

**Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo**  
**Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP**  
**“Dr. Antônio Guilherme de Souza”**  
**Instituto Butantan**

**Gabriel de Barros Corrêa**

**Serino protease Pet (*Plasmid-encoded toxin*) de *Escherichia coli* inativa  
proteínas do sistema complemento**

**São Paulo**  
**2020**

**Gabriel de Barros Corrêa**

**Serino protease Pet (*Plasmid-encoded toxin*) de *Escherichia coli* inativa  
proteínas do sistema complemento**

Trabalho de conclusão de curso de especialização apresentado ao Instituto Butantan, unidade do Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP “Doutor Antônio Guilherme de Souza”, como requisito parcial para a obtenção do título de Especialista em Biotecnologia para a Saúde – Vacinas e Biofármacos.

Orientador (a): Dr<sup>a</sup> Claudia Trigo Pedroso de Moraes

**São Paulo**

**2020**

## Dados internacionais de catalogação-na-publicação

Corrêa, Gabriel de Barros

Serino protease Pet (*Plasmid-encoded toxin*) de *Escherichia coli* inativa proteínas do sistema complemento / Gabriel de Barros Corrêa; orientadora Claudia Trigo Pedroso de Moraes. – São Paulo, 2020.

49 f.: il.

Trabalho de conclusão de curso de especialização apresentado ao Instituto Butantan, unidade do Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP “Doutor Antônio Guilherme de Souza”, como requisito parcial para a obtenção do título de Especialista em Biotecnologia para a Saúde – Vacinas e Biofármacos.

1. *Escherichia coli*. 2. Patogenicidade bacteriana. 3. Sistema Complemento. 4. Evasão Bacteriana. I. Moraes, Claudia Trigo Pedroso de. II. Instituto Butantan. III. Curso de Especialização em Biotecnologia para a Saúde – Vacinas e Biofármacos. IV. Serino protease Pet (*Plasmid-encoded toxin*) de *Escherichia coli* inativa proteínas do sistema complemento.

Esta monografia foi elaborada com base no **Guia prático para elaboração de trabalho acadêmico** desenvolvido pela Biblioteca do Instituto Butantan, de acordo com as normas da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas).

## AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, **Gabriel de Barros Corrêa**, aluno (a) do curso “Biotecnologia para a Saúde – Vacinas e Biofármacos”, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

( ) Imediato

( ) 06 meses

( ) 12 meses

(X) Outro prazo: Por conta da continuidade do projeto e a utilização dos resultados obtidos nesta monografia no Mestrado, no presente momento não iremos autorizar a divulgação deste trabalho. Assim que possível, entraremos em contato com a Biblioteca para a liberação e divulgação do trabalho.

São Paulo, 27 de Fevereiro de 2020

O acesso ao texto completo foi liberado na data de 06 de outubro de 2023.  
Repositório do Instituto Butantan

.....  
Aluno(a) *Gabriel B. Corrêa*

De acordo:.....  
Orientador(a): *Claudia Trigo Pedroso*  
Dr<sup>a</sup> Claudia Trigo Pedroso de Moraes

## **AGRADECIMENTOS**

À Dr<sup>a</sup> Claudia Trigo Pedroso de Moraes por me receber e me orientar, além de seus valiosos ensinamentos ao longo da especialização.

Aos colaboradores do projeto: Dr. Waldir Pereira Elias Júnior, Dr<sup>a</sup> Ângela da Silva Barbosa, Cláudia Andrade Freire e Dr. Fernando Navarro-Garcia pelos ensinamentos, apoio e sugestões no decorrer do projeto.

Aos colegas do laboratório de Bacteriologia, em especial Nayara Del Santos, Carolaine Costa, Matilde Costa Lima, Daniella Courrol, Kamila Nunes, Fernanda Andrade, Paulo Schüroff, Alejandra Del Carpio, Jonatas William, Cecilia Abe e Roberto Lima, pelo agradável convívio, incentivo e carinho.

Aos meus pais, Hércio Corrêa e Dagmar Barros, pelo apoio e incentivo neste longo ano.

Aos meus amigos, em especial Lais Gomes, Amanda Cavalari, Gabriel Lanza, Kimberlly Caroline, Giulianna Loffredo, Marcelo Costa, Cinthya de Lima, Daniela Pereira, Priscila Coutinho, Priscila Duarte e Márcia Rocha, pela amizade e companheirismo.

Ao Instituto Butantan pela oportunidade.

Ao CEFOR/SUS e FAPESP pelo apoio financeiro.

“Nada na vida deve ser temido, apenas ser entendido. Agora é a hora de entender mais, para que tenhamos menos medo.”

Marie Curie

## RESUMO

CORRÊA, Gabriel de Barros. **Serino protease Pet (*Plasmid-encoded toxin*) de *Escherichia coli* inativa proteínas do sistema complemento**. 2020. 49 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Biotecnologia para a Saúde – Vacinas e Biofármacos) – Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP; Instituto Butantan, São Paulo, 2020.

A *Escherichia coli* Enteroagregativa (EAEC) é uma bactéria Gram-negativa facultativa relacionada a casos de diarreia aguda e persistente em crianças e adultos. Este patótipo é caracterizado pelo padrão de aderência agregativa às células epiteliais e é considerado um patógeno emergente. Um dos seus fatores de virulência é a *Plasmid-encoded toxin* (Pet), uma proteína autotransportadora do grupo das SPATEs (Serino Proteases Autotransportadoras de Enterobacteriaceae), que desempenha um papel importante na patogenicidade da EAEC. O gene *pet* é albergado pelo pAA2 e, apesar de ser um fator de virulência típico da EAEC, Pet também está presente em outros patótipos de *Escherichia coli*. O sistema complemento é um importante mecanismo da imunidade inata. Este sistema funciona em cascata e pode ser ativado após a invasão de patógenos. Foi demonstrado na literatura que proteases produzidas por bactérias patogênicas apresentam atividade proteolítica contra componentes do sistema complemento, promovendo evasão do sistema imunológico. Considerando esses fatores, investigamos se Pet apresenta ação proteolítica sobre os componentes do sistema complemento C3, C3b, C4, C4b e C5. O sobrenadante do clone mínimo HB101 (pCEF<sub>N</sub>) foi utilizado nos ensaios proteolíticos. Os sobrenadantes foram incubados com os componentes do complemento por 5 e 24 horas a 37°C. Produtos de degradação foram analisados por *Western Blot* utilizando anticorpos primários específicos produzidos. Além disso, ensaios proteolíticos utilizando um inibidor de serino proteases, ensaios proteolíticos com os fatores I e H e ensaios de resistência ao soro humano pré-tratado com Pet foram realizados. De acordo com os resultados obtidos, verificamos que Pet degradou todos os componentes do sistema complemento testados, podendo interromper as três vias de ativação da cascata, Pet por si só é capaz de degradar os componentes do sistema complemento e a *Escherichia coli* HB101 sobreviveu ao soro humano pré-tratado com a Pet. A toxina Pet pode ser, portanto, um importante fator de virulência relacionado à resistência ao soro, que pode contribuir para que as *Escherichia coli* causem infecções extraintestinais e sepse.

**Palavras-chave:** *Escherichia coli*. Patogenicidade bacteriana. Sistema Complemento. Evasão Bacteriana.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
1.1 <i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa (EAEC).....	9
1.2 Serino Proteases Autotransportadoras de Enterobacteriaceae (SPATEs) ..	12
1.3 Plasmid-encoded toxin (Pet).....	14
1.4 O Sistema Complemento.....	15
1.5 Evasão do sistema complemento pelas <i>Escherichia coli</i> .....	18
1.6 Justificativa.....	19
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
2.1 Geral.....	20
2.2 Específicos.....	20
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	<b>21</b>
3.1 Componentes do sistema complemento, anticorpos e soro humano comercial.....	21
3.2 Proteína Pet.....	21
3.2.1 Coloração por Coomassie Blue.....	21
3.2.2 Coloração por Prata.....	22
3.2.3 <i>Western Blot</i> .....	22
3.3 Obtenção do sobrenadante de cultura de HB101.....	23
3.4 Ensaios de clivagem dos componentes do sistema complemento (C3, C3b, C4, C4b e C5).....	23
3.4.1 <i>Western Blot</i> .....	24
3.5 Ensaios proteolíticos com reguladores negativos do sistema complemento.....	25
3.5.1 <i>Western Blot</i> .....	25
3.6 Atividade bactericida do soro humano pós tratamento com o sobrenadante da proteína Pet.....	26



