma das células do hospedeiro eucariótico. Essas proteínas ativam vias de sinalização celular e podem interferir em uma variedade de funções celulares, incluindo a dinâmica de actina e tubulina, a expressão de genes, o tráfego de vesículas, a produção de citocinas, a morte celular programada e a progressão do ciclo celular (revisado por Kubori *et al.*, 1998; Kimbrough e Miller, 2002; Yip e Strynadka, 2006; Gálan e Wolf-Watz, 2006).

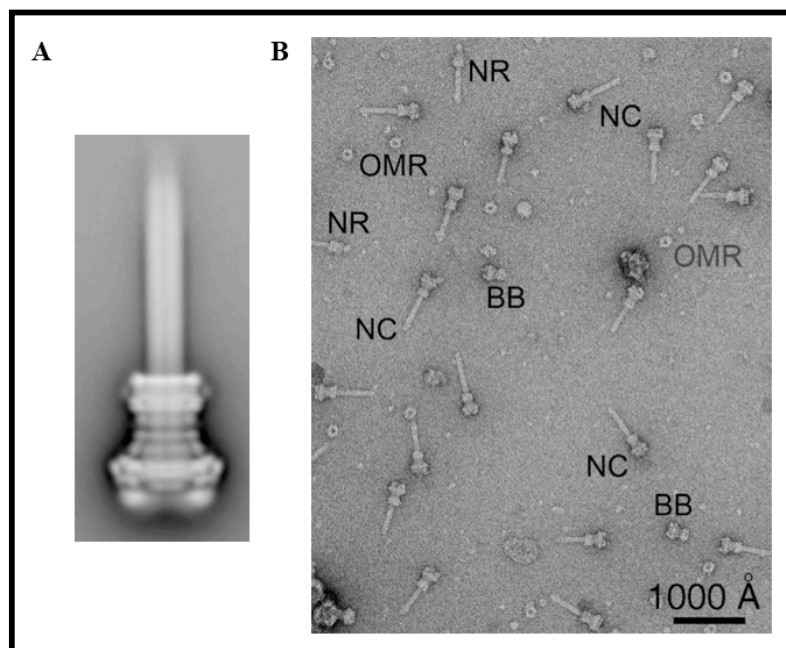
Embora os tipos de efetores variem muito nas diferentes espécies, a maquinaria molecular que medeia o processo de transporte dessas proteínas, o aparato de secreção do tipo três (TTSA), também denominado secreton ou complexo-agulha (NC), é estrutural e funcionalmente conservado entre os diferentes TTSSs (Pallen *et al.*, 2005). Mais de 20 componentes protéicos, muitos dos quais apresentam sequências idênticas em linhagens distintas, são requeridos para o funcionamento adequado do TTSA. A maioria dessas proteínas está envolvida na construção do complexo macromolecular que se estende a partir da membrana citoplasmática da bactéria, atravessa o espaço periplasmático, a camada de peptidoglicano, a membrana externa, o espaço extracelular e, finalmente, atinge a membrana da célula hospedeira (revisado por Yip e Strynadka, 2006), conforme pode ser observado na Figura 6.



**Figura 6.** O aparato de secreção do tipo três de EPEC e EHEC. A base é ancorada às membranas interna (IM) e externa (OM), atravessando a camada de peptidoglicano (PG). A agulha se projeta a partir da superfície da bactéria e se estende até a membrana da célula hospedeira eucariótica (EM), onde é inserido o poro de translocação. Fonte: Pallen *et al.*, 2005.

O NC, inicialmente identificado em *Salmonella typhimurium*, é composto por uma base formada por dois conjuntos de anéis concêntricos inseridos nas membranas interna e externa da bactéria que ancoram a estrutura ao envelope bacteriano, e por uma projeção helicoidal rígida semelhante a uma agulha, que se estende vários nanômetros a partir da superfície bacteriana (Kimbrough e Miller, 2000; Kubori *et al.*, 2000; Tamano *et al.*, 2000; Blocker *et al.*, 2001; Daniell *et al.*, 2001; Zenk *et al.*, 2007). Uma estrutura cilíndrica interna semelhante a um bastão conecta a agulha à base do TTSA. Análises recentes de NCs purificados de *Shigella flexneri* (Sani *et al.*, 2006) demonstraram que a base do TTSA dessa espécie é composta por sete anéis, conforme pode ser observado na Figura 7. O NC é atravessado por um canal estreito (aproximadamente 2,5 nm de diâmetro), que se estende desde o conjunto inferior de anéis até a extremidade da agulha, através do qual passam as proteínas a serem secretadas (revisado por Kubori *et al.*, 1998; Gálan e Wolf-Watz, 2006; Yip e Strynadka, 2006).





**Figura 7.** Aparato de secreção do tipo três de *Shigella flexneri*. **(A)** Projeção do NC completo, resultado da combinação de 1.500 imagens de partículas de NCs obtidas por microscopia eletrônica. O alinhamento foi feito em relação à base do NC, uma vez que o comprimento da agulha é variável. **(B)** Micrografia eletrônica de partículas do complexo-agulha purificadas e contrastadas negativamente. NC: complexo-agulha; BB: corpo basal; NR: NC sem os anéis da membrana interna; OMR: anéis da membrana externa. Fonte: Sani *et al.*, 2006.

Embora a organização estrutural seja semelhante àquela do flagelo (Aizawa, 2001), a agulha do TTSA é mais delgada que o filamento flagelar (Daniell *et al.*, 2001). A agulha e o flagelo possuem várias proteínas de seqüências homólogas e, mesmo quando a identidade entre as seqüências é pequena, as propriedades físico-químicas são semelhantes. Tanto o NC quanto o flagelo bacteriano consistem em anéis localizados nas membranas interna e externa, uma ATPase associada à membrana citoplasmática, estruturas extracelulares em forma de hélice e um interior oco que funciona como um canal para a passagem de proteínas. Além disso, os dois aparatos são considerados TTSA, pois ambos exportam componentes estruturais da maquinaria durante sua montagem (revisado por Kubori *et al.*, 1998; Aizawa, 2001; Alfano e Collmer, 2004; Gálan e Wolf-Watz, 2006; Yip e Strynadka, 2006). Apesar das similaridades, o flagelo provavelmente surgiu antes do complexo-agulha, uma vez que está presente em uma variedade maior de espécies de bactérias, tanto Gram-negativas como Gram-positivas (Aizawa, 2001).

A montagem da base do TTSA precede a montagem do bastão interno e da agulha (Sukhan *et al.*, 2001). Assim que é organizada, a base começa a atuar como uma maquinaria de secreção do tipo três, promovendo inicialmente a secreção de componentes estruturais do

TTSS ou de proteínas necessárias para a montagem do bastão interno e da agulha. Assim que a montagem do NC é completada, a maquinaria modifica sua especificidade e se torna competente para a secreção de proteínas translocadoras e efetoras (revisado por Kubori *et al.*, 2000; Kimbrough e Miller, 2002; Gálan e Wolf-Watz, 2006; Yip e Strynadka, 2006).

O processo de secreção é hierárquico, e as diferentes proteínas são secretadas em uma ordem pré-determinada. Como a introdução de mutações que alteram a fase de leitura não previne a secreção de muitas delas, acredita-se que o sinal para a secreção possa residir nos mRNAs que as codificam e não nos polipeptídeos propriamente ditos. Especificidade adicional pode ser conferida pelas chaperonas citosólicas, que se ligam a pelo menos algumas das proteínas secretadas pelo TTSA. Alguns estudos sugerem que a estrutura tridimensional da chaperona associada à sua proteína cognata poderia funcionar como um sinal universal conservado para o reconhecimento pelo TTSS, o que condiz com a observação de que a remoção do domínio de ligação à chaperona de algumas proteínas do TTSS previne sua secreção (revisado por Gálan e Wolf-Watz, 2006).

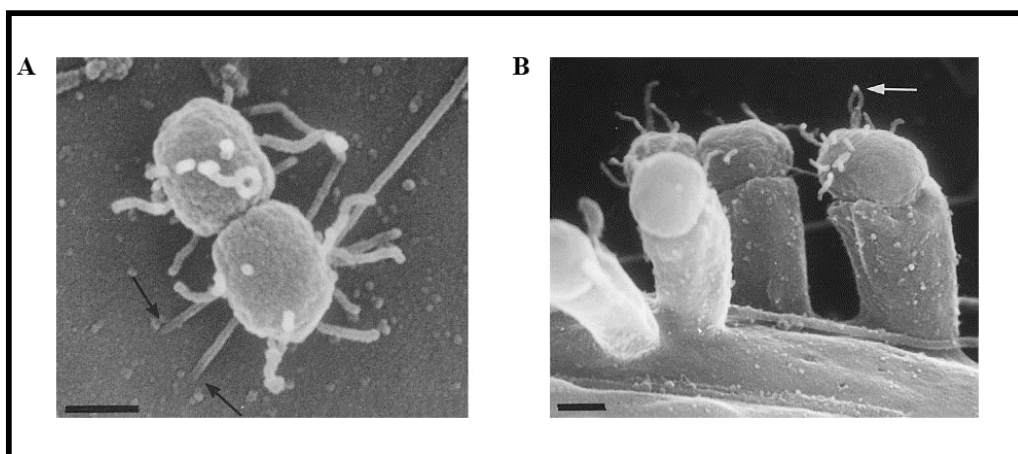
Outra função proposta para as chaperonas é prevenir interações prematuras e indesejáveis da proteína cognata a ser secretada com outros componentes da maquinaria de secreção do tipo três. Além disso, estas mantêm o seu domínio de ligação na proteína cognata em uma conformação não globular, sugerindo que uma de suas funções seria preparar as proteínas secretadas para o rápido desdobramento antes da secreção. Isso é necessário porque o canal por onde as proteínas devem passar é muito estreito para a maioria das proteínas globulares, sugerindo que os efetores devem ser parcial ou completamente desdobrados antes da translocação (revisado por Alfano e Collmer, 2004; Gálan e Wolf-Watz, 2006).

O TTSS também codifica uma ATPase altamente conservada, cuja atividade é crítica nos processos de recrutamento e desdobramento das proteínas a serem secretadas (revisado por Gálan e Wolf-Watz, 2006). A ATPase interage com a chaperona e facilita a translocação das proteínas, provavelmente por inserir o domínio desdobrado do efector no TTSA (revisado por Yip e Strynadka, 2006).

O NC por si só não é capaz de mediar a injeção de proteínas na célula hospedeira, e requer proteínas translocadoras, também secretadas pelo TTSS. Acredita-se que estas sejam inseridas na membrana da célula hospedeira e formem um canal, através do qual as proteínas efetoras passam. Ide e colaboradores demonstraram em 2001 que as proteínas translocadoras de EPEC, EspB e EspD, interagem entre si *in vitro* e formam poros com diâmetro externo de 55 a 65 nm na membrana de eritrócitos. O poro apresenta de seis a oito

subunidades e se assemelha a um funil, possuindo uma abertura mais larga que se estreita à medida que penetra na bicamada lipídica. Ensaios de osmoproteção revelaram que o diâmetro mínimo é de 3 a 5 nm. EspD parece ser o componente principal do poro de translocação (Shaw *et al.*, 2001); a distribuição de EspB entre o citosol e a membrana plasmática da célula hospedeira sugere que, além da atividade translocadora, essa proteína apresenta atividade efetora (revisado por Neves *et al.*, 2003).

Estruturas acessórias localizadas na extremidade distal da agulha, como o filamento de EspA de EPEC (Knutton *et al.*, 1998) e o complexo formado pela proteína LcrV de *Yersinia enterocolitica* (revisado por Gálan e Wolf-Watz, 2006; Yip e Strynadka, 2006), atuam como uma ponte que liga a agulha aos translocadores na membrana da célula-alvo, como pode ser observado na Figura 8 A. O filamento de EspA também é encontrado em EHEC, mas as proteínas EspA de diferentes sorotipos de EPEC e EHEC são polimórficas (Neves *et al.*, 2003). Filamentos semelhantes são observados ainda em *Pseudomonas syringae* e em *Ralstonia solanacearum*, e podem representar adaptações ao hospedeiro. Patógenos de plantas devem ser capazes de penetrar a parede celular para alcançar a membrana da célula vegetal, enquanto EPEC e EHEC precisam penetrar a barreira mucosa e um glicocálix espesso para atingir os enterócitos (Daniell *et al.*, 2001). A progressão da infecção por EPEC e EHEC leva à formação de lesões A/E maduras, excluindo os filamentos de EspA do sítio de adesão íntima. Entretanto, sua presença na superfície restante da bactéria ainda é visível (Figura 8 B).



**Figura 8.** Micrografias eletrônicas mostrando a adesão de EPEC a células HEL. Antes da formação de lesões A/E, estruturas de superfície filamentosas podem ser vistas na superfície da bactéria, formando uma ponte entre a bactéria e a célula HEL (A). Os filamentos que interagem com a superfície da célula são muito rígidos e parecem estar embebidos na membrana da célula eucariótica (A, setas). Filamentos também podem ser observados na superfície exposta da bactéria após a formação da lesão A/E madura (B, seta). A barra corresponde a 0,25  $\mu\text{m}$ . Adaptado de Knutton *et al.*, 1998.

O comprimento dos filamentos varia muito, e vai de 75 a 260 nm (Daniell *et al.*, 2001), podendo chegar a mais de 600 nm (Sekiya *et al.*, 2001). Em 2005, Crepin e colaboradores demonstraram que o alongamento ocorre pela adição de subunidades de EspA à extremidade do filamento em crescimento. Sua estrutura consiste em um tubo helicoidal de 12 nm de diâmetro e um canal central oco de 2,5 nm de diâmetro, através do qual as proteínas efetoras podem ser transportadas (Daniell *et al.*, 2003). Esse valor é semelhante ao do diâmetro mínimo do poro de translocação, o que é consistente com a função do filamento de EspA de ligação da agulha ao poro.

Uma região curta, de aproximadamente 50 nm do filamento de EspA, adjacente à superfície bacteriana, não é marcada com anticorpos anti-EspA. Com base nessa observação, Wilson e colaboradores (2001) elaboraram a hipótese de que essa região seria equivalente às agulhas observadas em *Shigella* e em *Salmonella*. A proteína EscF de EPEC assemelha-se às proteínas PrgI de *S. typhimurium* (24% de identidade) e MxiH de *Shigella flexneri* (25% de identidade), subunidades da agulha do TTSA. Por esta razão, foi sugerido que a proteína EscF consiste no componente principal dessa subestrutura em EPEC e EHEC. Neste mesmo trabalho, os autores demonstraram que a proteína EscF era requerida para a secreção dos efetores do TTSS e para a montagem do filamento de EspA. Além disso, verificou-se que EscF se liga a EspA, fornecendo evidências de que os filamentos de EspA são, de fato, uma extensão do NC. Sekiya e colaboradores observaram, no mesmo ano, que a infecção de células HeLa com mutantes de *escF* não provoca a formação de lesões A/E, e que EspA não é detectada no NC desses mutantes, o que está de acordo com os resultados apresentados por Wilson.

Ao contrário de outras toxinas bacterianas, que exercem suas funções introduzindo modificações covalentes irreversíveis em suas proteínas-alvo, os efetores do TTSS parecem agir mimetizando as funções das proteínas da célula-alvo (revisado por Gálan e Wolf-Watz, 2006). As proteínas EspA, EspB, EspD, EspF e Tir secretadas por EPEC são necessárias para a indução de vias de transdução de sinal nas células hospedeiras, e muitas das proteínas efetoras do TTSS de patógenos animais também suprimem respostas de defesa induzidas pela imunidade inata. Observações semelhantes foram feitas nas células hospedeiras de patógenos de plantas, sugerindo que os efetores funcionam como “agentes duplos”, por apresentarem tanto atividades de supressão quanto de ativação (revisado por Alfano e Collmer, 2004).

## 6. A regulação da expressão dos genes do TTSS

Os mecanismos de regulação do TTSS ocorrem, principalmente, em nível transcricional, sendo específicos para cada TTSS. O primeiro gene de LEE1, *ler*, codifica a proteína Ler (*LEE encoded regulator*) responsável por ativar a expressão dos demais operons LEE. Nas EPEC típicas, a expressão de *ler* é, por sua vez, induzida pelo regulador Per (*plasmid encoded regulator*), codificado pelo operon *perABC* localizado no plasmídeo EAF (revisado por Schmidt e Hensel, 2004). O trabalho publicado em 2004 por Deng e colaboradores revelou a existência de dois reguladores adicionais dos genes LEE, além de Ler, designados Orf10 (ou GrIR, de *global regulator of LEE-repressor*) e Orf11 (ou GrIA, de *global regulator of LEE-activator*). Os genes LEE também são regulados pela maquinaria de *quorum sensing* (Sperandio *et al.*, 1999).

Acredita-se que o principal sinal para a indução da expressão dos genes do TTSS seja gerado pelo contato entre a bactéria e o enterócito, o que é condizente com sua expressão *in vitro* sob condições semelhantes às encontradas no trato gastrointestinal (Kenny *et al.*, 1997). Essa percepção pode estar ligada a alterações conformacionais sofridas pela agulha em contato com a célula hospedeira, semelhantes às modificações que ocorrem no bastão flagelar durante as mudanças na orientação do movimento da bactéria (revisado por Yip e Strynadka, 2006).

## 7. Os genes TTSS como indicadores de virulência

Uma vez que os sistemas de secreção do tipo três de bactérias Gram-negativas estão relacionados à patogenicidade bacteriana, a presença de genes TTSS pode ser utilizada como um indicador de virulência de microrganismos (Stuber *et al.*, 2002).

Com base nessa observação, e no fato de TTSSs de diferentes bactérias serem bastante conservados (Pallen *et al.*, 2005), nosso grupo de pesquisa iniciou trabalhos visando a detecção e caracterização destes genes em isolados de DAEC, recuperados de crianças com diarreia internadas no Hospital Universitário de Brasília (Piva, 1998), a fim de melhor caracterizar o potencial patogênico desse patotipo. Os primeiros resultados obtidos revelaram a presença de sequências homólogas a genes dos operons LEE1, LEE2 e LEE3 de EPEC (Kyaw, 2004; Lorenzoni, 2009). Assim, dando continuidade a esta linha de pesquisa, o presente trabalho descreve a caracterização estrutural e funcional de outros genes TTSS

destes mesmos isolados de DAEC, a fim de melhor caracterizar a provável ilha de patogenicidade presente nestas bactérias.

## OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivos a caracterização estrutural e funcional de uma provável ilha de patogenicidade de DAEC.

### **Objetivos específicos**

1. Detectar e caracterizar genes TTSS de DAEC correspondentes àqueles encontrados no operon LEE4 de organismos portadores da ilha LEE.
2. Detectar e caracterizar os genes de DAEC situados na região correspondente ao operon LEE5, a qual em EPEC, EHEC e *C. rodentium* constitui o segmento de DNA que contém importantes genes associados à virulência. Tal etapa possibilitará a caracterização dos prováveis genes associados à virulência de DAEC.
3. Realizar a análise funcional e estrutural do TTSA de DAEC, por meio de experimentos de RT-PCR, microscopia eletrônica e microscopia de força atômica.

# MATERIAIS E MÉTODOS

## 1. Linhagens bacterianas

### 1.1. Linhagens de *Escherichia coli* de adesão difusa

As linhagens de DAEC utilizadas neste estudo foram recuperadas de crianças menores de dois anos de idade com sintomas de diarreia, atendidas no Hospital Universitário de Brasília entre os anos de 1990 e 1991. Esses isolados haviam sido previamente classificados como DAEC pelo grupo da Prof<sup>a</sup>. Dra. Loreny G. Giugliano, do Laboratório de Microbiologia da Universidade de Brasília (Piva, 1998). A presença de adesinas da família Afa/Dr foi investigada por meio de ensaios de PCR e *Southern blot*, e a existência de genes tipicamente associados aos demais patótipos de *E. coli* diarreio gênicas foi averiguada por meio de experimentos de hibridização de colônias e PCR. Para a caracterização fenotípica foram realizados testes de adesão a células HeLa. O padrão difuso de adesão, a presença de adesinas da família Afa/Dr e a ausência de genes classicamente associados aos demais patótipos de *E. coli* diarreio gênicas permitiram caracterizar essas bactérias como DAEC. A lista com todos os isolados utilizados neste trabalho é apresentada na Tabela 1.

**Tabela 1.** Características dos isolados de DAEC utilizados neste estudo.

Isolado	Sorotipo	Adesão	Afa/Dr	<i>eae</i> *	<i>tir</i> *	EAF**	<i>bfp</i> **
C39	O11:H <sup>-</sup>	D	+	-	-	-	-
C40	O2:H4	D	+	-	-	-	-
C74	O11:H <sup>-</sup>	D	+	-	-	-	-

**Legenda:**

D: adesão difusa; L: adesão localizada; NT: não testado

\*Genes encontrados em EPEC e em EHEC

\*\*Genes típicos de EPEC

### 1.2. Linhagens controle

- *Escherichia coli* K-12

Essa linhagem foi utilizada como controle negativo, pois não é patogênica e, portanto, não possui a PAI LEE.

- *Escherichia coli* enteropatogênica O127:H6 E2348/69

Essa linhagem, isolada de crianças do Reino Unido em um surto em 1969, é o



protótipo das EPEC que induzem a formação de lesões A/E. E2348/69 foi o principal controle positivo utilizado neste trabalho, e a sequência de sua PAI LEE foi empregada como molde para a construção dos iniciadores necessários aos experimentos de PCR.

- *Escherichia coli* enterohemorrágica O157:H7 EDL933

Essa EHEC prototípica, utilizada como controle positivo em alguns experimentos de PCR, foi isolada em 1983 após dois surtos que ocorreram nos Estados Unidos, em decorrência da ingestão de carne moída contaminada servida por uma cadeia de restaurantes *fast-food*.

### 1.3. Linhagens transformantes

- *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup> (Invitrogen)

F<sup>-</sup>  $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* ( $r_k^-$ ,  $m_k^+$ ) *phoA supE44*  $\lambda$  *thi-1 gyrA96 relA1*.

- *Escherichia coli* XL10-Gold<sup>TM</sup> (Stratagene)

Tet<sup>r</sup> $\Delta$ (*mcrA*)183  $\Delta$ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte* [F' *proAB lacI<sup>q</sup>Z* $\Delta$ M15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>) Amy Cam<sup>r</sup>].

## 2. Plasmídeos

- pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega)

O vetor pGEM<sup>®</sup>-T Easy apresenta 3.015 pares de bases e é construído pela clivagem de pGEM<sup>®</sup>-5Zf(+) com *EcoR* V e posterior adição de uma timidina à cada uma das extremidades 3'. Essas timidinas são complementares aos resíduos de deoxiadenosina dos produtos de PCR, adicionados às extremidades 3' por algumas *Taq* DNA polimerases, e também previnem que ocorra a religação do vetor. O vetor pGEM<sup>®</sup>-T Easy contém a origem de replicação do fago f1 e um gene de resistência ao antibiótico ampicilina, além dos promotores T7 e SP6 flanqueando a região de clonagem, que está localizada no interior da sequência que codifica a enzima beta-galactosidase. A inativação do gene da beta-galactosidase (*lacZ*) pela clonagem de um fragmento permite a identificação dos clones recombinantes pela coloração branca de suas colônias. A região de clonagem contém ainda sítios de restrição para diversas enzimas.

### 3. Meios de cultura

#### Meio Luria-Bertani (LB)

- Peptona de caseína 1% (p/v)
- Extrato de levedura 0,5% (p/v)
- NaCl 1% (p/v)
- Água destilada
- pH final 7,2.
- Esterilizado em autoclave a 121°C/1 atm por 15 minutos.

#### Meio Luria-Bertani tamponado

- Meio LB tamponado com Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5.
- Esterilizado em autoclave a 121°C/1 atm por 15 minutos.

#### Meio LB ágar (LA)

- Meio LB adicionado de ágar bacteriológico a 1,5% (p/v).
- pH final 7,2.
- Esterilizado em autoclave, a 121°C/1 atm por 15 minutos.

#### Meio DMEM (2X) - estoque

Para 1 litro de meio:

- 2 envelopes de DMEM (Gibco BRL)
- NaHCO<sub>3</sub> 7,40 g
- Água destilada qsp 1 L
- pH final 7,2.
- Esterilizado por filtração.

#### Meio DMEM (1X)

Para 200 mL de meio:

- DMEM 2X 100 mL
- Soro fetal bovino 10 mL (5% v/v)
- Solução estoque de antibióticos\* 500 µL
- Água destilada qsp 200 mL

\*Solução estoque dos antibióticos:

- ◆ Adicionar 5.000.000 U de Penicilina G
- ◆ Adicionar 500.000 U de Streptomicina
- ◆ Dissolver em água destilada qsp 10 mL e esterilizar por filtração. Estocar a -20°C, ao abrigo da luz.

#### **DMEM tamponado**

- Meio DMEM 1X tamponado com Tris-HCl 0,1 M final, pH 7,5.

### **4. Soluções**

#### **4.1. Soluções de uso geral**

##### **Tampão TE**

- Tris-HCl 10 mM
- EDTA 1 mM
- Água destilada
- pH final 7,5.

##### **Glicerol 70%**

- Glicerol 70% (v/v)
- Água destilada
- Esterilizada em autoclave, a 121°C/1 atm por 20 minutos.

#### **4.2. Soluções para a extração de DNA total**

##### **Fenol Saturado (BioAgency)**

- Fenol 10 v
- 8-hidroxiquinolina 0,1% (p/v)
- Saturado com tampão TE.
- pH final 7,6 ± 0,3.
- Estocar a 4 °C ao abrigo da luz.

### **Clorofil**

- Clorofórmio 24 v
- Álcool Isoamílico 1 v
- Equilibrado com 0,25 v de tampão TE.
- Estocado ao abrigo da luz.

### **Lisozima**

- Solução estoque: 100 mg/mL em água Milli-Q.

### **Tampão TE**

- Tris-HCl pH 7,5 25 mM
- EDTA pH 8,0 10 mM
- Glicose 50 mM
- Água destilada

## **4.3. Soluções para a extração e precipitação de RNA**

### **Acetato de sódio livre de RNase (estoque 3 M pH 5,2)**

- Estoque: 3 M.
- Concentração de uso: 0,3 M.
- pH final 5,2 (ajustar com ácido acético glacial).

### **Água Milli-Q livre de RNase**

### **Álcool isopropílico livre de RNase**

### **Clorofórmio**

### **Etanol 75% livre de RNase**

### **Etanol 100% livre de RNase**

### **TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen)**

## **4.4. Soluções para eletroforese em gel de agarose**

### **Tampão de Corrida Tris-borato (TEB 10X)**

- Trizma base 0,89 M
- Ácido bórico 0,89 M

- EDTA 0,02 M
- Água destilada
- pH final 8,0.

#### **Tampão de Corrida Tris-acetato livre de RNase (TAE 50X)**

Para 1 litro de solução:

- Trizma base livre de RNase 2 M
- Ácido acético glacial livre de RNase 57,1 mL
- EDTA livre de RNase 0,05 M
- Água Milli-Q livre de RNase qsp 1 L
- pH final 8,0.

#### **Tampão de Amostra (10X)**

- Glicerol 50% (v/v)
- Azul de bromofenol 0,1% (p/v)
- Xileno cianol 0,1% (p/v)
- Água destilada

#### **Tampão de Amostra livre de RNase (10X)**

- Glicerol livre de RNase 50% (v/v)
- Azul de bromofenol livre de RNase 0,1% (p/v)
- Xileno cianol livre de RNase 0,1% (p/v)
- Água Milli-Q livre de RNase

#### **Solução de Brometo de Etídio**

- Solução estoque: 10 mg/mL em água destilada.
- Concentração final de uso: 0,5 µg/mL.
- Armazenada ao abrigo da luz, à temperatura ambiente.

#### **Solução de Brometo de Etídio livre de RNase**

- Solução estoque: 10 mg/mL em água Milli-Q livre de RNase.
- Concentração final de uso: 0,5 µg/mL.
- Armazenada ao abrigo da luz, à temperatura ambiente.

#### **4.5. Solução de dietilpirocarbonato**

- DEPC (Sigma Aldrich) 0,1% (v/v)

#### **4.6. Antibióticos e soluções utilizadas na seleção de clones transformantes**

##### **Ampicilina**

- Solução estoque: 100 mg/mL em água destilada.
- Concentração final de uso: 100 µg/mL.
- Esterilizada por filtração e armazenada ao abrigo da luz, a -20°C.

##### **Cloreto de Cálcio**

- Cloreto de cálcio 100 mM
- Água destilada
- Solução esterilizada por filtração e armazenada a 4°C.

##### **IPTG**

- Solução estoque: 200 mg/mL de IPTG em água destilada.
- Solução esterilizada por filtração e armazenada a -20°C.

##### **X-Gal**

- Solução estoque: 20 mg/mL de X-Gal em N,N-Dimetilformamida.
- Armazenada a -20°C, ao abrigo da luz.

#### **4.7. Soluções para os testes de adesão e de infecção de células HeLa**

##### **PBS**

Para 1 litro de solução:

- NaCl 8,00 g
- KCl 0,20 g
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,50 g
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,20 g
- Água destilada qsp 1 L
- pH final 7,2.

- Esterilizar por filtração.

### **PBS glicosado**

Para 1 litro de solução:

- NaCl 8,00 g
- KCl 0,20 g
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 2,16 g
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,20 g
- glicose 1,00 g
- Água destilada qsp 1 L
- pH final 7,4.
- Esterilizar por filtração.
- Armazenar a 4°C.

### **Solução estoque de EDTA dissódico**

Para 50 mL de solução:

- EDTA 6,30 g
- Água destilada qsp 50 mL
- pH final 7,0
- Esterilizar por filtração.
- Armazenar a 4°C.

### **Solução estoque de tripsina**

Para 100 mL de solução:

- Tripsina 5,00 g
- Água destilada qsp 100 mL
- Ajustar o pH para 7,8.
- Deixar uma noite a 4°C e reajustar o pH para 7,6.
- Esterilizar por filtração.
- Estocar a -20°C.

### **Solução para repique de células HeLa**

Para 20 mL de PBS glicosado, adicionar:

- 800 µL da solução estoque de tripsina

- 160  $\mu$ L da solução estoque de EDTA dissódico

#### **Triton X-100**

- Triton X-100 0,3% (v/v)
- Diluir em água Milli-Q

### **4.8. Soluções para a Microscopia Eletrônica de Varredura**

#### **Solução estoque de paraformaldeído 10%**

Para 100 mL de solução:

- Adicionar 10 g de paraformaldeído a 90 mL de água destilada.
- Aquecer a 60°C e dissolver com o auxílio de uma bailarina.
- Ainda quente, adicionar NaOH 0,1 M até clarear parcialmente a solução.
- Esperar esfriar.
- Filtrar.
- pH final 7,2.
- Adicionar água destilada qsp 100 mL.
- Estocar a -20°C.

#### **Solução estoque de glutaraldeído**

A solução é comercializada a 25%. O estoque é mantido a -20°C, na concentração originalmente adquirida.

#### **Solução estoque de tampão cacodilato de sódio**

Para 100 mL de solução:

- Cacodilato de sódio (0,2 M final) 4,28 g
- Água destilada qsp 100 mL
- pH final 7,2 - 7,4.
- 

#### **Solução de fixador primário**

- Glutaraldeído 2%
- Paraformaldeído 2%
- Sacarose 3%
- Tampão cacodilato de sódio pH 7,2 - 7,4 0,1 M



- CaCl<sub>2</sub> 5 mM

### **Pós-fixador (tetróxido de ósmio e ferrocianeto de potássio)**

Mistura de tetróxido de ósmio e ferrocianeto de potássio 1:1 (v/v), que deve ser preparada no momento do uso contando-se as gotas de cada solução gotejadas sobre o material.

#### **A. Ferrocianeto de potássio 1,6%**

- Ferrocianeto de potássio 1,60 g
- CaCl<sub>2</sub> 10 mM
- Tampão cacodilato de sódio pH 7,3 0,2 M
- Água destilada qsp 100 mL
- Estocar a 4°C.

#### **B. Tetróxido de ósmio 2%**

- Preparar a solução 2% em água destilada previamente fervida.
- Guardar na capela, ao abrigo da luz.

## **5. Enzimas**

- Deoxyribonuclease I – 1 U/μL (Invitrogen)
- Elongase<sup>®</sup> (Invitrogen)
- ImProm-II<sup>™</sup> Reverse Transcriptase – 1 U/μL (Promega)
- Recombinant RNasin<sup>®</sup> Ribonuclease Inhibitor – 40 U/μL (Promega)
- *Taq* DNA polimerase – 5U/μL (Invitrogen)
- *Taq* DNA polimerase – 5U/μL (Phoneutria)
- *Taq* DNA polimerase – 5U/μL (Cenbiot)

## **6. Marcadores de massa molecular (MM)**

**1 kb DNA Ladder** (Promega – N° de catálogo: G5711) - fragmentos de 250/253, 500, 750, 1.000, 1.500, 2.000, 2.500, 3.000, 4.000, 5.000, 6.000, 8.000 e 10.000 pares de bases.

**High DNA Mass Ladder** (Invitrogen – N° de catálogo: 10496-016) - fragmentos de 1.000, 2.000, 3.000, 4.000, 6.000 e 10.000 pares de bases.

**TTSS Ladder 1** (Laboratório de Microbiologia - Universidade de Brasília) - fragmentos de 556, 758, 856, 1.088, 1.278, 1.510 e 2.130 pares de bases, correspondentes a genes do sistema de secreção tipo III (TTSS) da linhagem E2346/69 de *Escherichia coli*.

**TTSS Ladder 2** (Laboratório de Microbiologia - Universidade de Brasília) - fragmentos de 556, 826, 994, 1.088, 1.278, 1.510, 1.926, 2.130 pares de bases, correspondentes a genes do sistema de secreção tipo III (TTSS) da linhagem E2346/69 de *Escherichia coli*.

**TTSS Ladder 3** (Laboratório de Microbiologia - Universidade de Brasília) - fragmentos de 556, 856, 1.088, 1.278, 1.510 e 2.130 pares de bases, correspondentes a genes do sistema de secreção tipo III (TTSS) da linhagem E2346/69 de *Escherichia coli*.

## 7. Kits utilizados

- “Deoxyribonuclease I, Amplification Grade”, Invitrogen
- “DNeasy Blood & Tissue Kit”, Qiagen
- “DYEnamic™ ET Dye Terminator Kit”, GE Healthcare
- Elongase® Enzyme Mix (Invitrogen)
- “FlexiPrep™ Kit”, Amersham Pharmacia Biotech
- “HiYield™ Plasmid Mini Kit YPD 100”, Real Genomics
- “ImProm-II™ Reverse Transcription System”, Promega
- “pGEM®-T Easy Vector System I”, Promega
- “TRIzol® Reagent”, Invitrogen
- “Wizard® Genomic DNA Purification Kit”, Promega
- “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System”, Promega

## 8. Manutenção da linhagens bacterianas

As linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho foram armazenadas a -20°C em meio LB contendo 35% de glicerol.

## **9. Extração de DNA para a realização de experimentos de PCR**

### **9.1. Cultivo das linhagens bacterianas**

Alíquotas de 100 µL dos estoques de células foram inoculadas em 5 mL de meio LB e incubadas em estufa a 37°C, por cerca de 16 horas. A partir das culturas crescidas foi então extraído o DNA total a ser utilizado como molde nos ensaios de PCR, para a amplificação de prováveis genes TTSS de DAEC.

### **9.2. Extração de DNA total**

A extração de DNA foi realizada com os kits “Wizard® Genomic DNA Purification Kit” (Promega) ou “DNeasy Blood & Tissue Kit” (Qiagen), segundo as instruções dos fabricantes, ou ainda utilizando o protocolo de extração com fenol (baseado em Sambrook *et al.*, 2000) descrito a seguir.