<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>28</b>
<b>4.1 Detecção da proteína Pet no sobrenadante do clone mínimo HB101 (pCEF<sub>N</sub>) .....</b>	<b>28</b>
<b>4.2 Pet degrada os componentes do sistema complemento C3, C3b, C4, C4b e C5 .....</b>	<b>29</b>
<b>4.3 Inibição da degradação dos componentes do complemento por PMSF.....</b>	<b>33</b>
<b>4.4 A degradação por Pet não necessita do Fator I.....</b>	<b>39</b>
<b>4.5 Sobrevivência de bactérias quando incubadas em soro humano pré-tratado com Pet.....</b>	<b>40</b>
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>41</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>44</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>45</b>

## 1 INTRODUÇÃO

*Escherichia coli* é uma bactéria gram-negativa facultativa que coloniza o trato gastrointestinal de crianças horas após o nascimento (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Essas bactérias fazem parte da microbiota e raramente causam doenças, com exceção de pacientes imunossuprimidos ou quando transpõem a barreira gastrointestinal. Entretanto, ao longo da evolução, as *Escherichia coli* adquiriram fatores de virulência e tornaram-se patogênicas, sendo capazes de causar doenças em indivíduos saudáveis (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

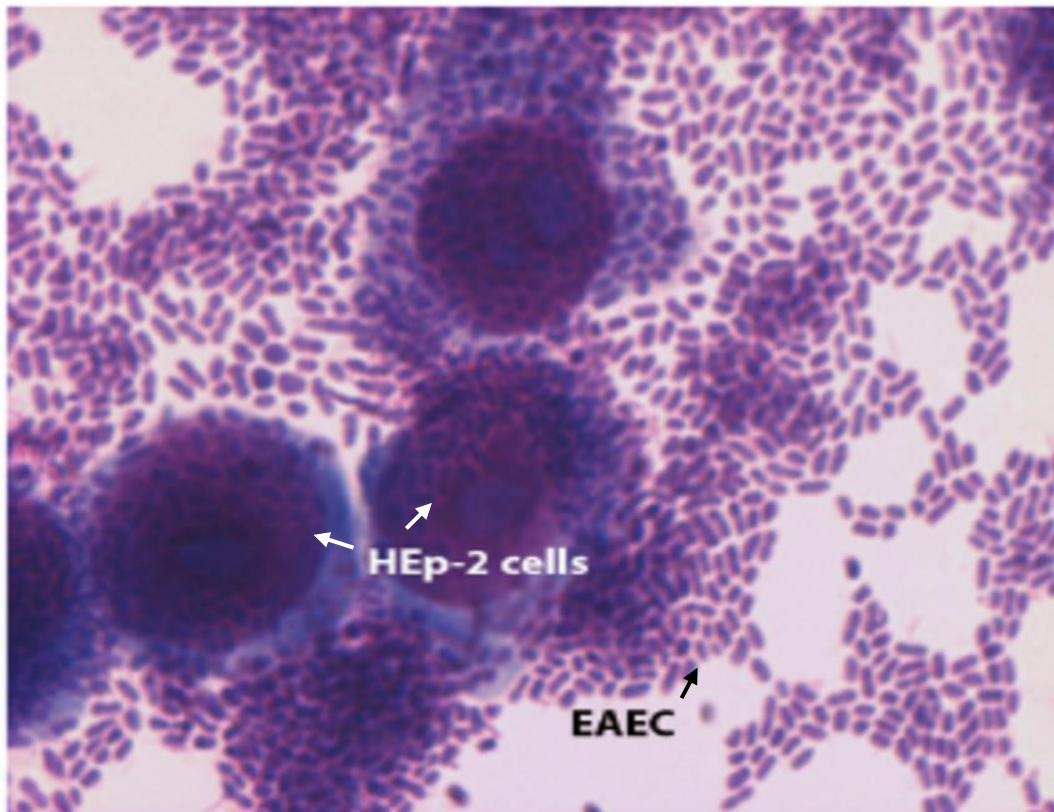
São reconhecidos seis patótipos diarreiogênicos, cada um com seu distinto perfil clínico, epidemiológico e patogênico: *Escherichia coli* Enterotoxigênica (ETEC), *Escherichia coli* Enteroinvasiva (EIEC), *Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC), *Escherichia coli* Enterohemorrágica (EHEC), *Escherichia coli* Difusamente Aderente (DAEC) e *Escherichia coli* Enteroagregativa (EAEC) (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006).

Infecções extraintestinais por *Escherichia coli* também são comuns. Cepas isoladas de sítios extraintestinais foram denominadas ExPEC (*extraintestinal pathogenic E. coli*) (RUSSO; JOHNSON, 2000) e divididas em grupos de acordo com seu sítio de isolamento, incluindo as *Escherichia coli* Uropatogênicas (UPEC), *Escherichia coli* Associadas a Meningite Neonatal (NMEC) e *Escherichia coli* Causadoras de Sepsis (SEPEC) (DALE; WOODFORD, 2015).

### 1.1 *Escherichia coli* Enteroagregativa (EAEC)

*Escherichia coli* Enteroagregativa (EAEC) (Figura 1) é definida como “*Escherichia coli* que não secreta LTs (*heat-labile enterotoxins*) ou STs (*heat-stable enterotoxins*), e se adere em células HEp-2 (*Human Epithelial type 2 cells*) em um padrão conhecido como padrão de aderência agregativa. O padrão de adesão agregativo das EAEC se caracteriza por uma configuração de tijolos empilhados” (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

**Figura 1** – Padrão de aderência agregativa de *Escherichia coli* Enteroagregativa (EAEC) em células HEp-2



**Fonte:** NAVARRO-GARCIA et al., 2010.

O padrão de aderência de EAECs a células HEp-2 (*Human epithelial type 2 cells*) é conhecido como aderência agregativa, no qual as bactérias aderem umas às outras em uma configuração de 'tijolos empilhados'. As setas brancas indicam as células epiteliais, enquanto que a seta preta indica o aglomerado de EAECs.

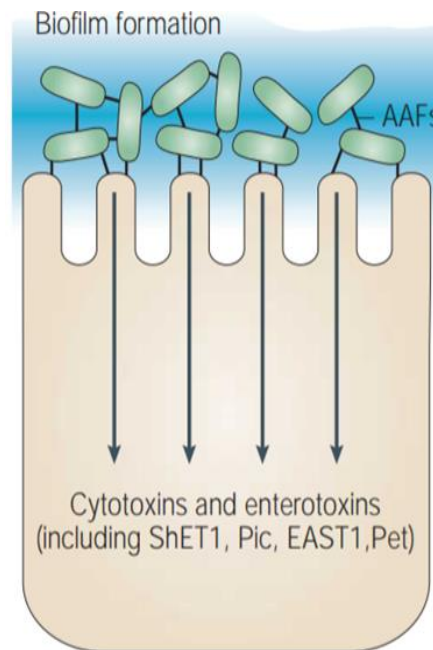
A EAEC foi descrita primeiramente em 1985 e foi associada à diarreia em crianças no Chile (NATARO *et al.*, 1987). Diferentes cepas foram testadas em voluntários e apenas uma delas, a 042, isolada de uma criança com diarreia aguda no Peru, causou diarreia nos voluntários. Por conta de sua capacidade de causar infecção, começou a ser considerada como a cepa padrão de EAEC (NATARO *et al.*, 1995).

Diversos estudos descrevem as EAECs associadas a casos de diarreia aguda e persistente em crianças e adultos de países desenvolvidos e subdesenvolvidos, diarreia do viajante e surtos de intoxicação alimentar (NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011). Além disso, também foram relacionadas a casos de colonização assintomática, causando inflamações intestinais crônicas que levam à desnutrição e

deficiência no crescimento e desenvolvimento da criança (NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011). Por conta disso, este patótipo começou a ser classificado como um patógeno emergente (NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011).

A infecção por EAEC (Figura 2) geralmente consiste em três etapas: aderência à mucosa intestinal pelas fímbrias de aderência agregativa; aumento na produção de muco levando a formação de um extenso biofilme na superfície dos enterócitos; secreção de toxinas e indução da resposta inflamatória (JENKINS, 2018).

**Figura 2** - Modelo da patogenicidade de EAEC



**Fonte:** KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004.

As EAECs se aderem ao epitélio do intestino delgado e grosso pelas fímbrias de aderência agregativa (AAFs), aumentando a produção do muco e, conseqüentemente, a formação de um extenso biofilme. Além disso, secretam toxinas e induzem a resposta inflamatória.

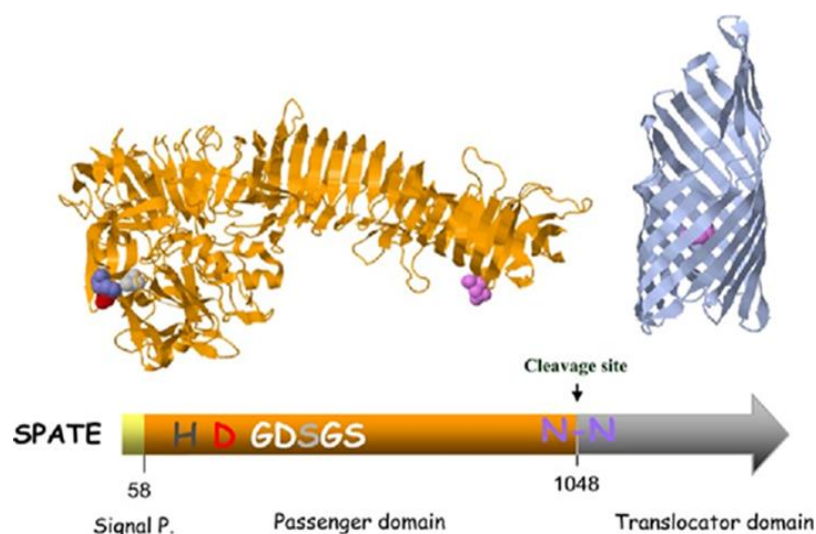
O padrão AA (aderência agregativa) está associado à presença do plasmídeo de aderência agregativa (pAA) e à expressão das fímbrias de aderência agregativa (AAFs). A fímbria AAF/I, expressa pelo pAA1, foi inicialmente descrita na cepa EAEC 17-2. Já a fímbria AAF/II, expressa pelo pAA2, foi primeiramente detectada na cepa EAEC 042 (ELIAS *et al.*, 1999). As subunidades fimbriais da AAF/I e AAF/II são 25% idênticas e ambas são responsáveis pela aderência observada na EAEC 17-2 e EAEC 042 (ELIAS *et al.*, 1999).

O plasmídeo pAA apresenta o gene *aggR* que codifica a proteína reguladora AggR, responsável pela expressão de genes envolvidos na biogênese fimbrial, bem como outros importantes fatores de virulência (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006). A presença ou ausência do AggR, portanto, diferencia a EAEC típica da EAEC atípica por regular ambos fatores de virulência codificados pelo cromossomo e pelo plasmídeo (GUERRIERI *et al.*, 2019). Apesar das cepas típicas de EAEC serem caracterizadas como mais virulentas e prováveis a causar diarreia em humanos do que as cepas atípicas, algumas cepas atípicas também já foram relatadas em casos de surtos (GUERRIERI *et al.*, 2019).

### 1.2 Serino Proteases Autotransportadoras de Enterobacteriaceae (SPATEs)

As SPATEs (Figura 3) são uma família de proteínas das enterobactérias capazes de se autotransportarem para o meio extracelular e apresentarem um domínio conservado GDSGS, característico de serino proteases (DUTTA *et al.*, 2002). Estas proteases foram inicialmente identificadas como proteínas secretadas por espécies patogênicas, como *Escherichia coli* diarreio gênicas e *Shigella*, embora possam ser detectadas ocasionalmente em cepas não patogênicas (DAUTIN, 2010).

**Figura 3** - Estrutura geral de um membro das SPATEs

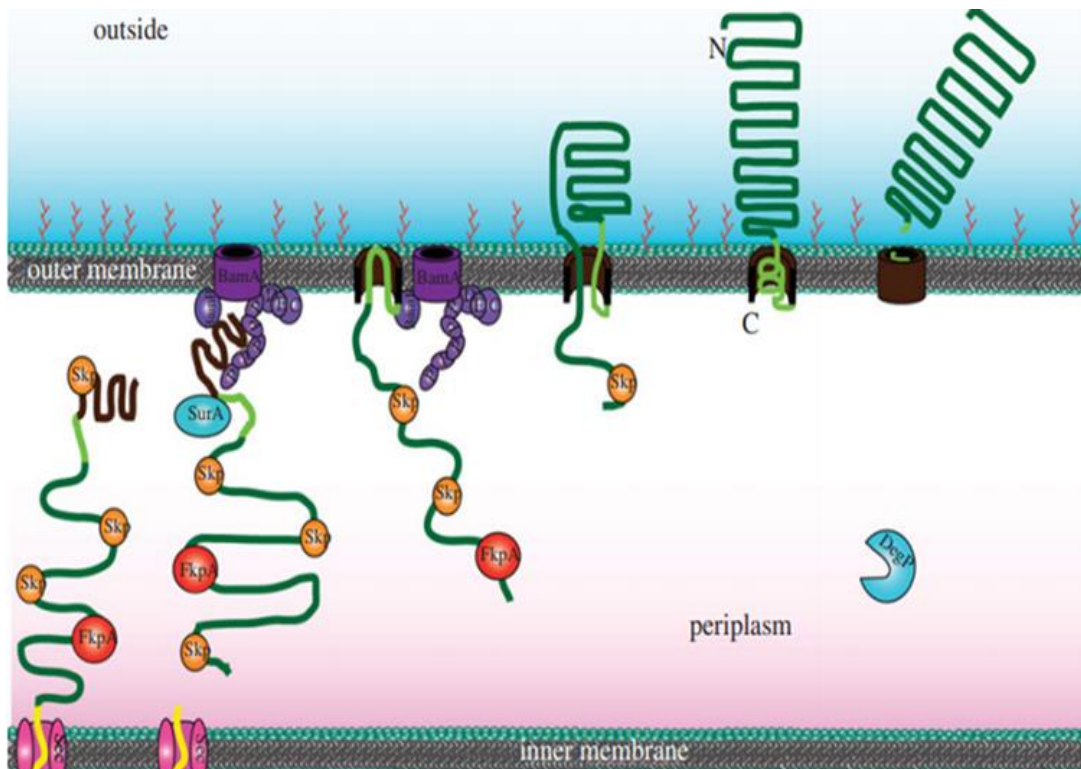


**Fonte:** RUIZ-PEREZ; NATARO, 2014.

As SPATEs são reconhecidas por sua organização em comum: possuem uma N-terminal secundária dependente, um peptídeo sinal necessário para a passagem pela membrana interna, um domínio passageiro (parte funcional da proteína) e um β-domínio C-terminal, ou domínio translocador, que se insere na membrana externa como um β-barril.

A translocação de proteínas em bactérias Gram-negativas envolve a passagem pela membrana interna, espaço periplasmático e membrana externa por meio dos chamados sistemas de secreção (HENDERSON; NATARO, 2005). O Sistema de Secreção Tipo Va (Figura 4) inclui as proteínas autotransportadoras (LEO; GRIN; LINKE, 2012).

**Figura 4 - Modelo de autotransporte Tipo Va**



**Fonte:** LEO; GRIN; LINKE, 2012.

As proteínas são secretadas pelo sistema de secreção geral Sec para o periplasma, onde um peptídeo sinal estendido permite que a proteína se prepare para o autotransporte na membrana externa com a porção N-terminal ainda ligada à maquinaria Sec. O  $\beta$ -barril (BamA) é formado na membrana externa pela porção C-terminal da proteína autotransportadora, onde um “grampo” é originado dentro do poro. O domínio passageiro começa a se dobrar da porção C-terminal para a porção N-terminal, puxando todo o resto da proteína como consequência. Após a C-terminal do domínio passageiro passar pelo poro, o desdobramento sequencial da já exportada C-terminal completa o processo.

A família de proteases autotransportadoras foi dividida em duas classes. As proteases classe 1 apresentam efeitos citotóxicos em cultura de células e atividade de enterotoxina em tecidos intestinais, como por exemplo EspP (*extracellular serine protease plasmid-encoded*), Sat (*secreted autotransporter toxin*) e Pet (*plasmid-encoded toxin*). Já as proteases de classe 2 apresentam atividade proteolítica em mucinas e estão envolvidas na evasão imune, como por exemplo Pic (*protease*

*involved in intestinal colonization*), PicU (*Pic from uropathogenic E. coli*), Tsh (*temperature-sensitive hemagglutinin*) e Vat (*vacuolating autotransporter toxin*) (RUIZ-PERES; NATARO, 2014).

Algumas serino proteases foram descritas em EAEC, sendo elas: Pic, uma proteína autotransportadora codificada pelo cromossomo, também encontrada no plasmídeo de uma EPEC atípica BA589 (ABREU *et al.*, 2016), que apresenta atividade de mucinase, e Pet, uma proteína autotransportadora que é codificada pelo pAA e apresenta atividade citotóxica (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

### 1.3 Plasmid-encoded toxin (Pet)

A toxina Pet (*Plasmid-encoded toxin*) é uma proteína de 104 kDa, pertencente ao grupo das Serino Proteases Autotransportadoras de Enterobacteriaceae (SPATEs), a qual tem importante função na patogenicidade da EAEC (NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011). A toxina foi detectada e descrita em 1998 em um surto no México, e é codificada pelo gene *pet*, presente no plasmídeo pAA de EAEC (ESLAVA *et al.*, 1998).