1. Transferir cerca de 1,5 mL da cultura crescida por cerca de 16 horas para um tubo tipo eppendorf e centrifugar a 3.500 g por 3 minutos. Descartar o sobrenadante.
2. Repetir o procedimento descrito no item 1.
3. Ressuspender o sedimento em 200 µL de tampão TE.
4. Adicionar 10 µL de lisozima e incubar no gelo por 10 minutos.
5. Adicionar 200 µL de fenol hidratado.
6. Homogeneizar em vórtex duas vezes por 4 segundos.
7. Centrifugar a 3.500 g por 6 minutos.
8. Coletar a fase aquosa e transferir para um tubo novo.
9. Adicionar 200 µL de clorofil.
10. Homogeneizar suavemente por meio de repetidas inversões do tubo.
11. Centrifugar a 6.220 g por 6 minutos.
12. Transferir a fase aquosa para um tubo novo.
13. Adicionar NaCl para uma concentração final de 0,3 M.
14. Homogeneizar suavemente por meio de repetidas inversões do tubo.
15. Adicionar 2,5 volumes de etanol 100% gelado.
16. Homogeneizar suavemente por repetidas inversões do tubo.

17. Incubar durante a noite a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
18. Centrifugar a 16.430 g por 20 minutos.
19. Descartar o sobrenadante.
20. Lavar o sedimento com 500  $\mu\text{L}$  de etanol 70% gelado.
21. Centrifugar a 16.430 g por 20 min.
22. Descartar o sobrenadante.
23. Deixar o sedimento secar.
24. Ressuspender em 50  $\mu\text{L}$  de Tris-HCl 10 mM pH 7,5.
25. Armazenar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **9.3. Extração de DNA plasmidial**

O DNA plasmidial dos clones transformados foi extraído com os kits “FlexiPrep™ Kit” (Amersham Pharmacia Biotech) e “HiYield™ Plasmid Mini Kit YPD 100” (Real Genomics). O protocolo de extração com o kit “FlexiPrep™ Kit” foi modificado a partir das instruções do fabricante e, resumidamente, consiste em:

1. Transferir 1,5 mL da cultura crescida por cerca de 16 horas para um tubo do tipo eppendorf e centrifugar por 1 minuto a 4.760 g.
2. Remover o maior volume possível de sobrenadante por aspiração.
3. Ressuspender o sedimento em 200  $\mu\text{L}$  de solução I e homogeneizar vigorosamente.
4. Adicionar 200  $\mu\text{L}$  de solução II e misturar por inversão do tubo.
5. Adicionar 200  $\mu\text{L}$  de solução III e misturar por inversão do tubo.
6. Centrifugar por 10 minutos a 9.720 g.
7. Transferir o sobrenadante cuidadosamente para um tubo novo.
8. Adicionar 1 mL de etanol 100% gelado e misturar por inversão do tubo. Armazenar a  $-20^{\circ}\text{C}$  por cerca de 16 horas.
9. Centrifugar por 25 minutos a 14.000 g e descartar o sobrenadante.
10. Adicionar 1 mL de etanol 70% gelado.
11. Centrifugar por 25 minutos a 14.000 g.
12. Descartar o etanol 70%, esperar o sedimento secar e ressuspender em 30  $\mu\text{L}$  de Tris-HCl 2 mM pH 7,5.

## **10. Extração de RNA**

### **10.1. Cultivo das linhagens bacterianas e indução da expressão dos genes TTSS**

Alíquotas de 100  $\mu$ L dos estoques de células da EPEC E2348/69 e dos isolados C39 e C74 de DAEC foram inoculadas em meio LB e incubadas a 37°C por cerca de 16 horas, sob agitação. A seguir, 100  $\mu$ L de cada cultura foram transferidos para tubos de rosca contendo 10 mL de LB tamponado com Tris-HCl 0,1 M pH 7,5 e crescidos a 37°C sob agitação, a fim de induzir a expressão dos genes TTSS (Kenny *et al.*, 1997). Uma amostra de cada isolado foi retirada do agitador nos seguintes tempos: 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3,5 horas e 5 horas.

### **10.2. Extração**

Imediatamente após à retirada das culturas crescidas em LB tamponado do agitador, entre 5 e 8 mL de células foram centrifugados em tubos de 2 mL do tipo eppendorf, a 1.550 g por cinco minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e as células coletadas armazenadas a -20°C, até que todas as culturas de todos os tempos de indução fossem centrifugadas.

Em seguida, procedeu-se à extração de RNA utilizando o kit “TRIzol® Reagent” (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Os RNAs dos tempos de 30 minutos e 1 hora foram ressuspensos em 30  $\mu$ L de água Milli-Q; os de 2 horas em 40  $\mu$ L e os de 3,5 e 5 horas em 50  $\mu$ L.

### **10.3. Tratamento dos RNAs extraídos com DNase I**

A fim de eliminar o DNA contaminante, o volume total dos RNAs extraídos foi tratado com DNase I livre de RNase, empregando o kit “Deoxyribonuclease I, Amplification Grade” (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. A eficácia do tratamento foi comprovada por meio de um experimento de PCR utilizando os iniciadores N1 e N2, direcionados ao gene da ATPase do TTSS.

O EDTA utilizado para inativar a DNase foi eliminado pela precipitação do RNA. À cada amostra foram adicionados acetato de sódio para uma concentração final de 0,3 M e

três volumes de etanol 100%, ao que se seguiu incubação por cerca de 16 horas a -20°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4°C por 20 minutos a 12.000 g, lavadas com 500 µL de etanol 75%, e novamente centrifugadas sob as mesmas condições. A lavagem com etanol 75% foi repetida e as amostras foram centrifugadas a 4°C por 10 minutos a 12.000 g.

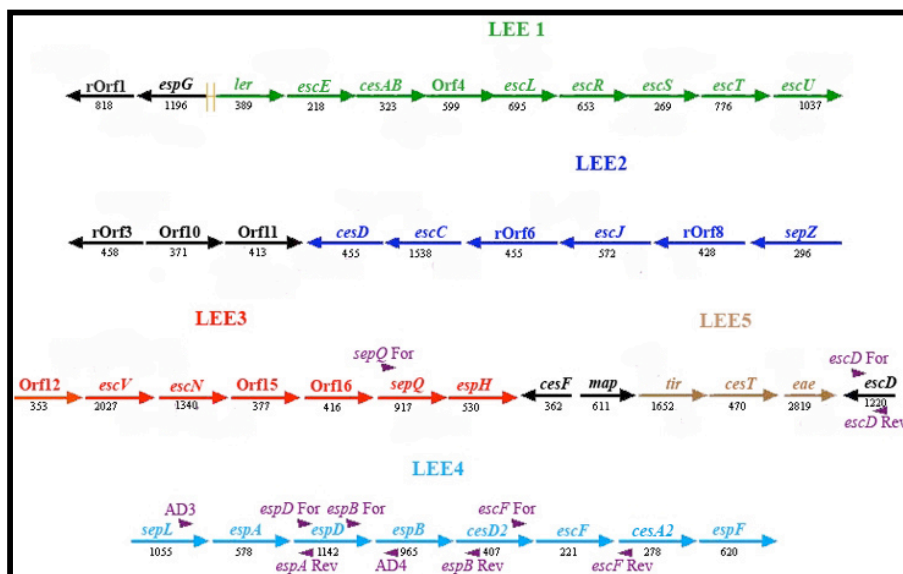
## 11. Ensaio de PCR para a amplificação de prováveis genes TTSS de DAEC

Neste trabalho os ensaios de PCR foram realizados sob diversas condições, a fim de obter uma melhor eficiência com cada um dos pares de iniciadores empregados. Nesta seção serão descritas as condições gerais empregadas.

A primeira etapa consistiu na definição e síntese dos iniciadores, que são apresentados na Tabela 2. Os iniciadores foram desenhados com o auxílio do programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>), utilizando os genes TTSS da linhagem E2348/69 de EPEC como moldes (Figura 9).

**Tabela 2.** Iniciadores utilizados nos experimentos de PCR.

Iniciador	Sequência	Tm	Gene-alvo	Produto esperado
AD3 espA REV	5' CAT GCT AAG AAA GAT TAT GAA GAG GT 3'	52°C	<i>espA</i>	634 pb
espD FOR	5' ACA TTA AGC ATA GTT ATC TCC GG 3'			
AD4 espB FOR	5' CCT TAT CTT TCT CAG GTG AAT AAC G 3'	60°C	<i>espD</i>	866 pb
espB REV	5' GAT AGT ATT CAT AAT AAA CGC CTC TTT A 3'			
escF FOR	5' TGC GCG AGT GAA TAT CCG 3'	46°C	<i>espB</i>	1.103 pb
escF REV	5' CCT TCT GTA TTG TGT ACC C 3'			
escD FOR	5' AAA CAG AAG ACG GAA TTT GG 3'	58°C	<i>escF</i>	358 pb
escD REV	5' AGC TAC AGC CGC CCA C 3'			
sepQ FOR	5' GCG GGA GAT GTT GAT ACC AT 3'	50°C	<i>escD</i>	997 pb
escD REV	5' ATT TTG GAT TGA TGG GCA AC 3'			
sepQ FOR	5' ATT ACG TCC GAA GGT CAT GC 3'	54-60°C	<i>sepQ</i>	?
escD REV	5' ATT TTG GAT TGA TGG GCA AC 3'			
N1	5' CGC CTT TTA CAA GAT AGA AC 3'	51°C	<i>escN</i>	856 pb
N2	5' CAT CAA GAA TAG AGC GGA C 3'			
GAP F	5' GTT CAC GCT ACT ACC GCT AC 3'	52°C	GAPDH	253 pb
GAP R	5' GCT TTG ATC TGC TCG TAA GT 3'			



**Figura 9.** Esquema do LEE de EPEC E2348/69, utilizado como molde na síntese dos iniciadores. As setas indicam cada gene e seu tamanho em pares de bases. Os iniciadores estão representados em roxo, na posição aproximada onde ocorre o anelamento com o gene-alvo.

Os experimentos foram realizados nos termocicladores PTC-100 (MJ Research) e, no caso das PCRs com gradiente de temperatura, PCR Express (Thermo Hybaid). Após a combinação de todos os componentes listados nas Tabelas 3 e 4, água Milli-Q foi adicionada a fim de ajustar o volume para 30 (*Taq* DNA polimerase; Tabela 3) ou 50  $\mu$ L (Elongase<sup>®</sup>; Tabela 4). Os ensaios empregando a enzima Elongase<sup>®</sup> foram realizados de acordo com as instruções do fabricante.

**Tabela 3.** Componentes utilizados nos ensaios de PCR com a *Taq* DNA polimerase.

Componente	Concentração final
DNA	50 ng / reação
Tampão de reação	1X
MgCl <sub>2</sub>	1,5 – 2,5 mM
Iniciador A	0,3 $\mu$ M
Iniciador B	0,3 $\mu$ M
dNTPs	0,2 mM
<i>Taq</i> DNA polimerase	1,5 ou 2,0 U / reação

As seguintes condições foram empregadas nos ensaios de PCR com a *Taq* DNA polimerase:

1. Desnaturação a 95°C / 2 minutos
2. Desnaturação a 95°C / 1 minuto

3. Anelamento a 46 - 60°C / 1 minuto
4. Extensão a 72°C / 2 minutos
5. Repetição das etapas 2 a 4 por 34 vezes
6. Extensão a 72°C / 5 minutos
7. Manutenção a 4°C

**Tabela 4.** Componentes utilizados nos ensaios de PCR com a enzima Elongase<sup>®</sup>. A quantidade dos tampões A e B varia de acordo com o concentração desejada de Mg<sup>2+</sup>.

Componente	Concentração final
DNA	150 ng / reação
Tampão A (5X)	5 / 3 / 0 mM
Tampão B (5X)	5 / 7 / 10 mM
Mg <sup>2+</sup>	1,5 / 1,7 / 2,0 mM
Iniciador A	0,2 µM
Iniciador B	0,2 µM
dNTP mix	0,2 mM
Elongase <sup>®</sup>	1,5 ou 2 µL

Nos experimentos de PCR com a enzima Elongase<sup>®</sup>, as seguintes condições foram empregadas:

1. Desnaturação a 94°C / 30 ou 45 segundos
2. Desnaturação a 94°C / 30 ou 45 segundos
3. Anelamento a 54°C - 60°C / 30 ou 45 segundos
4. Extensão a 68°C / 9 ou 11 minutos
5. Repetição das etapas 2 a 4 por 35 vezes
6. Manutenção a 4°C

## 12. PCR dos DNAs plasmidiais extraídos com os iniciadores Universal e Reverso

Com a finalidade de verificar a integridade dos insertos clonados no vetor pGEM<sup>®</sup>-T Easy, foram realizados experimentos de PCR com os iniciadores Universal e Reverso. Os componentes empregados nessas PCRs e suas concentrações finais são apresentados na Tabela 5.



**Tabela 5.** Componentes utilizados nos ensaios de PCR com os DNAs plasmidiais.

Componente	Concentração final
DNA	1 µL / reação
Tampão de reação	1X
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
Iniciador Universal	0,2 µM
Iniciador Reverso	0,2 µM
dNTPs	0,2 mM
<i>Taq</i> DNA polimerase	2,0 U / reação

As seguintes condições de PCR foram empregadas:

1. Desnaturação a 94°C / 3 minutos
2. Desnaturação a 94°C / 2 minutos
3. Anelamento a 50°C / 1 minuto
4. Extensão a 72°C / 2 minutos
5. Repetição das etapas 2 a 4 por 38 vezes
6. Extensão a 72°C / 5 minutos
7. Manutenção a 4°C

### 13. Transcrição reversa dos RNAs extraídos e PCRs empregando o cDNA gerado

#### 13.1. Síntese da fita de cDNA

A transcrição reversa (RT-PCR) empregando os RNAs extraídos conforme descrito no item 10 foi realizada com o kit “ImProm-II™ Reverse Transcription System” (Promega), segundo as instruções do fabricante (Tabela 6). O volume final de cada reação foi 20 µL.

**Tabela 6.** Componentes utilizados nos ensaios de RT-PCR.

Componente	Concentração final
RNA experimental	1 µg / reação
Random Primer	0,5 µg / reação
Água livre de nucelase qsp 20 µL	-
ImProm-II™ 5X Reaction Buffer	1X
MgCl <sub>2</sub>	6 mM
dNTP mix	0,5 mM
Recombinant Rnasin® Ribonuclease Inhibitor	20 U / reação
ImProm-II™ Reverse Transcriptase	1 µL / reação

### **13.2. Ensaios de PCR para amplificação do cDNA produzido por RT-PCR**

Cerca de 4,5 µL de cada cDNA produzido foram utilizados nos ensaios de PCR com os pares de iniciadores AD3 / espA REV, espD FOR / AD4, espB FOR / espB REV e escF FOR / escF REV, a fim de verificar se os prováveis genes TTSS *espA*, *espD*, *espB* e *escF* de DAEC são transcritos. As mesmas condições descritas no item 11 para as reações de amplificação com a enzima *Taq* DNA Polimerase foram empregadas nesses experimentos.

### **14. Análise dos produtos de PCR e das amostras extraídas de DNA total, RNA e DNA plasmidial por eletroforese em gel de agarose**

Os produtos das reações de PCR (empregando DNA ou cDNA como molde) e as amostras extraídas de DNA total, RNA total e DNA plasmidial foram analisadas por meio de eletroforese em gel de agarose. Os géis foram preparados com 0,8 - 1,0% (p/v) de agarose em tampão TEB 1X ou TAE 1X, e posteriormente corados com brometo de etídio a uma concentração final de 0,5 µg/mL. Ao fim da corrida, os géis foram analisados e fotografados sob luz ultra-violeta (UV-B  $\lambda = \pm 295 \text{ nm}$ ).

Para os géis de RNA, a vidraria, as espátulas e as tiras de papel alumínio, utilizadas na pesagem da agarose e na dissolução do pó no tampão TAE 1X, foram deixadas em estufa a 180°C por cerca de 24 horas antes de seu uso, a fim de garantir a inativação das RNases. A cuba de eletroforese e seus acessórios foram previamente tratados com uma solução de DEPC 0,1%, também com o objetivo de inativar RNases.

### **15. Clonagem dos produtos amplificados por PCR no vetor pGEM<sup>®</sup>-T Easy**

Os fragmentos amplificados nos ensaios de PCR foram purificados com o kit “Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega), quantificados com o auxílio do equipamento GeneQuant pro RNA/DNA Calculator (Amersham Pharmacia) e posteriormente clonados no vetor pGEM<sup>®</sup>-T Easy, de acordo com as instruções do fabricante. Cerca de 5 µL dos sistemas de ligação foram utilizados para transformar células das linhagens DH5 $\alpha$ <sup>™</sup> (Invitrogen) ou XL-10 Gold<sup>™</sup> (Stratagene).

## **16. Transformação de *Escherichia coli* por choque térmico**

### **16.1. Transformação de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup>**

Um volume de 50  $\mu$ L do estoque da linhagem DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup> de *E. coli* foi inoculado em 5 mL de LB e incubado a 37°C em agitador rotatório, durante a noite (pré-inóculo). Na manhã seguinte, 300  $\mu$ L do pré-inóculo foram transferidos para 30 mL de LB e incubados sob agitação, a 37°C, até a cultura atingir de 0,2 a 0,3 de Abs<sub>660</sub> (cerca de  $2 \times 10^7$  células/mL). A seguir, as células foram centrifugadas a 4.000 g, por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspense em 15 mL de solução gelada de CaCl<sub>2</sub> 100 mM. As células ressuspensas foram mantidas no gelo por 20 minutos, e posteriormente centrifugadas a 2.000 g, por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi novamente descartado, e o sedimento ressuspense em 1 mL de solução gelada de CaCl<sub>2</sub> 100 mM.

A 100  $\mu$ L dessas células tratadas foram adicionados 5  $\mu$ L do sistema de ligação, com posterior incubação a 0°C por 30 minutos. O choque térmico consistiu na transferência desse sistema do gelo para uma estufa a 37°C, onde foi incubado por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 1 mL de LB e a cultura foi novamente incubada a 37°C por 1 hora.

A semeadura foi realizada utilizando esferas de vidro estéreis, em placas de LA contendo 100  $\mu$ g/mL do antibiótico ampicilina, que foram então incubadas a 37°C durante a noite. Colônias brancas referentes a cada inserto foram inoculadas em LB contendo ampicilina e posteriormente submetidas à extração de DNA plasmidial.

### **16.2. Transformação de *Escherichia coli* XL-10 Gold<sup>TM</sup>**

Este procedimento foi similar àquele empregado para a linhagem DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup>, exceto pelo choque térmico, que foi realizado a 42°C.

## **17. Sequenciamento automático dos produtos obtidos por PCR utilizando como molde DNA total ou DNA plasmidial extraído dos clones transformados**

Os fragmentos amplificados por PCR e os DNAs plasmidiais extraídos dos clones transformados foram purificados com o kit “Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega). As amostras resultantes foram então quantificadas por espectrofotometria com o

equipamento “GeneQuant pro RNA/DNA Calculator” (Amersham Pharmacia), ou pela análise por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8% utilizando o marcador de massa molecular “High DNA Mass Ladder” (Invitrogen). Cerca de 150 a 200 ng de DNA foram utilizados na reação de sequenciamento nos sentidos *forward* e *reverse*, com os mesmos iniciadores empregados nas reações de PCR.

As sequências nucleotídicas foram deduzidas por sequenciamento automático em capilar, utilizando o sequenciador MegaBACE 500 e o kit “DYEnamic™ ET Dye Terminator Kit” (GE Healthcare). A qualidade das bases resultantes foi avaliada pelo eletroferograma gerado e pelo programa Phred (Ewing *et al.*, 1998). Quando mais de uma sequência foi obtida para um mesmo fragmento de DNA, um *contig* foi construído a fim de obter uma sequência consenso.

As análises de identidade foram realizadas com o auxílio dos programas BLAST e FASTA, disponíveis nos endereços eletrônicos <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> e <http://www.ebi.ac.uk/fasta33>, respectivamente. Os alinhamentos das sequências geradas com alguns de seus homólogos foram realizados utilizando o algoritmo ClustalW, implementado na versão 11.0.4 do programa MacVector (MacVector, Inc).

Com algumas exceções, apenas as bactérias contendo homólogos de todos os prováveis genes de DAEC analisados neste trabalho depositados no banco de dados GenBank foram incluídas nas tabelas de análise de identidade, apresentadas para cada provável gene de DAEC.

## **18. Análises filogenéticas**

A sequência de cada provável gene TTSS de DAEC foi submetida aos programas BLAST e FASTA, visando buscar homólogos de espécies bacterianas evolutivamente relacionadas. Os números de acesso dos organismos cujas sequências foram coletadas no banco de dados GenBank estão listados na Tabela 7. O genoma de alguns dos organismos apresentados na Tabela 7 foi completamente sequenciado, no entanto, para a maioria apenas as sequências dos genes TTSS são conhecidas. O alinhamento desses homólogos com os prováveis genes de DAEC foi gerado pelo algoritmo ClustalW (Thompson *et al.*, 1994), implementado no programa BioEdit (Hall, 1999).

Árvores filogenéticas foram construídas a partir dos alinhamentos, a fim de avaliar em qual clado genético as DAEC investigadas se agrupam. As análises filogenéticas foram realizadas pelo método de máxima parcimônia utilizando o programa MEGA 4.0 (Tamura *et*

al., 2007), e o modelo evolutivo escolhido foi Kimura 2 parâmetros (Kimura, 1980). Os *gaps* e as bases não sequenciadas - *missing data* - foram considerados na análise. A árvore filogenética inicial foi gerada pela adição randômica das sequências (10 replicatas) e, em seguida, as árvores mais parcimoniosas foram obtidas pelo algoritmo *Close Neighbor Interchange* (Nei & Kumar, 2000). A confiabilidade dos ramos foi inferida a partir de 1.000 rearranjos aleatórios - *bootstrap* - da matriz gerada pelo alinhamento (Felsenstein, 1985), e somente os ramos com valor igual ou superior a 50% foram considerados na árvore consenso (Major rule = 50). As árvores filogenéticas foram construídas com o auxílio do TreeExplorer, implementado no próprio MEGA 4.0.

**Tabela 7.** Linhagens bacterianas cujos genes TTSS foram coletados do banco de dados GenBank para análises de identidade e construção de árvores.

Nº de acesso	Organismo	Origem
AB426060	EPEC O111:H- linhagem B171-1	humana
AE005174	EHEC O157:H7 linhagem EDL933	bovina
AF022236	EPEC O127:H7 linhagem E2348/69	humana
AF200363	EPEC O15:H- linhagem RDEC-1	cunicular
AF311901	<i>Citrobacter rodentium</i> linhagem DBS100	murina
AJ277443	STEC O26:H linhagem 413/89-1	bovina
AJ303141	STEC O103:H2 linhagem RW 1374	bovina
AP010953	EHEC O26:H11 linhagem 11368	humana
AP010958	EHEC O103:H2 linhagem 12009	humana
BA000007	EHEC O157:H7 linhagem Sakai	humana
EU871627	EPEC O55:H7 linhagem EDS-58	-
EU871628	EHEC O145:H- linhagem 33264	humana
FM201463	DA-EPEC O26:K60 linhagem B6	humana
FM201464	DA-EPEC O128:H2 linhagem 9812	humana
FM986650	<i>E. coli</i> linhagem DEC8A	-
FM986651	<i>E. coli</i> linhagem IHIT 1190	-
FM986652	<i>E. coli</i> linhagem 537/89	-
AP010960	EHEC O111:H- linhagem 11128	humana
AF020808	<i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium</i> linhagem SL1344	-
AJ224892	<i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium</i> linhagem LT2	-

## 19. Microscopia Eletrônica

### 19.1. Cultivo das linhagens bacterianas para Microscopia Eletrônica

Alíquotas de 100 µL dos estoques de células foram inoculadas em 5 mL de meio LB tamponado e crescidas por cerca de 16 horas a 37°C, sob agitação. Posteriormente, 50 µL de

cada cultura foram transferidos para 450  $\mu$ L de DMEM tamponado e incubados por 3 horas a 37°C sob agitação, com a finalidade de induzir a expressão dos genes TTSS.

## 19.2. Teste de adesão de células HeLa em meio abiótico

O teste de adesão das células HeLa foi realizado segundo o seguinte protocolo:

1. Cultivar as células HeLa até o estado de semi-confluência em 5 mL de DMEM 1X suplementado com 5% de soro fetal bovino, em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.
2. Descolar as células HeLa das paredes da garrafa de cultivo da seguinte maneira:
  - Descartar o meio antigo vertendo a garrafa de cultivo;
  - Lavar a garrafa três vezes com cerca de 2 a 3 mL da solução para repique de células HeLa, deixando uma fina camada sobre as células após a terceira lavagem;
  - Colocar a garrafa com a rosca frouxamente fechada em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, por 10 minutos ou até que as células descolem da parede.
3. Adicionar 1 mL de DMEM 1X e homogeneizar.
4. Calcular a concentração celular por contagem em Câmara de Neubauer.
5. De acordo com a concentração celular encontrada e a concentração final desejada ( $0,8 \times 10^5$  células por mL), definir o volume da cultura a ser diluído em DMEM 1X de maneira a depositar em torno de 0,6 mL em cada poço da placa de titulação.
6. Colocar uma lamínula de vidro de dimensões 13  $\times$  13 mm em cada poço da placa de titulação a ser utilizado. As lamínulas de vidro devem ser previamente lavadas da seguinte maneira:
  - ferver em solução de água destilada contendo 1% de detergente Extran;
  - enxaguar com água destilada fervente;
  - adicionar à solução aquosa 4% de etanol e 1% de ácido acético glacial;
  - lavar com água destilada;
  - lavar com acetona P.A.;
  - secar em forno a 60°C;
  - guardar as lamínulas empilhadas e intercaladas com papel-filtro.

7. Homogeneizar e repicar sobre as lamínulas os 0,6 mL definidos no item 5.
8. Incubar por 48 horas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, para a formação de monocamada aderida.

### **19.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

#### **A. Infecção de células HeLa**

O teste de infecção de células HeLa para a MET foi realizado segundo o seguinte protocolo:

1. Retirar o DMEM da placa de titulação e lavar a monocamada de células HeLa três vezes com 400 µL de PBS por lavagem.
2. Adicionar 400 µL de DMEM tamponado.
3. Adicionar 100 µL da cultura de bactérias à monocamada de células HeLa.
4. Para sincronizar a infecção, centrifugar a placa de titulação por 3 minutos a 1.000 g, em centrífuga refrigerada.
5. Lavar as células infectadas três vezes com 500 µL de PBS em cada lavagem, para remover as bactérias não aderidas.
6. Adicionar 400 µL de DMEM tamponado e homogeneizar.
7. Incubar por 20 ou 45 minutos.
8. Retirar o DMEM e adicionar 700 µL de PBS.
9. Interromper a infecção por lise das células HeLa. Adicionar:
  - 250 µL de solução de tripsina 4% e incubar por 5 minutos.
  - 250 µL de Triton X-100 0,3% e homogeneizar.
10. Coletar todo o material do poço da placa de titulação e transferir para um tubo do tipo eppendorf.
11. Centrifugar a 870 g por 5 minutos a 4°C, para remover o lisado de células HeLa.
12. Descartar o sobrenadante.
13. Adicionar 1 mL de PBS para lavar as bactérias.
14. Centrifugar a 870 g por 5 minutos a 4°C.

## **B. Purificação dos filamentos de EspA**

O protocolo de purificação dos filamentos de EspA foi adaptado de Daniell e colaboradores (2003), e consiste em:

1. Ressuspender o sedimento contendo as bactérias em 100  $\mu$ L de PBS.
2. Separar os filamentos de EspA do restante do TTSA por passagem da solução através de uma agulha 25 gauge, pelo menos 3 vezes.
3. Remover as bactérias por centrifugação a 870 g por 5 minutos e visualizar o sobrenadante em microscópio eletrônico de transmissão.

## **C. Processamento das amostras e análise ao microscópio**

Uma gota de cada amostra foi pingada sobre uma telinha de cobre coberta por um filme de formvar, e deixada à temperatura ambiente por cerca de 15 minutos. Em seguida, foi realizada a contrastação negativa do material com acetato de uranila 3% por 5 minutos. As amostras assim processadas foram analisadas ao microscópio MET JEOL JEM 1011 do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Virologia da Universidade de Brasília, gentilmente cedido pela Prof<sup>ª</sup>. Dra. Sônia Nair Bão. A voltagem de operação utilizada foi 80 kV.

## **19.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

### **A. Infecção de células HeLa**

O teste de infecção de células HeLa para MEV foi realizado segundo o seguinte protocolo:

1. Retirar o DMEM da placa de titulação e lavar a monocamada de células HeLa três vezes com 400  $\mu$ L de PBS por lavagem.
2. Adicionar 400  $\mu$ L de DMEM tamponado.
3. Adicionar as bactérias à cultura subconfluente de células HeLa. Utilizar 20 ou 40  $\mu$ L de bactérias por mL de células HeLa (adaptado de Knutton *et al.*, 1987).
4. Para sincronizar a infecção, centrifugar a placa contendo as bactérias e as células HeLa por 3 minutos a 1.000 g, em centrífuga refrigerada.



5. Lavar as células infectadas cinco vezes com 500  $\mu\text{L}$  de PBS em cada lavagem, a fim de remover as bactérias não aderidas.
6. Adicionar 400  $\mu\text{L}$  de DMEM tamponado e homogeneizar.
7. Incubar por 15, 30 ou 45 minutos.
8. Descartar o meio de cultura.
9. Lavar duas vezes com 500  $\mu\text{L}$  de PBS e verificar se as bactérias ainda se encontram bem aderidas e espalhadas, a fim de garantir uma pequena espessura de material a ser analisado.

## **B. Processamento das amostras e análise ao microscópio**

As amostras foram fixadas com a solução de fixador primário por cerca de 14 horas a  $4^{\circ}\text{C}$  e, após lavagem com tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pós-fixadas com tetróxido de ósmio e ferrocianeto de potássio em proporção 1:1 (v/v), por uma hora. A desidratação foi realizada pela imersão das lamínulas em soluções com concentrações crescentes de etanol (30, 50, 70, 90 e 100%). Em seguida, as amostras foram submetidas à secagem ao ponto crítico com o equipamento Balzers CPD 030 e à pulverização com ouro por 120 segundos. As lamínulas foram então analisadas ao microscópio Zeiss DSM 962 do Laboratório de Microscopia Eletrônica da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), gentilmente cedido por Ana Claudia Guerra de Araujo. As voltagens de operação utilizadas foram 10 e 11 kV.

## **20. Microscopia de Força Atômica**

### **20.1. Cultivo das linhagens bacterianas**

As DAEC C39 e C74, o controle positivo EPEC E2348/69 e o controle negativo K-12 foram crescidos em meio LB por cerca de 16 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, 100  $\mu\text{L}$  de cada cultura foram transferidos para 5 mL de LB tamponado, onde as bactérias cresceram por 45 minutos ou uma hora e meia em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$ , sob agitação.

## **20.2. Preparação das amostras**

Após a indução da expressão dos genes TTSS, as culturas crescidas foram centrifugadas a 870 g por 5 minutos para baixar as células. Descartou-se o sobrenadante resultante e o sedimento foi lavado três vezes com água Milli-Q. A seguir, cerca de 10 µL de cada cultura foram pipetados sobre lamínulas de vidro pré-tratadas com poli-L-lisina, e as amostras secaram durante uma noite à temperatura ambiente em dessecador acoplado à bomba de vácuo TE-058 (Tecnal).

## **20.3. Análise ao microscópio de força atômica**

A obtenção de imagens das bactérias aderidas às lamínulas de vidro foi realizada com o microscópio SPM-9600 (Shimadzu) do Laboratório de Espectrometria de Massa da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), gentilmente cedido pelo Dr. Luciano Paulino da Silva. O conjunto cantilever/ponteira empregado foi o modelo PPP-NCHR-20, da Nanosensors. O cantilever é do tipo retangular, recoberto por alumínio, e apresenta 125 µm de comprimento, frequência de ressonância de 320 kHz e constante de mola de 42 N/m. Sua ponteira de silício é piramidal, com raio menor que 10 nm. As amostras foram analisadas utilizando o modo dinâmico de operação e o modo fase de aquisição, com taxa de varredura de 1 Hz e resolução de 512 pixels/linha. O processamento das imagens obtidas foi realizado com o auxílio do programa WSxM 5.0 Develop 1.3, da Nanotec Electronica S.L.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. Detecção de prováveis genes TTSS de DAEC

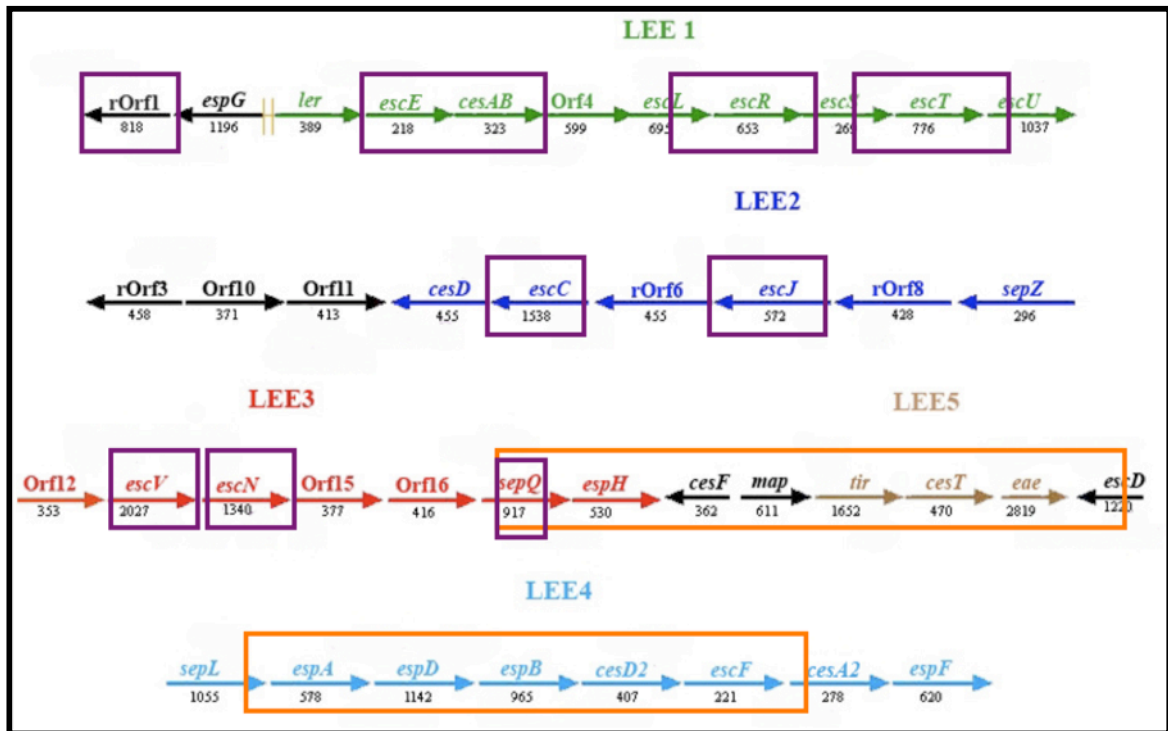
#### 1.1. Definição dos genes a serem amplificados

Tendo em vista que a presença de genes TTSS é um forte indício de virulência para bactérias Gram-negativas (Stuber *et al.*, 2002), nosso grupo de pesquisa, coordenado pela Profª. Dra. Cynthia Maria Kyaw, iniciou a busca por prováveis genes TTSS de DAEC, identificando alguns dos mais conservados entre os diferentes TTSS (Deng *et al.*, 2004; Pallen *et al.*, 2005): *escR*, *escT*, *escC*, *escJ*, *escV*, *escN* e *sepQ* (Kyaw *et al.*, 2003; Kyaw, 2004; Lorenzoni, 2009), além de *rOrf1*, *escE* e *cesAB*. Uma vez que as sequências já identificadas encontram-se nos operons LEE1, LEE2 e LEE3 e na região a montante de LEE1, neste trabalho foram escolhidos genes do operon LEE4 e da região entre LEE3 e LEE4 para a síntese de iniciadores, a serem utilizados em experimentos de PCR (Figura 10).

Os genes do operon LEE4 escolhidos para a síntese de iniciadores foram *espA*, que codifica o filamento da agulha do TTSA (Knutton *et al.*, 1998); *espB* e *espD*, cujos produtos formam o poro de translocação que é inserido na célula hospedeira (Ide *et al.*, 2001), e *escF*, o gene que codifica a agulha propriamente dita (Wilson *et al.*, 2001).

Além desses genes LEE4, optou-se por caracterizar ainda a região que se encontra entre *sepQ* e *escD* (Figura 10). Como as DAEC não possuem os genes *eae*, *tir*, *cesT*, os quais constituem o operon LEE5 de EPEC, nem os genes que codificam as proteínas efetoras EspH e Map, localizados entre LEE3 e LEE5, é possível que essa região contenha genes das proteínas efetoras de DAEC.

O gene *escD*, localizado entre os operons LEE5 e LEE4 (Figura 10) e para o qual também foram sintetizados iniciadores, codifica uma provável proteína de membrana interna, e seu mutante em EHEC e em EPEC é incapaz de montar o TTSA e de secretar as proteínas EspA, EspB e EspD e o efector Tir (Kresse *et al.*, 1998; Ogino *et al.*, 2006). Conforme pode ser observado na Figura 6, a proteína EscD interage com o anel da membrana externa, formado pela proteína EscC (Ogino *et al.*, 2006).



**Figura 10.** Representação esquemática da PAI LEE da EPEC prototípica E2348/69, utilizada como modelo para a identificação de regiões e genes correspondentes em DAEC. Os prováveis genes TTSS de DAEC já identificados por nosso grupo de pesquisa estão destacados em roxo, e as regiões que são objeto de investigação deste trabalho estão destacadas em laranja.

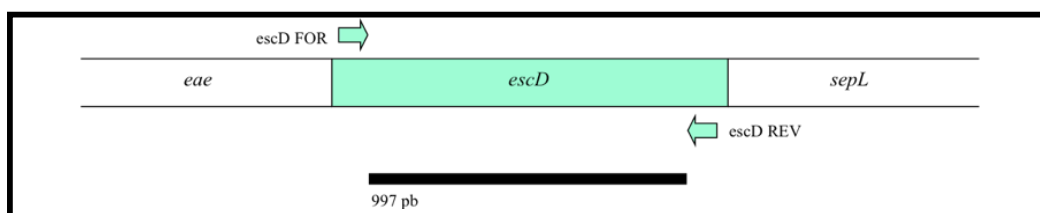
## 1.2. Síntese dos iniciadores

Após a definição dos genes a serem amplificados por PCR, os iniciadores apresentados na Tabela 2 foram desenhados com o auxílio do programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>), utilizando a sequência da PAI LEE da EPEC E2348/69 como molde.

Como os genes *espA*, *espD*, *espB*, *escF* e *escD* são mais conservados entre os diferentes TTSS que os genes das proteínas efetoras, pelo fato de codificarem componentes estruturais do TTSA (Pallen *et al.*, 2005), esperava-se que os tamanhos dos produtos amplificados com os pares de iniciadores direcionados a cada um deles fossem semelhantes aos dos respectivos homólogos da EPEC E2348/69. Por outro lado, a combinação de iniciadores *sepQ* FOR / *escD* REV foi utilizada com a finalidade de amplificar genes de supostos efetores de DAEC e, portanto, o tamanho do fragmento esperado deveria ser diferente daquele do produto obtido para a EPEC.

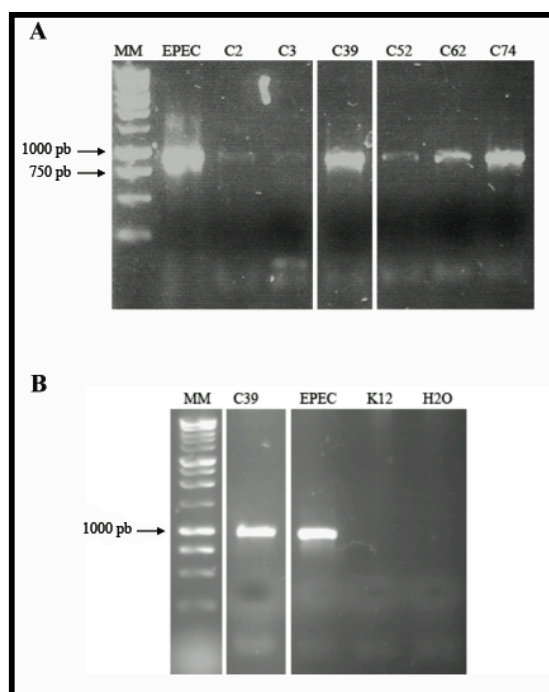
### 1.3. Identificação e caracterização do provável gene *escD* de DAEC

A presença de um provável gene que codifica a proteína de membrana interna EscD em DAEC foi investigada por meio de experimentos de PCR com os iniciadores *escD* FOR e *escD* REV. O fragmento amplificado por esse par de iniciadores utilizando DNA do controle EPEC E2348/69 como molde apresenta 997 pb (Figura 11).



**Figura 11.** Local de anelamento dos iniciadores *escD* FOR e *escD* REV no LEE da EPEC E2348/69. O fragmento esperado de 997 pb é representado por uma barra.

Embora tenham sido obtidos produtos empregando DNA dos isolados C2, C3, C39, C52, C62 e C74 de DAEC como molde, apenas o resultado de C39 mostrou-se reprodutível (Figura 12).



**Figura 12.** Perfis eletroforéticos dos produtos de PCR obtidos com os iniciadores *escD* FOR e *escD* REV. Fragmentos do tamanho esperado foram amplificados empregando-se DNA dos isolados C2, C3, C39, C52, C62 e C74 de DAEC como molde, e também do controle positivo EPEC E2348/69. Não houve amplificação nos controles negativos K-12 e água (B). As setas apontam para as bandas de interesse do marcador de massa molecular (MM) 1 kb DNA Ladder.

O fato da mesma quantidade de DNA ter sido utilizada para todos os isolados levanta a hipótese de que a variação da  $T_m$  ideal entre as DAEC testadas depende de outros fatores, tais como diferenças em seus genomas. Essas diferenças, se confirmadas, seriam uma forte evidência a favor da heterogeneidade desse patotipo, já observada por Lopes e colaboradores em 2005.

A fim de gerar um banco dos prováveis genes TTSS de C39, amplificados com alta eficiência nos experimentos de PCR descritos nesta e nas próximas seções, foi realizada a clonagem e a transformação dos fragmentos obtidos com os iniciadores *escD* FOR e *escD* REV. Além disso, a clonagem também permitiria o sequenciamento dos insertos com os iniciadores Universal e Reverso, possibilitando assim a obtenção de sua sequência completa, o que nem sempre ocorre com os produtos lineares de PCR.

Os produtos amplificados a partir do DNA do isolado C39 foram ligados ao vetor de clonagem pGEM<sup>®</sup>-T Easy e utilizados para transformar células de *E. coli* da linhagem DH5 $\alpha$ <sup>™</sup>. Após a transformação, algumas colônias brancas contendo o plasmídeo com o inserto clonado foram selecionadas e submetidas à extração de DNA plasmidial, mas somente uma das extrações foi bem sucedida. Com o objetivo de verificar a integridade e a homogeneidade do inserto, o DNA plasmidial dessa extração foi então utilizado em experimentos de PCR com os iniciadores Universal e Reverso.

O DNA plasmidial e os produtos da PCR originados do isolado C39 foram purificados, quantificados e submetidos ao sequenciamento automático no Laboratório de Biologia Molecular da UnB. Com o auxílio do programa Phred gerou-se um *contig* formado por duas sequências correspondentes a insertos clonados e duas diretamente derivadas de PCR.

O *contig* gerado, com 997 pb de extensão, foi submetido a análises de identidade empregando os programas BLAST e FASTA. Os resultados obtidos revelaram que dois genes de EHEC (uma de origem bovina e outra de origem humana, Tabela 8) apresentavam maior grau de identidade com o provável *escD* de C39. Em contrapartida, as linhagens prototípicas de EPEC e de EHEC (E2348/69 e EDL933, respectivamente), bem como a linhagem DBS100 *C. rodentium*, cujo modelo de infecção é muito utilizado para estudar a lesão A/E (Deng *et al.*, 2004), possuíam homólogos com menor grau de identidade em relação à sequência parcial do *escD* de C39.

**Tabela 8.** Análise de identidade do provável gene *escD* do isolado C39 de DAEC.

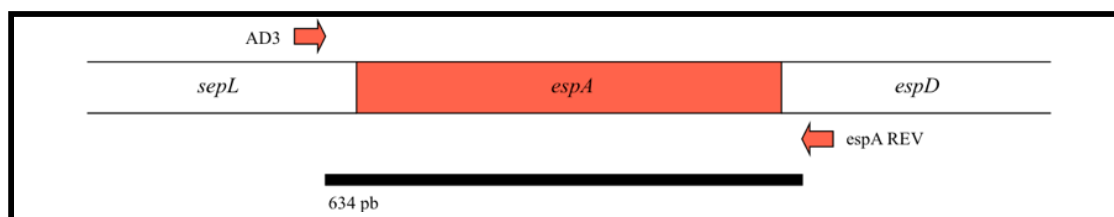
Gene	Nº de acesso	Organismo	Origem	Identidade	Query coverage*	E-value**
<i>escD</i>	AJ303141	STEC O103:H2 RW 1374	bovina	99,80%	100%	0
<i>escD</i>	AP010958	EHEC O103:H2 12009	humana	99,80%	100%	0
<i>escD</i>	AF200363	EPEC O15:H <sup>-</sup> RDEC-1	cunicular	99,30%	100%	0
<i>escD</i>	AP010953	EHEC O26:H11 11368	humana	99,30%	100%	0
<i>escD</i>	FM201463	DA-EPEC O26:K60 B6	humana	99,30%	100%	0
<i>escD</i>	AJ277443	STEC O26:H 413/89-1	bovina	99,20%	100%	0
<i>escD</i>	AB426060	EPEC O111:H <sup>-</sup> B171-1	humana	99,10%	100%	0
<i>escD</i>	FM201464	DA-EPEC O128:H2 9812	humana	99,10%	100%	0
<i>escD</i>	FM986652	<i>E. coli</i> 537/89	-	95,00%	100%	1,2e <sup>-202</sup>
<i>escD</i>	AE005174	EHEC O157:H7 EDL933	humana	94,90%	100%	2,2e <sup>-202</sup>
<i>ECs4558</i>	BA000007	EHEC O157:H7 Sakai	humana	94,90%	100%	2,2e <sup>-202</sup>
<i>escD</i>	FM986651	<i>E. coli</i> IHIT 1190	-	94,90%	100%	3,2e <sup>-202</sup>
<i>escD</i>	EU871627	EPEC O55:H7 EDS-58	-	94,90%	100%	3,8e <sup>-202</sup>
<i>escD</i>	FM986650	<i>E. coli</i> DEC8A	-	94,80%	100%	8,5e <sup>-202</sup>
<i>escD</i>	AP010960	EHEC O111:H <sup>-</sup> 11128	humana	94,80%	100%	5,9e <sup>-202</sup>
<i>escD</i>	EU871628	EHEC O145:H <sup>-</sup> 33264	humana	94,60%	100%	6,5e <sup>-201</sup>
<i>escD</i>	AF022236	EPEC O127:H7 E2348/69	humana	93,70%	100%	4,1e <sup>-197</sup>
<i>rCR9</i>	AF311901	<i>C. rodentium</i> DBS100	murina	88,30%	100%	1,4e <sup>-174</sup>

\*Query coverage: representa a extensão da sequência investigada que apresenta identidade com a sequência de outro organismo.

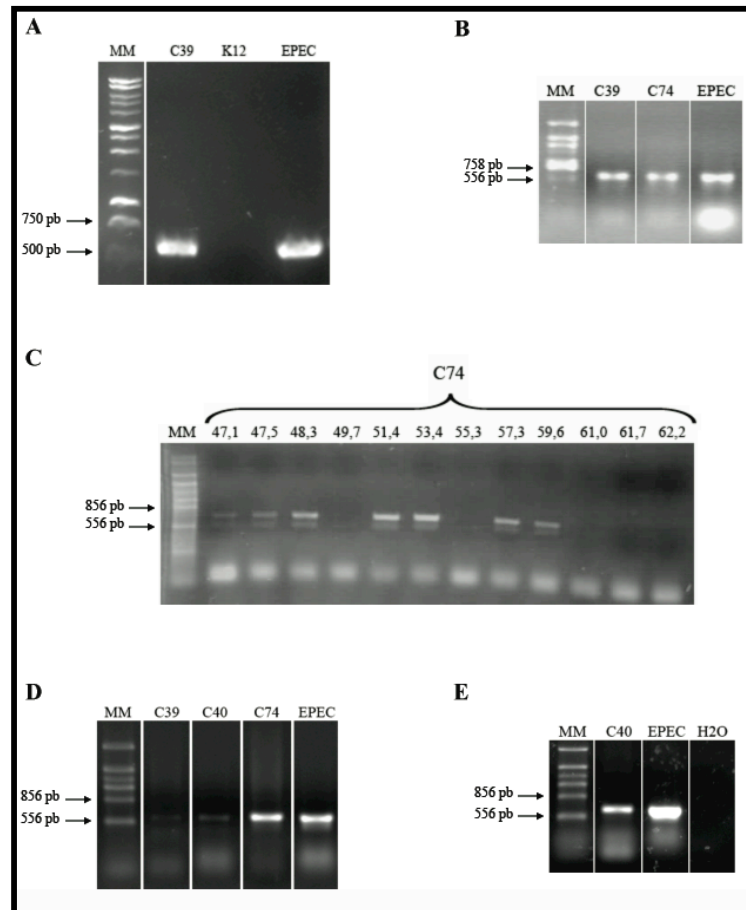
\*\*E-value: indica a probabilidade dos alinhamentos obtidos serem casuais.

#### 1.4. Identificação e caracterização de prováveis genes *espA* de DAEC

O gene *espA* do LEE de EPEC, EHEC e *C. rodentium* codifica a proteína EspA, que forma bainha filamentosa que liga a agulha do TTSS aos translocadores inseridos na membrana da célula hospedeira (Knutton *et al.*, 1998). A fim de amplificar um possível homólogo de DAEC, os iniciadores AD3 e *espA* REV (Figura 13) foram empregados em vários experimentos de PCR, cujos perfis eletroforéticos dos produtos resultantes são apresentados na Figura 14.



**Figura 13.** Local de anelamento dos iniciadores AD3 e *espA* REV no LEE de EPEC. O fragmento esperado da amplificação, de 634 pares de bases, está representado pela barra.



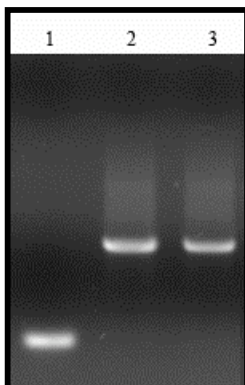
**Figura 14.** Perfis eletroforéticos dos produtos de PCR obtidos com o par de iniciadores AD3 e *espA* REV. Fragmentos de tamanho esperado foram amplificados com o DNA dos isolados C39 (A, B, D), C40 (D, E) e C74 (B, C, D) de DAEC, e também com o controle positivo EPEC E2348/69. Os números acima dos poços do gel (C) indicam a temperatura de anelamento (°C) utilizada na PCR de gradiente. Não houve amplificação nos controles negativos K-12 (A) e água (E). As setas indicam as bandas de interesse dos marcadores de massa molecular (MM) 1 kb DNA Ladder (A), TTSS Ladder 1 (B), TTSS Ladder 2 (C) e TTSS Ladder 3 (D e E).

Conforme pode ser observado na Figura 14, produtos de tamanho esperado foram obtidos a partir do DNA de C39, C40 e C74, sugerindo a existência de prováveis genes *espA* nesses isolados de DAEC. Devido à baixa reprodutibilidade dos resultados obtidos para C2, C3, C52 e C62 nos experimentos em busca do gene *escD*, apenas os isolados C39 e C74 foram utilizados nas primeiras PCRs com os iniciadores AD3 e *espA* REV. Ainda assim, foi necessária a realização de uma PCR com gradiente de temperatura, a fim de otimizar a temperatura de anelamento para C74 (Figura 14 C). Posteriormente, tentou-se amplificar um possível *espA* do isolado C40, tendo em vista que tal isolado apresentava prováveis genes TTSS mais semelhantes àqueles de EPEC E2348/69 (Kyaw, 2004).

Como o provável *espA* de C39 foi o único amplificado com alto rendimento, apenas os fragmentos de PCR obtidos a partir desse isolado foram ligados ao vetor de clonagem e



utilizados na transformação de células DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup>. Três colônias brancas foram então escolhidas e submetidas à extração de DNA plasmidial. O DNA extraído de cada clone foi utilizado em experimentos de PCR com os iniciadores Universal e Reverso (Figura 15), com a finalidade de verificar a integridade dos insertos clonados. A Figura 15 revela que provavelmente apenas os clones 2 e 3 continham um plasmídeo com o inserto de tamanho esperado.



**Figura 15.** Perfil eletroforético dos produtos de amplificação com os iniciadores Universal e Reverso. Como moldes foram empregados os DNAs plasmidiais extraídos das células transformadas. Os números localizados acima de cada poço do gel correspondem aos nomes dos clones.

Os produtos de PCR amplificados a partir do DNA dos isolados C39, C40 e C74, bem como o DNA plasmidial extraído dos clones 2 e 3 transformados com o provável *espA* de C39 foram purificados, quantificados e submetidos ao sequenciamento automático. A partir das sequências obtidas foram gerados *contigs*, os quais foram utilizados em análises de identidade, cujos resultados estão agrupados nas Tabelas 9, 10 e 11.

#### 1.4.1. Provável *espA* do isolado C39

O provável gene *espA* do isolado C39 de DAEC está completo, apresenta 579 pb de extensão e foi gerado a partir de cinco sequências independentes; três correspondentes a insertos clonados e duas diretamente derivadas de PCR. Sua sequência é idêntica à dos homólogos das linhagens RW 1374 e 12009 de EHEC (Tabela 9), e foi depositada no GenBank sob o número de acesso EU715409.

**Tabela 9.** Análise de identidade do provável gene *espA* do isolado C39 de DAEC.

Gene	N° de acesso	Organismo	Origem	Identidade	Query coverage*	E-value**
<i>espA</i>	AJ303141	STEC O103:H2 RW 1374	bovina	100,00%	100%	3e <sup>-150</sup>
<i>espA</i>	AP010958	EHEC O103:H2 12009	humana	100,00%	100%	1,5e <sup>-143</sup>
<i>espA</i>	AY223511	STEC O49:H12 NV92	bovina	97,90%	100%	1,1e <sup>-143</sup>
<i>espA</i>	AP010953	EHEC O26:H11 11368	humana	95,00%	100%	3,7e <sup>-136</sup>
<i>espA</i>	FM201463	DA-EPEC O26:K60 B6	humana	95,00%	100%	7,1e <sup>-136</sup>
<i>espA</i>	FM201464	DA-EPEC O128:H2 9812	humana	95,00%	100%	7,3e <sup>-136</sup>
<i>espA</i>	AB426060	EPEC O111:H <sup>-</sup> B171-1	humana	95,00%	100%	6,4e <sup>-136</sup>
<i>espA</i>	AJ277443	STEC O26:H 413/89-1	bovina	95,00%	100%	7,1e <sup>-136</sup>
<i>espA</i>	AF200363	EPEC O15:H <sup>-</sup> RDEC-1	cunicular	95,00%	100%	8,3e <sup>-136</sup>
<i>espA</i>	AF022236	EPEC O127:H7 E2348/69	humana	88,60%	100%	1,4e <sup>-117</sup>
<i>espA</i>	AJ225019	EPEC O55:H6	ovina	88,40%	100%	1,8e <sup>-116</sup>
<i>espA</i>	AP010960	EHEC O111:H <sup>-</sup> 11128	humana	87,73%	100%	1,9e <sup>-115</sup>
<i>espA</i>	FM986650	<i>E. coli</i> DEC8A	-	87,70%	100%	3,5e <sup>-115</sup>
<i>espA</i>	FM986651	<i>E. coli</i> IHIT 1190	-	87,60%	100%	1,1e <sup>-114</sup>
<i>espA</i>	FM986652	<i>E. coli</i> 537/89	-	87,40%	100%	3,2e <sup>-114</sup>
<i>espA</i>	EU871628	EHEC O145:H <sup>-</sup> 33264	humana	85,80%	100%	9,9e <sup>-110</sup>
<i>espA</i>	EU871627	EPEC O55:H7 EDS-58	-	85,50%	100%	1,0e <sup>-108</sup>
<i>ECs4556</i>	BA000007	EHEC O157:H7 Sakai	humana	85,50%	100%	6,3e <sup>-109</sup>
<i>espA</i>	AE005174	EHEC O157:H7 EDL933	humana	85,50%	100%	6,3e <sup>-109</sup>
<i>Cr24</i>	AF311901	<i>C. rodentium</i> DBS100	murina	83,80%	100%	8,4e <sup>-104</sup>

\*Query coverage: representa a extensão da sequência investigada que apresenta identidade com a sequência de outro organismo.

\*\*E-value: indica a probabilidade dos alinhamentos obtidos serem casuais.

#### 1.4.2. Provável *espA* do isolado C40

Apesar da localização dos iniciadores AD3 e *espA* REV permitir a amplificação do gene *espA* completo (Figura 13), o provável *espA* obtido do isolado C40 está incompleto. Partindo do pressuposto de que seu tamanho é o mesmo dos homólogos encontrados na EPEC E2348/69 e nos isolados C39 e C74 de DAEC (579 pb), faltariam as 72 bases finais da sequência. Esse resultado poderia ser explicado pelo fato do *contig* do provável *espA* de C40 ter sido formado por apenas duas sequências, cujas bases a jusante não apresentavam boa qualidade.

A análise de identidade do provável *espA* de C40 revelou 99,20% de identidade com o gene *espA* da EPEC E2348/69. Índice semelhante foi obtido com a EPEC ovina O55:H6, cujo *espA* possui 99% de bases idênticas à sequência de C40. Pode-se supor, no entanto, que a identidade com o gene da EPEC E2348/69 seja de 100%, uma vez que as bases distintas entre os dois homólogos (Figura 16) não podem ser facilmente identificadas nos

eletroferogramas das sequências que originaram o *contig* do possível *espA*, devido à baixa qualidade do sequenciamento dessa região.

Os resultados das análises de identidade com o provável *espA* de C40 são bastante diferentes daqueles obtidos com os outros dois isolados de DAEC (Tabelas 9 e 11). Os possíveis *espA* de C39 e C74 exibem maior similaridade com genes *espA* de várias outras linhagens de *E. coli* que com *espA* das EPEC E2348/69 e O55:H6. No caso de C39, observa-se 88,60 e 88,40% de identidade, respectivamente e, para C74 os valores correspondem a 91,00 e 90,80%, respectivamente.

**Tabela 10.** Análise de identidade do provável gene *espA* do isolado C40 de DAEC.

Gene	Nº de acesso	Organismo	Origem	Identidade	Query coverage*	E-value**
<i>espA</i>	AF022236	EPEC O127:H7 E2348/69	humana	99,20%	100,00%	8,6e <sup>-123</sup>
<i>espA</i>	AJ225019	EPEC O55:H6	ovina	99,00%	100,00%	2,8e <sup>-121</sup>
<i>espA</i>	AP010960	EHEC O111:H <sup>-</sup> 11128	humana	92,40%	100,00%	2,4e <sup>-106</sup>
<i>espA</i>	FM986650	<i>E. coli</i> DEC8A	-	92,40%	100,00%	3,7e <sup>-106</sup>
<i>espA</i>	FM986652	<i>E. coli</i> 537/89	-	92,20%	100,00%	1,0e <sup>-105</sup>
<i>espA</i>	FM986651	<i>E. coli</i> IHIT 1190	-	92,00%	100,00%	3,2e <sup>-105</sup>
<i>espA</i>	AP010953	EHEC O26:H11 11368	humana	89,60%	100,00%	9,3e <sup>-100</sup>
<i>espA</i>	AB426060	EPEC O111:H <sup>-</sup> B171-1	humana	89,60%	100,00%	1,2e <sup>-99</sup>
<i>espA</i>	AJ277443	STEC O26:H 413/89-1	bovina	89,60%	100,00%	1,4e <sup>-99</sup>
<i>espA</i>	FM201463	DA-EPEC O26:K60 B6	humana	89,60%	100,00%	1,4e <sup>-99</sup>
<i>espA</i>	FM201464	DA-EPEC O128:H2 9812	humana	89,60%	100,00%	1,5e <sup>-99</sup>
<i>espA</i>	AF200363	EPEC O15:H <sup>-</sup> RDEC-1	cunicular	89,60%	100,00%	1,7e <sup>-99</sup>
<i>espA</i>	AP010958	EHEC O103:H2 12009	humana	87,10%	100,00%	1,2e <sup>-93</sup>
<i>espA</i>	AJ303141	STEC O103:H2 RW 1374	bovina	87,10%	100,00%	1,4e <sup>-93</sup>
<i>espA</i>	EU715409	DAEC O11:H0	humana	87,10%	100,00%	1,3e <sup>-92</sup>
<i>espA</i>	AY223511	STEC O49:H12 NV92	bovina	86,50%	100,00%	3,4e <sup>-91</sup>
<i>cr24</i>	AF311901	<i>C. rodentium</i> DBS100	murina	83,70%	100,00%	2,1e <sup>-85</sup>
<i>espA</i>	EU871628	EHEC O145:H <sup>-</sup> 33264	humana	83,10%	100,00%	5,1e <sup>-84</sup>
<i>espA</i>	EU871627	EPEC O55:H7 EDS-58	-	82,90%	100,00%	1,6e <sup>-83</sup>
<i>ECs4556</i>	BA000007	EHEC O157:H7 Sakai	humana	82,70%	100,00%	2,6e <sup>-83</sup>
<i>espA</i>	AE005174	EHEC O157:H7 EDL933	humana	82,70%	100,00%	2,6e <sup>-83</sup>

\*Query coverage: representa a extensão da sequência investigada que apresenta identidade com a sequência de outro organismo.

\*\*E-value: indica a probabilidade dos alinhamentos obtidos serem casuais.

### 1.4.3. Provável *espA* do isolado C74

O provável gene *espA* da DAEC C74, assim como o homólogo de C39, está completo e possui 579 pares de bases de extensão. Este *contig* foi gerado a partir de sete sequências independentes, todas diretamente derivadas de PCR. Sua sequência é 100% idêntica à de

genes homólogos de oito linhagens de EHEC, EPEC e DA-EPEC de diversas origens, algumas das quais são apresentadas na Tabela 11.

**Tabela 11.** Análise de identidade do provável gene *espA* do isolado C74 de DAEC.

Gene	Nº de acesso	Organismo	Origem	Identidade	Query coverage*	E-value**
<i>espA</i>	AP010953	EHEC O26:H11 11368	humana	100,00%	100,00%	3,1e <sup>-148</sup>
<i>espA</i>	AB426060	EPEC O111:H <sup>-</sup> B171-1	humana	100,00%	100,00%	4,0e <sup>-148</sup>
<i>espA</i>	AJ277443	STEC O26:H 413/89-1	bovina	100,00%	100,00%	4,5e <sup>-148</sup>
<i>espA</i>	FM201463	DA-EPEC O26:K60 B6	humana	100,00%	100,00%	4,5e <sup>-148</sup>
<i>espA</i>	FM201464	DA-EPEC O128:H2 9812	humana	100,00%	100,00%	4,6e <sup>-148</sup>
<i>espA</i>	AF200363	EPEC O15:H <sup>-</sup> RDEC-1	cunicular	100,00%	100,00%	5,3e <sup>-148</sup>
<i>espA</i>	AP010958	EHEC O103:H2 12009	humana	95,00%	100,00%	6,7e <sup>-135</sup>
<i>espA</i>	AJ303141	STEC O103:H2 RW 1374	bovina	95,00%	100,00%	7,6e <sup>-135</sup>
<i>espA</i>	EU715409	DAEC O11:H0	humana	95,00%	100,00%	4,9e <sup>-134</sup>
<i>espA</i>	AY223511	STEC O49:H12 NV92	bovina	95,00%	100,00%	4,9e <sup>-134</sup>
<i>espA</i>	AF022236	EPEC O127:H7 E2348/69	humana	91,00%	100,00%	2,0e <sup>-123</sup>
<i>espA</i>	AJ225019	EPEC O55:H6	ovina	90,80%	100,00%	2,6e <sup>-122</sup>
<i>espA</i>	AP010960	EHEC O111:H <sup>-</sup> 11128	humana	90,50%	100,00%	3,4e <sup>-122</sup>
<i>espA</i>	FM986650	<i>E. coli</i> DEC8A	-	90,50%	100,00%	4,8e <sup>-122</sup>
<i>espA</i>	FM986652	<i>E. coli</i> 537/89	-	90,20%	100,00%	4,4e <sup>-121</sup>
<i>espA</i>	FM986651	<i>E. coli</i> IHIT 1190	-	90,00%	100,00%	1,4e <sup>-120</sup>
<i>espA</i>	EU871628	EHEC O145:H <sup>-</sup> 33264	humana	87,70%	100,00%	3,5e <sup>-114</sup>
<i>Ecs4556</i>	BA000007	EHEC O157:H7 Sakai	humana	87,60%	100,00%	7,0e <sup>-114</sup>
<i>espA</i>	AE005174	EHEC O157:H7 EDL933	humana	87,60%	100,00%	7,0e <sup>-114</sup>
<i>espA</i>	EU871627	EPEC O55:H7 EDS-58	-	87,60%	100,00%	1,1e <sup>-113</sup>
<i>cr24</i>	AF311901	<i>C. rodentium</i> DBS100	murina	86,20%	100,00%	4,3e <sup>-109</sup>

\*Query coverage: representa a extensão da sequência investigada que apresenta identidade com a sequência de outro organismo.

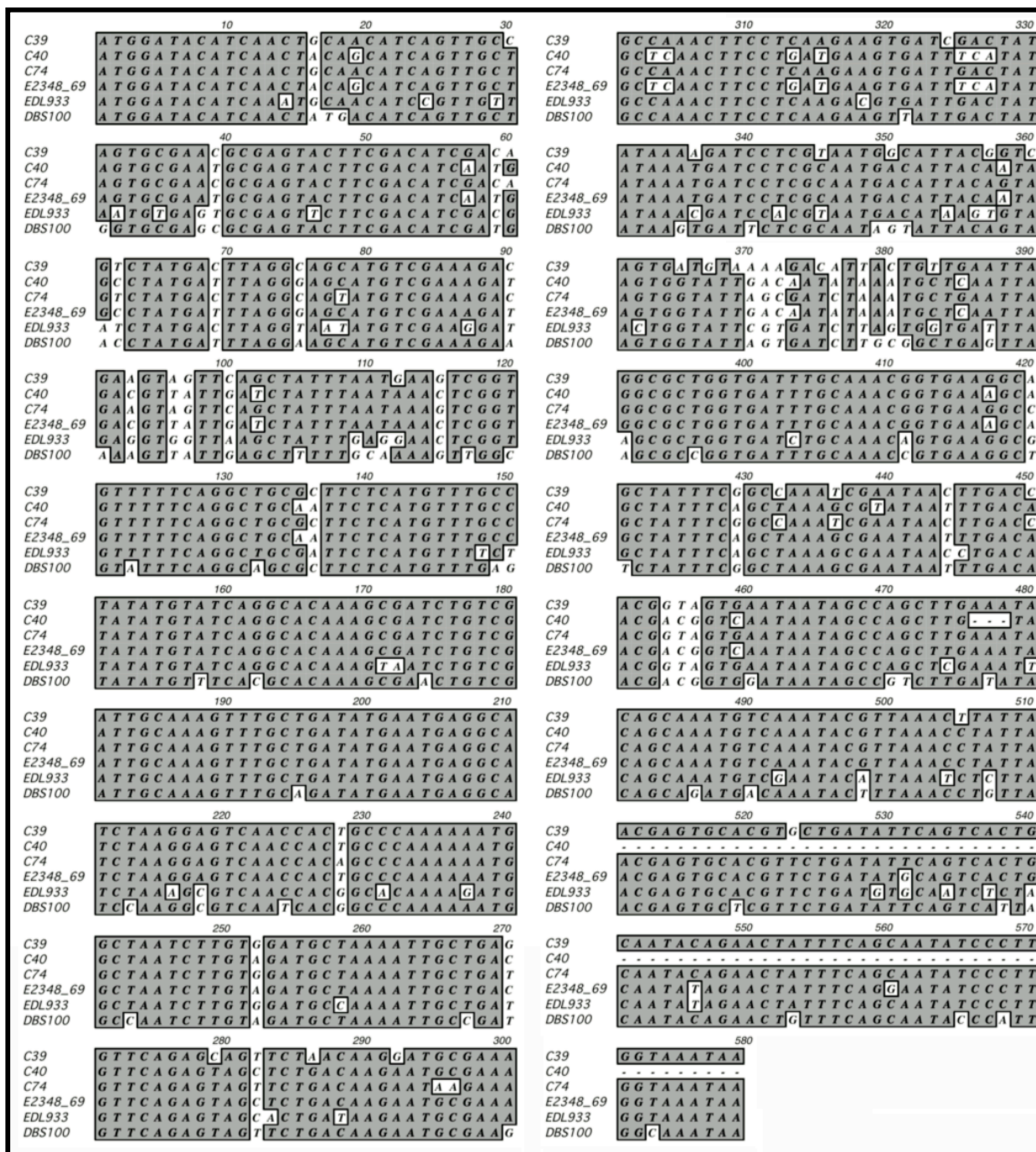
\*\*E-value: indica a probabilidade dos alinhamentos obtidos serem casuais.

Conforme mencionado anteriormente, os genes que codificam as proteínas formadoras da base do complexo-agulha são muito conservados. Os genes que codificam a adesina intimina (*eae*), seu receptor Tir (*tir*), e as proteínas secretadas EspA, EspB e EspD (*espA*, *espB* e *espD*, respectivamente), por sua vez, são bastante variáveis (China *et al.*, 1999; Bertin *et al.*, 2004; Garrido *et al.*, 2006). Diversas combinações dessas variantes são conhecidas, e algumas são mais comumente associadas a linhagens patogênicas do que a linhagens comensais (China *et al.*, 1999). Assim sendo, a tipagem dos alelos *eae*, *tir* e *esp* é uma ferramenta importante para diagnósticos de rotina e estudos epidemiológicos e clonais. Atualmente, 16 variantes de *eae*, quatro variantes de *tir* e de *espA* e três variantes de *espD* e *espB* já foram identificadas (China *et al.*, 1999; Bertin *et al.*, 2004; Garrido *et al.*, 2006).

As proteínas EspA de E2348/69, RDEC-1 e EDL933 pertencem às variantes  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , respectivamente (China *et al.*, 1999; Garrido *et al.*, 2006). A proteína predita a partir da variante do gene *espA* descrita por Bertin e colaboradores em 2004 apresenta 92% de identidade com EspA $\beta$  de RDEC-1, 82% de identidade com EspA $\alpha$  de E2348/69 e 80% de identidade com EspA $\gamma$  de EDL933, e foi denominada EspA $\beta$ v. Essa variante é encontrada nas linhagens de STEC bovina NV92 (O49:H12) e NV220 (O103:H2).