As EAECs induzem encurtamento e necrose hemorrágica das vilosidades e uma amena resposta inflamatória com edemas e infiltrações mononucleares da submucosa (NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011). Além disso, foi observado que em culturas de células epiteliais, Pet induz contração do citoesqueleto, perda de fibras de actina e arredondamento e descolamento das células (NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011).

Segundo o estudo de Villaseca *et al.* (2000), Pet é capaz de degradar proteínas do citoesqueleto, fodrina e espectrina, que conectam os filamentos de actina e são responsáveis pela manutenção do arcabouço celular e estabilidade das células. A atividade proteolítica da toxina pode, portanto, levar à alteração da membrana celular e, conseqüentemente, à morte celular. O sítio ativo de serino protease da toxina é responsável por esses eventos intracelulares e, portanto, pela ação citotóxica de Pet (CANIZALEZ-ROMAN; NAVARRO-GARCIA, 2003).

A espectrina, presente nos eritrócitos, e a fodrina, presente na maioria das células do corpo, são alvos intracelulares, portanto, a internalização da Pet é sugerida. Segundo Betancourt-Sanchez e Navarro-Garcia (2009), as EAECs secretam a toxina Pet em quantidade suficiente para ser internalizada por células

epiteliais. Esse evento é dependente de outros fatores, como adesão. Além disso, há uma importante correlação entre a secreção e internalização da toxina e os efeitos citotóxicos e morte celular induzida pela EAEC.

No estudo de Nava-Acosta e Navarro-Garcia (2013), foi observado que a citoqueratina 8 (CK8) presente na superfície das células epiteliais é um importante receptor para a Pet iniciar seus efeitos citotóxicos. De acordo com Navarro-Garcia *et al.* (2007b), a internalização para clivar a fodrina ocorre por endocitose mediada por vesículas revestidas de clatrina. Após ser internalizada, a toxina chega ao complexo de Golgi e é transportada de forma retrógrada ao retículo endoplasmático rugoso (NAVARRO-GARCIA *et al.*, 2007a).

Embora Pet tenha sido caracterizada em amostras de EAEC, o gene *pet* também pode estar presente em amostras de ExPEC e pode ser responsável por infecções extraintestinais, como infecções urinárias (NAZEMI *et al.*, 2011; PARK, *et al.*, 2009, NUNES *et al.*, 2017, ABE *et al.*, 2008), ou levar a quadros de sepse (HERZOG *et al.*, 2013). Recentemente, foi reportado um caso de Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) na Argentina, decorrente de uma infecção por STEC que albergava fatores de virulência de EAEC (Stx-EAEC O59:NM [H19]), dentre eles, o gene *pet* (CARBONARI *et al.*, 2019).

#### 1.4 O Sistema Complemento

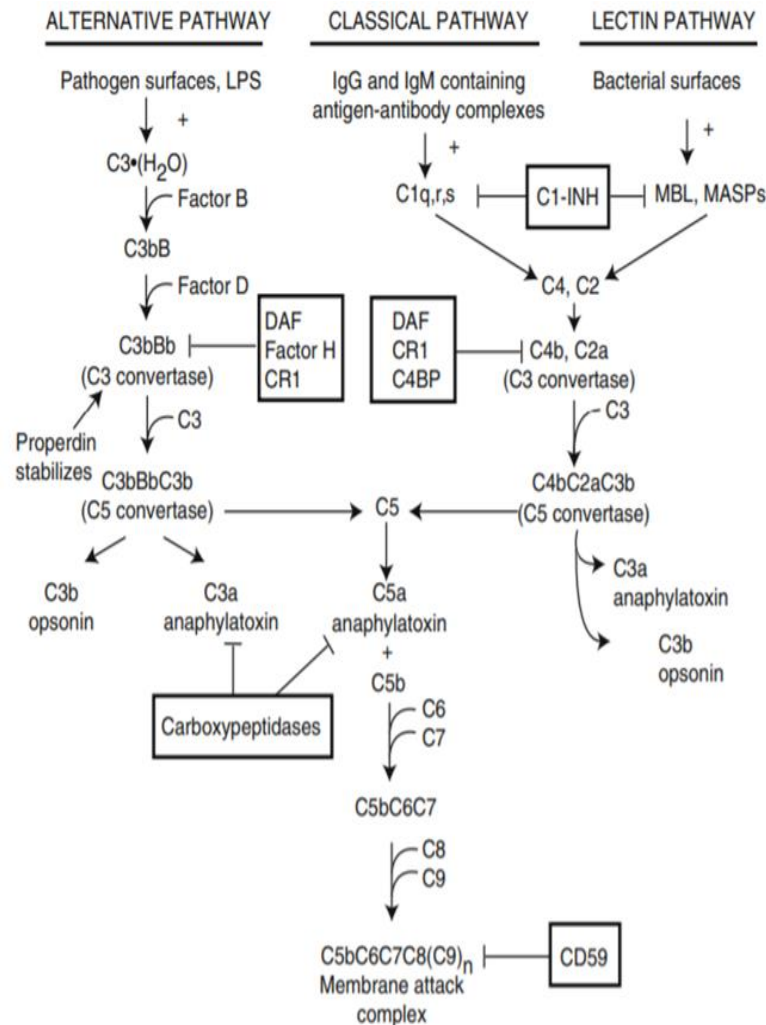
O Sistema Complemento é um importante mecanismo de defesa contra os patógenos, capaz de eliminar fragmentos celulares, células apoptóticas e microrganismos invasores (RICKLIN *et al.*, 2010). Além da eliminação de microrganismos, o sistema complemento participa de diversos outros processos, como a maturação da sinapse, *clearance* de complexos imunes, angiogênese, mobilização das HSPCs (*Hematopoietic stem-progenitor cells*), regeneração de tecidos e metabolização de lipídios (RICKLIN *et al.*, 2010).

A ativação do complemento pode ocorrer por três diferentes vias (Figura 5): a alternativa, a clássica e a das lectinas. As proteínas são clivadas e ativadas em sequência, caracterizando um sistema em cascata. Todas as vias convergem em C3, a proteína do complemento mais abundante no sangue. A clivagem de C3 resulta na formação dos seguintes produtos: C3a e C5a, importantes anafilotoxinas,



C3b, uma importante opsonina, e o Complexo de Ataque à Membrana (C5b-9), importante na lise bacteriana (SARMA; WARD, 2011).

**Figura 5 - Vias de ativação do sistema complemento**



**Fonte:** SARMA; WARD, 2011.

As três vias de ativação do complemento: a alternativa, iniciada pelo reconhecimento do patógeno; a clássica, iniciada pelo reconhecimento de IgG e IgM contendo complexos antígeno-anticorpo; e a das lectinas, iniciada pelo reconhecimento de superfícies bacterianas, como MBLs. Importantes reguladores do sistema complemento são indicados em caixas. A ativação do sistema complemento, por qualquer que seja a via, levará à formação de C3. Este, por sua vez, acarretará a formação de C5 e conseqüentemente à formação do Complexo de Ataque à Membrana (MAC).

A Via Alternativa, em condições fisiológicas normais, é a via dominante no plasma (MERLE *et al.*, 2015). Esta via monitora a invasão de patógenos mantendo um baixo nível de ativação por um processo descrito como *C3 tick-over* (LACHMANN; HALBWACHS, 1975). Este processo consiste na hidrólise espontânea de C3, onde seu domínio TED (*thioester domain*) sofre mudanças estruturais para

expor um sítio de ligação para o FB (*factor B*). O complexo C3(H<sub>2</sub>O)B é clivado pela serino protease FD (*factor D*), gerando a C3 convertase, que interage e cliva outras moléculas nativas de C3 em C3a e C3b (MERLE *et al.*, 2015). Estas pequenas quantidades de C3b geradas pela C3 convertase se ligam em domínios TED de qualquer outra superfície adjacente contendo grupos hidroxilas (MERLE *et al.*, 2015). Por fim, C3b se unirá com outros componentes da cascata e dará origem à C5 convertase, responsável pelo início da via terminal da cascata do sistema complemento (RICKLIN *et al.*, 2010).