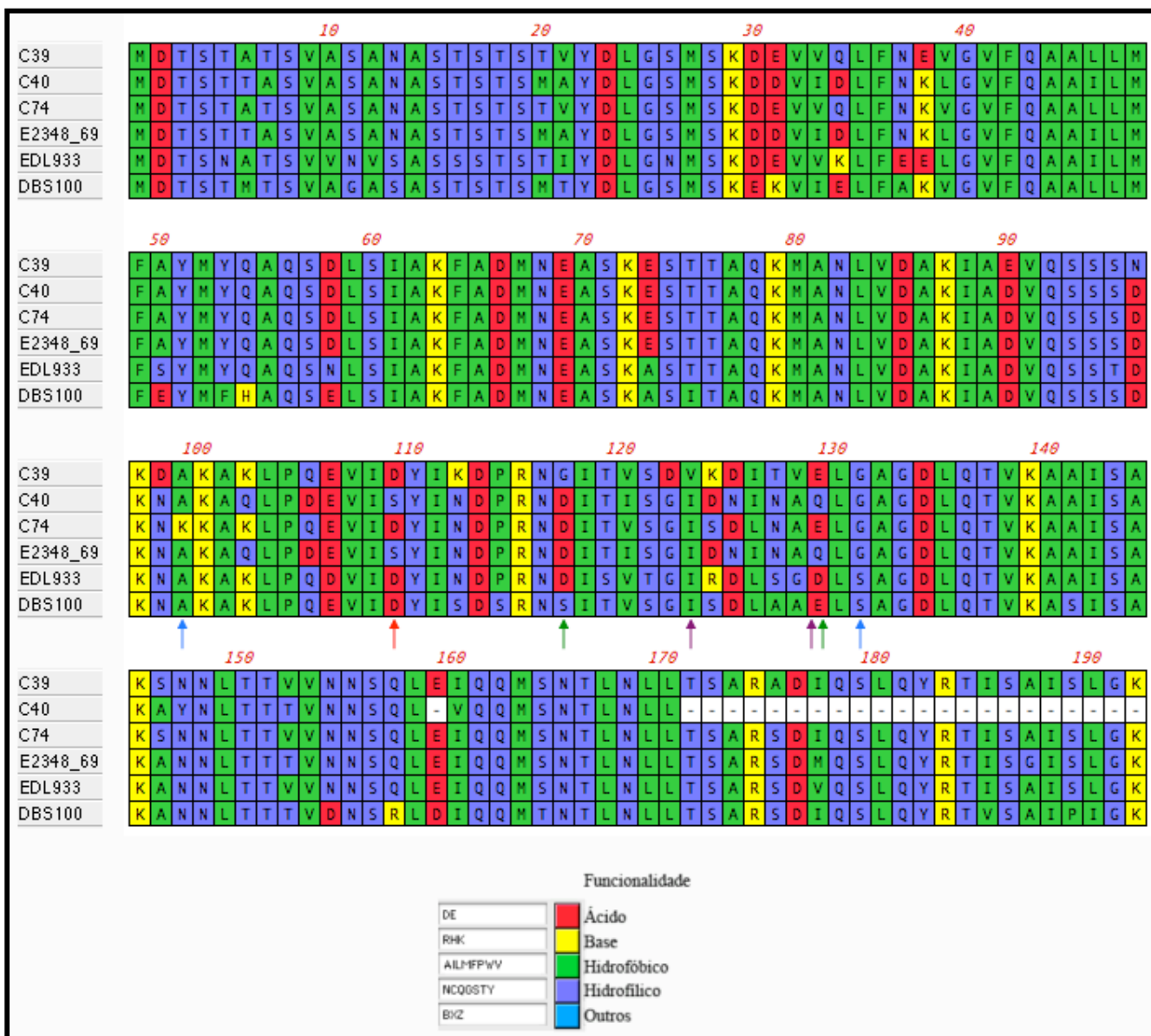
Uma vez que o provável *espA* de C39 é idêntico ao homólogo da linhagem bovina de STEC RW 1374, pertencente ao mesmo sorotipo da STEC bovina NV220, e apresenta 97,90% de identidade com o *espA* de NV92 (Tabela 9), é possível que também corresponda à variante *espA* $\beta$ v. O provável gene de C40, por sua vez, apresenta um alto valor de identidade em relação ao homólogo da EPEC E2348/69 (Tabela 10), o que sugere que pertença à variante  $\alpha$ . Finalmente, o provável *espA* de C74 é 100% idêntico ao *espA* da EPEC de coelho RDEC-1 e, por isso, possivelmente corresponde à variante  $\beta$ .

A Figura 16 mostra o alinhamento das sequências dos prováveis *espA* de C39, C40 e C74 com os homólogos das linhagens prototípicas EPEC E2348/69, EHEC EDL933 e *C. rodentium* DBS100. As sequências *espA* de C39 e C74 apresentam 95% de identidade, enquanto a sequência de C40 exibe 87 e 90% de identidade com C39 e C74, respectivamente. Vale ressaltar que as bases que diferem entre o *espA* da EPEC E2348/69 e o homólogo de C40 podem ser, de fato, erros de sequenciamento. A base localizada na posição 439 corresponde a uma timina apenas na sequência de C40, sendo uma adenina em todos os demais homólogos analisados. Nas posições 476, 477 e 478, por sua vez, há deleções no provável *espA* de C40, enquanto que nos homólogos de C39, C74, E2348/69 e EDL933 há três adeninas, e no gene de DBS100 uma adenina, uma timina e outra adenina. Assim sendo, é possível que a região sequenciada do provável *espA* de C40 seja de fato 100% idêntica ao homólogo da EPEC E2348/69.



**Figura 16.** Alinhamento dos prováveis genes *espA* das DAEC C39, C40 e C74 com os homólogos da EPEC E2348/69, EHEC EDL933 e de *Citrobacter rodentium* DBS100.

As sequências das proteínas EspA previstas de C39, C40 e C74 foram alinhadas com as proteínas correspondentes dos protótipos E2348/69, EDL933 e DBS100 (Figura 17).



**Figura 17.** Alinhamento das proteínas EspA preditas de C39, C40, C74, e EspA da EPEC humana E2348/69, da EHEC bovina EDL933 e de *C. rodentium* DBS100. O resíduo de aminoácido 109 é apontado pela seta vermelha. O início e o fim da região variável e das regiões hipervariáveis HV1 e HV2 estão indicados pelas setas azuis, roxas e verdes, respectivamente.

Apesar da elevada identidade de seqüências entre os prováveis genes *espA* de C39 e C74 (Tabela 11 e Figura 16), suas proteínas preditas não são idênticas (Figura 17). As proteínas preditas de C40 e EPEC E2348/69, por sua vez, são praticamente idênticas, diferindo apenas nas posições 147, 159 e 160 da cadeia de aminoácidos. Essas diferenças devem-se às bases que possivelmente consistem em erros de sequenciamento do provável *espA* de C40 (Figura 16).

Na Figura 17 observam-se setas que assinalam epítomos de EspA, cuja variabilidade é responsável pelo não reconhecimento da proteína de um determinado sorotipo por



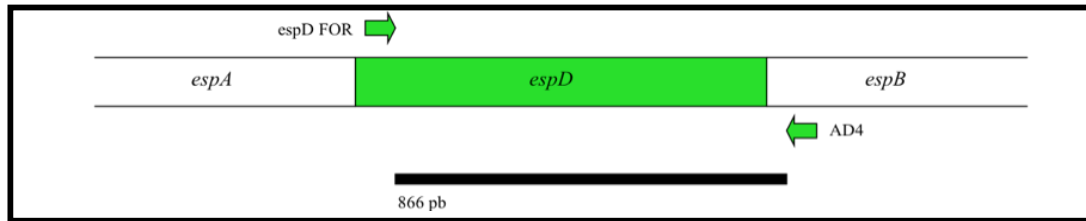
anticorpos dirigidos contra EspA de outros sorotipos (Neves *et al.*, 2003; Crepin *et al.*, 2005). A região hipervariável 1 (HV1) está contida na região hipervariável 2 (HV2), e ambas fazem parte de uma região variável mais abrangente, delimitada pelas setas azuis. Em 2005, Crepin e colaboradores demonstraram que o resíduo de aminoácido da posição 109 e as regiões HV1 e HV2 são responsáveis pela antigenicidade da proteína EspA da EPEC E2348/69. Uma mutação pontual no resíduo 109 é capaz de produzir filamentos de EspA com antigenicidade dupla, reconhecidos tanto por anticorpos contra EPEC E2348/69 quanto por anticorpos contra EHEC O157:H7, o mesmo sorotipo da linhagem prototípica EDL933. Além disso, a troca do resíduo de serina (S) por um resíduo de aspartato (D) nessa posição, em combinação com mudanças em HV1 ou HV2, foi capaz de converter a antigenicidade do EspA da EPEC, igualando-a à da proteína da EHEC. Um resíduo de serina nessa posição também é encontrado no sorotipo O55:H6 de EPEC, proximamente relacionado à E2348/69, ao passo que um resíduo de aspartato é observado na EPEC O55:H7, considerada o ancestral das EHEC O157:H7.

A análise da posição 109 das proteínas preditas das DAEC C39, C40 e C74 revela um resíduo de aspartato em C39 e em C74, enquanto em C40 há um resíduo de serina. Além disso, as regiões hipervariáveis de C39 e de C74 assemelham-se mais à região equivalente de EDL933 que à da EPEC E2348/69. Já a HV1 e a HV2 de C40 são idênticas às regiões hipervariáveis do protótipo E2348/69. Esses resultados são fortes evidências a favor da hipótese de que as EspA preditas de C39 e C74 seriam reconhecidas por anticorpos dirigidos contra a proteína correspondente da EHEC EDL933, mas não por anticorpos contra a EspA da EPEC E2348/69. Tal hipótese poderia justificar o resultado negativo obtido em um experimento de Western blot realizado a fim de verificar a produção de EspA pelo isolado C39 (resultados não apresentados). Neste experimento, os anticorpos anti-EspA eram dirigidos contra a respectiva proteína da EPEC E2348/69. A proteína EspA predita de C40, por sua vez, seria reconhecida apenas por anticorpos contra o EspA da EPEC.

### **1.5. Identificação e caracterização de prováveis genes *espD* de DAEC**

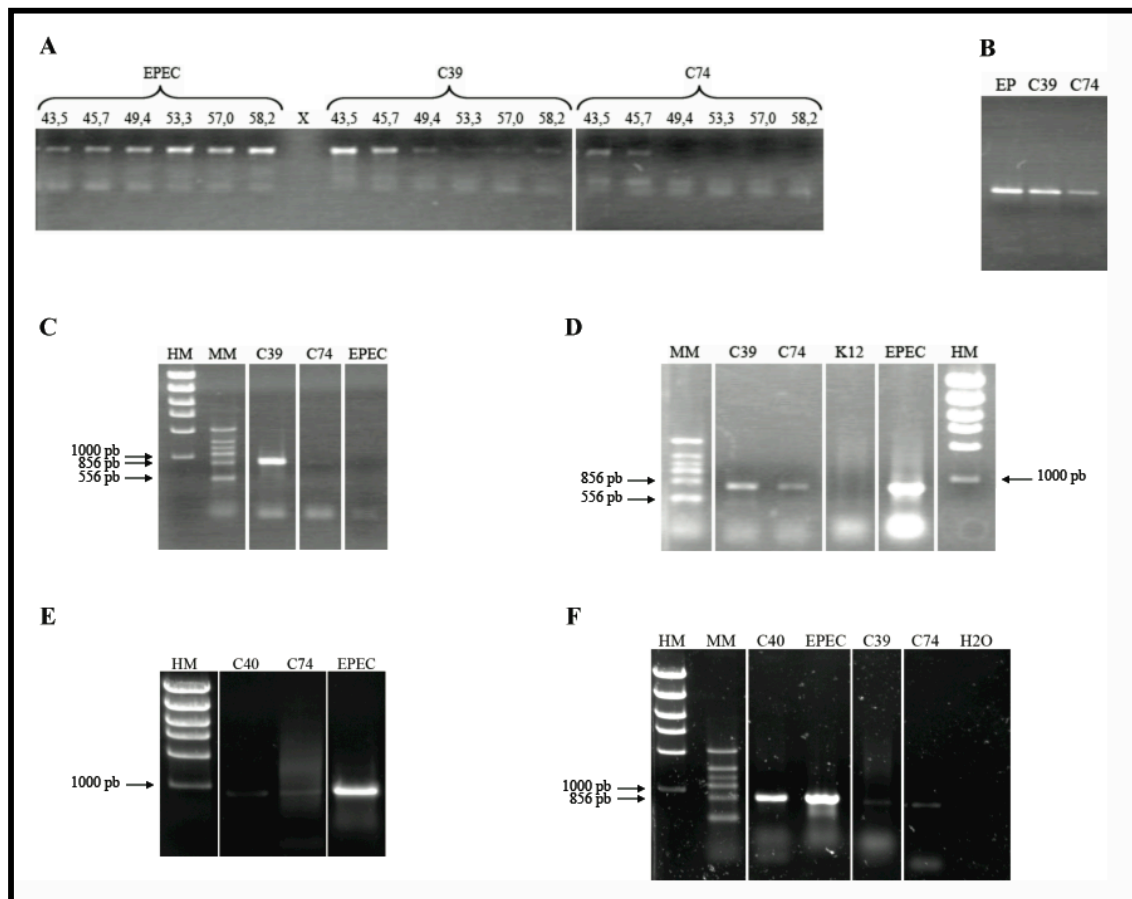
O par de iniciadores *espD* FOR e AD4 (Figura 18) foi desenhado com o objetivo de identificar possíveis homólogos do gene *espD* em DAEC, o qual codifica uma das proteínas formadoras do poro de translocação (Ide *et al.*, 2001).





**Figura 18.** Região de anelamento dos iniciadores espD FOR e AD4 no LEE de EPEC. O fragmento amplificado é representado por uma barra.

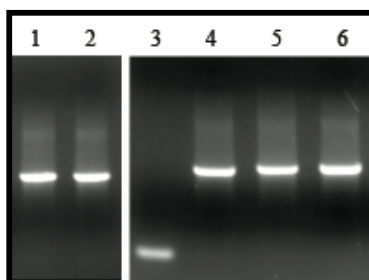
Os perfis eletroforéticos dos produtos de PCR amplificados com esses iniciadores e DNA dos isolados C39, C40 e C74 de DAEC são apresentados na Figura 19. Uma PCR com gradiente de temperatura foi realizada a fim de otimizar a temperatura de anelamento (Figura 19 A), principalmente para o isolado C74, cujo rendimento das amplificações era significativamente menor que o observado com a amostra C39.



**Figura 19.** Perfis eletroforéticos dos fragmentos de PCR obtidos empregando os iniciadores espD FOR e AD4. Produtos de tamanho esperado foram obtidos a partir das DAEC C39 (A, B, C, D, F), C40 (E, F) e C74 (A, B, C, D, E, F), e do controle positivo EPEC E2348/69. Não houve amplificação utilizando os controles negativos K-12 (D) e água (F). Os números acima de cada poço do gel (A) indicam a temperatura de anelamento (°C) utilizada na PCR de gradiente. As setas apontam para as bandas de interesse dos marcadores de massa molecular (MM) TTSS Ladder 3 (C, D, F) e High DNA Mass Ladder (HM) (C, D, E, F).

Curiosamente, quanto maior a temperatura empregada nessa PCR, maior foi a intensidade da banda obtida para o controle positivo EPEC E2348/69, sendo o inverso verificado com as amostras C39 e C74. Essa observação sugere que a temperatura ideal de anelamento varia também entre os diferentes patótipos de *E. coli* testados. Apesar desses resultados, a melhor  $T_m$  obtida no termociclador convencional (PTC-100, MJ Research) utilizado no Laboratório de Microbiologia foi de 60°C (Tabela 2), próxima à temperatura mais elevada empregada na PCR de gradiente (Figura 19), a qual se mostrou inadequada com DNA dos isolados de DAEC. Esse resultado poderia sugerir que a temperatura indicada por pelo menos uma das duas máquinas utilizadas não corresponde ao valor real atingido.

Devido ao melhor rendimento obtido com o DNA do isolado C39 (Figura 19), foi possível clonar seus produtos de PCR no vetor pGEM<sup>®</sup>-T Easy e transformar células de *E. coli* DH5 $\alpha$ <sup>™</sup>. Após a transformação, seis colônias brancas foram submetidas à extração de DNA plasmidial. Esses DNAs foram utilizados em experimentos de PCR com os iniciadores Universal e Reverso (Figura 20), indicando que aparentemente apenas o clone 3 não continha um inserto do tamanho esperado.



**Figura 20.** Perfil eletroforético dos produtos de amplificação com os iniciadores Universal e Reverso. Como molde empregou-se os DNAs plasmidiais extraídos das células transformadas. Os números localizados acima de cada poço do gel correspondem aos nomes dos clones.

DNA plasmidial extraído dos clones 2 e 5 transformados com *espD* de C39, bem como os produtos de PCR empregando os iniciadores *espD* FOR e AD4 foram purificados, quantificados e submetidos ao sequenciamento automático. O mesmo procedimento foi realizado com os fragmentos de PCR obtidos a partir de C40. Não foi possível sequenciar os produtos de C74, pois o rendimento das amplificações foi muito baixo, não permitindo a obtenção de quantidades adequadas de material (Figura 19).

Com o auxílio do programa Phred, *contigs* foram gerados a partir das seqüências de cada provável gene. As análises de identidade empregando esses *contigs* são apresentadas nas Tabelas 12 e 13.

### 1.5.1. Provável *espD* do isolado C39

O provável *espD* de C39 apresenta 834 pb e foi gerado a partir de 13 sequências independentes; seis correspondem a insertos clonados e sete são derivadas de PCR. A localização do iniciador *espD* FOR, interna ao *espD* da EPEC E2348/69 (Figura 18), não permitiu a amplificação do gene completo.

A sequência parcial do possível *espD* de C39 é idêntica à do homólogo da EHEC bovina RW 1374, e bastante similar aos homólogos de outras linhagens de EHEC, EPEC e DA-EPEC, de origem predominantemente humana (Tabela 12). Curiosamente, o provável gene apresenta maior identidade com *cr25* de *C. rodentium* que com o homólogo da EHEC EDL933, resultado não observado com os demais possíveis genes TTSS desse isolado.

**Tabela 12.** Análise de identidade do provável gene *espD* do isolado C39 de DAEC.

Gene	Nº de acesso	Organismo	Origem	Identidade	Query coverage*	E-value**
<i>espD</i>	AJ303141	STEC O103:H2 RW 1374	bovina	100,00%	100%	1,2e <sup>-208</sup>
<i>espD</i>	AP010958	EHEC O103:H2 12009	humana	99,90%	100%	3,1e <sup>-208</sup>
<i>espD</i>	AP010953	EHEC O26:H11 11368	humana	99,80%	100%	9,0e <sup>-208</sup>
<i>espD</i>	FM201463	DA-EPEC O26:K60 B6	humana	99,80%	100%	1,2e <sup>-207</sup>
<i>espD</i>	FM201464	DA-EPEC O128:H2 9812	humana	99,80%	100%	1,3e <sup>-207</sup>
<i>espD</i>	AB426060	EPEC O111:H <sup>-</sup> B171-1	humana	99,80%	100%	1,1e <sup>-207</sup>
<i>espD</i>	AJ277443	STEC O26:H 413/89-1	bovina	99,80%	100%	1,2e <sup>-207</sup>
<i>espD</i>	AF200363	EPEC O15:H <sup>-</sup> RDEC-1	cunicular	99,80%	100%	1,4e <sup>-207</sup>
<i>espD</i>	AF022236	EPEC O127:H7 E2348/69	humana	86,80%	100%	5,3e <sup>-157</sup>
<i>cr25</i>	AF311901	<i>C. rodentium</i> DBS100	murina	86,30%	100%	3,7e <sup>-155</sup>
<i>espD</i>	AP010960	EHEC O111:H <sup>-</sup> 11128	humana	85,40%	100%	1,4e <sup>-151</sup>
<i>espD</i>	FM986650	<i>E. coli</i> DEC8A	-	85,40%	100%	1,9e <sup>-151</sup>
<i>espD</i>	FM986651	<i>E. coli</i> IHIT 1190	-	85,10%	100%	1,6e <sup>-150</sup>
<i>espD</i>	FM986652	<i>E. coli</i> 537/89	-	85,10%	100%	1,5e <sup>-150</sup>
<i>ECs4555</i>	BA000007	EHEC O157:H7 Sakai	humana	83,50%	100%	4,2e <sup>-144</sup>
<i>espD</i>	AE005174	EHEC O157:H7 EDL933	humana	83,50%	100%	4,2e <sup>-144</sup>
<i>espD</i>	EU871627	EPEC O55:H7 EDS-58	-	83,30%	100%	1,9e <sup>-143</sup>
<i>espD</i>	EU871628	EHEC O145:H <sup>-</sup> 33264	humana	83,30%	100%	1,9e <sup>-143</sup>

\*Query coverage: representa a extensão da sequência investigada que apresenta identidade com a sequência de outro organismo.

\*\*E-value: indica a probabilidade dos alinhamentos obtidos serem casuais.

### 1.5.2. Provável *espD* do isolado C40

Conforme mencionado anteriormente, o iniciador *espD* FOR é interno ao *espD* da EPEC E2348/69 e impossibilita a amplificação do gene completo. Entretanto, o iniciador

AD4 anela-se em *espB*, o que permitiria a síntese de toda a região a jusante de *espD*, inclusive o final do gene (Figura 18). Porém, no *contig* gerado com base nas sequências dos produtos de PCR amplificados com esse par de iniciadores e DNA de C40, é encontrada apenas a sequência do iniciador *espD* FOR, pois a região a jusante apresentava-se de má qualidade, não sendo utilizada em sua construção. O *contig* de 803 pares de bases foi obtido a partir de duas sequências independentes, ambas diretamente derivadas de PCR.

Seguindo a tendência já observada na Tabela 10, o homólogo mais semelhante ao provável *espD* de C40 corresponde à EPEC E2348/69 (Tabela 13), seguido pelo *espD* da DA-EPEC O119:H9:K61 (resultado não apresentado), com 96,30% de identidade. O possível *espD* de C39, por sua vez, bem como os genes correspondentes que possuem identidade igual ou muito próxima de 100% em relação à sua sequência (Tabela 12), são apenas 85% idênticos ao homólogo de C40. É interessante notar que, em conformidade com a observação feita para o provável *espD* de C39 (Tabela 12), o homólogo de C40 também se assemelha mais a *cr25* de *C. rodentium* que ao *espD* de EDL933.

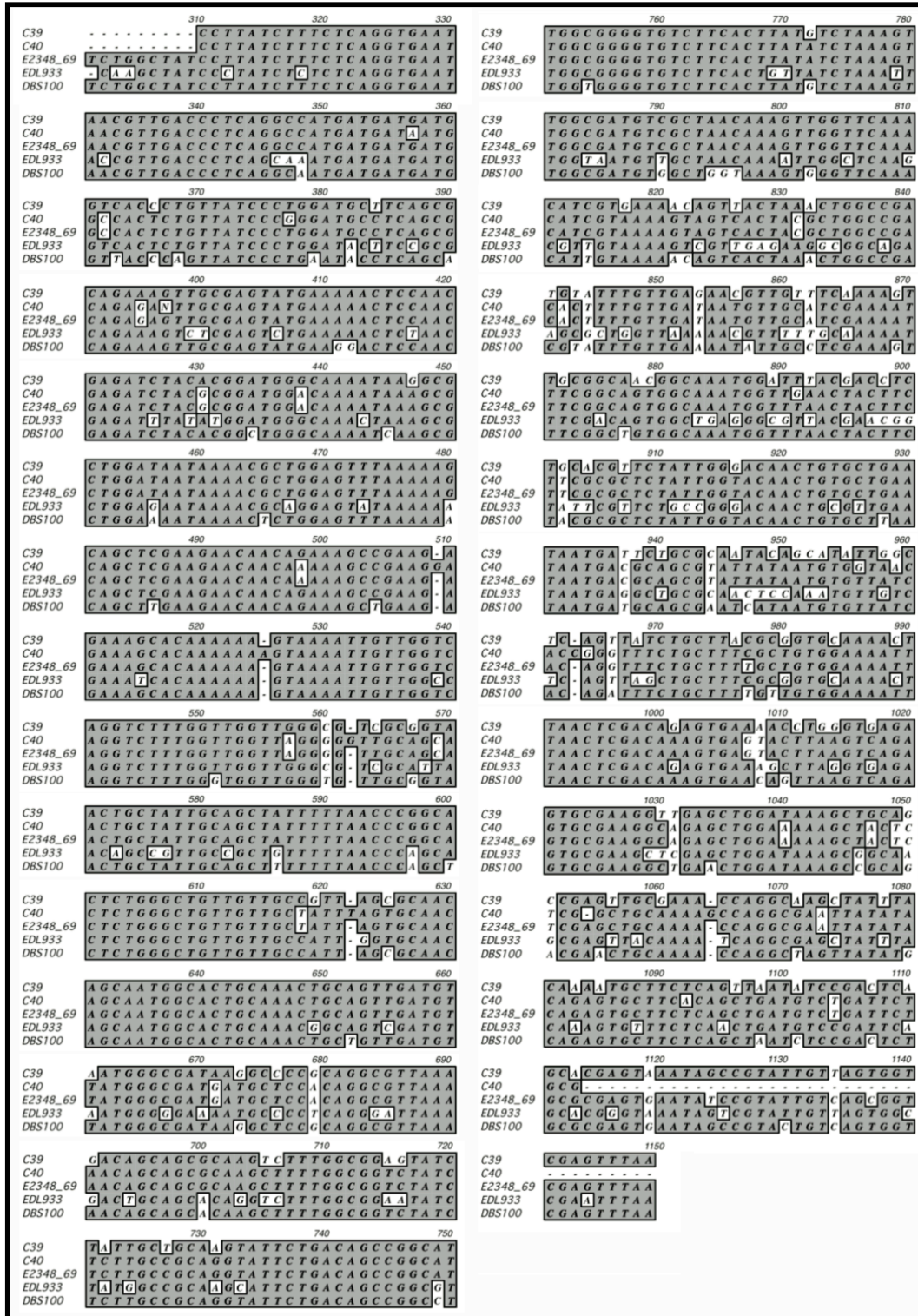
**Tabela 13.** Análise de identidade do provável gene *espD* do isolado C40 de DAEC.

Gene	Nº de acesso	Organismo	Origem	Identidade	Query coverage*	E-value**
<i>espD</i>	AF022236	EPEC O127:H7 E2348/69	humana	98,00%	100,00%	3,2e <sup>-193</sup>
<i>espD</i>	AP010960	EHEC O111:H <sup>-</sup> 11128	humana	91,00%	100,00%	1,5e <sup>-166</sup>
<i>espD</i>	FM986650	<i>E. coli</i> DEC8A	-	91,00%	100,00%	2,1e <sup>-166</sup>
<i>espD</i>	FM986652	<i>E. coli</i> 537/89	-	90,80%	100,00%	1,8e <sup>-165</sup>
<i>espD</i>	FM986651	<i>E. coli</i> IHIT 1190	-	90,80%	100,00%	1,9e <sup>-165</sup>
<i>cr25</i>	AF311901	<i>C. rodentium</i> DBS100	murina	87,80%	100,00%	7,1e <sup>-154</sup>
<i>espD</i>	AJ303141	STEC O103:H2 RW 1374	bovina	85,40%	99,87%	1,3e <sup>-144</sup>
<i>espD</i>	AP010958	EHEC O103:H2 12009	humana	85,30%	99,87%	3,5e <sup>-144</sup>
<i>espD</i>	AP010953	EHEC O26:H11 11368	humana	85,20%	99,87%	1,1e <sup>-143</sup>
<i>espD</i>	AB426060	EPEC O111:H <sup>-</sup> B171-1	humana	85,20%	99,87%	1,3e <sup>-143</sup>
<i>espD</i>	AJ277443	STEC O26:H 413/89-1	bovina	85,20%	99,87%	1,4e <sup>-143</sup>
<i>espD</i>	FM201463	DA-EPEC O26:K60 B6	humana	85,20%	99,87%	1,4e <sup>-143</sup>
<i>espD</i>	FM201464	DA-EPEC O128:H2 9812	humana	85,20%	99,87%	1,5e <sup>-143</sup>
<i>espD</i>	AF200363	EPEC O15:H <sup>-</sup> RDEC-1	cunicular	85,20%	99,87%	1,6e <sup>-143</sup>
<i>ECs4555</i>	BA000007	EHEC O157:H7 Sakai	humana	78,00%	99,87%	7,1e <sup>-117</sup>
<i>espD</i>	AE005174	EHEC O157:H7 EDL933	humana	78,00%	99,87%	7,1e <sup>-117</sup>
<i>espD</i>	EU871628	EHEC O145:H <sup>-</sup> 33264	humana	77,90%	99,87%	3,2e <sup>-116</sup>
<i>espD</i>	EU871627	EPEC O55:H7 EDS-58	-	77,90%	99,87%	3,3e <sup>-116</sup>

\*Query coverage: representa a extensão da sequência investigada que apresenta identidade com a sequência de outro organismo.

\*\*E-value: indica a probabilidade dos alinhamentos obtidos serem casuais.

O alinhamento dos possíveis *espD* incompletos de C39 e C40 com as regiões homólogas das linhagens prototípicas E2348/69, EDL933 e DBS100 é apresentado na Figura 21.

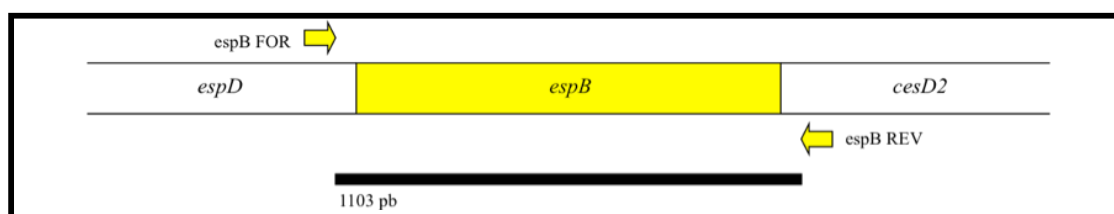


**Figura 21.** Alinhamento entre os prováveis genes *espD* parciais de C39 e C40 e os homólogos das linhagens prototípicas EPEC E2348/69, EHEC EDL933 e *Citrobacter rodentium* DBS100.

Observa-se que há várias inserções de bases no provável gene de C40 em relação aos homólogos analisados, localizadas nas posições 509, 525, 562, 622, 963 e 1.064, além de uma deleção na posição 1.054. Como as inserções e a deleção são encontradas apenas em C40, é bastante provável que sejam artefatos, devido à baixa qualidade das sequências que formam o *contig* nos locais em que ocorrem (resultado não apresentado). Além disso, as demais bases que diferem entre o possível *espD* de C40 e o homólogo da EPEC não podem ser facilmente distinguidas nos eletroferogramas gerados para a DAEC, indicando que sua confiabilidade é pequena. A hipótese de erro de sequenciamento é reforçada pelo fato do provável *espD* apresentado na Figura 21 ter sido formado por apenas duas sequências, o que dificulta a construção do *contig* nas regiões em que a qualidade do sequenciamento é inadequada, diminuindo também a confiabilidade do consenso obtido.

### 1.6. Identificação e caracterização de prováveis genes *espB* de DAEC

A fim de obter sequências homólogas ao gene que codifica EspB, a segunda proteína formadora do poro de translocação em EPEC (Ide *et al.*, 2001), foram utilizados os iniciadores *espB* FOR e *espB* REV (Figura 22).



**Figura 22.** Regiões de anelamento dos iniciadores *espB* FOR e *espB* REV no LEE de EPEC. O tamanho esperado do fragmento amplificado é 1.103 pares de bases.

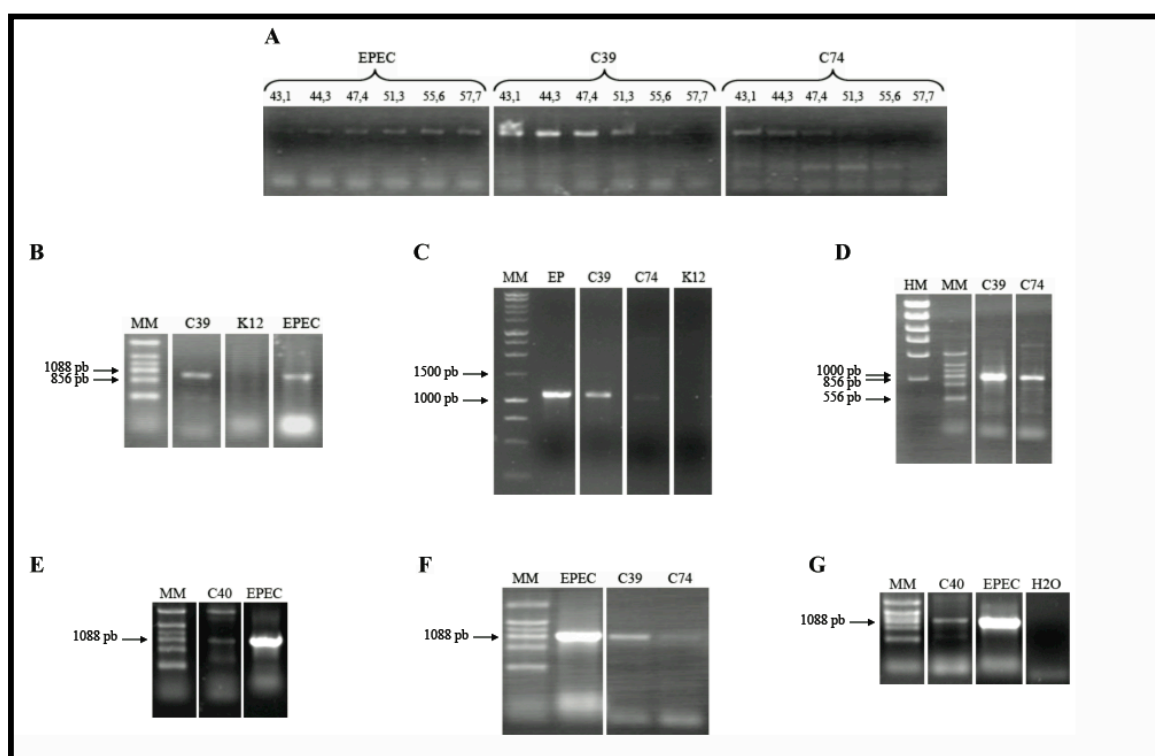
Diversos experimentos de PCR foram realizados com esse par de iniciadores, principalmente em virtude da baixa reprodutibilidade dos resultados obtidos para os isolados C40 e C74 devido à dificuldade em otimizar a temperatura de anelamento para essas DAEC. Os perfis eletroforéticos dos produtos de alguns desses experimentos são apresentados na Figura 23.

De maneira geral, o rendimento da amplificação foi relativamente alto nas PCRs em que se empregou DNA do isolado C39 como molde (Figura 23 D). Para C40 e C74, no entanto, a quantidade de DNA amplificado foi baixa e, com frequência, ocorreram amplificações inespecíficas (Figura 23 C, D, E e G). Nesses casos, os produtos de PCR do



tamanho esperado foram excisados do gel de agarose e então purificados para o sequenciamento automático.

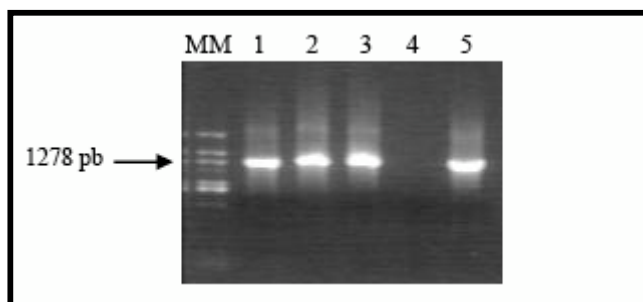
Conforme já havia sido constatado para o par de iniciadores espD FOR e AD4 (Figura 19 A), a temperatura de anelamento ideal inferida a partir da PCR com gradiente de temperatura (Figura 23 A) não correspondeu à T<sub>m</sub> ideal no termociclador do Laboratório de Microbiologia, onde foram realizadas as demais PCRs. Esse resultado reforça a hipótese de que a temperatura indicada por pelo menos uma das duas máquinas utilizadas não equivale ao valor atingido de fato. Além disso, novamente verificou-se que, quanto maior a temperatura empregada na PCR de gradiente, maior foi a intensidade do produto obtido para o controle positivo EPEC E2348/69, sendo o inverso observado com DNA das DAEC C39 e C74 (Figura 23 A).



**Figura 23.** Perfis eletroforéticos dos produtos de PCR obtidos com os iniciadores espB FOR e espB REV. Como moldes empregou-se DNA das DAEC C39 (A, B, C, D, F), C40 (E, G) e C74 (A, C, D, F), e do controle positivo EPEC E2348/69. Não houve amplificação utilizando os controles negativos K-12 (B, C) e água (G). Os números acima de cada poço do gel (A) indicam a temperatura de anelamento (°C) utilizada na PCR de gradiente. As setas apontam para as bandas de interesse dos marcadores de massa molecular (MM) TTSS Ladder 3 (B, D, E, F, G), 1 kb DNA Ladder (C) e High DNA Mass Ladder (HM) (D).

Após os experimentos de PCR com DNA do isolado C39 como molde, alguns produtos obtidos para esse isolado foram clonados no vetor pGEM<sup>®</sup>-T Easy e utilizados

para transformar células de *E. coli* XL10-Gold™. Cinco colônias brancas foram selecionadas e submetidas à extração de DNA plasmidial, que serviu como molde em um experimento de PCR com os iniciadores Universal e Reverso (Figura 24), indicando que apenas o clone 4 não continha um inserto do tamanho esperado.



**Figura 24.** Perfil eletroforético dos produtos de amplificação obtidos com os iniciadores Universal e Reverso, empregando os DNAs plasmidiais extraídos das células transformadas. Os fragmentos amplificados com DNA dos clones 1, 2, 3 e 5, cujos tamanhos esperados são 1.245 pb, correspondem ao provável gene *espB* do isolado C39 de DAEC, em adição aos 142 pb de DNA plasmidial amplificados com esse par de iniciadores. A seta aponta para a banda de interesse do marcador de massa molecular (MM) TTSS Ladder 1. Os números localizados acima de cada poço do gel correspondem aos nomes dos clones.

DNA plasmidial extraído dos clones 1, 2, 3 e 5 e produtos de PCR amplificados com DNA dos isolados C39 e C74 e o par de iniciadores *espB* FOR e *espB* REV foram purificados, quantificados e submetidos ao sequenciamento automático. Embora os fragmentos do tamanho esperado obtidos nas PCRs com DNA do isolado C40 tenham sido excisados dos géis de agarose para purificação, não havia a quantidade necessária para seu sequenciamento (Figura 23 E e G).

A partir das sequências geradas para C39 e C74 foram construídos *contigs*, cujas análises de identidade são apresentadas nas Tabelas 14 e 15.

### 1.6.1. Provável *espB* do isolado C39

Análises de identidade utilizando o provável *espB* de C39 e genes homólogos de outros organismos (Tabela 14) indicam que sua sequência de 945 pb está completa. Esse *contig* foi gerado a partir de 18 sequências independentes; sete correspondem a insertos clonados e 11 são derivadas de PCR. Além disso, o possível gene é idêntico ao *espB* da EHEC humana 12009 e apresenta alta identidade com sequências de EHEC, EPEC e DA-EPEC de diversas origens (Tabela 14).



**Tabela 14.** Análise de identidade do provável gene *espB* do isolado C39 de DAEC.

Gene	Nº de acesso	Organismo	Origem	Identidade	Query coverage*	E-value**
<i>espB</i>	AP010958	EHEC O103:H2 12009	humana	100,00%	100,00%	0
<i>espB</i>	AJ303141	STEC O103:H2 RW 1374	bovina	99,80%	100%	0
<i>espB</i>	AF200363	EPEC O15:H <sup>-</sup> RDEC-1	cunicular	99,70%	100%	0
<i>espB</i>	FM201464	DA-EPEC O128:H2 9812	humana	99,70%	100%	0
<i>espB</i>	FM201463	DA-EPEC O26:K60 B6	humana	99,70%	100%	0
<i>espB</i>	AP010953	EHEC O26:H11 11368	humana	99,60%	100%	0
<i>espB</i>	AJ277443	STEC O26:H 413/89-1	bovina	99,50%	100%	0
<i>espB</i>	AB426060	EPEC O111:H <sup>-</sup> B171-1	humana	99,40%	100%	0
<i>ECs4554</i>	BA000007	EHEC O157:H7 Sakai	humana	78,40%	100%	1,1e <sup>-84</sup>
<i>espB</i>	AE005174	EHEC O157:H7 EDL933	humana	78,40%	100%	1,1e <sup>-84</sup>
<i>espB</i>	EU871628	EHEC O145:H <sup>-</sup> 33264	humana	78,40%	100%	4,7e <sup>-84</sup>
<i>espB</i>	EU871627	EPEC O55:H7 EDS-58	-	78,40%	100%	1,4e <sup>-83</sup>
<i>espB</i>	AF022236	EPEC O127:H7 E2348/69	humana	74,10%	100%	1,9e <sup>-72</sup>
<i>cr26</i>	AF311901	<i>C. rodentium</i> DBS100	murina	71,60%	100%	1,2e <sup>-63</sup>
<i>espB</i>	AP010960	EHEC O111:H <sup>-</sup> 11128	humana	75,00%	91%	4,0e <sup>-164</sup>
<i>espB</i>	FM986652	<i>E. coli</i> 537/89	-	74,60%	91%	1,8e <sup>-43</sup>
<i>espB</i>	FM986651	<i>E. coli</i> IHIT 1190	-	74,60%	91%	1,8e <sup>-43</sup>
<i>espB</i>	FM986650	<i>E. coli</i> DEC8A	-	74,60%	91%	1,9e <sup>-43</sup>

\*Query coverage: representa a extensão da sequência investigada que apresenta identidade com a sequência de outro organismo.

\*\*E-value: indica a probabilidade dos alinhamentos obtidos serem casuais.

### 1.6.2. Provável *espB* do isolado C74

O provável *espB* de C74, assim como o homólogo da DAEC C39, está completo e possui 945 pb de extensão. Esse *contig* foi gerado a partir de quatro sequências independentes, todas diretamente derivadas de produtos amplificados por PCR. Sua sequência é idêntica à do *espB* da linhagem de EPEC humana B171-1, e apresenta 99% de identidade com os homólogos de outras linhagens de EPEC, DA-EPEC e EHEC, de origem humana, bovina e cunicular, conforme pode ser verificado na Tabela 15.

É interessante notar que, contrariamente ao observado nas análises de identidade com o provável *espA* de C74 (Tabela 11), os genes *espB* da EHEC 11128 e das *E. coli* 537/89, IHIT 1190 e DEC8A não alinham com o possível *espB* dessa DAEC ao longo de toda a sua extensão (Tabela 15). Curiosamente, a Tabela 14 traz a mesma informação para o isolado C39. O alinhamento dos prováveis genes das duas DAEC com os homólogos das linhagens mencionadas ocorrem a partir da base 83 (resultado não apresentado), levantando a hipótese de que os prováveis *espB* desses isolados talvez sejam menos conservados que os demais possíveis genes TTSS.

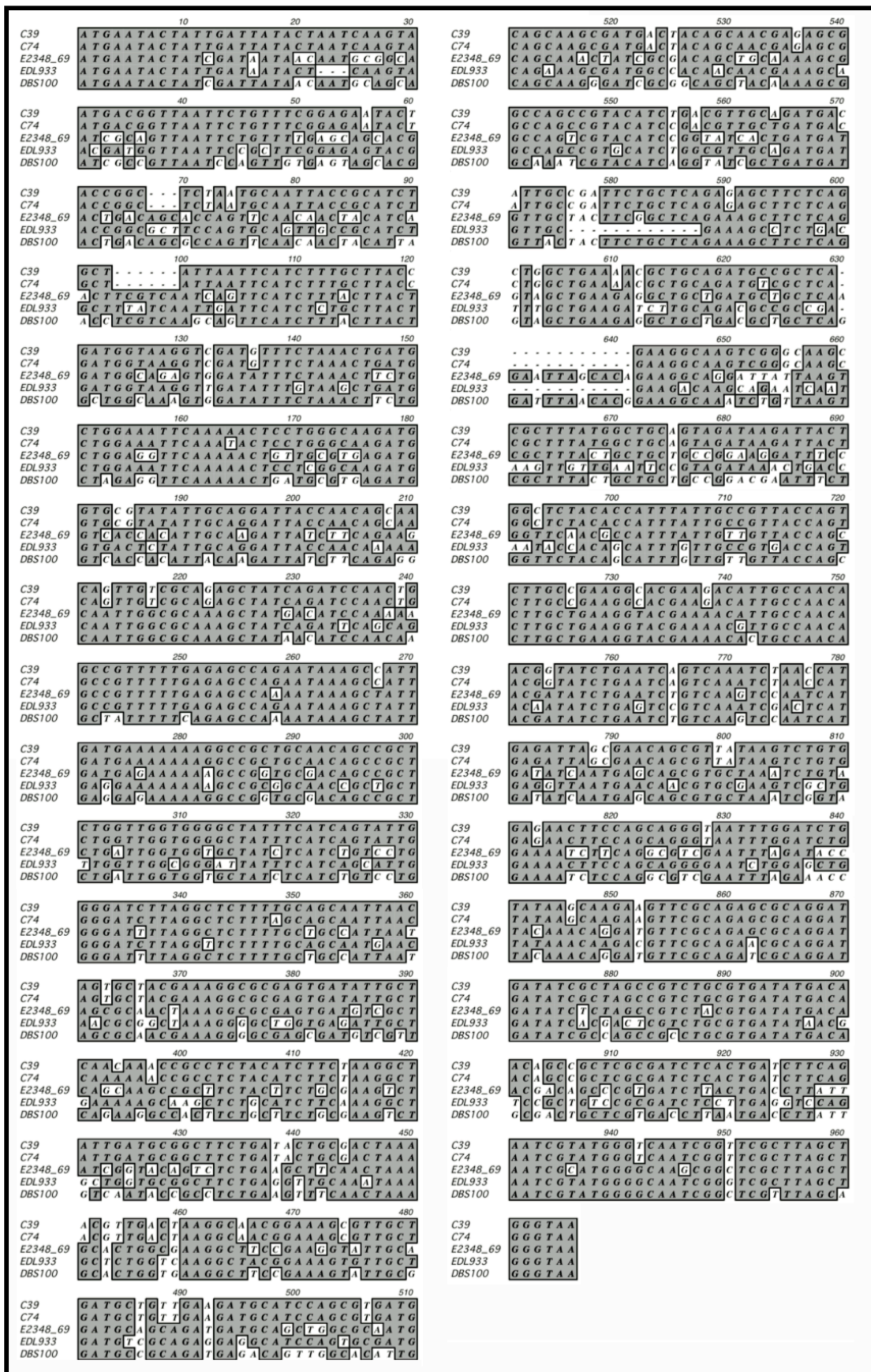
**Tabela 15.** Análise de identidade do provável gene *espB* do isolado C74 de DAEC.

Gene	Nº de acesso	Organismo	Origem	Identidade	Query coverage*	E-value**
<i>espB</i>	AB426060	EPEC O111:H <sup>-</sup> B171-1	humana	100,00%	100%	0
<i>espB</i>	AF200363	EPEC O15:H <sup>-</sup> RDEC-1	cunicular	99,70%	100%	0
<i>espB</i>	FM201464	DA-EPEC O128:H2 9812	humana	99,70%	100%	0
<i>espB</i>	FM201463	DA-EPEC O26:K60 B6	humana	99,70%	100%	0
<i>espB</i>	AP010953	EHEC O26:H11 11368	humana	99,60%	100%	0
<i>espB</i>	AJ277443	STEC O26:H 413/89-1	bovina	99,50%	100%	0
<i>espB</i>	AP010958	EHEC O103:H2 12009	humana	99,40%	100%	0
<i>espB</i>	AJ303141	STEC O103:H2 RW 1374	bovina	99,20%	100%	0
<i>ECs4554</i>	BA000007	EHEC O157:H7 Sakai	humana	78,00%	100%	1,7e <sup>-84</sup>
<i>espB</i>	AE005174	EHEC O157:H7 EDL933	humana	78,00%	100%	1,7e <sup>-84</sup>
<i>espB</i>	EU871628	EHEC O145:H <sup>-</sup> 33264	humana	78,00%	100%	6,9e <sup>-84</sup>
<i>espB</i>	EU871627	EPEC O55:H7 EDS-58	-	77,70%	100%	2,2e <sup>-83</sup>
<i>espB</i>	AF022236	EPEC O127:H7 E2348/69	humana	73,90%	100%	1,4e <sup>-72</sup>
<i>Cr26</i>	AF311901	<i>C. rodentium</i> DBS100	murina	71,50%	100%	3,8e <sup>-64</sup>
<i>espB</i>	AP010960	EHEC O111:H <sup>-</sup> 11128	humana	74,20%	91%	9,8e <sup>-45</sup>
<i>espB</i>	FM986652	<i>E. coli</i> 537/89	-	74,20%	91%	1,2e <sup>-44</sup>
<i>espB</i>	FM986651	<i>E. coli</i> IHIT 1190	-	74,20%	91%	1,3e <sup>-44</sup>
<i>espB</i>	FM986650	<i>E. coli</i> DEC8A	-	74,20%	91%	1,3e <sup>-44</sup>

\*Query coverage: representa a extensão da sequência investigada que apresenta identidade com a sequência de outro organismo.

\*\*E-value: indica a probabilidade dos alinhamentos obtidos serem casuais.

Os *contigs* obtidos para os prováveis *espB* das DAEC C39 e C74 foram alinhados com os homólogos da EPEC E2348/69, EHEC EDL933 e *C. rodentium* DBS100 (Figura 25). A Figura revela que a identidade entre os dois *contigs* é bastante alta (99,36%), e que há várias deleções nas sequências de DAEC em relação aos genes das linhagens prototípicas E2348/69 e DBS100. Entretanto, é muito provável que as deleções não sejam decorrentes de erros de sequenciamento, mas sim de polimorfismos do gene, uma vez que os *espB* de duas linhagens de EHEC e EPEC são 100% idênticos aos homólogos de C39 e C74 (Tabelas 14 e 15). Além disso, uma dessas deleções também é encontrada no *espB* da EHEC EDL933.



**Figura 25.** Alinhamento dos prováveis *espB* das DAEC C39 e C74 com os genes homólogos das linhagens prototípicas EPEC E2348/69, EHEC EDL933 e *Citrobacter rodentium* DBS100.

## 1.7. Identificação e caracterização de prováveis genes *cesD2* de DAEC

Devido à localização dos iniciadores espB REV (Figura 22) e escF FOR (Figura 26), foi possível amplificar parte de um provável gene *cesD2* dos isolados C39 e C74 de DAEC, o qual codifica uma chaperona alternativa da proteína translocadora EspD (Neves *et al.*, 2003). As sequências obtidas estavam, portanto, incluídas nos produtos de PCR cujos perfis eletroforéticos são apresentados nas Figuras 23 e 27.

### 1.7.1. Provável *cesD2* do isolado C39

Empregando DNA do isolado C39 foram amplificadas as porções inicial e final do provável gene *cesD2*. Embora essas sequências sejam curtas (70 e 44 pb, respectivamente), a qualidade dos sequenciamentos que as originaram foi bastante alta. O *contig* correspondente à porção 5' foi gerado a partir de sete sequências independentes, cinco correspondentes a insertos clonados e duas derivadas de PCR. A porção 3' do gene foi construída a partir de seis sequências distintas, quatro insertos clonados e dois fragmentos amplificados por PCR. Os dados das análises de identidade empregando o início e o fim do possível *cesD2* de C39 foram agrupados nas Tabelas 16 e 17, respectivamente.

**Tabela 16.** Análise de identidade da porção 5' do provável gene *cesD2* da DAEC C39.

Gene	Nº de acesso	Organismo	Origem	Identidade	Query coverage*	E-value**
<i>orf57</i>	AJ303141	STEC O103:H2 RW 1374	bovina	100,00%	100%	1,1e <sup>-11</sup>
<i>cesD2</i>	AB426060	EPEC O111:H <sup>-</sup> B171-1	humana	100,00%	100%	1,3e <sup>-11</sup>
<i>cesD2</i>	AP010960	EHEC O111:H <sup>-</sup> 11128	humana	100,00%	100%	9,5e <sup>-12</sup>
<i>cesD2</i>	AP010958	EHEC O103:H2 12009	humana	100,00%	100%	9,5e <sup>-12</sup>
<i>cesD2</i>	AP010953	EHEC O26:H11 11368	humana	100,00%	100%	9,5e <sup>-12</sup>
<i>cesD2</i>	FM986652	<i>E. coli</i> 537/89	-	100,00%	100%	1,4e <sup>-11</sup>
<i>cesD2</i>	FM986651	<i>E. coli</i> IHIT 1190	-	100,00%	100%	1,4e <sup>-11</sup>
<i>cesD2</i>	FM986650	<i>E. coli</i> DEC8A	-	100,00%	100%	1,4e <sup>-11</sup>
<i>st39</i>	AJ277443	STEC O26:H 413/89-1	bovina	100,00%	100%	1,4e <sup>-11</sup>
<i>cesD2</i>	FM201463	DA-EPEC O26:K60 B6	humana	100,00%	100%	1,4e <sup>-11</sup>
<i>cesD2</i>	FM201464	DA-EPEC O128:H2 9812	humana	100,00%	100%	1,5e <sup>-11</sup>
<i>orf27</i>	AF200363	EPEC O15:H <sup>-</sup> RDEC-1	cunicular	100,00%	100%	1,7e <sup>-11</sup>
<i>ECs4553</i>	BA000007	EHEC O157:H7 Sakai	humana	97,10%	100%	9,2e <sup>-11</sup>
<i>cesD2</i>	AE005174	EHEC O157:H7 EDL933	humana	97,10%	100%	9,2e <sup>-11</sup>
-	EU871628	EHEC O145:H <sup>-</sup> 33264	humana	97,10%	100%	1,5e <sup>-10</sup>
-	EU871627	EPEC O55:H7 EDS-58	-	97,10%	100%	1,6e <sup>-10</sup>
<i>cesD2</i>	AF022236	EPEC O127:H7 E2348/69	humana	97,10%	100%	1,7e <sup>-10</sup>
<i>cr27</i>	AF311901	<i>C. rodentium</i> DBS100	murina	87,10%	100%	4,5e <sup>-07</sup>

\*Query coverage: representa a extensão da sequência investigada que apresenta identidade com a sequência de outro organismo.

\*\*E-value: indica a probabilidade dos alinhamentos obtidos serem casuais.

**Tabela 17.** Análise de identidade da porção 3' do provável gene *cesD2* do isolado C39 de DAEC.

Gene	Nº de acesso	Organismo	Origem	Identidade	Query coverage*	E-value**
<i>orf57</i>	AJ303141	STEC O103:H2 RW 1374	bovina	100,00%	100%	2,7e <sup>-05</sup>
<i>cesD2</i>	AB426060	EPEC O111:H <sup>-</sup> B171-1	humana	100,00%	100%	3,1e <sup>-05</sup>
<i>st39</i>	AJ277443	STEC O26:H 413/89-1	bovina	100,00%	100%	3,6e <sup>-05</sup>
<i>cesD2</i>	FM201463	DA-EPEC O26:K60 B6	humana	100,00%	100%	3,6e <sup>-05</sup>
<i>cesD2</i>	FM201464	DA-EPEC O128:H2 9812	humana	100,00%	100%	3,7e <sup>-05</sup>
<i>orf27</i>	AF200363	EPEC O15:H <sup>-</sup> RDEC-1	cunicular	100,00%	100%	4,3e <sup>-05</sup>
<i>cesD2</i>	AP010958	EHEC O103:H2 12009	humana	100,00%	100%	2,4e <sup>-05</sup>
<i>cesD2</i>	AP010953	EHEC O26:H11 11368	humana	100,00%	100%	2,4e <sup>-05</sup>
<i>cesD2</i>	FM986652	<i>E. coli</i> 537/89	-	97,70%	100%	0,00011
<i>cesD2</i>	FM986651	<i>E. coli</i> IHIT 1190	-	97,70%	100%	0,00011
<i>cesD2</i>	FM986650	<i>E. coli</i> DEC8A	-	97,70%	100%	0,00012
<i>cr27</i>	AF311901	<i>C. rodentium</i> DBS100	murina	86,40%	100%	0,05
<i>ECs4553</i>	BA000007	EHEC O157:H7 Sakai	humana	97,70%	98%	0,00015
<i>cesD2</i>	AE005174	EHEC O157:H7 EDL933	humana	97,70%	98%	0,00015
-	EU871628	EHEC O145:H <sup>-</sup> 33264	humana	97,70%	98%	0,00025
-	EU871627	EPEC O55:H7 EDS-58	-	97,70%	98%	0,00026
<i>cesD2</i>	AF022236	EPEC O127:H7 E2348/69	humana	97,70%	98%	0,00028

\*Query coverage: representa a extensão da sequência investigada que apresenta identidade com a sequência de outro organismo.

\*\*E-value: indica a probabilidade dos alinhamentos obtidos serem casuais.

Nessas tabelas verifica-se que os dois fragmentos amplificados são idênticos a regiões homólogas de diversas linhagens de EPEC, EHEC e DA-EPEC. No entanto, esse valor talvez não corresponda a um retrato fiel da identidade do provável *cesD2* completo de C39 com os homólogos listados, pois é possível que as extremidades do gene sejam mais conservadas que o restante de sua sequência.

### 1.7.2. Provável *cesD2* do isolado C74

A porção final de um possível *cesD2* de C74, com 44 pares de bases de extensão, também foi amplificada em PCRs empregando o iniciador escF REV; essa sequência foi obtida a partir de um único produto de PCR. As análises de identidade utilizando esse fragmento são apresentadas na Tabela 18.

**Tabela 18.** Análise de identidade da porção 3' do provável gene *cesD2* do isolado C74 de DAEC.

Gene	Nº de acesso	Organismo	Origem	Identidade	Query coverage*	E-value**
<i>cesD2</i>	AP010958	EHEC O103:H2 12009	humana	90,90%	100%	0,0029
<i>cesD2</i>	AP010953	EHEC O26:H11 11368	humana	90,90%	100%	0,0029
<i>orf57</i>	AJ303141	STEC O103:H2 RW 1374	bovina	90,90%	100%	0,0032
<i>cesD2</i>	AB426060	EPEC O111:H <sup>-</sup> B171-1	humana	90,90%	100%	0,0035
<i>st39</i>	AJ277443	STEC O26:H 413/89-1	bovina	90,90%	100%	0,0038
<i>cesD2</i>	FM201463	DA-EPEC O26:K60 B6	humana	90,90%	100%	0,0039
<i>cesD2</i>	FM201464	DA-EPEC O128:H2 9812	humana	90,90%	100%	0,0039
<i>orf27</i>	AF200363	EPEC O15:H <sup>-</sup> RDEC-1	cunicular	90,90%	100%	0,0044
<i>cesD2</i>	AP010960	EHEC O111:H <sup>-</sup> 11128	humana	88,60%	100%	0,0099
<i>cesD2</i>	FM986652	<i>E. coli</i> 537/89	-	88,60%	100%	0,013
<i>cesD2</i>	FM986651	<i>E. coli</i> IHIT 1190	-	88,60%	100%	0,013
<i>cesD2</i>	FM986650	<i>E. coli</i> DEC8A	-	88,60%	100%	0,013
<i>Cr27</i>	AF311901	<i>C. rodentium</i> DBS100	murina	77,30%	100%	6,3
<i>cesD2</i>	AE005174	EHEC O157:H7 EDL933	humana	88,40%	98%	0,019
<i>ECs4553</i>	BA000007	EHEC O157:H7 Sakai	humana	88,40%	98%	0,019
-	EU871628	EHEC O145:H <sup>-</sup> 33264	humana	88,40%	98%	0,027
-	EU871627	EPEC O55:H7 EDS-58	-	88,40%	98%	0,028
<i>cesD2</i>	AF022236	EPEC O127:H7 E2348/69	humana	88,40%	98%	0,03

\*Query coverage: representa a extensão da sequência investigada que apresenta identidade com a sequência de outro organismo.

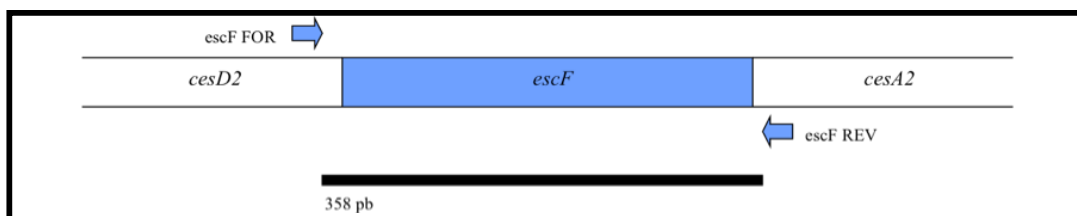
\*\*E-value: indica a probabilidade dos alinhamentos obtidos serem casuais.

O alinhamento do provável *cesD2* de C74 com vários dos homólogos depositados no GenBank ocorre ao longo de toda a sua extensão (Tabela 18). Apenas quatro bases diferem entre o possível *cesD2* e as regiões dos genes com as quais esse fragmento apresenta identidade mais elevada; uma corresponde ao suposto códon de terminação. Essas diferenças provavelmente devem-se a erros de sequenciamento, uma vez que a maior parte das bases sequenciadas apresenta qualidade inferior a 20. Suporte adicional à essa hipótese é fornecido pelo fato do possível gene de C74 ter sido obtido a partir de uma única sequência.

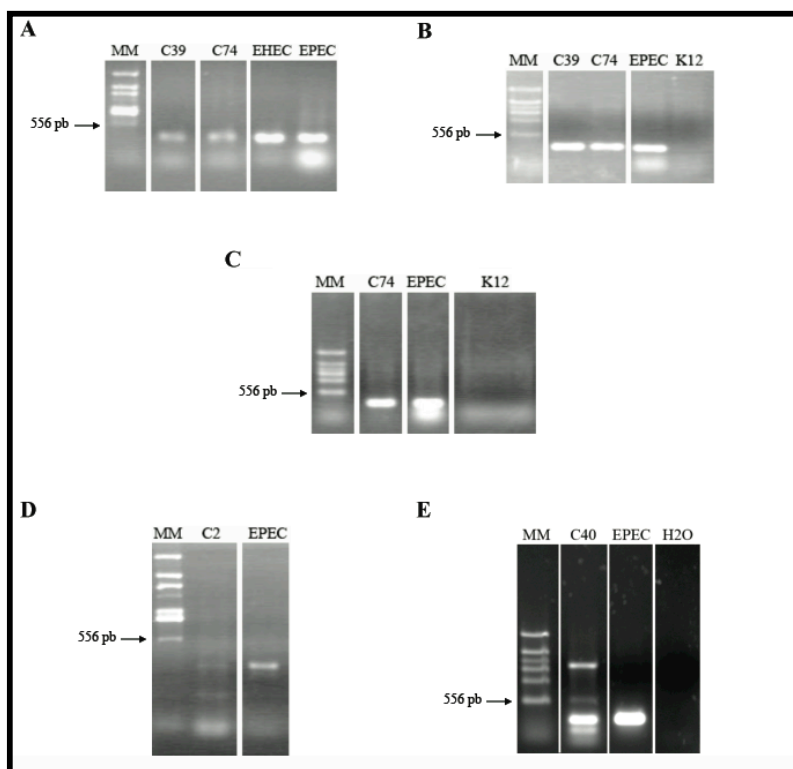
### 1.8. Identificação e caracterização de prováveis genes *escF* de DAEC

Os iniciadores *escF* FOR e *escF* REV (Figura 26) foram utilizados em experimentos de PCR para amplificar um homólogo do gene *escF* em DAEC, o qual codifica a subunidade da agulha (Wilson *et al.*, 2001) e provavelmente também do bastão central do corpo basal (Ogino *et al.*, 2006) do TTSA de EPEC.

Fragmentos do tamanho esperado foram obtidos empregando-se DNA das DAEC C2, C39, C40 e C74 (Figura 27), porém produtos inespecíficos foram amplificados com C2 (Figura 27 D) e C40 (Figura 27 E), apesar do uso de diversas temperaturas de anelamento.



**Figura 26.** Região de anelamento dos iniciadores escF FOR e escF REV no LEE de EPEC. O produto de amplificação esperado, de 358 pb, está representado por uma barra.

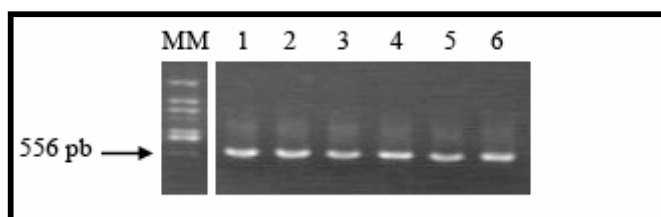


**Figura 27.** Perfis eletroforéticos dos produtos de PCR obtidos com os iniciadores escF FOR e escF REV. Fragmentos foram amplificados empregando DNA das DAEC C2 (**D**), C39 (**A**, **B**), C40 (**E**) e C74 (**A**, **B**, **C**), bem como dos controles positivos EPEC E2348/69 e EHEC EDL933. Não houve amplificação utilizando os controles negativos K-12 (**B**, **C**) e água (**E**). As setas apontam para as bandas de interesse dos marcadores de massa molecular (MM) TTSS Ladder 1 (**A**, **D**) e TTSS Ladder 3 (**B**, **C**, **E**).

Uma alíquota do DNA amplificado a partir de C39 foi clonada no vetor pGEM<sup>®</sup>-T Easy e transformada em células de *E. coli* XL10-Gold<sup>™</sup>. DNA plasmidial foi extraído de seis colônias brancas selecionadas e utilizado em experimentos de PCR com os iniciadores



Universal e Reverso (Figura 28), revelando que todos os clones possuíam um inserto de tamanho esperado.



**Figura 28.** Perfil eletroforético dos produtos de amplificação com os iniciadores Universal e Reverso, empregando DNAs plasmidiais extraídos das células transformadas. Os fragmentos amplificados a partir de todos os clones correspondem ao provável gene *escF* do isolado C39 de DAEC. A seta aponta para a banda de interesse do marcador de massa molecular (MM) TTSS Ladder 1. Os números localizados acima de cada poço do gel correspondem aos nomes dos clones.

DNA plasmidial extraído dos clones 2 e 5 e produtos de PCR amplificados com DNA dos isolados C39, C40 e C74 foram purificados, quantificados e submetidos ao sequenciamento automático. Devido à amplificação de produtos inespecíficos em C40 (Figura 27 E), o fragmento do tamanho esperado foi excisado do gel de agarose e purificado. Não foi possível sequenciar o produto obtido para o isolado C2, uma vez que a eficiência da amplificação foi muito baixa (Figura 27 D) e não forneceu a quantidade necessária de DNA.

*Contigs* foram obtidos a partir das sequências dos prováveis *escF* de C39 e C74 e empregados em análises de identidade com genes homólogos de outros organismos (Tabelas 19 e 20). Devido à baixíssima qualidade das sequências obtidas para C40, não foi gerado um *contig* do possível *escF* desse isolado.

### 1.8.1. Provável *escF* do isolado C39

A sequência do possível *escF* de C39 está completa e foi depositada no GenBank sob o número de acesso EU715410. Esse *contig* de 222 pb de extensão foi construído a partir de oito sequências distintas; quatro insertos clonados e quatro derivadas de PCR. Sua sequência é idêntica à de 11 genes homólogos de outras linhagens de *E. coli*, incluindo EPEC, EHEC e DA-EPEC. Curiosamente, foram encontrados ainda homólogos do possível *escF* em duas linhagens distintas de *Salmonella enterica*. Em *S. enterica*, os genes *ssaG* e *ssaH* dos isolados LT2 e SL1344 pertencem à ilha de patogenicidade 2 (SPI-2), cuja expressão é



importante para a infecção sistêmica causada por essa bactéria em animais, no que diz respeito à sobrevivência e à replicação em fagócitos (revisado por Schmidt e Hensel, 2004). A identidade desses genes com o homólogo de DAEC, no entanto, é bem menor que a observada em relação às linhagens de *E. coli*, sendo mais próxima da verificada com *cr28* de *C. rodentium* (Tabela 19).

**Tabela 19.** Análise de identidade do provável gene *escF* do isolado C39 de DAEC.

Gene	Nº de acesso	Organismo	Origem	Identidade	Query coverage*	E-value**
<i>escF</i>	AJ303141	STEC O103:H2 RW 1374	bovina	100,00%	100%	9,7e <sup>-56</sup>
<i>escF</i>	AB426060	EPEC O111:H <sup>-</sup> B171-1	humana	100,00%	100%	1,1e <sup>-55</sup>
<i>escF</i>	AJ277443	STEC O26:H 413/89-1	bovina	100,00%	100%	1,3e <sup>-55</sup>
<i>escF</i>	FM201463	DA-EPEC O26:K60 B6	humana	100,00%	100%	1,3e <sup>-55</sup>
<i>escF</i>	FM201464	DA-EPEC O128:H2 9812	humana	100,00%	100%	1,3e <sup>-55</sup>
<i>escF</i>	AF200363	EPEC O15:H <sup>-</sup> RDEC-1	cunicular	100,00%	100%	1,5e <sup>-55</sup>
<i>escF</i>	AP010958	EHEC O103:H2 12009	humana	100,00%	100%	7,0e <sup>-109</sup>
<i>escF</i>	AP010953	EHEC O26:H11 11368	humana	100,00%	100%	7,0e <sup>-109</sup>
<i>escF</i>	FM986652	<i>E. coli</i> 537/89	-	97,30%	100%	1,5e <sup>-52</sup>
<i>escF</i>	FM986651	<i>E. coli</i> IHIT 1190	-	97,30%	100%	1,6e <sup>-52</sup>
<i>escF</i>	FM986650	<i>E. coli</i> DEC8A	-	97,30%	100%	1,6e <sup>-52</sup>
<i>escF</i>	AP010960	EHEC O111:H <sup>-</sup> 11128	humana	97,30%	100%	1,0e <sup>-100</sup>
<i>ECs4552</i>	BA000007	EHEC O157:H7 Sakai	humana	96,80%	100%	3,4e <sup>-52</sup>
<i>escF</i>	AE005174	EHEC O157:H7 EDL933	humana	96,80%	100%	3,4e <sup>-52</sup>
<i>escF</i>	EU871628	EHEC O145:H <sup>-</sup> 33264	humana	96,80%	100%	5,7e <sup>-52</sup>
<i>escF</i>	EU871627	EPEC O55:H7 EDS-58	-	96,80%	100%	6,0e <sup>-52</sup>
<i>escF</i>	AF022236	EPEC O127:H7 E2348/69	humana	96,80%	100%	6,4e <sup>-52</sup>
<i>cr28</i>	AF311901	<i>C. rodentium</i> DBS100	murina	75,20%	100%	3,5e <sup>-27</sup>
<i>ssaG</i>	AJ224892	<i>S. enterica</i> LT2	-	66,10%	56%	0,0043
<i>ssaH</i>	AF020808	<i>S. entérica</i> SL1344	-	66,10%	56%	0,0046

\*Query coverage: representa a extensão da sequência investigada que apresenta identidade com a sequência de outro organismo.

\*\*E-value: indica a probabilidade dos alinhamentos obtidos serem casuais.