Na Via Clássica, C1q se liga a complexos imunes contendo IgG ou IgM e CRPs (*C-reactive proteins*), formando uma estrutura conhecida como um “buquê de tulipas” (DOBO; KOCSIS; GAL, 2018). Uma mudança conformacional ocorre quando C1q se liga ao antígeno, transmitindo um sinal por meio de CLR (*collagen-like regions*) para induzir a auto ativação de C1r, que, subsequentemente, cliva e ativa C1s (MERLE *et al.*, 2015). A forma ativa de C1s interage com C4 e C2, clivando as duas moléculas e formando C3 convertase nas proximidades do sítio de ligação do C1; a cascata de ativação prosseguirá conforme descrito na Via Alternativa (MERLE *et al.*, 2015).

Na Via das Lectinas, as PRMs são MBLs (*mannose-binding lectin*), colectinas e as ficolinas estão envolvidas na ativação do sistema complemento (MERLE *et al.*, 2015). As colectinas contêm domínios de carboidratos que reconhecem padrões de açúcar que estão raramente presentes em proteínas e superfície de células, mas estão frequentemente expressas em bactérias, vírus e células debilitadas. Já as ficolinas estão associadas as proteínas MASPs, que são capazes de se ligar à grupos acetila na superfície bacteriana (MERLE *et al.*, 2015). Após a ligação, MASPs associados às MBLs ou ficolinas são ativadas, resultando na clivagem de C4 e C2 (MERLE *et al.*, 2015). As isoformas resultantes de ambos os processos de clivagem, culminarão na formação de C3 convertase, que clivará C5 e dará início a via terminal e, consequentemente, à formação do MAC (RICKLIN *et al.*, 2010).

Nas três vias de ativação do sistema complemento, importantes fatores são necessários para sua regulação, contribuindo para o auto reconhecimento e prevenindo ataques as próprias células humanas (RICKLIN *et al.*, 2010). Dentre eles, há: o FH (*factor H*) e seu homólogo FHL-1 (*factor H-like protein 1*), que agem nas C3 convertases da via alternativa ou como cofator para a degradação de C3b mediada pelo FI (*factor I*) (RICKLIN *et al.*, 2010); o C4BP (*C4b-binding protein*), que

apresenta efeitos similares ao FH nas vias clássicas e das lectinas (RICKLIN *et al.*, 2010); o C1Inh (*C1 Inhibitor*), que se liga e inativa ambos C1r e C1s, levando a dissociação do complexo C1 e liberando C1q e complexos covalentes inativos entre C1Inh e C1r ou C1s (MERLE *et al.*, 2015).

### 1.5 Evasão do sistema complemento pelas *Escherichia coli*

As bactérias Gram-negativas apresentam alguns mecanismos para escapar do sistema complemento, como por exemplo: modificação das moléculas de LPS, expressão de proteínas que inibem a formação do MAC e “sequestro” dos reguladores do complemento para resistir à lise bacteriana mediada pelo MAC (BERENDS *et al.*, 2014). Como observado por Lee e Tesh (2019), a toxina Stx2a, de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC), se liga ao FH e outras moléculas relacionadas. O FH é essencial à clivagem de C3b em iC3b mediada pelo FI. Essa ligação retarda a clivagem da cadeia  $\alpha$  de C3b, prejudicando a capacidade do FH de interagir com superfícies celulares, levando à inativação tardia de C3b e uma atividade de C3 convertase prolongada.

*Escherichia coli* podem possuir fatores de virulência capazes de clivar componentes do sistema complemento. A serino protease Pic reduziu significativamente a ativação do complemento pelas três vias, degradando componentes como C3, C3b, C4 e C2. Além disso, a adição dos Fatores I e H às reações potencializou a degradação de C3 pela proteína Pic, inativando o componente (ABREU *et al.* 2015). No estudo de Orth *et al.* (2010), foi observado que a serino protease EspP, de *Escherichia coli* Enterohemorrágica, foi capaz de degradar os componentes C3, C3b e C5. Uma vez que Pet é uma SPATE, resolvemos investigar se esta toxina poderia interagir com o sistema complemento e inativá-lo, por meio da clivagem de seus componentes.

## 1.6 Justificativa

Embora a toxina Pet tenha sido caracterizada em EAEC, o gene codificador da proteína também pode ser encontrado em isolados de *Escherichia coli* extraintestinais. Além disso, há casos de EAEC que causam infecções extraintestinais reportados na literatura que atingem o sistema urinário, bem como a corrente sanguínea. Dessa forma, o presente estudo visou investigar se a toxina poderia ser um fator de virulência relacionado à evasão do sistema complemento, bem como à resistência ao soro humano.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

O presente estudo teve como objetivo investigar a atividade proteolítica de Pet sobre os componentes C3, C3b, C4, C4b e C5 do sistema complemento, bem como o papel desta toxina na resistência ao soro humano.

### **2.2 Específicos**

- Testar a inibição da degradação dos componentes do sistema complemento com o inibidor de serino proteases, PMSF;
- Verificar se a presença do Fator I é necessária para a degradação de componentes do sistema complemento pela proteína Pet;
- Analisar a atividade bactericida do Soro Humano Comercial quando pré-tratado com a proteína Pet.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Componentes do sistema complemento, anticorpos e soro humano comercial

Para a realização dos testes, foram utilizadas proteínas purificadas do complemento (C3, C3b, C4, C4b, C5, fator H e fator I) e seus anticorpos específicos (Complement Technology), soro adsorvido com HB101 contendo anti-Pet (gentilmente cedido pela Dra. Roxane Maria Fontes Piazza, Instituto Butantan, Laboratório de Bacteriologia, São Paulo, Brasil), anticorpos secundários anti IgG de cabra e anti IgG de coelho (Sigma-Aldrich) e Soro Humano Comercial (Sigma-Aldrich).

#### 3.2 Proteína Pet

O clone mínimo HB101 (pCEFN) foi usado como produtor da Pet e a proteína concentrada liofilizada foi gentilmente cedida pelo Dr. Fernando Navarro-Garcia (Departamento de Biología Celular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN - CINVESTAV-IPN, México). A obtenção e purificação da Pet no clone mínimo é descrita no trabalho de Eslava *et al.* (1998). Pet liofilizada foi ressuspensa com água Milli-Q para se obter concentração de 1 µg/µL. Após a ressuspensão, 5 µL da amostra foram desnaturadas a 98°C por 5 minutos com *sample buffer* (7,5 mL de Tris HCl pH 6,8; 3 g de Dodecil Sulfato de Sódio 10%; 0,15g de Bromofenol; 15 mL de Glicerol; 2,1 mL de β-mercapto e q.s.p. 30 mL de água Milli-Q) e aplicadas em duplicata em dois géis SDS-PAGE 10%, um para coloração por Coomassie Blue e outro para Coloração por Prata, para verificar a presença da Pet. Além disso, o *Western Blot* foi realizado utilizando o soro específico anti-Pet para verificar a integridade da proteína.

##### 3.2.1 Coloração por Coomassie Blue

O primeiro gel SDS-PAGE 10% (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) foi deixado em solução corante (2,5g de azul Coomassie, 400 mL de etanol, 70 mL de ácido acético e q.s.p. 1L de água destilada) *overnight*, sob agitação à temperatura ambiente. Em seguida, o gel foi descorado utilizando-se uma solução

descolorante (300 mL de etanol, 70 mL de ácido acético e q.s.p. 1L de água destilada) sob agitação à temperatura ambiente. O gel foi lavado em água destilada e escaneado para armazenamento dos resultados.

### 3.2.2 Coloração por Prata

O segundo gel SDS-PAGE 10% foi deixado em solução fixadora (100 mL de etanol, 25 mL de ácido acético, 100 µL de formaldeído 37% e q.s.p. 200 mL de água destilada) *overnight* e sob agitação. Em seguida, o gel foi lavado quatro vezes por 20 minutos sob agitação com a solução de lavagem (100 mL de etanol e 100 mL de água destilada), desprezando a solução anterior. Após a lavagem, o gel foi colocado em tiosulfato de sódio 0,02% por 1 minuto, sob agitação, e em seguida lavado três vezes por 20 segundos, sob agitação, com água destilada. Após a lavagem com água, o gel foi colocado em solução corante (0,1g de AgNO<sub>3</sub>, 37,5 µL de formaldeído 37% e 50 mL de água destilada) por 20 minutos, sob agitação, e em seguida lavado duas vezes por 20 segundos, sob agitação, com água destilada. Após a nova lavagem com água, o gel foi colocado em solução reveladora (3g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 25 µL de formaldeído 37%, 10 µL de tiosulfato de sódio 0,2% e 50 mL de água destilada) até as bandas aparecerem nitidamente. A reação foi interrompida com solução STOP (100 mL de etanol, 24 mL de ácido acético e q.s.p. 200 mL de água destilada) e o gel foi lavado em água destilada e escaneado para armazenamento dos resultados.