### 1.8.2. Provável *escF* do isolado C74

O provável *escF* de C74 também está completo e foi construído a partir de seis sequências distintas, todas diretamente derivadas de PCR. Esse *contig* possui homólogos 100% idênticos em 12 linhagens de EPEC, DA-EPEC, EHEC e DAEC (Tabela 20); essa DAEC corresponde ao isolado C39. Assim, era de se esperar que os genes *ssaG* e *ssaH* dos isolados LT2 e SL1344 de *S. enterica* também fossem detectados nas análises de identidade empregando o possível *escF* de C74 (Tabela 20).

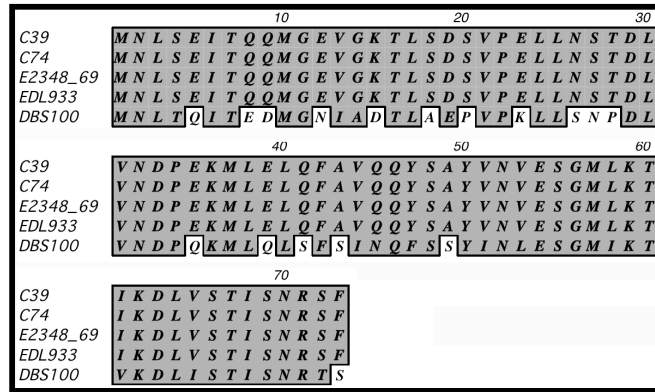
**Tabela 20.** Análise de identidade do provável gene *escF* do isolado C74 de DAEC.

Gene	Nº de acesso	Organismo	Origem	Identidade	Query coverage*	E-value**
<i>escF</i>	AP010958	EHEC O103:H2 12009	humana	100,00%	100%	6,0e <sup>-56</sup>
<i>escF</i>	AP010953	EHEC O26:H11 11368	humana	100,00%	100%	6,0e <sup>-56</sup>
<i>escF</i>	AJ303141	STEC O103:H2 RW 1374	bovina	100,00%	100%	7,0e <sup>-56</sup>
<i>escF</i>	AB426060	EPEC O111:H <sup>-</sup> B171-1	humana	100,00%	100%	7,9e <sup>-56</sup>
<i>escF</i>	AJ277443	STEC O26:H 413/89-1	bovina	100,00%	100%	9,1e <sup>-56</sup>
<i>escF</i>	FM201463	DA-EPEC O26:K60 B6	humana	100,00%	100%	9,1e <sup>-56</sup>
<i>escF</i>	FM201464	DA-EPEC O128:H2 9812	humana	100,00%	100%	9,5e <sup>-56</sup>
<i>escF</i>	AF200363	EPEC O15:H <sup>-</sup> RDEC-1	cunicular	100,00%	100%	1,1e <sup>-55</sup>
<i>escF</i>	EU715410	DAEC O11:H0	humana	100,00%	100%	9,5e <sup>-55</sup>
<i>escF</i>	AP010960	EHEC O111:H <sup>-</sup> 11128	humana	97,30%	100%	7,7e <sup>-53</sup>
<i>escF</i>	FM986652	<i>E. coli</i> 537/89	-	97,30%	100%	1,1e <sup>-52</sup>
<i>escF</i>	FM986651	<i>E. coli</i> IHIT 1190	-	97,30%	100%	1,1e <sup>-52</sup>
<i>escF</i>	FM986650	<i>E. coli</i> DEC8A	-	97,30%	100%	1,2e <sup>-52</sup>
<i>escF</i>	AE005174	EHEC O157:H7 EDL933	humana	96,80%	100%	2,5e <sup>-52</sup>
<i>ECs4552</i>	BA000007	EHEC O157:H7 Sakai	humana	96,80%	100%	2,5e <sup>-52</sup>
<i>escF</i>	EU871628	EHEC O145:H <sup>-</sup> 33264	humana	96,80%	100%	4,2e <sup>-52</sup>
<i>escF</i>	EU871627	EPEC O55:H7 EDS-58	-	96,80%	100%	4,4e <sup>-52</sup>
<i>escF</i>	AF022236	EPEC O127:H7 E2348/69	humana	96,80%	100%	4,7e <sup>-52</sup>
<i>cr28</i>	AF311901	<i>C. rodentium</i> DBS100	murina	75,20%	100%	3,1e <sup>-27</sup>
<i>ssaG</i>	AJ224892	<i>S. enterica</i> LT2	-	66,10%	56%	0,0044
<i>ssaH</i>	AF020808	<i>S. entérica</i> SL1344	-	66,10%	56%	0,0047

\*Query coverage: representa a extensão da sequência investigada que apresenta identidade com a sequência de outro organismo.

\*\*E-value: indica a probabilidade dos alinhamentos obtidos serem casuais.

Embora os prováveis *escF* das DAEC C39 e C74 não sejam idênticos aos homólogos das linhagens prototípicas EDL933 e E2348/69, o alinhamento de suas proteínas preditas demonstra que as sequências de aminoácidos das quatro *E. coli* são idênticas (Figura 29). Esse resultado indica que as diferenças possivelmente se devem a mutações pontuais silenciosas que ocorreram nos genes homólogos em questão, e/ou em genes de outros organismos, a partir dos quais essas linhagens evoluíram.



**Figura 29.** Alinhamento das proteínas EscF previstas das DAEC C39 e C74 e EscF de EPEC E2348/69, EHEC EDL933 e *Citrobacter rodentium* DBS100.

### 1.9. Identificação e caracterização de um provável gene *cesA2* de DAEC

Devido à localização do iniciador escF REV (Figura 26), foi possível amplificar a porção inicial de um provável *cesA2* da DAEC C39, com 51 pb de extensão. Esse *contig* foi construído a partir de sete sequências distintas; quatro insertos clonados e três fragmentos diretamente derivados de PCR. O gene *cesA2* codifica uma chaperona alternativa da proteína formadora da bainha da agulha do TTSA (Su *et al.*, 2008), necessária para a secreção tanto de efetores quanto de translocadores do TTSS (Deng *et al.*, 2004).

O fragmento amplificado está incluído, portanto, nos produtos de PCR obtidos com os iniciadores escF FOR e escF REV (Figura 27) e nos insertos dos clones 2 e 5 apresentados na Figura 28, cujo DNA plasmidial foi extraído, quantificado, purificado e enviado para sequenciamento automático. As análises de identidade empregando o *contig* gerado a partir dessas sequências são apresentadas na Tabela 21.

A porção 5' obtida para o provável *cesA2* é 100% idêntica a oito homólogos depositados no GenBank, pertencentes a linhagens de EHEC, EPEC e DA-EPEC de diversas origens. Os valores elevados de identidade observados para os homólogos das demais linhagens, inclusive *cr29* de *C. rodentium*, possivelmente devem-se à pequena extensão do fragmento e não correspondem necessariamente ao que seria obtido para a sequência completa do provável gene.

**Tabela 21.** Análise de identidade da região 5' do provável gene *cesA2* do isolado C39 de DAEC.

Gene	Nº de acesso	Organismo	Origem	Identidade	Query coverage*	E-value**
<i>orf54</i>	AJ303141	STEC O103:H2 RW 1374	bovina	100,00%	100%	1,4e <sup>-08</sup>
<i>orf29</i>	AB426060	EPEC O111:H <sup>-</sup> B171-1	humana	100,00%	100%	1,5e <sup>-08</sup>
<i>st41</i>	AJ277443	STEC O26:H 413/89-1	bovina	100,00%	100%	1,7e <sup>-08</sup>
<i>orf29</i>	FM201463	DA-EPEC O26:K60 B6	humana	100,00%	100%	1,7e <sup>-08</sup>
<i>orf29</i>	AF200363	EPEC O15:H <sup>-</sup> RDEC-1	cunicular	100,00%	100%	2,0e <sup>-08</sup>
-	AP010958	EHEC O103:H2 12009	humana	100,00%	100%	1,2e <sup>-08</sup>
-	AP010953	EHEC O26:H11 11368	humana	100,00%	100%	1,2e <sup>-08</sup>
<i>orf29</i>	FM201464	DA-EPEC O128:H2 9812	humana	98,00%	100%	6,7e <sup>-08</sup>
-	AP010960	EHEC O111:H <sup>-</sup> 11128	humana	96,00%	98%	3,8e <sup>-07</sup>
<i>orf29</i>	FM986652	<i>E. coli</i> 537/89	-	96,00%	98%	5,0e <sup>-07</sup>
<i>orf29</i>	FM986651	<i>E. coli</i> IHIT 1190	-	96,00%	98%	5,2e <sup>-07</sup>
<i>orf29</i>	FM986650	<i>E. coli</i> DEC8A	-	96,00%	98%	5,3e <sup>-07</sup>
<i>cesA2</i>	AE005174	EHEC O157:H7 EDL933	humana	94,10%	100%	7,0e <sup>-07</sup>
<i>ECs4551</i>	BA000007	EHEC O157:H7 Sakai	humana	94,10%	100%	7,0e <sup>-07</sup>
-	EU871628	EHEC O145:H <sup>-</sup> 33264	humana	94,10%	100%	1,0e <sup>-06</sup>
-	EU871627	EPEC O55:H7 EDS-58	-	94,10%	100%	1,1e <sup>-06</sup>
<i>orf29</i>	AF022236	EPEC O127:H7 E2348/69	humana	94,10%	100%	1,1e <sup>-06</sup>
<i>cr29</i>	AF311901	<i>C. rodentium</i> DBS100	murina	90,00%	98%	3,3e <sup>-05</sup>

\*Query coverage: representa a extensão da sequência investigada que apresenta identidade com a sequência de outro organismo.

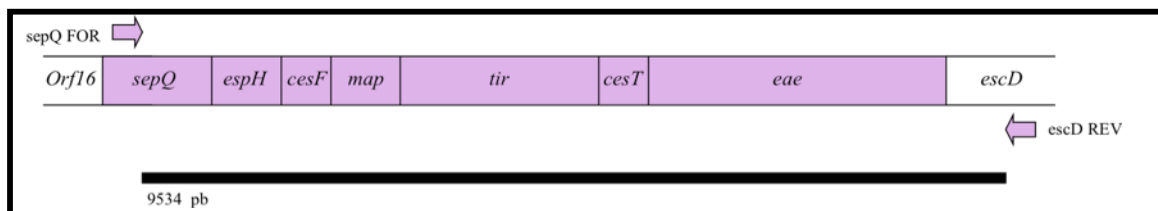
\*\*E-value: indica a probabilidade dos alinhamentos obtidos serem casuais.

### 1.10. Investigação da região entre os prováveis *sepQ* e *escD* de DAEC – busca pelos possíveis efetores de DAEC

Conforme mencionado anteriormente, não se esperava encontrar em DAEC homólogos dos genes da EPEC E2348/69 localizados entre *sepQ* e *escD* (Figura 9), uma vez que suas sequências codificam proteínas efetoras envolvidas na lesão A/E e suas chaperonas, específicas dos patotipos EPEC e EHEC (Kaper *et al.*, 2004). Assim, é bastante provável que a região localizada entre os possíveis *sepQ* e *escD* de DAEC contenha ao menos alguns de seus efetores.

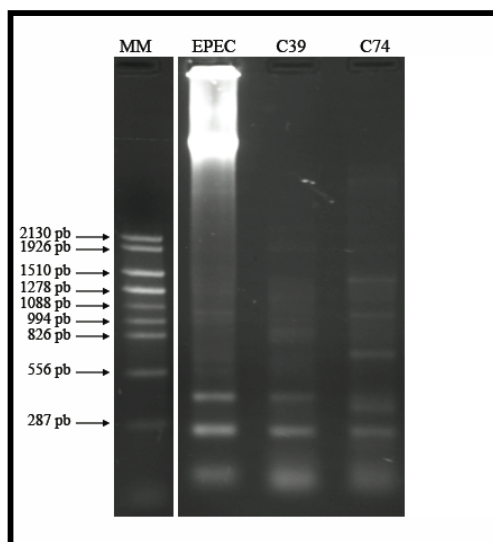
Como um possível gene *escD* do isolado C39 de DAEC foi identificado neste trabalho e prováveis *sepQ* de C39 e C74 foram previamente detectados por nosso grupo (Lorenzoni, 2009), experimentos de PCR foram conduzidos com o par de iniciadores *sepQ* FOR e *escD* REV (Figura 30) e DNA dos isolados C39 e C74, a fim de identificar a natureza da região que se encontra entre esses prováveis genes de DAEC. Devido à grande extensão do produto obtido empregando como molde DNA da EPEC E2348/69, optou-se por utilizar a enzima

Elongase<sup>®</sup>, capaz de amplificar fragmentos de até 20 kb. Obviamente não se esperava a obtenção de um fragmento do mesmo tamanho com DNA das DAEC testadas, uma vez que esses isolados não possuem os mesmos fatores de virulência de EPEC (Piva, 1998).



**Figura 30.** Região de anelamento dos iniciadores sepQ FOR e escD REV no LEE de EPEC. O produto esperado como resultado da amplificação está representado por uma barra.

Embora diversas temperaturas de anelamento, concentrações de MgCl<sub>2</sub> e quantidades de DNA tenham sido testadas, todas as PCRs resultaram na obtenção de diversos produtos com tamanhos distintos, tanto para o isolado C39 quanto para C74 (Figura 31). Como o rendimento dos produtos amplificados e a reprodutibilidade dos resultados foram sempre muito baixos, não foi possível enviar os fragmentos gerados para sequenciamento com o objetivo de caracterizá-los.



**Figura 31.** Perfil eletroforético dos produtos de PCR obtidos empregando DNA das amostras C39 e C74 de DAEC e do controle positivo EPEC 2348/69, com os iniciadores sepQ FOR e escD REV e a enzima Elongase<sup>®</sup>. A temperatura de anelamento foi de 50°C. Os DNAs utilizados como moldes foram os produtos de uma amplificação prévia realizada sob as mesmas condições. As setas indicam o tamanho das bandas do marcador TTSS Ladder 2.

### **1.11. Análise comparativa das identidades entre os prováveis genes TTSS identificados em DAEC e os homólogos depositados no GenBank**

A partir das tabelas que apresentam as análises de identidade dos prováveis genes TTSS *escD*, *espA*, *espD*, *espB* e *escF* de C39, *espA* e *espD* de C40 e *espA*, *espB* e *escF* de C74 com alguns de seus homólogos depositados no GenBank, foi construída uma única tabela em que todos os valores de identidade obtidos foram agrupados (Tabela 22). A média aritmética das identidades de cada possível gene em relação aos homólogos analisados foi calculada, permitindo a comparação das diferentes sequências identificadas neste trabalho. Os prováveis *cesD2* de C39 e C74 e *cesA2* de C39 não foram incluídos nessas análises devido à sua pequena extensão, o que tornava desaconselhável a extrapolação dos valores de identidade obtidos para o restante de suas sequências.

As médias aritméticas das identidades dos prováveis genes de C39 e C74 com seus homólogos revelam que o possível gene mais conservado é *escF* e o mais divergente é *espB* (Tabela 22). A comparação entre sequências comuns aos isolados C39 e C74 revela que as mais conservadas são as de *escF*, 100% idênticas, e as mais divergentes são as de *espA*, 95% idênticas (resultados não apresentados).

A Tabela 22 mostra ainda que os dois organismos cujos genes TTSS apresentam os maiores valores de identidade em relação aos homólogos da DAEC C39 são as EHEC de origem bovina e humana RW 1374 (número de acesso AJ303141) e 12009 (número de acesso AP010958), respectivamente. A *E. coli* que mais se assemelha ao isolado C40, por sua vez, é a EPEC prototípica E2348/69, de número de acesso AF022236. Finalmente, todos os prováveis genes de C74 são 100% idênticos aos homólogos da linhagem de EPEC humana B171-1, cujo número de acesso é AB426060.

A variabilidade dos possíveis genes TTSS dos isolados C39 e C74 em relação ao isolado C40, bem como os valores distintos de identidade obtidos para as sequências de cada isolado de DAEC e seus homólogos de outros organismos, poderiam ser explicados por três hipóteses distintas:

1. Cada provável gene TTSS foi adquirido em um evento independente de transferência horizontal;
2. Todos os prováveis genes foram adquiridos em um único evento de transferência horizontal e, posteriormente, sofreram mutações pontuais silenciosas;

**Tabela 22.** Média aritmética das identidades dos prováveis genes TTSS dos isolados C39, C40 e C74 de DAEC em relação aos homólogos depositados no GenBank. Em negrito estão destacados os valores de identidade mais elevados obtidos para cada provável gene.

N° de acesso	C39					C40		C74		
	<i>escD</i>	<i>espA</i>	<i>espD</i>	<i>espB</i>	<i>escF</i>	<i>espA</i>	<i>espD</i>	<i>espA</i>	<i>espB</i>	<i>escF</i>
AB426060	99,10%	95,00%	99,80%	99,40%	100,00%	89,60%	85,20%	<b>100,00%</b>	<b>100,00%</b>	<b>100,00%</b>
AE005174	94,90%	85,50%	83,50%	78,40%	96,80%	82,70%	78,00%	87,60%	78,00%	96,80%
AF022236	93,70%	88,60%	86,80%	74,10%	96,80%	<b>99,20%</b>	<b>98,00%</b>	91,00%	73,90%	96,80%
AF200363	99,30%	95,00%	99,80%	99,70%	100,00%	89,60%	85,20%	100,00%	99,70%	100,00%
AF311901	88,30%	83,80%	86,30%	71,60%	75,20%	83,70%	87,80%	86,20%	71,50%	75,20%
AJ277443	99,20%	95,00%	99,80%	99,50%	100,00%	89,60%	85,20%	100,00%	99,50%	100,00%
AJ303141	<b>99,80%</b>	<b>100,00%</b>	<b>100,00%</b>	99,80%	<b>100,00%</b>	87,10%	85,40%	95,00%	99,20%	100,00%
AP010953	99,30%	95,00%	99,80%	99,60%	100,00%	89,60%	85,20%	100,00%	99,60%	100,00%
AP010958	<b>99,80%</b>	<b>100,00%</b>	99,90%	<b>100,00%</b>	<b>100,00%</b>	87,10%	85,30%	95,00%	99,40%	100,00%
AP010960	94,80%	87,73%	85,40%	75,00%	97,30%	92,40%	91,00%	90,50%	74,20%	97,30%
BA000007	94,90%	85,50%	83,50%	78,40%	96,80%	82,70%	78,00%	87,60%	78,00%	96,80%
EU871627	94,90%	85,50%	83,30%	78,40%	96,80%	82,90%	77,90%	87,60%	77,70%	96,80%
EU871628	94,60%	85,80%	83,30%	78,40%	96,80%	83,10%	77,90%	87,70%	78,00%	96,80%
FM201463	99,30%	95,00%	99,80%	99,70%	100,00%	89,60%	85,20%	100,00%	99,70%	100,00%
FM201464	99,10%	95,00%	99,80%	99,70%	100,00%	89,60%	85,20%	100,00%	99,70%	100,00%
FM986650	94,80%	87,70%	85,40%	74,60%	97,30%	92,40%	91,00%	90,50%	74,20%	97,30%
FM986651	94,90%	87,60%	85,10%	74,60%	97,30%	92,00%	90,80%	90,00%	74,20%	97,30%
FM986652	95,00%	87,40%	85,10%	74,60%	97,30%	92,20%	90,80%	90,20%	74,20%	97,30%
Média	96,43%	90,84%	91,47%	86,42%	97,13%	88,62%	85,73%	93,27%	86,15%	97,13%

3. Todos os prováveis genes foram adquiridos em um único evento de transferência horizontal, e novos eventos de transferência resultaram na aquisição de genes TTSS adicionais, que sofreram recombinações homólogas com os possíveis genes já integrados ao genoma.

Dentre as três hipóteses, a segunda é a que parece explicar as variações observadas da maneira mais simples, embora a terceira também possa ser plausível.

## **2. Construção de árvores filogenéticas empregando as sequências dos prováveis genes TTSS de DAEC**

As sequências nucleotídicas dos prováveis genes *escD*, *espA*, *espD*, *espB*, *cesD2*, *escF* e *cesA2* para a DAEC C39, bem como as dos possíveis *espA*, *espB* e *escF* de C74 e *espA* de C40 foram utilizados na construção de árvores filogenéticas com os homólogos de grande parte dos organismos apresentados nas Tabelas 8 a 21. Nessas construções empregou-se o critério da parcimônia em combinação com a definição de um grupo externo, que consistiu nos genes TTSS de *Citrobacter rodentium* ou de *Salmonella enterica*. Assim, os membros de cada árvore filogenética foram arranjados de modo a minimizar o número de passos evolutivos necessários para derivar seus estados de caráter avançados a partir dos estados primitivos, representados pelos grupos externos incluídos na análise (Futuyma, 2003).

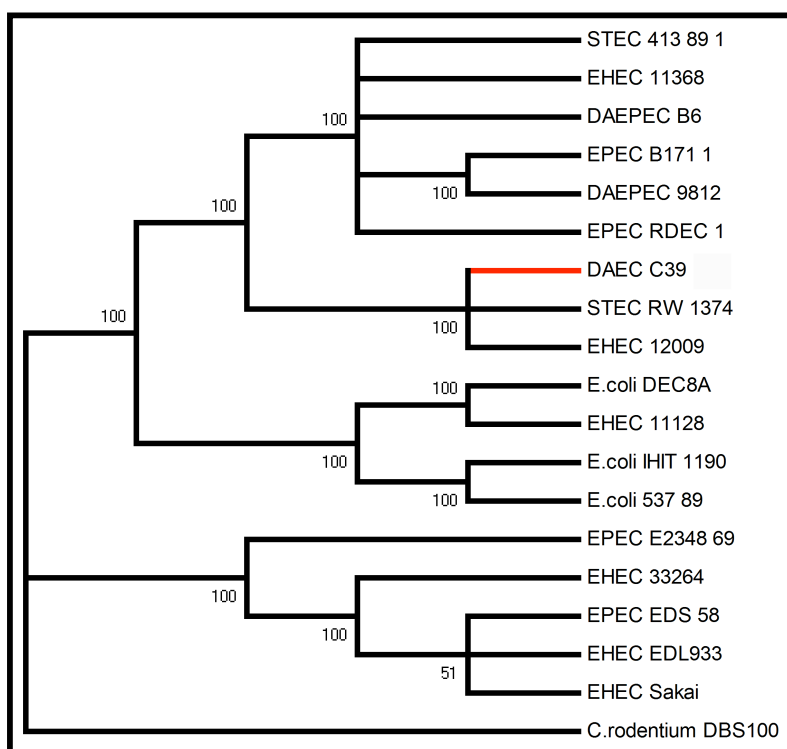
O provável *espD* de C40 não foi empregado devido às inserções e à deleção existentes em sua sequência, as quais poderiam ser consideradas *gaps* evolutivamente significativos pelo programa utilizado e alterar a árvore gerada para esse gene, levando a interpretações equivocadas. O fragmento do possível *cesD2* de C74 também não foi utilizado, pois sua sequência apresenta baixa qualidade e substituições de bases que resultariam em agrupamentos incorretos na árvore filogenética, principalmente em decorrência da substituição no suposto códon de terminação. Os *gaps* que aparentemente não resultam de erros de sequenciamento, bem como as bases não sequenciadas - *missing data* - de cada provável gene, foram considerados na construção das árvores.

### **2.1. Árvore filogenética com o provável *escD* da DAEC C39**

A árvore construída com o provável *escD* de C39 e seus homólogos é apresentada na Figura 32. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 8, C39 está incluída no



mesmo clado da STEC bovina RW 1374 e da EHEC humana 12009, cujos *escD* são 99,80% idênticos ao possível gene da DAEC.

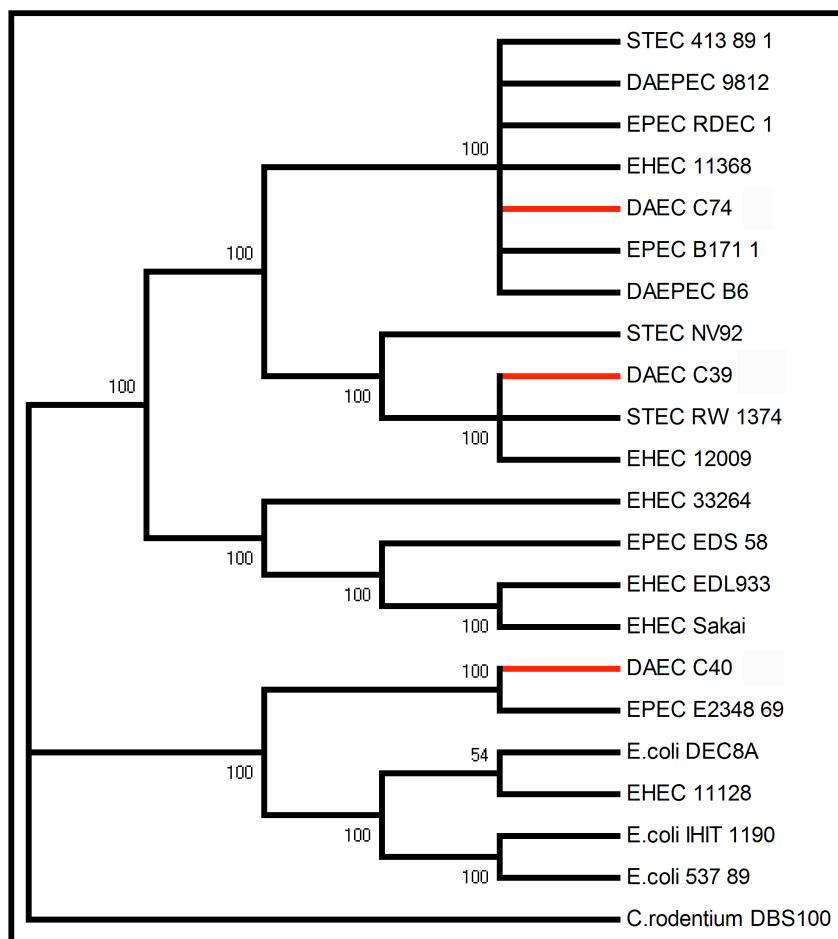


**Figura 32.** Árvore filogenética construída a partir da sequência do provável *escD* da DAEC C39 e alguns homólogos depositados no GenBank. O gene *rCR29* de *Citrobacter rodentium* foi escolhido como grupo externo. A confiabilidade de cada ramo foi averiguada por *bootstrap*, e os ramos com percentual acima de 50% são mostrados.

## 2.2. Árvore filogenética com o provável *espA* das DAEC C39, C40 e C74

A Figura 33 apresenta a árvore filogenética gerada a partir das sequências dos possíveis *espA* dos isolados C39, C40 e C74 e vários homólogos incluídos nas Tabelas 9, 10 e 11. Novamente C39 encontra-se agrupada com a STEC RW 1374 e com a EHEC 12009, já que seus homólogos são exatamente iguais, e essas três linhagens estão proximamente relacionadas à STEC bovina NV92, cujo *espA* pertence à variante  $\beta$ v. A DAEC C74, por sua vez, está no mesmo clado que a STEC bovina 413/89-1, a EHEC humana 11368, as EPEC RDEC-1 (variante  $\beta$ ) e B171-1 de origem cunicular e humana, respectivamente, e as DA-EPEC humanas 9812 e B6, pois suas sequências são 100% idênticas. Embora C39 e C74 não se localizem no mesmo ramo, seus possíveis *espA* estão evolutivamente mais próximos entre si que do homólogo de C40, o qual foi agrupado com o gene da EPEC

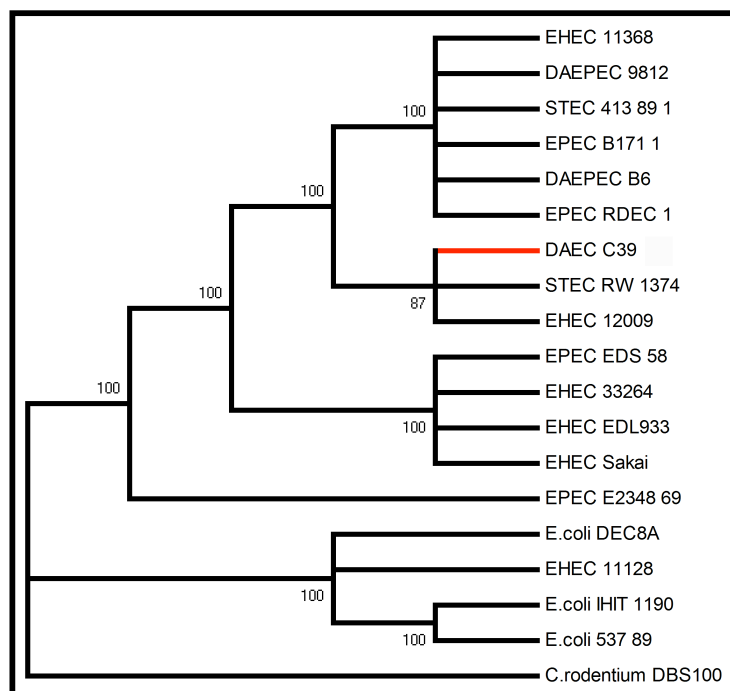
E2348/69 (variante  $\alpha$ ). Esses resultados reforçam a hipótese de que os prováveis *espA* de C39, C40 e C74 pertencem às variantes  $\beta_v$ ,  $\alpha$  e  $\beta$ , respectivamente.



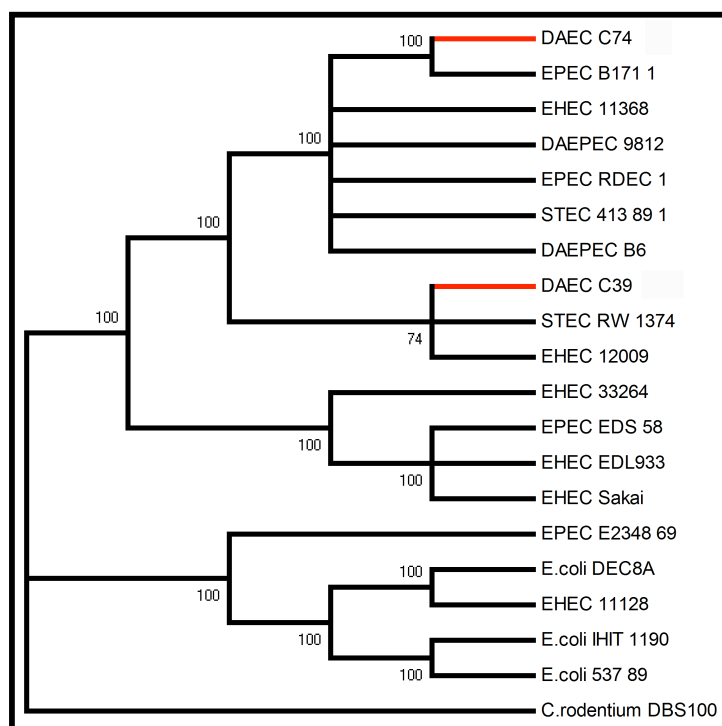
**Figura 33.** Árvore filogenética construída a partir das sequências dos prováveis *espA* dos isolados C39, C40 e C74 de DAEC e alguns homólogos depositados no GenBank. O gene *cr24* de *Citrobacter rodentium* foi escolhido como grupo externo. A confiabilidade de cada ramo foi testada por *bootstrap*, e apenas os ramos com percentual acima de 50% são mostrados.

### 2.3. Árvores filogenéticas com os prováveis *espD* da DAEC C39 e *espB* das DAEC C39 e C74

Conforme pode ser observado nas Figuras 34 e 35, os prováveis genes *espD* e *espB* de C39 também estão mais próximos evolutivamente dos homólogos das EHEC RW1374 e 12009, confirmando os resultados apresentados nas Tabelas 12 e 14 e seguindo o padrão já observado para os possíveis *escD* e *espA* desse isolado (Figuras 32 e 33).



**Figura 34.** Árvore filogenética construída a partir do provável *espD* da DAEC C39 e alguns homólogos depositados no GenBank. O gene *cr25* de *Citrobacter rodentium* foi escolhido como grupo externo. A confiabilidade de cada ramo foi testada por *bootstrap*, e os ramos com percentual acima de 50% são mostrados.

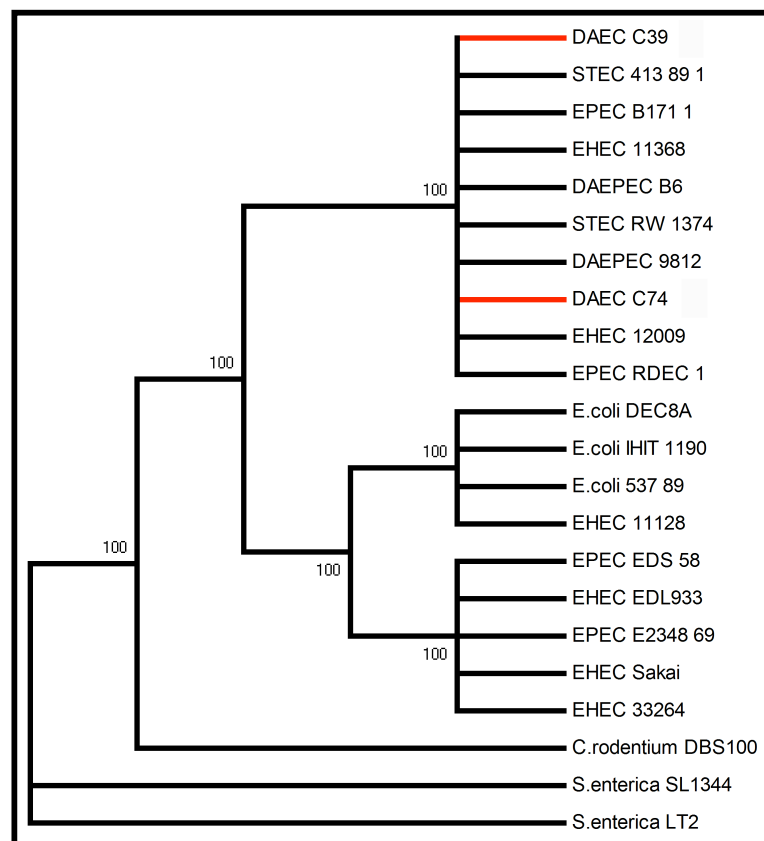


**Figura 35.** Árvore filogenética construída a partir dos prováveis *espB* das DAEC C39 e C74 e de alguns de seus homólogos depositados no GenBank. O gene *cr26* de *Citrobacter rodentium* foi escolhido como grupo externo. A confiabilidade de cada ramo foi testada por *bootstrap*, e os ramos com percentual acima de 50% são mostrados.

Na árvore filogenética construída para o gene *espB* (Figura 35) verifica-se que, embora C74 esteja mais próximo das mesmas linhagens com as quais se agrupava na árvore de *espA* (Figura 33), há um novo ramo dentro do grupo a partir do qual se destacam a DAEC e a EPEC humana B171-1. A presença desse ramo justifica-se pelo fato do homólogo de B171-1 ser 100% idêntico ao provável *espB* de C74 (Tabela 15).

#### 2.4. Árvore filogenética com os prováveis *escF* das DAEC C39 e C74

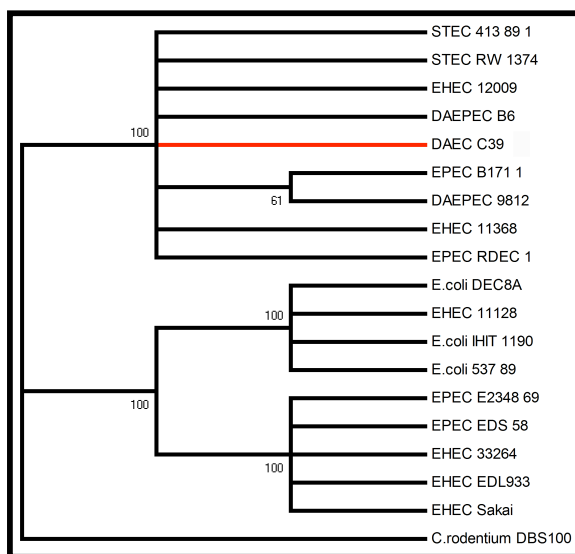
Na árvore filogenética construída para o gene *escF* (Figura 36), os isolados C39 e C74 de DAEC e os organismos mais proximamente relacionados foram agrupados no mesmo clado, não havendo a divisão anteriormente observada nas árvores de *escD*, *espA*, *espD* e *espB*. Isso pode ser explicado pelo fato das sequências homólogas das linhagens que constituem esse ramo serem 100% idênticas, conforme já verificado nas Tabelas 19 e 20.



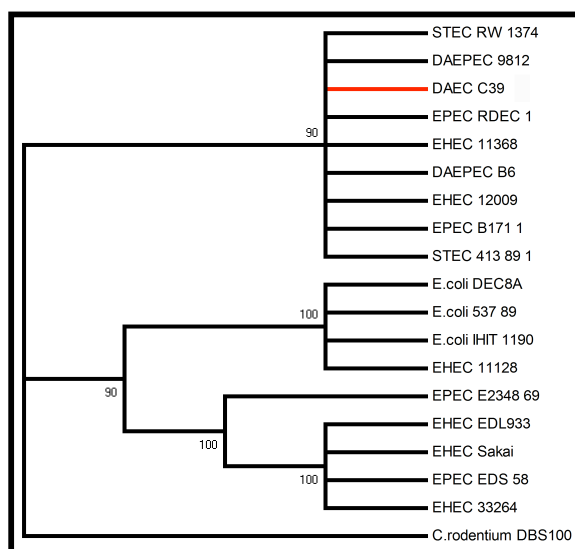
**Figura 36.** Árvore filogenética construída a partir das sequências dos prováveis *escF* dos isolados C39 e C74 de DAEC e alguns homólogos depositados no GenBank. Os genes *ssaG* e *ssaH* das linhagens LT2 e SL1344 de *Salmonella enterica* foram escolhidos como grupo externo. A confiabilidade de cada ramo foi testada por *bootstrap*, e os ramos com percentual acima de 50% são mostrados.

## 2.5. Árvores filogenéticas com os prováveis *cesD2* e *cesA2* da DAEC C39

Como os prováveis genes *cesD2* e *cesA2* de C39 também são idênticos às sequências homólogas dos isolados 413/89-1, RW 1374 e 11368 de EHEC, 12009, B171-1 e RDEC-1 de EPEC e B6 e 9812 de DA-EPEC (Tabelas 16, 17 e 21), era de se esperar que todas essas linhagens fossem agrupadas em um único clado, conforme se observa nas Figuras 37 e 38.



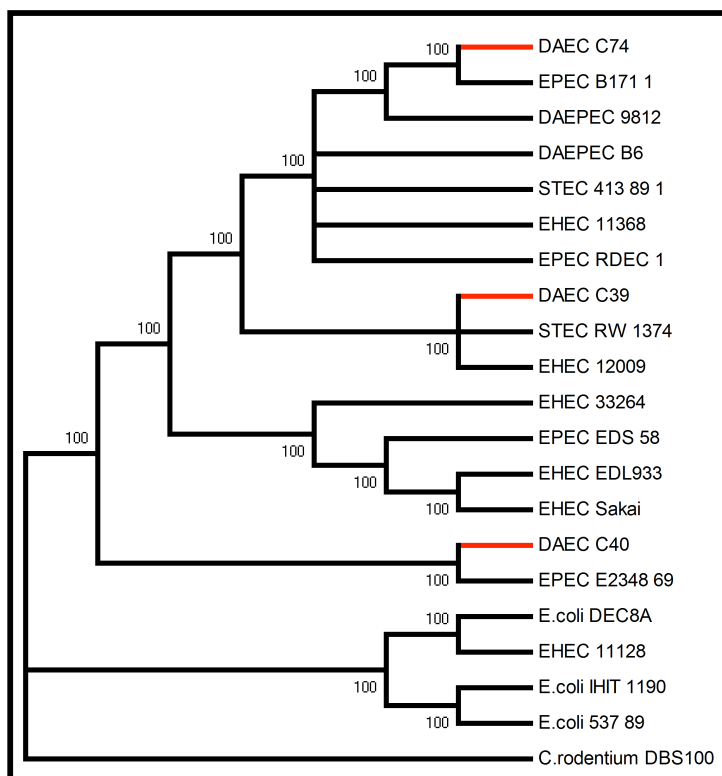
**Figura 37.** Árvore filogenética construída a partir da sequência do provável *cesD2* do isolado C39 de DAEC e alguns homólogos depositados no GenBank. O gene *cr27* de *Citrobacter rodentium* foi escolhido como grupo externo. A confiabilidade de cada ramo foi testada por *bootstrap*, e os ramos com percentual acima de 50% são mostrados.



**Figura 38.** Árvore filogenética construída a partir da sequência do provável *cesA2* do isolado C39 de DAEC e alguns homólogos depositados no GenBank. O gene *cr29* de *Citrobacter rodentium* foi escolhido como grupo externo. A confiabilidade de cada ramo foi testada por *bootstrap*, e os ramos com percentual acima de 50% são mostrados.

## 2.6. Árvore filogenética consenso, com os prováveis genes TTSS das DAEC C39, C40 e C74

Uma árvore filogenética consenso, construída a partir de todos os prováveis genes e de seus homólogos analisados individualmente nos itens 2.1 a 2.5, é apresentada na Figura 39 e confirma os resultados obtidos nas árvores anteriores e na Tabela 22. Como as bases não sequenciadas (*missing data*) de cada um dos isolados de DAEC também foram consideradas na análise, a árvore consenso é bastante similar à árvore obtida para o provável gene *espA* (Figura 33), o único cuja sequência total ou parcial é conhecida para as três DAEC investigadas.



**Figura 39.** Árvore filogenética construída a partir das sequências dos prováveis genes TTSS das DAEC C39, C40 e C74 utilizadas nas árvores anteriores e de alguns de seus homólogos depositados GenBank. Os genes de *Citrobacter rodentium* foram escolhidos como grupo externo. A confiabilidade de cada ramo foi testada por *bootstrap*, e apenas os ramos com percentual acima de 50% são mostrados.

Curiosamente, enquanto o isolado C39 aparece no mesmo ramo que duas EHEC pertencentes ao sorotipo O103:H2 (RW 1374 e 12009), C74 é agrupada com uma EPEC (B171-1). Na Figura 39 também é possível verificar que C39 e C74 são evolutivamente mais próximos entre si do que em relação a C40. Além disso, em relação às linhagens

prototípicas de EHEC e EPEC, as DAEC C39 e C74 compartilham um ancestral comum mais recente com EDL933 do que com E2348/69.

O isolado C40, por sua vez, é agrupado com a EPEC E2348/69, resultado semelhante ao observado na árvore filogenética construída para os possíveis *escJ* de C39 e C40 (Kyaw, 2004). Entretanto, o provável *escJ* de C40, que na EPEC prototípica codifica uma proteína da base do complexo-agulha, mostrou-se mais próximo do homólogo da EHEC EDL933 do que do homólogo da EPEC E2348/69, resultado que difere do obtido neste trabalho para o possível *espA* desse isolado.

As grandes diferenças observadas entre os isolados C39, C40 e C74 quanto à reprodutibilidade nos experimentos de PCR, à identidade dos prováveis genes TTSS em relação aos homólogos encontrados em outras bactérias diarreio gênicas, e à proximidade evolutiva em relação a essas bactérias são fortes evidências a favor da heterogeneidade desse patotipo (Kyaw, 2004; Lopes *et al.*, 2005). Além disso, os relatos conflitantes no que diz respeito à patogenicidade das DAEC (Forestier *et al.*, 1996; Girón *et al.*, 1991; Gomes *et al.*, 1989; Gunzburg *et al.*, 1993; Jallat *et al.*, 1993; Levine *et al.*, 1993; Poitrineau *et al.*, 1995; Scaletsky *et al.*, 2001; Scaletsky *et al.*, 2002a; Scaletsky *et al.*, 2002b) sugerem que esse grupo deveria ser analisado mais a fundo e dividido em subgrupos, que levassem em consideração critérios como a patogenicidade e a combinação de fatores de virulência de cada isolado patogênico.

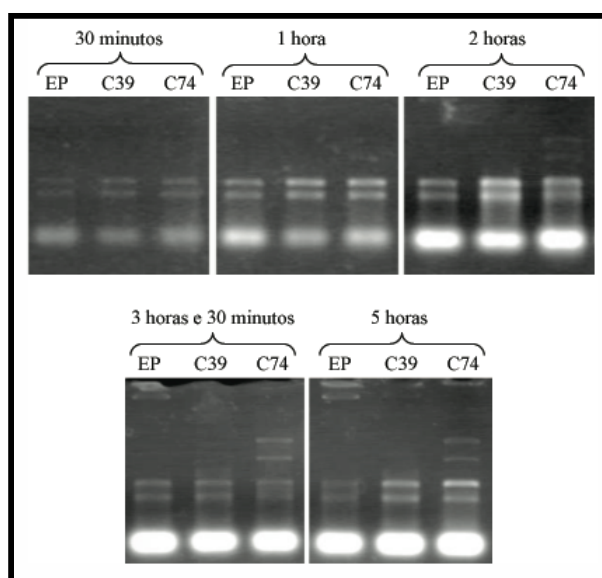
### **3. Análise da expressão dos prováveis genes TTSS de DAEC por meio de experimentos de transcrição reversa**

#### **3.1. Análise da expressão dos prováveis genes TTSS de DAEC sob condições de indução**

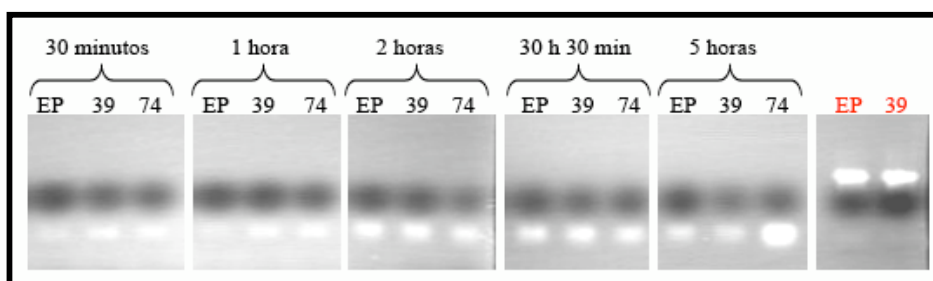
A fim de verificar se os prováveis genes TTSS detectados em DAEC são de fato transcritos, foram realizados experimentos de transcrição reversa (RT-PCR) empregando os isolados C39 e C74 e o controle positivo EPEC E2348/69.

Embora na literatura o meio LB seja descrito como não indutor da expressão de genes TTSS, sabe-se que meios tamponados induzem a secreção de proteínas pelo TTSA (Kenny *et al.*, 1997). Assim sendo, a expressão dos genes TTSS de EPEC e dos homólogos de DAEC foi induzida por meio de seu crescimento, por diferentes tempos, em LB tamponado com Tris-HCl. A seguir, os RNAs foram extraídos com o kit “TRIzol<sup>®</sup> Reagent” (Figura 40)

e tratados com DNase para remover o DNA contaminante. A PCR confirmatória do tratamento com DNase foi realizada com os iniciadores N1 e N2, e o perfil eletroforético de seus produtos é apresentado na Figura 41. Esse par de iniciadores também foi desenhado empregando o LEE da EPEC E2348/69 como molde e seu alvo é o gene *escN*, bastante conservado entre os diferentes TTSSs por codificar uma ATPase, cuja atividade é essencial aos processos de recrutamento e desdobramento das proteínas a serem secretadas pelo TTSA (revisado por Gálan e Wolf-Watz, 2006). A Tm empregada foi 51°C e, como controles positivos da PCR utilizou-se DNA da EPEC E2348/69 e do isolado C39 de DAEC.



**Figura 40.** Perfis eletroforéticos dos RNAs dos isolados C39 e C74 de DAEC e do controle positivo EPEC E2348/69, extraídos após 30 minutos, uma hora, duas horas, três horas e trinta minutos e cinco horas de indução da expressão dos genes TTSS.

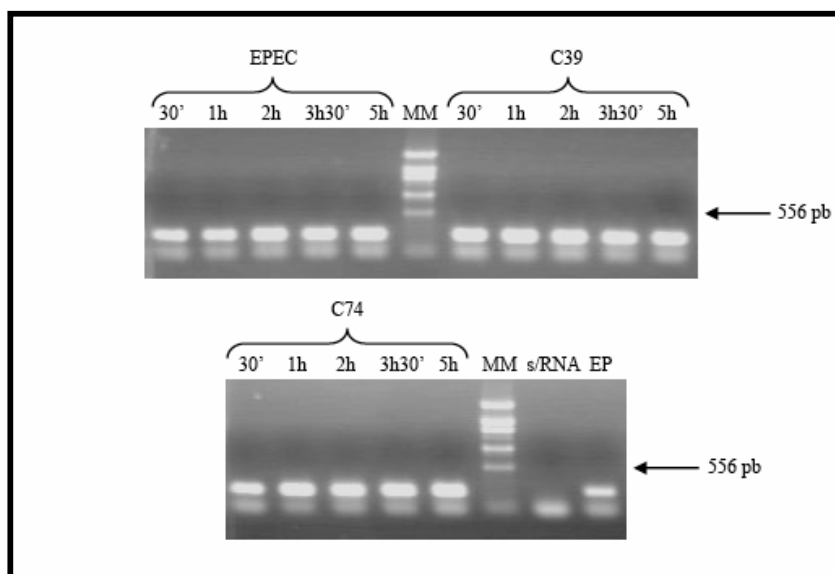


**Figura 41.** Perfil eletroforético dos produtos da PCR confirmatória do tratamento com DNase. Como moldes empregou-se os RNAs dos isolados C39 e C74 de DAEC e EPEC E2348/69, extraídos após diferentes tempos de indução. Os controles positivos da PCR estão destacados em vermelho. A Tm utilizada foi 51°C.

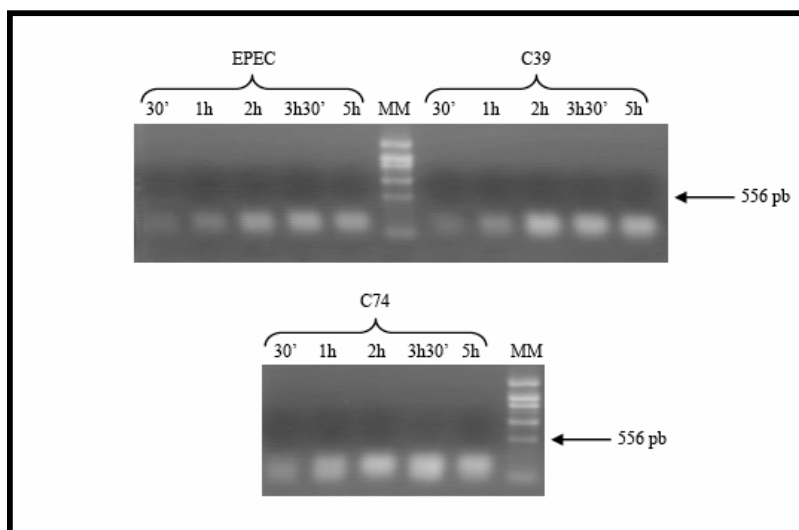


Após a confirmação de que não havia mais DNA contaminando os RNAs extraídos (Figura 41) foram realizados experimentos de RT-PCR, e os cDNAs produzidos serviram como moldes em ensaios de PCR com os iniciadores testados na seção 1. O controle negativo consistiu em um sistema de reação de transcrição reversa sem RNA, a fim de avaliar se algum componente empregado na RT-PCR ou na PCR estava contaminado com DNA. Como controle positivo das PCRs foi utilizado DNA da EPEC E2348/69.

Além disso, foram realizados experimentos de PCR com cDNA ou RNA das bactérias testadas e os iniciadores GAP F e GAP R, direcionados ao gene que codifica a enzima da via glicolítica gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, de expressão constitutiva. O emprego desse par de iniciadores com moldes de cDNA (Figura 42) e RNA (Figura 43) funcionou como um controle positivo e um controle negativo adicionais, respectivamente. Conforme pode ser observado nas Figuras 42 e 43, os resultados dessas PCRs estão de acordo com o esperado, pois fragmentos de 253 pb foram amplificados apenas quando se utilizou como molde cDNA.

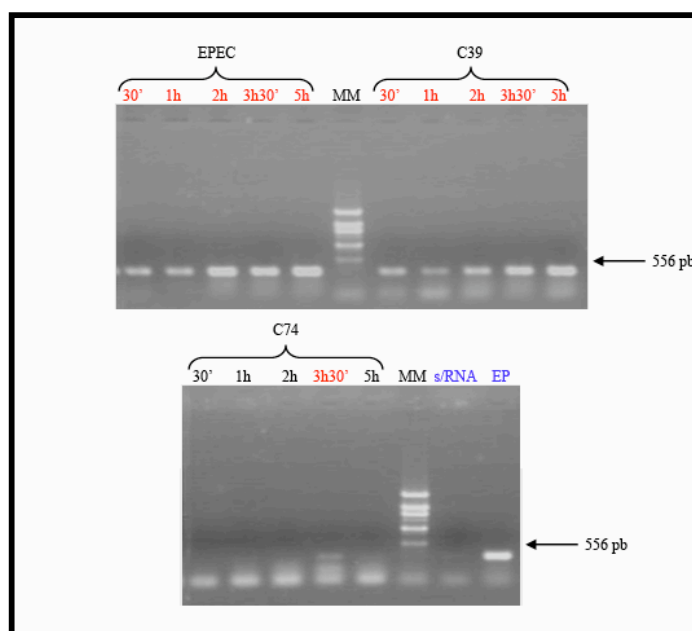


**Figura 42.** Perfis eletroforéticos dos produtos amplificados por PCR com o par de iniciadores GAP F e GAP R, empregando como molde cDNA gerado a partir da transcrição reversa dos RNAs da EPEC E2348/69 e dos isolados C39 e C74 de DAEC. Os diferentes tempos de indução da expressão dos genes TTSS são indicados. As setas apontam para a banda de 556 pb do marcador de massa molecular TTSS Ladder 3.



**Figura 43.** Perfis eletroforéticos dos produtos amplificados por PCR com o par de iniciadores GAP F e GAP R, empregando como molde os RNAs extraídos da EPEC E2348/69 e dos isolados C39 e C74 de DAEC. Os diferentes tempos de indução da expressão dos genes TTSS são indicados. As setas apontam para a banda de 556 pb do marcador de massa molecular TTSS Ladder 3.

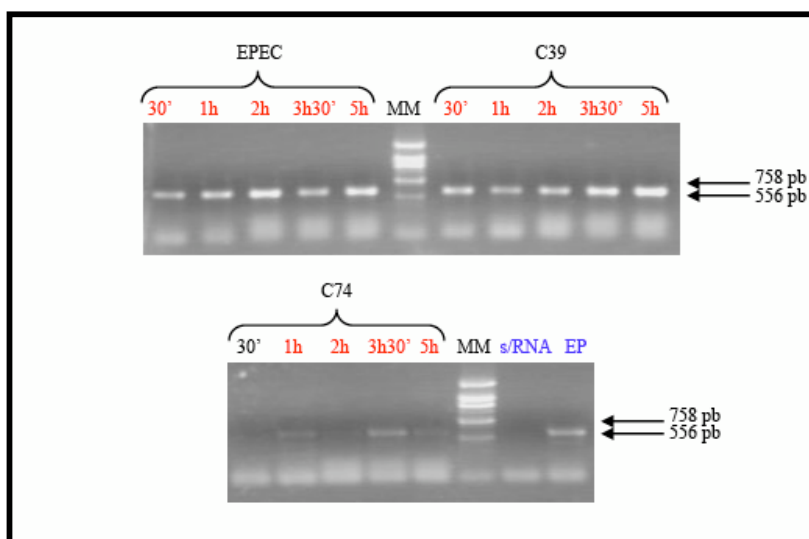
O primeiro par de iniciadores testado nas PCRs com o cDNA foi *escF* FOR / *escF* REV (Figura 44), e o resultado obtido indica que há transcrição dos prováveis genes *escF* de C39 e C74.



**Figura 44.** Perfis eletroforéticos dos produtos amplificados por PCR com o par de iniciadores *escF* FOR e *escF* REV, empregando cDNA da EPEC E2348/69 e dos isolados C39 e C74 de DAEC. Os diferentes tempos de indução da expressão dos genes TTSS são indicados. As setas apontam para a banda de 556 pb do marcador de massa molecular TTSS Ladder 3; em vermelho estão destacadas as amostras positivas, e em azul estão os controles negativo e positivo.

Curiosamente, o possível gene de C74 parece ter sido transcrito apenas três horas e meia após o início da indução, sugerindo que talvez o mecanismo de regulação da expressão da provável PAI dos dois isolados de DAEC testados seja diferente, o que seria mais uma evidência a favor da já reportada heterogeneidade do patotipo DAEC (Kyaw, 2004; Lopes *et al.*, 2005). Outra hipótese que poderia explicar as diferenças observadas em relação à transcrição dos genes homólogos desses isolados é a de que a extração de seus respectivos RNAs ocorreu com eficiências distintas.

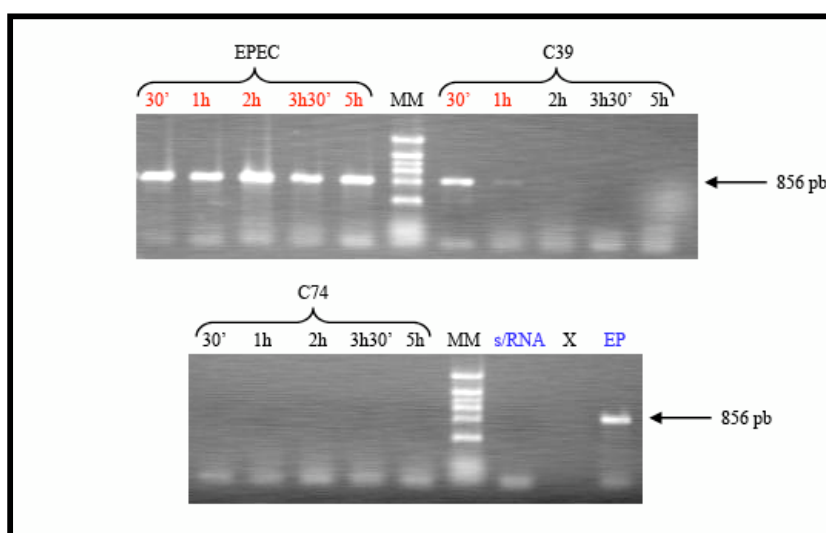
Em outro experimento de PCR foram empregados os iniciadores AD3 e *espA* REV, e os perfis eletroforéticos dos produtos amplificados são apresentados na Figura 45. A transcrição ocorreu em todos os tempos de indução testados com o isolado C39, enquanto que para o isolado C74 não houve transcrição no tempo de 30 minutos. Novamente, esse resultado pode ser devido a diferenças na eficiência de extração do RNA de C74 em relação à de C39, ou ainda devido a condições de indução distintas necessárias à expressão dos prováveis genes das duas DAEC.



**Figura 45.** Perfis eletroforéticos dos produtos amplificados por PCR com o par de iniciadores AD3 e *espA* REV, empregando cDNA da EPEC E2348/69 e dos isolados C39 e C74 de DAEC. Os diferentes tempos de indução da expressão dos genes TTSS são indicados. As setas apontam para as bandas de 556 e 758 pb do marcador de massa molecular TTSS Ladder 3; em vermelho estão destacadas as amostras positivas, e em azul estão os controles negativo e positivo.

Os resultados da RT-PCR com os iniciadores *espD* FOR e AD4 (Figura 46) foram um pouco diferentes dos observados para *escF* FOR/*escF* REV e AD3/*espA* REV. Apenas o gene *espD* do isolado C39 de DAEC foi transcrito e, ainda assim, somente nos tempos de indução de 30 minutos e uma hora. É pouco provável que uma bactéria invista energia na

transcrição dos genes que codificam a agulha do TTSA e sua bainha em todos os tempos de indução testados mas não transcreva os genes que constituem o poro de translocação, necessário à secreção dos efetores no citoplasma da célula hospedeira. Além disso, é possível que o gene *espD* seja um dos últimos a serem transcritos, uma vez que a proteína formadora do poro por ele codificada é translocada apenas quando a base e a agulha do TTSA já estão montadas. Se a transcrição de genes do operon LEE4 já ocorre mesmo antes do tempo de trinta minutos em EPEC e continua cinco horas após o início da infecção (Leverton e Kaper, 2005), era de se esperar que situação semelhante fosse observada também com os isolados de DAEC, já que a proteína EspD é necessária durante todo o processo de translocação dos efetores para o citoplasma da célula hospedeira.



**Figura 46.** Perfis eletroforéticos dos produtos amplificados por PCR com o par de iniciadores *espD* FOR e AD4, empregando como molde cDNA da EPEC E2348/69 e dos isolados C39 e C74 de DAEC. Os diferentes tempos de indução da expressão dos genes TTSS são indicados. As setas apontam para a banda de 856 pb do marcador de massa molecular TTSS Ladder 3; em vermelho estão destacadas as amostras positivas, e em azul estão os controles negativo e positivo.

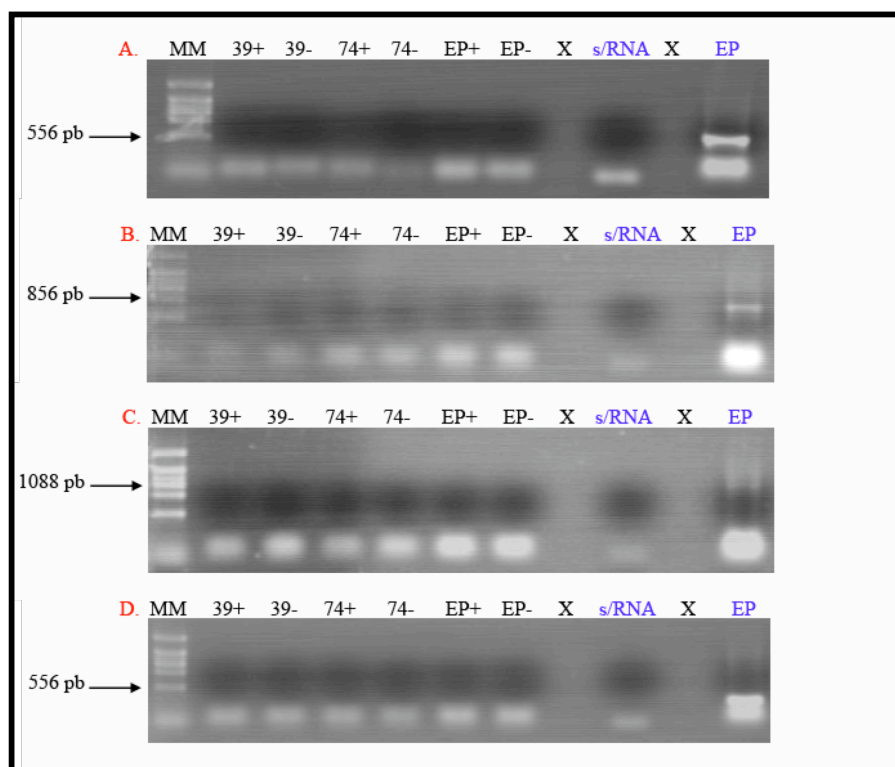
Esses resultados sugerem que as condições de indução da expressão dos prováveis genes *espD* de DAEC não foram adequadas e ainda necessitam de ajustes, ou ainda que o tempo de expressão dos genes TTSS pode variar entre os patótipos de *E. coli* diarreio gênicas. Outra possibilidade é a de que a temperatura de anelamento não tenha sido ideal, embora seja a  $T_m$  mais eficiente dentre as testadas com DNA desses isolados de DAEC. No entanto, como não houve transcrição de um provável *espD* de C74, também não deve ser excluída a hipótese de que sua sequência não seja de fato transcrita nesse isolado.

O experimento de PCR empregando cDNA dos isolados de DAEC e do controle E2348/69 com os iniciadores espB FOR e espB REV resultou em produtos de amplificação apenas para os tempos de 30 minutos, duas horas e cinco horas do controle positivo (resultado não apresentado). Como surgiram muitos problemas nos experimentos de PCR utilizando DNA e esse par de iniciadores em relação à definição da melhor temperatura de anelamento, é possível que a  $T_m$  utilizada nessa PCR também não tenha sido a mais adequada.

Desta forma, os experimentos de RT-PCR realizados com as amostras C39 e C74 de DAEC permitem concluir que as sequências obtidas no decorrer deste trabalho correspondem a verdadeiros genes TTSS e não a prováveis genes TTSS.

### **3.2. Análise da expressão dos prováveis genes TTSS de DAEC na ausência de condições de indução**

A fim de verificar se o meio LB tamponado de fato induz a expressão dos genes TTSS de DAEC ou se essa expressão é constitutiva, foi realizada a extração de RNA no tempo zero. Para esse controle, as células dos isolados de DAEC e EPEC crescidas por uma noite em LB foram transferidas para LB tamponado e imediatamente centrifugadas. O RNA foi extraído e submetido à transcrição reversa, sendo o cDNA resultante empregado em experimentos de PCR utilizando os pares de iniciadores AD3/espA REV, espD FOR/AD4, espB FOR/espB REV e escF FOR/escF REV. Conforme pode ser observado na Figura 47, não houve transcrição dos genes *espA*, *espD*, *espB* e *escF* da EPEC E2348/69 e de seus homólogos em DAEC. Esse resultado confirma que o crescimento em meio de cultura tamponado induz a expressão dos genes TTSS, o que está de acordo com as observações feitas por Kenny *et al.* em 1997.



**Figura 47.** Perfis eletroforéticos dos produtos amplificados por PCR, empregando como moldes os cDNAs obtidos a partir dos RNAs extraídos no tempo zero. Os pares de iniciadores utilizados foram AD3/espA REV (**A**), espD FOR/AD4 (**B**), espB FOR/espB REV (**C**) e escF FOR/escF REV (**D**). As setas pretas apontam para bandas do marcador TTSS Ladder 3. Os sinais + e – indicam a utilização e a não utilização, respectivamente, da enzima transcriptase reversa nos experimentos de RT-PCR.

#### 4. Análise da montagem do suposto complexo-agulha de DAEC por microscopia eletrônica e microscopia de força atômica

Seria pouco provável imaginar que as DAEC C39 e C74 transcrevam genes TTSS (Figuras 44, 45 e 46) mas não montem o aparato de secreção do tipo três, uma vez que o investimento energético para a transcrição de tantos genes ao longo de cinco horas é bastante alto. A fim de verificar a presença de complexos-agulha na superfície desses isolados, foram realizadas análises de microscopia eletrônica de varredura, de microscopia eletrônica de transmissão e de microscopia de força atômica. Os equipamentos utilizados nessas análises foram gentilmente cedidos pela Prof<sup>ª</sup>. Dra. Sônia Nair Bão (IB – UnB), pela Dra. Ana Claudia Guerra de Araujo (CENARGEN) e pelo Dr. Luciano Paulino Silva (CENARGEN).

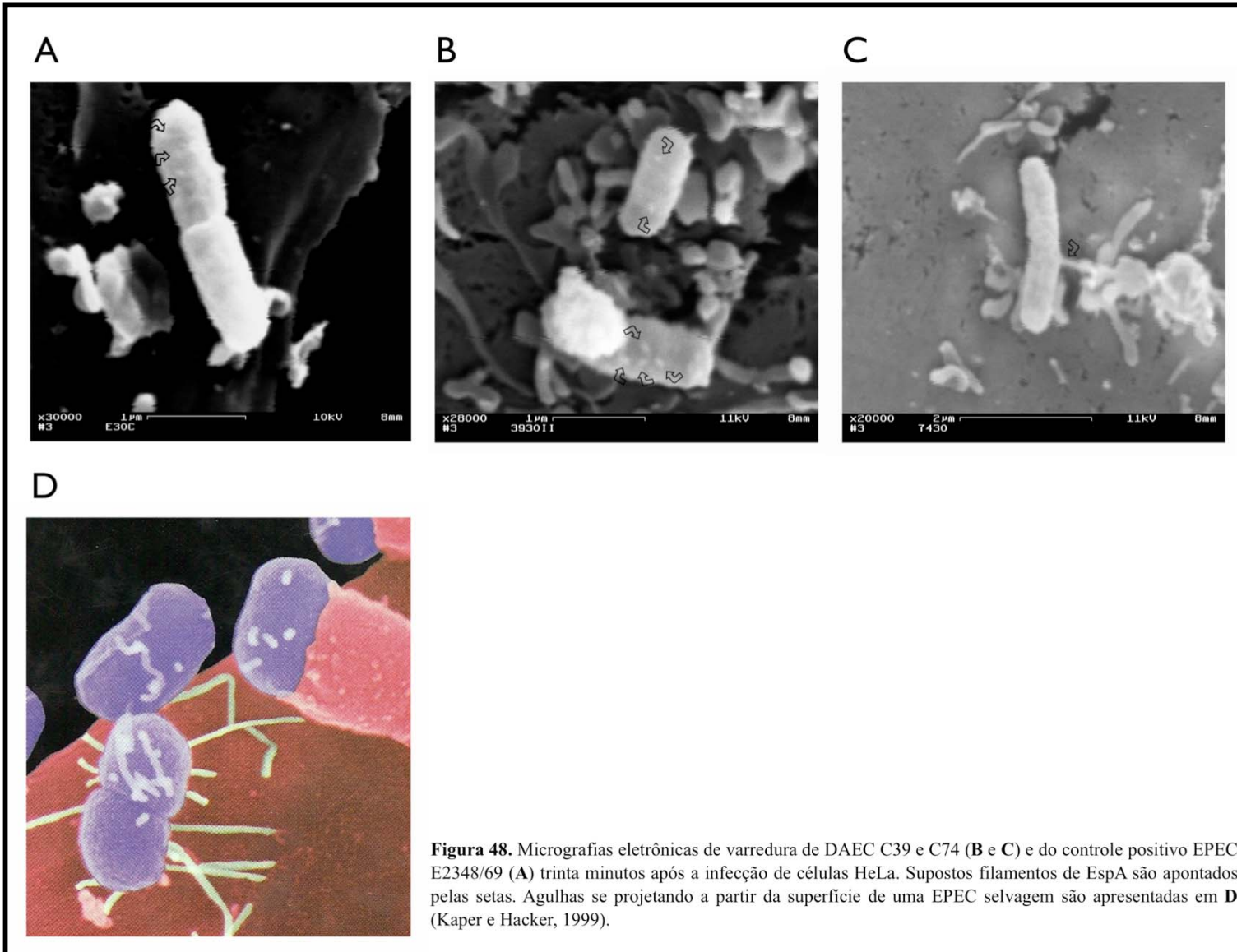
#### **4.1. Busca por aparatos de secreção do tipo três na superfície de DAEC por meio de microscopia eletrônica de varredura**

Uma vez que um dos principais sinais fisiológicos para a ativação da maquinaria de secreção do TTSS consiste no contato da bactéria com a célula hospedeira (revisado por Gálan e Wolf-Watz, 2006), células HeLa aderidas a lamínulas foram infectadas com os isolados C39, C40 e C74 de DAEC e com a EPEC E2348/69. As bactérias haviam sido pré-ativadas pelo crescimento em LB tamponado e posteriormente em DMEM tamponado. As infecções foram realizadas em triplicata e interrompidas após 15, 30 ou 45 minutos. Em seguida, procedeu-se ao processamento das amostras e as lamínulas cobertas com ouro foram analisadas ao microscópio eletrônico de varredura.

Devido às condições de operação do microscópio não terem sido as ideais e ao fato da eficiência da desidratação não ter sido de 100%, as imagens geradas não apresentaram boa qualidade. Além disso, não foi possível obter aumentos acima de 30.000 vezes, o que dificultou ainda mais a análise.

Apesar destas dificuldades, estruturas semelhantes às observadas em micrografias eletrônicas de trabalhos anteriores foram obtidas para a EPEC e para as DAEC C39 e C74, após 30 minutos de infecção (Figura 48).