### 3.2.3 Western Blot

Além das colorações por Coomassie Blue e Prata, foi realizado um terceiro gel SDS-PAGE 10% para realizar um *Western Blot* e confirmar a presença da Pet, bem como verificar a integridade da proteína no concentrado do sobrenadante de pCFN1 liofilizado. Em seguida, as bandas do gel foram transferidas para a membrana de nitrocelulose (*GE Healthcare – Life Sciences*) pelo sistema semi-seco *Trans-Blot Semi dry* (Bio Rad) à 10V por 45 minutos. Após a transferência das bandas, a membrana de nitrocelulose foi colocada em solução bloqueio (20 mL de tampão PBS - *Phosphate-Buffered Saline*: 137 mM de NaCl, 10 mM de fosfato, 2,7 mM de KCl, pH 7,4 - e 5% de leite desnatado) a 4°C *overnight* e sem agitação.

Para a imunodeteção, a membrana foi lavada com PBS-T (200 mL de tampão PBS e 0,05% de detergente Tween® 20) três vezes por 5 minutos, com

agitação. Após a primeira lavagem, a membrana foi incubada com o anticorpo primário (anti-Pet, diluído 1:1.000 em 10 mL de tampão PBS e 2,5% de leite desnatado) e colocada em agitação por 1 hora. Em seguida, a membrana foi lavada novamente com PBS-T nas mesmas condições anteriores. Após a segunda lavagem a membrana foi incubada com o anticorpo secundário (anti IgG de coelho, diluído 1:10.000 em 10 mL de tampão PBS e 2,5% de leite desnatado) e colocada em agitação por 1 hora. Em seguida, a membrana foi lavada pela última vez com PBS-T nas mesmas condições anteriores. Por fim, a membrana foi colocada na solução reveladora DAB (15 mL de tampão DAB – 0,05 M de tris, 0,15 M de NaCl, 200 ml de água destilada, pH 7,6; 0,01g de diaminobenzidina e 12 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) até as bandas aparecerem nitidamente e a reação foi interrompida com água destilada. Todas as incubações foram realizadas à temperatura ambiente.

### **3.3 Obtenção do sobrenadante de cultura de HB101**

O sobrenadante de uma *Escherichia coli* HB101 foi utilizado como controle negativo (ABREU *et al.*, 2015). Para prepará-lo, o pré-inóculo foi realizado em duplicata, na diluição de 1:100 em 3 mL de meio LB (Luria Bertani) e cultivado a 37°C, 250 rpm. Ao fim do dia, o pré-inóculo foi transferido para 100 mL de meio LB 1:100, novamente em duplicata, cultivado a 37°C, 250 rpm, *overnight*. Posteriormente, foram preparados dois tubos de 50 mL e os mesmos foram centrifugados a 12.000 g por 10 minutos para coletar o sobrenadante. Por fim, o sobrenadante foi filtrado em bomba à vácuo e concentrado em Centricon de 100 MWCO. A quantidade de proteínas totais do sobrenadante foi quantificada pelo método Pierce (*Pierce BCA protein – Thermo Scientific*).

### **3.4 Ensaios de clivagem dos componentes do sistema complemento (C3, C3b, C4, C4b e C5)**

Os sobrenadantes de cultura concentrados de HB101 (pCEFN) e *Escherichia coli* HB101 (1 µg de proteínas totais) foram incubados por 5 e 24 horas a 37°C com os componentes do sistema complemento (0.5 µg para C3, C3b, C4 e C4b, e 1 µg para C5; diluídos em água Milli-Q) e tampão MOPS (3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid) (125 mM de MOPS; 12,5 µM de ZnSO<sub>4</sub>; 250mM



NaCl; pH 7,5). Como controle negativo, foi realizada uma incubação apenas entre os componentes do sistema complemento e o tampão MOPS. O volume final para os tubos foi de 50 µL.

A inibição da degradação de cada componente foi realizada adicionando-se um inibidor de serino protease. Para tal, os sobrenadantes de cultivo bacteriano foram previamente incubados com PMSF (*phenylmethylsulfonyl fluoride*) a 1 mM por 30 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, os sobrenadantes de cultura da HB101 (pCEF1) e *Escherichia coli* HB101 (1 µg de proteínas totais) foram incubados por 5 e 24 horas a 37°C com componentes do sistema complemento (0.5 µg para C3, C3b, C4 e C4b, e 1 µg para C5; diluídos em água Milli-Q) e tampão MOPS. O volume final para os tubos foi de 50 µL. Os produtos de degradação foram analisados por *Western Blot*.

#### 3.4.1 *Western Blot*

Foram realizados dois géis SDS-PAGE 10% para cada componente do complemento, contendo 10 µL/well de reação e 5 µL/well de peso molecular *Kaleidoscope* (Bio Rad). Em seguida, as bandas do gel foram transferidas para a membrana de nitrocelulose utilizando-se o sistema semi-seco *Trans-Blot Semi dry* (Bio Rad) à 10V por 45 minutos. Após a transferência das bandas, a membrana de nitrocelulose foi colocada em solução bloqueio (20 mL de tampão PBS e 5% de leite desnatado) a 4°C *overnight* e sem agitação.

Para a imunodeteção, a membrana foi lavada com PBS-T (200 mL de tampão PBS e 0,05% de detergente Tween® 20) três vezes por 5 minutos, com agitação. Após a primeira lavagem, a membrana foi incubada com o anticorpo específico para cada componente (diluídos 1:5000 para anti-C3, 1:2500 para anti-C4 e 1:2000 para anti-C5 em 10 mL de tampão PBS e 2,5% de leite desnatado) e colocada em agitação por 1 hora. Em seguida, a membrana foi lavada novamente com PBS-T nas mesmas condições anteriores. Após a segunda lavagem a membrana foi incubada com o anticorpo secundário (anti IgG de cabra, diluído 1:10.000 em 10 mL de tampão PBS e 2,5% de leite desnatado) e colocada em agitação por 1 hora. Em seguida, a membrana foi lavada pela última vez com PBS-T nas mesmas condições anteriores.

Por fim, as membranas foram reveladas por ECL (*enhanced chemiluminescent – Thermo Scientific*). Foram homogeneizados 500 µL de *stable*

*peroxide* e 500 µL de luminol em uma placa, e em seguida a membrana foi tratada por 1 minuto com a solução. Posteriormente, a membrana foi revelada por quimiluminescência em transiluminador (Uvitech – UVI-1D).

### **3.5 Ensaios proteolíticos com reguladores negativos do sistema complemento**

Para verificar se a degradação dos componentes do sistema complemento por Pet dependeria de um cofator, novas incubações foram realizadas contendo os Fatores I e H importantes reguladores negativos do sistema complemento. O componente C3b foi utilizado por apresentar padrão de degradação conhecido pelos fatores H e I (CASTIBLANCO-VALENCIA *et al.*, 2012). Foram realizadas uma reação contendo C3b e os dois fatores (0.5 µg para C3b e Fator I, e 0.25 µg para Fator H), uma reação contendo apenas C3b como controle, uma reação contendo C3b e Pet (0.5 µg para C3b e 1 µg para Pet) e, por fim, uma reação contendo C3b, Pet e o Fator H (0.5 µg para C3b, 1 µg para Pet e 0.25 µg para Fator H). O tampão MOPS foi utilizado em todas as reações e as incubações foram feitas por 5 horas a 37°C. O volume final para os tubos foi de 20 µL. Os Produtos de degradação foram analisados por *Western Blot*.

#### **3.5.1 Western Blot**

A eletroforese em gel SDS-PAGE e a transferência para membrana de nitrocelulose foram realizadas conforme o item 3.4.1. Para a imunodeteção, a membrana foi lavada com PBS-T (200 ml de tampão PBS e 0,05% de detergente Tween® 20) três vezes por 5 minutos, com agitação. Após a primeira lavagem, a membrana foi tratada com o anticorpo primário (anti-C3, diluído 1:5000 em 10 mL de tampão PBS e 2,5% de leite desnatado) e colocada em agitação por 1 hora. Em seguida, a membrana foi lavada novamente com PBS-T nas mesmas condições anteriores. Após a segunda lavagem a membrana foi tratada com o anticorpo secundário (anti IgG de cabra, diluído 1:10.000 em 10 mL de tampão PBS e 2,5% de leite desnatado) e colocada em agitação por 1 hora. Por fim, as membranas foram reveladas utilizando-se ECL, conforme descrito no item 3.4.1.