Em A e B há projeções a partir da superfície da EPEC e de C39 muito semelhantes às aquelas de D, que correspondem a filamentos de EspA de uma micrografia apresentada no trabalho de Kaper e Hacker (1999). Em C é possível observar um filamento que se projeta lateralmente a partir da parede do isolado C74 que também se assemelha às projeções laterais que aparecem em D. Embora seja possível que essas projeções correspondam a filamentos de EspA, novas análises são necessárias para a obtenção de imagens mais limpas e definidas, que permitam conclusões mais seguras.



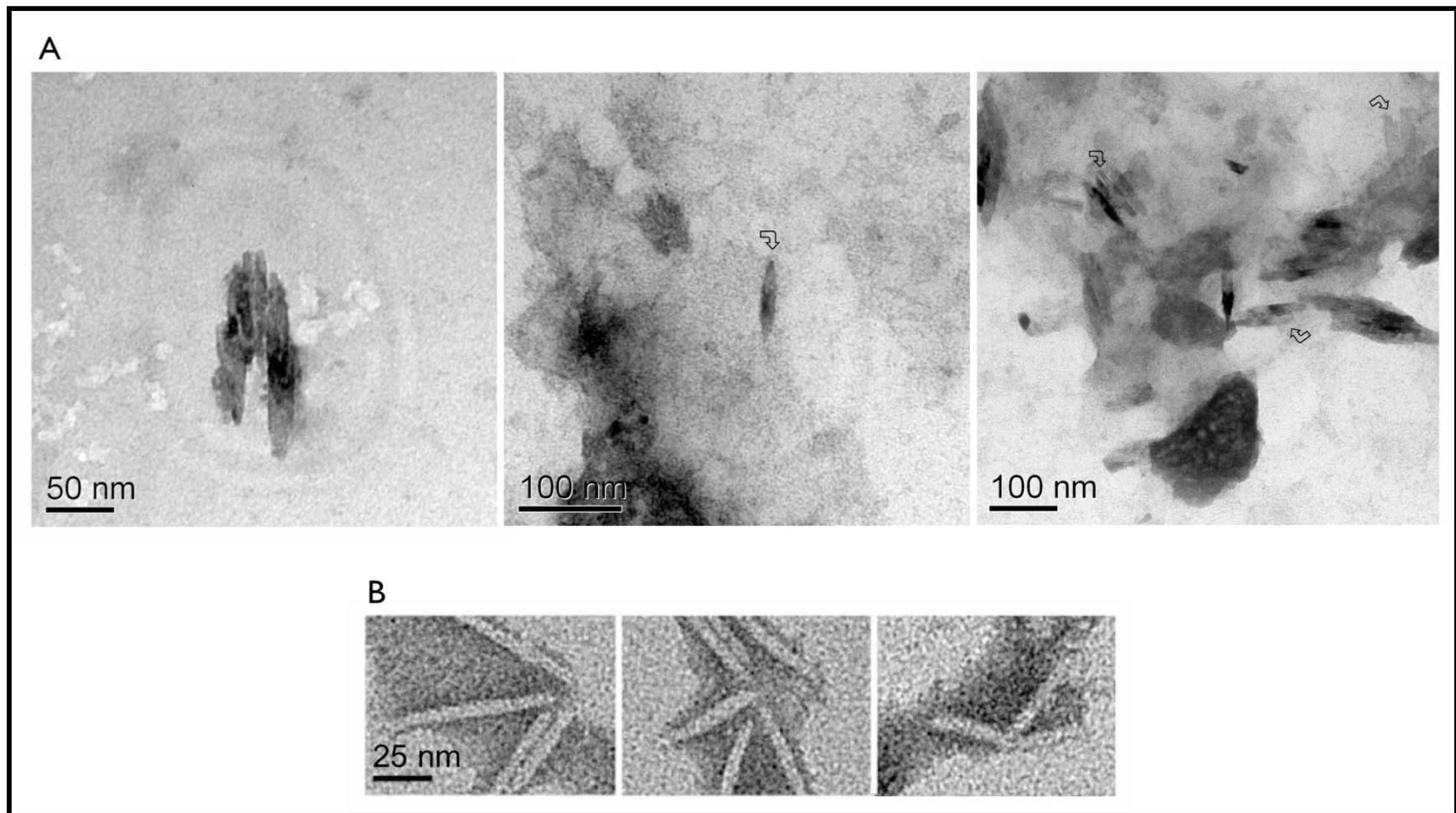


#### **4.2. Busca por aparatos de secreção do tipo três na superfície de DAEC por meio de microscopia eletrônica de transmissão**

Para o experimento de microscopia eletrônica de transmissão, células HeLa aderidas a lamínulas foram infectadas com DAEC C39 e com o controle positivo E2348/69 por 20 ou 45 minutos. A infecção foi então interrompida por meio da adição de tripsina e Triton X-100, e o lisado resultante de células HeLa foi eliminado por centrifugação. Em seguida, os filamentos de EspA foram destacados do restante da maquinaria de secreção pela passagem da solução contendo as bactérias através de uma agulha 25 gauge, um protocolo adaptado daquele descrito por Daniell e colaboradores em 2003. Posteriormente, as células foram descartadas por centrifugação. As agulhas purificadas foram então submetidas à contrastação negativa com acetato de uranila e analisadas ao microscópio eletrônico de transmissão.

Assim como na microscopia eletrônica de varredura, as micrografias obtidas não apresentaram boa qualidade em decorrência da formação de grande quantidade de precipitado do contrastante. As estruturas de C39 apontadas por setas na Figura 49 A assemelham-se aos filamentos de EspA observados por Veenendaal e colaboradores em 2007 (Figura 49 B), no entanto, o grande número de cristais e de precipitados nas imagens reduz a confiabilidade dessa suposição. Além disso, nas telas do controle positivo havia quantidade ainda maior de precipitado, impossibilitando a análise e, conseqüentemente, a aquisição de imagens. Dessa forma, não havia parâmetro de comparação para as micrografias obtidas empregando a DAEC, o que torna as conclusões ainda mais imprecisas.

Novamente, fica clara a necessidade de realizar experimentos adicionais a fim de melhorar a qualidade das imagens produzidas e permitir análises mais confiáveis.



**Figura 49.** Micrografias eletrônicas de transmissão da DAEC C39 (A). Supostos filamentos de EspA são apontados pelas setas. A imagem (B) é uma micrografia apresentada no trabalho de Veenendaal e colaboradores em 2007.

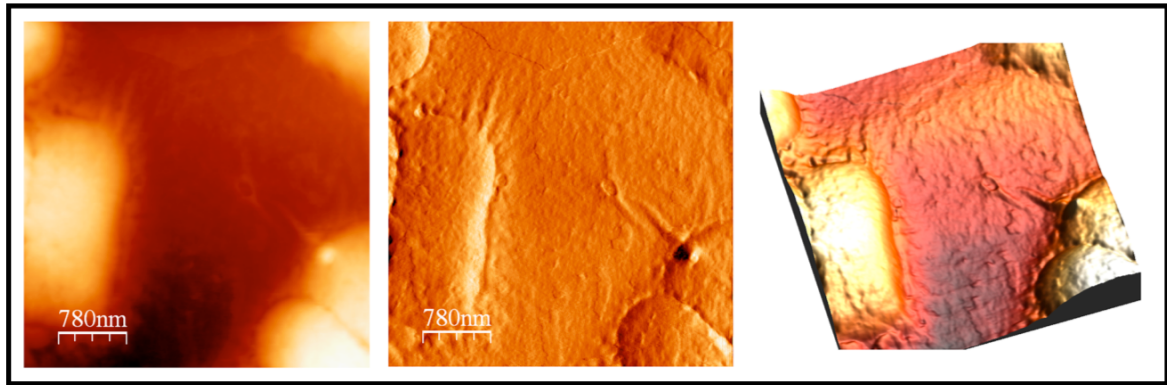
### **4.3. Busca por aparatos de secreção do tipo três na superfície de DAEC por meio de microscopia de força atômica**

Devido à maior simplicidade na preparação das amostras para microscopia de força atômica (MFA) e, com base nos resultados obtidos por Ide e colaboradores em 2001, experimentos de MFA foram conduzidos com a finalidade de visualizar os supostos TTSA de DAEC.

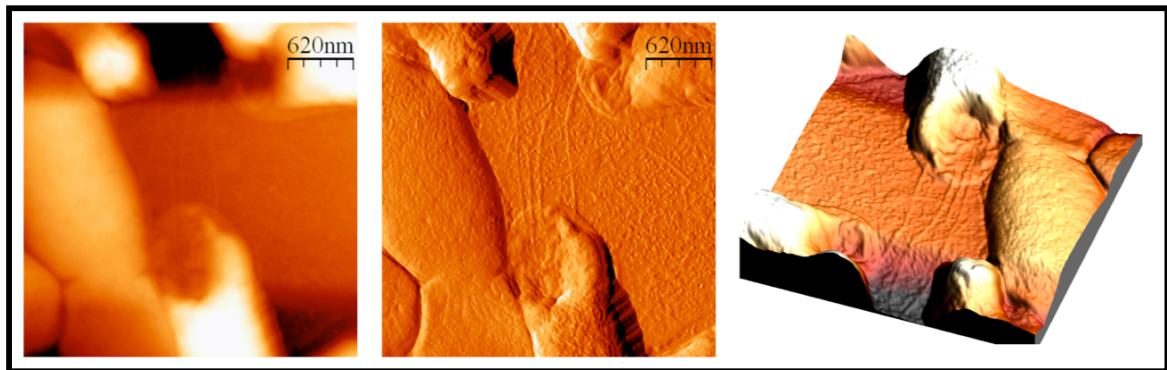
A expressão do complexo-agulha foi estimulada por meio do crescimento dos isolados C39 e C74 e das linhagens E2348/69 e K-12 utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente, em meio LB tamponado. A preparação das células para a MFA consistiu em uma adaptação da metodologia empregada por Li e colaboradores em 2007. O meio de cultura foi descartado e seus resíduos foram removidos por meio de repetidas lavagens com água Milli-Q. Um pequeno volume de cada cultura foi depositado sobre lamínulas recobertas com poli-L-lisina, as quais foram submetidas à desidratação em um dessecador a vácuo. Em seguida, procedeu-se à análise das lamínulas ao microscópio de força atômica, e as imagens obtidas foram editadas com o auxílio do programa WSxM (Horcas *et al.*, 2007).

Embora flagelos com aproximadamente 20 nm de espessura tenham sido observados em algumas células do controle negativo K-12 (resultado não apresentado) e da DAEC C39 (Figura 51), não foi constatada a presença de TTSA's nessas linhagens ou no controle positivo E2348/69 (Figura 50). Estruturas semelhantes a apêndices também foram vistas nas lamínulas da EPEC E2348/69 (Figura 50), no entanto, a espessura de aproximadamente 40 nm descarta a possibilidade de que sejam fímbrias, flagelos ou complexos-agulha, que apresentam cerca de 7, 18 e 12 nm de diâmetro, respectivamente (Daniell *et al.*, 2001). Nenhuma imagem foi salva para o isolado C74 porque havia muitas células na lamínula, dificultando a análise individual das bactérias.

Apesar da preparação das amostras para a MFA ter sido bastante eficiente, a quantidade de células pipetada nas lamínulas foi excessiva, o que dificultou muito as análises. Além disso, verificou-se a presença de cocos nas amostras de C39 e de C74, indicando contaminação. Assim, é necessário repetir os experimentos de MFA, utilizando menos células, a fim de obter imagens mais claras e que permitam a visualização de bactérias isoladas.



**Figura 50.** Estruturas semelhantes a apêndices se projetando a partir da superfície da *Escherichia coli* enteropatogênica E2348/69. À esquerda está a imagem gerada no modo fase de aquisição, no centro a imagem correspondente de deflexão, e à direita uma reconstrução em 3D baseada nas informações de altura da imagem obtida no modo fase. A área de varredura é de  $3,9 \times 3,9 \mu\text{m}$ .



**Figura 51.** Imagens de microscopia de força atômica mostrando flagelos da DAEC C39. À esquerda está a imagem gerada no modo fase de aquisição, no centro a imagem correspondente de deflexão, e à direita uma reconstrução em 3D baseada nas informações de altura da imagem obtida no modo fase. A área de varredura é de  $3,1 \times 3,1 \mu\text{m}$ .

## CONCLUSÕES

Neste trabalho foram identificados genes TTSS dos isolados C39, C40 e C74 de DAEC, recuperados de crianças internadas com diarreia no Hospital Universitário de Brasília. Os fragmentos amplificados por PCR incluem homólogos dos genes *escD*, *espA*, *espD*, *espB*, *cesD2*, *escF* e *cesA2* da EPEC prototípica E2348/69, empregada como controle positivo neste trabalho. A disposição dos possíveis genes de C39 e de C74 nos *contigs* é a mesma observada no LEE de E2348/69.

Os genes *espA*, *espB* e *escF* dos isolados C39 e C74 estão completos e apresentam altos valores de identidade entre si (95, 99 e 100%, respectivamente), enquanto que os possíveis genes incompletos de C40 são mais divergentes em relação aos homólogos das outras duas DAEC testadas, aproximando-se mais dos genes correspondentes da EPEC E2348/69.

A construção de árvores filogenéticas empregando os genes TTSS identificados revelou que C39 pertence ao mesmo clado que as EHEC de origem bovina e humana RW 1374 e 12009, ao passo que C40 é agrupada com a EPEC humana E2348/69 e C74 está no mesmo ramo que a EPEC B171-1, também de origem humana.

Experimentos de transcrição reversa demonstraram que os genes *espA*, *espD* e *escF* de C39 e *espA* e *escF* de C74 são transcritos sob indução, por meio do crescimento desses isolados em LB tamponado.

A busca por filamentos de EspA do complexo-agulha nos isolados C39 e C74 revelou a presença de estruturas semelhantes às encontradas em EPEC, porém, a baixa resolução das imagens geradas no microscópio eletrônico de varredura e a grande presença de contaminantes nas micrografias eletrônicas de transmissão tornam esses resultados inconclusivos.

## PERSPECTIVAS

- Concluir a caracterização dos genes TTSS já identificados nas DAEC C39, C40 e C74.
- Identificação dos demais genes TTSS de DAEC.
- Identificação e caracterização da região da suposta PAI de DAEC correspondente ao operon LEE5 da EPEC E2348/69.
- Sequenciamento completo da provável PAI das DAEC C39, C40 e C74 por meio de pirosequenciamento.
- Análise da transcrição dos genes TTSS por meio de experimentos de PCR em tempo real.
- Identificação de proteínas do possível TTSS de DAEC utilizando a técnica de *Western blot*.
- Novas análises em busca de um suposto aparato de secreção do tipo três em DAEC, por meio de microscopia eletrônica e microscopia de força atômica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIZAWA, S. (2001) Bacterial flagella and type III secretion systems. *FEMS Microbiol. Lett.*, **202**:157-164.
- ALFANO, J. R.; COLLMER, A. (2004) Type III secretion effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **42**:385-414.
- BAQUI, A. H.; SACK, R. B.; BLACK, R. E.; HAIDER, K.; HOSSAIN, A.; ALIM, A. R.; YUNUS, M.; CHOWDHURY, H. R.; SIDDIQUE, A. K. (1992) Enteropathogens associated with acute and persistent diarrhea in Bangladeshi children less than 5 years of age. *J. Infect. Dis.*, **166**:792-796.
- BERNET-CAMARD, M. F.; COCONNIER, M. H.; HUDAULT, S.; SERVIN, A. (1996) Pathogenicity of the diffusely adhering strain *Escherichia coli* C1845: F1845 adhesin-decay accelerating factor interaction, brush border microvillus injury, and actin disassembly in cultured human intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.*, **64**:1918-1928.
- BERTIN, Y.; BOUKHORS, K.; LIVRELLI, V.; MARTIN, C. (2004) Localization of the Insertion Site and Pathotype Determination of the Locus of Enterocyte Effacement of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**:61-68.
- BLANC-POTARD, A. B.; TINSLEY, C.; SCALETSKY, I.; LE BOUGUÉNEC, C.; GUIGNOT, J.; SERVIN, A. L.; NASSIF, X.; BERNET-CAMARD, M. F. (2002) Representational difference analysis between Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* and nonpathogenic *E. coli* K-12. *Infect. Immun.*, **70**:5503-5511.
- BLOCKER, A.; JOUIHRI, N.; LARQUET, E.; GOUNON, P.; EBEL, F.; PARSOT, C.; SANSONETTI, P.; ALLAOUI, A. (2001) Structure and composition of the *Shigella flexneri* 'needle complex', a part of its type III secretion. *Mol. Microbiol.*, **39**:652-663.
- BREST, P.; BÉTIS, F.; ÇUBURU, N.; SELVA, E.; HERRANT, M.; SERVIN, A.; AUBERGER, P.; HOFMAN, P. (2004) Increased rate of apoptosis and diminished phagocytic ability of human neutrophils infected with Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* strains. *Infect. Immun.*, **72**:5741-5749.
- CHINA, B.; GOFFAUX, F.; PIRSON, V.; MAINIL, J. (1999) Comparison of *eae*, *tir*, *espA* and *espB* genes of bovine and human attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol. Lett.*, **178**:177-182.
- COOKSON, S. T.; NATARO, J. P. (1996) Characterization of HEp-2 cell projection formation induced by diffusely adherent *Escherichia coli*. *Microb. Pathog.*, **21**:421-434.
- CRAVIOTO, A.; TELLO, A.; NAVARRO, A.; RUIZ, J. VILLAFÁN, H.; URIBE, F.; ESLAVA, C. (1991) Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea. *Lancet*, **337**:262-264.

- CREPIN, V. F.; SHAW, R.; ABE, C. M.; KNUTTON, S.; FRANKEL, G. (2005) Molecular basis of antigenic polymorphism of EspA filaments: development of a peptide display technology. *J. Mol. Biol.*, **350**:42-52.
- CREPIN, V. F.; SHAW, R.; ABE, C. M.; KNUTTON, S.; FRANKEL, G. (2005) Polarity of enteropathogenic *Escherichia coli* EspA filament assembly and protein secretion. *J. Bacteriol.*, **187**:2881-2889.
- DANIELL, S. J.; KOCSIS, E.; MORRIS, E.; KNUTTON, S.; BOOY, F. P.; FRANKEL, G. (2003) 3D structure of EspA filaments from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **49**:301-308.
- DANIELL, S. J.; TAKAHASHI, N.; WILSON, R.; FRIEDBERG, D.; ROSENSHINE, I.; BOOY, F. P.; SHAW, R. K.; KNUTTON, S.; FRANKEL, G.; AIZAWA, S-I. (2001) The filamentous type III secretion translocon of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell. Microbiol.*, **3**:865-871.
- DENG, W.; PUENTE, J. L.; GRUENHEID, S.; LI, Y.; VALLANCE, B. A.; VÁZQUEZ, A.; BARBA, J.; IBARRA, J. A.; O' DONNELL, P.; METALNIKOV, P.; ASHMAN, K.; LEE, S.; GOODE, D.; PAWSON, T.; FINLAY, B. B. (2004) Dissecting virulence: Systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**:3597-3602.
- ELLIOTT, S. J.; WAINWRIGHT, L. A.; MCDANIEL, T. K.; JARVIS, K. G.; DENG, Y.; LAI, L.; MCNAMARA, B. P.; DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B. (1998) The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol. Microbiol.*, **28**:1-4.
- EWING, B. HILLIER, L.; WENDL, M.; GREEN, P. (1998) Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using *Phred*. I. Accuracy Assessment *Genome Res.*, **8**:175-185.
- FELSENSTEIN, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, **39**:783-791.
- FORESTIER, C.; MEYER, M.; FAVRE-BONTE, S.; RICH, C.; MALPUECH, G.; LE BOUGUENEC, C.; SIROT, J.; JOLY, B.; DE CHAMPS, C. (1996) Enteroadherent *Escherichia coli* and diarrhea in children: a prospective case-control study. *J. Clin. Microbiol.*, **34**:2897-2903.
- FUTUYMA, D. J. (2003) *Biologia evolutiva*. Ribeirão Preto: FUNPEC, pp 316-322.
- GÁLAN, J. E.; WOLF-WATZ, H. (2006) Protein delivery into eucaryotic cells by type III secretion machines. *Nature*, **444**:567-573.
- GARRIDO, P.; BLANCO, M.; MORENO-PAZ, M.; BRIONES, C.; DAHBI, G.; BLANCO, J.; BLANCO, J.; PARRO, V. (2006) STEC-EPEC Oligonucleotide Microarray: A New Tool for Typing Genetic Variants of the LEE Pathogenicity Island of Human and Animal Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) and Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) Strains. *Clin. Chem.*, **52**:192-201.



- GIRÓN, J. A.; JONES, T.; MILLÁN-VELASCO, F.; CASTRO-MUÑOZ, E.; ZÁRATE, L.; FRY, J.; FRANKEL, G.; MOSELEY, S. L.; BAUDRY, B.; KAPER, J. B.; SCHOOLNIK, G. K.; RILEY, L. W. (1991) Diffuse-adhering *Escherichia coli* (DAEC) as a putative cause of diarrhea in Mayan children in Mexico. *J. Infect. Dis.*, **163**:507-513.
- GOMES, T. A. T.; BLAKE, P. A.; TRABULSI, L. R. (1989) Prevalence of *Escherichia coli* strains with localized, diffuse, and aggregative adherence to HeLa cells in infants with diarrhea and matched controls. *J. Clin. Microbiol.*, **27**:266-269.
- GOMES, T. A. T.; VIEIRA, M. A. M.; ABE, C. M.; RODRIGUES, D.; GRIFFIN, P. M.; RAMOS, S. R. T. S. (1998) Adherence patterns and adherence-related DNA sequences in *Escherichia coli* isolates from children with and without diarrhea in São Paulo, Brazil. *J. Clin. Microbiol.*, **36**:3609-3613.
- GUNZBURG, S. T.; CHANG, B. J.; ELLIOTT, S. J.; BURKE, V.; GRACEY, M. (1993) Diffuse and enteroaggregative patterns of adherence of enteric *Escherichia coli* isolated from aboriginal children from the Kimberley Region of Western Australia. *J. Infect. Dis.*, **167**:755-758.
- HACKER, J.; KAPER, J. B. (1999) The concept of pathogenicity islands. In: KAPER, J. B.; HACKER, J. *Pathogenicity islands and other mobile virulence elements*. Washington: Asm Press, pp 33-58.
- HACKER, J.; KAPER, J. B. (2000) Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol.*, **54**:641-679.
- HALL, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **41**:95-98.
- HORCAS, I.; FERNÁNDEZ, R.; GÓMEZ-RODRÍGUEZ, J. M.; COLCHERO, J.; GÓMEZ-HERRERO, J.; BARO, A. M. (2007) WSXM: A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. *Rev. Sci. Instrum.*, **78**: 013705.
- IDE, T.; LAARMANN, S.; GREUNE, H. S.; SCHILLERS, H.; OBERLEITHNER, H.; SCHMIDT, M. A. (2001) Characterization of translocation pores inserted into plasma membranes by type III-secreted Esp proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell. Microbiol.*, **3**:669-679.
- JALLAT, C.; LIVRELLI, V.; DARFEUILLE-MICHAUD, A.; RICH, C.; JOLY, B. (1993) *Escherichia coli* strains involved in diarrhea in France: high prevalence and heterogeneity of diffusely adhering strains. *J. Clin. Microbiol.*, **31**:2031-2037.
- KAPER, J. B.; MELLIES, J. L.; NATARO, J. P. (1999) Pathogenicity islands and other mobile genetic elements of diarrheagenic *Escherichia coli*. In: KAPER, J. B.; HACKER, J. *Pathogenicity islands and other mobile virulence elements*. Washington: Asm Press, pp 33-58.
- KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Rev.*, **2**:123-140.

- KENNY, B.; ABE, A.; STEIN, M.; FINLAY, B. B. (1997) Enteropathogenic *Escherichia coli* protein secretion is induced in response to conditions similar to those in the gastrointestinal tract. *Infect. Immun.*, **65**:2606-2612.
- KIMBROUGH, T. G.; MILLER, S. I. (2000) Contribution of *Salmonella typhimurium* type III secretion components to needle complex formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**:11008-11013.
- KIMBROUGH, T. G.; MILLER, S. I. (2002) Assembly of the type III secretion needle complex of *Salmonella typhimurium*. *Microbes Infect.*, **4**:75-82.
- KIMURA, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, **16**: 111-120.
- KNUTTON, S.; LLOYD, D. R.; MCNEISH, A. S. (1987) Adhesion of Enteropathogenic *Escherichia coli* to Human Intestinal Enterocytes and Cultured Human Intestinal Mucosa. *Infect. Immun.*, **55**:69-77.
- KNUTTON, S.; ROSENSHINE, I.; PALLAN, M. J.; NISAN, I.; NEVES, B. C.; BAIN, C.; WOLFF, C.; DOUGAN, G.; FRANKEL, G. (1998) A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. *EMBO J.*, **17**:2166-2176.
- KRESSE, A. U.; SCHULZE, K.; DEIBEL, C.; EBEL, F.; ROHDE, M.; CHAKRABORTY, T.; GUZMÁN, C. A. (1998) Pas, a novel protein required for protein secretion and attaching and effacing activities of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **180**:4370-4379.
- KUBORI, T.; MATSUSHIMA, Y.; NAKAMURA, D.; URALIL, J.; LARA-TEJERO, M.; SUKHAN, A.; GÁLÁN, J. E.; AIZAWA, S.-I. (1998) Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science*, **280**:602-605.
- KUBORI, T.; SUKHAN, A.; AIZAWA, S.-I.; GÁLÁN, J. E. (2000) Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**:10225-10230.
- KYAW, C. M.; DE ARAUJO, C. R.; LIMA, M. R.; GONDIM, E. G. S.; BRÍGIDO, M. M.; GIUGLIANO, L. G. (2003) Evidence for the presence of a type III secretion system in diffusely adhering *Escherichia coli* (DAEC). *Infect. Genet. Evol.*, **3**:111-117.
- KYAW, C. M. (2004) Evidências da presença de um sistema de secreção do tipo III em isolados de *Escherichia coli* de adesão difusa (DAEC). Tese de Doutorado em Biologia Molecular - Universidade de Brasília.
- LE BOUGUÉNEC, C.; SERVIN, A.L. (2006) Diffusely adherent *Escherichia coli* strains expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): hitherto unrecognized pathogens. *FEMS Microbiol Lett.*, **256**:185-194.

- LEVERTON, L. Q.; KAPER, J. B. (2005) Temporal expression of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence genes in an in vitro model of infection. *Infect. Immun.*, **73**:1034-1043.
- LEVINE, M. M.; FERRECCIO, C.; PRADO, V.; CAYAZZO, M.; ABREGO, P.; MARTINEZ, J.; MAGGI, L.; BALDINI, M. M.; MARTIN, W.; MANEVAL, D.; KAY, B.; GUERS, L.; LIOR, H.; WASSERMAN, S. S.; NATARO, J. P. (1993) Epidemiologic studies of *Escherichia coli* diarrheal infections in a low socioeconomic level peri-urban community in Santiago, Chile. *Am. J. Epidemiol.*, **138**:849-869.
- LI, A.; LEE, P. Y.; HO, B.; DING, J. L.; LIM, C. T. (2007) Atomic force microscopy study of the antimicrobial action of Sushi peptides on Gram negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, **1768**:411-418.
- LOPES, L. M.; FABBRICOTTI, S. H.; FERREIRA, A. J. P.; KATO, M. A. M. F.; MICHALSKY, J.; SCALETSKY, I. C. A. (2005) Heterogeneity among strains of diffusely adherent *Escherichia coli* isolated in Brazil. *J. Clin. Microbiol.*, **43**:1968-1972.
- LORENZONI, M. M. (2009) Caracterização de prováveis genes do sistema de secreção do tipo III em *Escherichia coli* de adesão difusa. Dissertação de Mestrado em Patologia Molecular - Universidade de Brasília.
- MCDANIEL, T. K.; JARVIS, K. G.; DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B. (1995) A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**:1664-1688.
- NATARO, J. P.; KAPER, J. B. (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.*, **11**: 142-201.
- NEI, M.; KUMAR, S. (2000) *Close Neighbor Interchange*. New York: Oxford University Press.
- NEVES, B. C.; MUNDY, R.; PETROVSKA, L.; DOUGAN, G.; KNUTTON, S.; FRANKEL, G. (2003) CesD2 of enteropathogenic *Escherichia coli* is a second chaperone for the type III secretion translocator protein EspD. *Infect. Immun.*, **71**:2130-2141.
- NEVES, B. C.; SHAW, R. K.; FRANKEL, G.; KNUTTON, S. (2003) Polymorphisms within EspA filaments of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **71**:2262-2265.
- OGINO, T.; OHNO, R.; SEKIYA, K.; KUWAE, A.; MATSUZAWA, T.; NONAKA, T.; FUKUDA, H.; IMAJOH-OHMI, S.; ABE, A. (2006) Assembly of the type III secretion apparatus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **188**:2801-2811.
- PALLEN, M. J.; BEATSON, S. A.; BAILEY, C. M. (2005) Bioinformatic analysis of the locus of enterocyte effacement provides novel insights into type-III secretion. *BMC Microbiol.*, **5**:9-29.

- PEIFFER, I.; BERNET-CAMARD, M. F.; ROUSSET, M.; SERVIN, A. L. (2001) Impairments in enzyme activity and biosynthesis of brush border-associated hydrolases in human intestinal Caco-2/TC7 cells infected by members of the Afa/Dr family of diffusely-adhering *Escherichia coli*. *Cell. Microbiol.*, **3**:341-357.
- PEIFFER, I., BLANC-POTARD, A. B.; BERNET-CAMARD, M. F.; GUIGNOT, J.; BARBAT, A.; SERVIN, A. L. (2000) Afa/Dr Diffusely Adhering *Escherichia coli* C1845 Infection Promotes Selective Injuries in the Junctional Domain of Polarized Human Intestinal Caco-2/TC7 Cells. *Infect. Immun.*, **68**:3431-3442.
- PEIFFER, I.; SERVIN, A. L.; BERNET-CAMARD, M. F. (1998) Piracy of Decay-Accelerating Factor (CD55) Signal Transduction by the Diffusely Strain *Escherichia coli* C1845 Promotes Cytoskeletal F-Actin Rearrangements in Cultured Human Intestinal INT407 Cells. *Infect. Immun.*, **66**:4036-4042.
- PERNA, N. T.; MAYHEW, G. F.; PÓSFAL, G.; ELLIOTT, S.; DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B.; BLATTNER, F. R. (1998) Molecular evolution of a pathogenicity island from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.*, **66**:3810-3817.
- PIVA, I. C. (1998) Incidência e caracterização de *Escherichia coli* diarreogênica isolada em Brasília. Tese de Mestrado em Biologia Molecular - Universidade de Brasília.
- POITRINEAU, P.; FORESTIER, C.; MEYER, M.; JALLAT, C.; RICH, C.; MALPUECH, G.; DE CHAMPS, C. (1995) Retrospective case-control study of diffusely adhering *Escherichia coli* and clinical features in children with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.*, **33**:1961-1962.
- SAMBROOK, J.; MACCALLUM, P.; RUSSELL, D. (2000) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SANI, M.; ALLAOU, A.; FUSETTI, F.; OOSTERGETEL, G. T.; KEEGSTR, W.; BOEKEMA, E. J. (2006) Structural organization of the needle complex of the type III secretion apparatus of *Shigella flexneri*. *Micron*, **38**:291-301.
- SCALETSKY, I. C. A.; FABBRICOTTI, S. H.; CARVALHO, R. L. B.; NUNES, C. R.; MARANHÃO, H. S.; MORAIS, M. B.; FAGUNDES-NETO, U. (2002a) Diffusely adherent *Escherichia coli* as a cause of acute diarrhea in young children in northeast Brazil: a case-control study. *J. Clin. Microbiol.*, **40**:645-648.
- SCALETSKY, I. C. A.; FABBRICOTTI, S. H.; CARVALHO, R. L. B.; NUNES, C. R.; MARANHÃO, H. S.; MORAIS, M. B.; RILEY, L.; FAGUNDES-NETO, U. (2001) Diffuse and enteroaggregative patterns of adherence of *Escherichia coli* isolated from stools of children in northeastern Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, **32**:313-319.
- SCALETSKY, I. C. A.; FABBRICOTTI, S. H.; SILVA, S. O. C.; MORAIS, M. B.; FAGUNDES-NETO, U. (2002b) HEp-2-Adherent *Escherichia coli* strains associated with acute infantile diarrhea, São Paulo, Brazil. *Emerging Infect. Dis.*, **8**:855-858.

- SCALETSKY, I. C. A.; SILVA, M. A.; TRABULSI, L. R. (1984) Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infct. Immun.*, **45**:534-536.
- SCHMIDT, H.; HENSEL, M. (2004) Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.*, **17**:14-56.
- SEKIYA, K.; OHISHI, M.; OGINO, T.; TAMANO, K.; SASAKAWA, C.; ABE, A. (2001) Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**:11638-11643.
- SERVIN, A. L. (2005) Pathogenesis of Afa/Dr Diffusely Adhering *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.*, **18**:264-292.
- SHAW, R. K.; DANIELL, S.; EBEL, F.; FRANKEL, G.; KNUTTON, S. (2001) EspA filament-mediated protein translocation into red blood cells. *Cell. Microbiol.*, **3**:213-222.
- SPERANDIO, V.; MELLIES, J. L.; NGUYEN, W.; SHIN, S.; KAPER, J. B. (1999) Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretions in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**:15196-15201.
- STUBER, K.; FREY, J.; BURNENS, A. P.; KUHNERT, P. (2002) Detection of type III secretion genes as a general indicator of bacterial virulence. *Mol. Cell. Probes.*, **17**:25-32.
- SU, M. S-W.; KAO, H-C.; LIN, C-N.; SYU, W-J. (2008) Gene *10017* encodes a second chaperone for EspA of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiology*, **154**:1094-1103.
- SUKHAN, A.; KUBORI, T.; WILSON, J.; GÁLAN, J. E. (2001) Genetic analysis of assembly of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium type III secretion-associated needle complex. *J. Bacteriol.*, **183**:1159-1167.
- TAMANO, K.; AIZAWA, S-I.; KATAYAMA, E.; NONAKA, T.; IMAJOH-OHMI, S.; KUWAE, A.; NAGAI, S.; SASAKAWA, C. (2000) Supramolecular structure of the *Shigella* type III secretion machinery: the needle part is changeable in length and essential for delivery of effectors. *EMBO J.*, **19**:3876-3887.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, **24**:1596-1599.
- THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G., GIBSON, T.J. (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Ac. Res.*, **22**:4673-4680.

- VEENENDAAL, A. K. J.; HODGKINSON, J. L.; SCHWARZER, L.; STABAT, D.; ZENK, S. F.; BLOCKER, A. J. (2007) The type III secretion system needle tip complex mediates host cell sensing and translocon insertion. *Mol. Microbiol.*, **63**:1719-1730.
- WILSON, R. K.; SHAW, R. K.; DANIELL, S.; KNUTTON, S.; FRANKEL, G. (2001) Role of EscF, a putative needle complex proteins, in the type III protein translocation system of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell. Microbiol.*, **3**:753-762.
- WINSTANLEY, C.; HART, C. A. (2001) Type III secretion systems and pathogenicity islands. *J. Med. Microbiol.*, **50**:116-126.
- YIP, C. K.; STRYNADKA, C. J. (2006) New structural insights into the bacterial type III secretion system. *Trends Biochem. Sci.*, **31**:223-230.
- ZENK, S. F.; STABAT, D.; HODGKINSON, J. L.; VEENENDAAL, A. K. J.; JOHNSON, S.; BLOCKER, A. J. (2007) Identification of minor inner-membrane components of the *Shigella* type III secretion system 'needle complex'. *Microbiology*, **153**:2405-2415.