### 3.6 Atividade bactericida do soro humano pós tratamento com o sobrenadante da proteína Pet

Para verificar o papel de Pet na evasão do sistema complemento, foi realizado um ensaio de resistência à atividade bactericida do soro humano. Para tal, as bactérias *Escherichia coli* HB101 foram incubadas com o soro humano comercial em diferentes condições. O pré-inóculo bacteriano foi preparado em caldo LB e incubado a 37°C por 18 h. Ao fim deste período, um novo cultivo 1:50 em caldo LB (Luria Bertani) foi incubado a 37°C/ 250 rpm, até que o cultivo atingisse a densidade óptica 0,5 a 600 nm. O cálculo da quantidade necessária de Pet para inativação das moléculas do complemento foi baseado na relação enzima/substrato observada entre Pet e C3 nos ensaios proteolíticos (2:1) e na concentração sérica de C3 no soro humano normal (1500 µg/mL).

Em seguida, 20 µL do inóculo da cepa foram adicionados aos microtubos preparados de forma que o volume final de cada microtubo foi de 200 µL e a concentração final de soro nos tubos que o continham foi de 50%. O conteúdo dos três microtubos (Tabela 1) foi homogeneizado e os microtubos contendo soro humano sem tratamento (NHS), soro inativado pelo calor (IHS) e soro pré-tratado com Pet (Pet IHS) foram incubados a 37°C por 60 min. Imediatamente após a adição do inóculo, 20 µL do microtubo controle (tempo 0) foram coletados.

**Tabela 1** – Disposição dos microtubos

	NHS	IHS	Pet IHS
<i>Soro</i>	100 µL	100 µL	100 µL
<i>Inóculo</i>	20 µL	20 µL	20 µL
<i>MOPS</i>	80 µL	80 µL	30 µL
<i>Pet</i>	-	-	50 µL
<b>V. final da reação</b>	200 µL	200 µL	200 µL

Aos 30 e 60 min de incubação, 20 µL do conteúdo dos microtubos NHS, IHS e Pet IHS foram coletados, diluídos de forma seriada em PBS 0,01M estéril ( $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$  e  $10^{-8}$ ) e semeadas em ágar MacConkey pelo método da microdiluição em

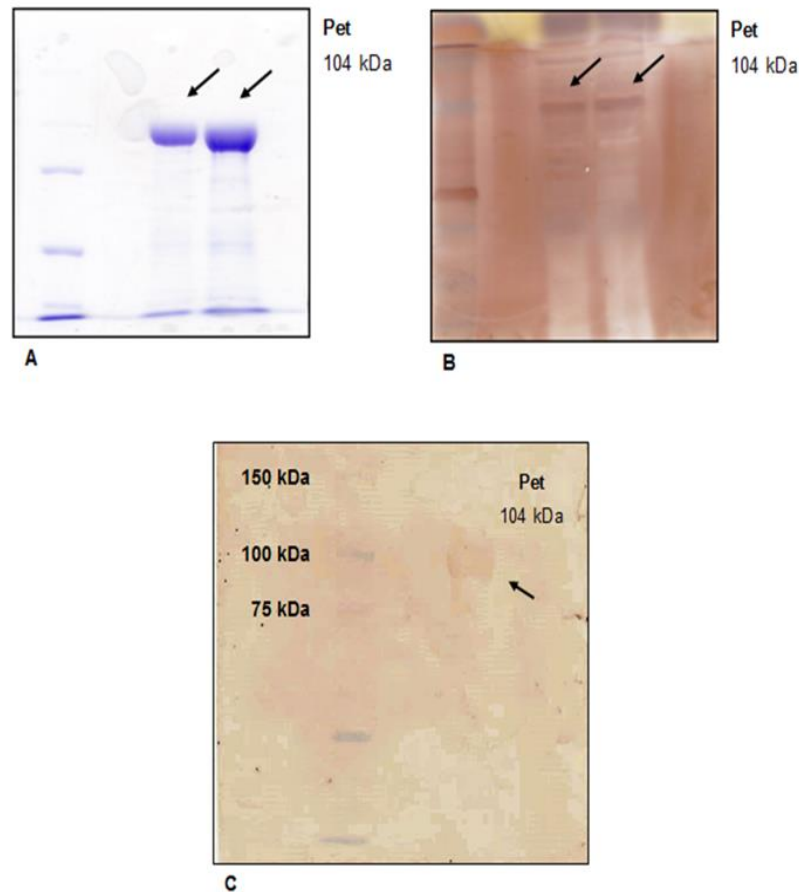
placa. Todas as placas de ágar MacConkey foram incubadas a 37°C por 18 h e as colônias foram contadas para determinar a quantidade de UFC/mL. Os resultados foram plotados em um gráfico “tempo de incubação x UFC/mL”, utilizando-se o programa Prisma.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Detecção da proteína Pet no sobrenadante do clone mínimo HB101 (pCEF<sub>N</sub>)

Para verificar a integridade da proteína Pet no sobrenadante do clone mínimo HB101 pCEF<sub>N</sub>, realizou-se a eletroforese seguida por coloração de prata e Coomassie, bem como o *Western Blot* utilizando os anticorpos anti-Pet. Foram observadas bandas com peso de 104 kDa, que corresponde ao peso molecular de Pet nos géis de prata e Coomassie (Figura 6 a e b). A presença da proteína foi confirmada por *Western Blot*, conforme demonstrado na figura 6c.

**Figura 6** - Detecção da Pet por colorações de Coomassie (A), Prata (B) e *Western Blot* (C)



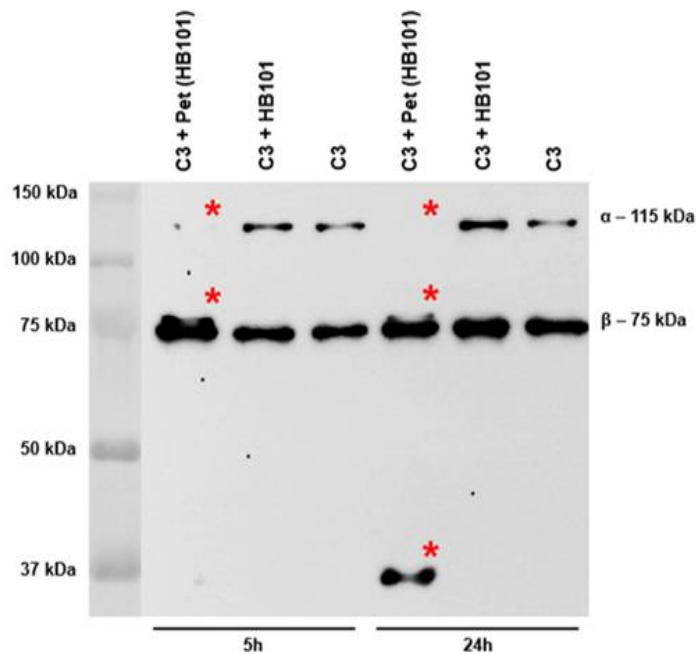
As colorações de Coomassie (A) e Prata (B) foram realizadas para verificar a presença da proteína Pet; as setas indicam bandas de peso molecular próximos a 104 kDa, peso descrito para a Pet na literatura. Além disso, um *Western Blot* (C) foi realizado utilizando o soro específico anti-Pet para verificar a integridade da proteína; novamente, a seta indica uma banda de peso molécula próximo a 104 kDa.

## 4.2 Pet degrada os componentes do sistema complemento C3, C3b, C4, C4b e C5

Para verificar a degradação dos componentes do sistema complemento pela proteína Pet, realizou-se a eletroforese seguida por *Western Blot* utilizando anticorpos específicos para cada componente.

Na figura 7, observa-se o padrão de degradação obtido no teste realizado com C3. Em 5 horas, observa-se o aparecimento de um produto de degradação de aproximadamente 75 kDa, enquanto que em 24 horas, observa-se o aparecimento de produtos de degradação de aproximadamente 75 e 37 kDa. Em ambos os tempos de incubação, nota-se desaparecimento total da cadeia  $\alpha$ . Não foi possível observar degradações espontâneas da molécula.

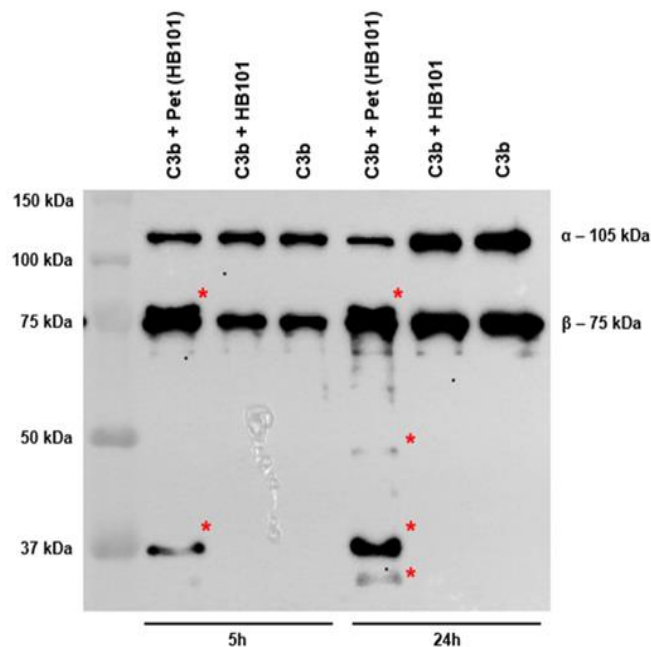
**Figura 7** - Degradação de C3 após a incubação com sobrenadante de HB101 pCEFN



Para a realização dos ensaios proteolíticos, um gel SDS-PAGE 10% contendo bandas das reações foi transferido para uma membrana de nitrocelulose. Após a transferência, a membrana foi incubada com anticorpos específicos e revelada por ECL (*enhanced chemiluminescent*) em um transiluminador. A molécula de C3 possui duas cadeias, a cadeia  $\alpha$  de 115 kDa e a cadeia  $\beta$  de 75 kDa. Marcados em vermelho, observa-se o aparecimento de produtos de degradação específicos de C3 na incubação com o sobrenadante de HB101 (pCEFN) que não aparecem na incubação com sobrenadante de *Escherichia coli* HB101 e no controle negativo. Além disso, observa-se que o padrão de degradação em 24h foi mais intenso do que em 5h, onde um produto de degradação de 37 kDa foi detectado apenas em 24h de incubação. Em ambos os tempos, houve desaparecimento total da cadeia  $\alpha$  e a detecção de um produto de degradação de aproximadamente 75 kDa.

Na figura 8, observa-se o padrão de degradação obtido no teste realizado com C3b. Em 5 horas, observa-se o aparecimento de produtos de degradação de aproximadamente 75 e 37 kDa, enquanto que em 24 horas, observa-se o aparecimento de produtos de degradação de aproximadamente 75, 50 e 37 kDa. Não foi possível observar degradações espontâneas da molécula.

**Figura 8** - Degradação de C3b após a incubação com sobrenadante de HB101 pCEFV

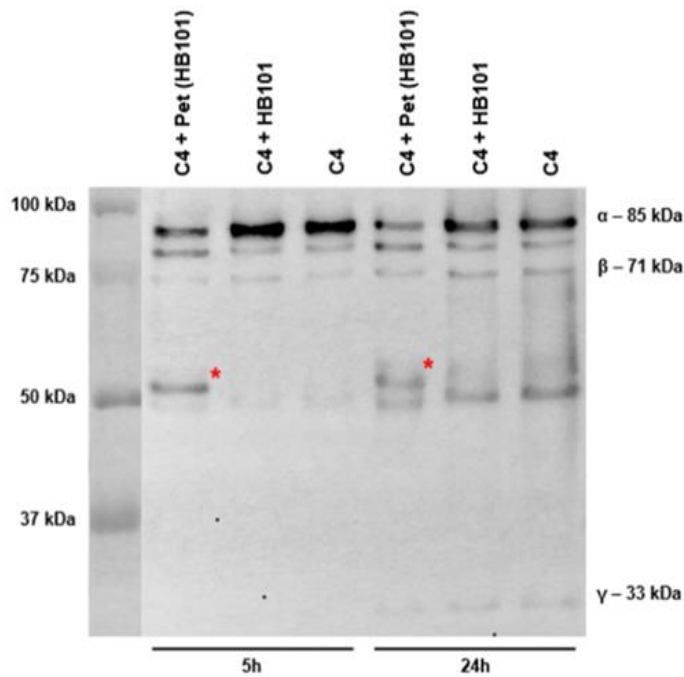


Para a realização dos ensaios proteolíticos, um gel SDS-PAGE 10% contendo bandas das reações foi transferido para uma membrana de nitrocelulose. Após a transferência, a membrana foi incubada com anticorpos específicos e revelada por ECL (*enhanced chemiluminescent*) em um transiluminador. A molécula de C3b possui duas cadeias, a cadeia  $\alpha$  de 105 kDa e a cadeia  $\beta$  de 75 kDa. Marcados em vermelho, observa-se o aparecimento de produtos de degradação específicos de C3b na incubação com o sobrenadante de HB101 (pCEFV) que não aparecem na incubação com sobrenadante de *Escherichia coli* HB101 e no controle negativo. Novamente, observa-se que o padrão de degradação em 24h foi mais intenso do que em 5h, sendo possível detectar alguns produtos de degradação que não aparecem em 5h de incubação e o produto de degradação de 37 kDa foi detectado com maior intensidade. Embora não tenha sido observado desaparecimento da cadeia  $\alpha$ , nota-se que há uma diferença de tamanho da banda em comparação com os outros grupos, sugerindo uma possível degradação.

Na figura 9, observa-se o padrão de degradação obtido no teste realizado com C4. Em 5 horas, observa-se o aparecimento de um produto de degradação de aproximadamente 50 kDa, enquanto que em 24 horas, observa-se o mesmo produto de degradação de aproximadamente 50 kDa. Neste caso, foi possível observar

produtos inespecíficos, provenientes da degradação espontânea de C4, que não estão relacionados à incubação com o sobrenadante de HB101 (pCEFN).

**Figura 9** - Degradação de C4 após a incubação com sobrenadante de HB101 pCEFN

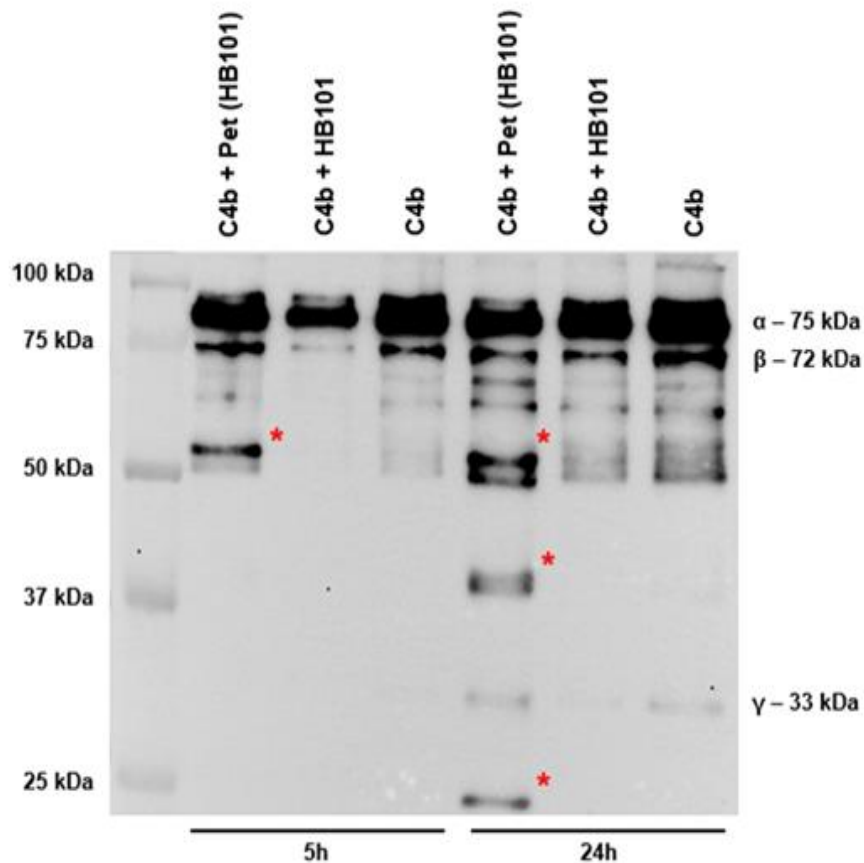


Para a realização dos ensaios proteolíticos, um gel SDS-PAGE 10% contendo bandas das reações foi transferido para uma membrana de nitrocelulose. Após a transferência, a membrana foi incubada com anticorpos específicos e revelada por ECL (*enhanced chemiluminescent*) em um transiluminador. A molécula de C4 possui três cadeias, a cadeia  $\alpha$  de 85 kDa, a cadeia  $\beta$  de 71 kDa e a cadeia  $\gamma$  de 33 kDa. Marcados em vermelho, observa-se o aparecimento de produtos de degradação específicos de C4 na incubação com o sobrenadante de HB101 (pCEFN) que não aparecem na incubação com sobrenadante de *Escherichia coli* HB101 e no controle negativo. Observam-se também produtos de degradação inespecíficos que aparecem tanto na presença do sobrenadante do clone mínimo quanto nos outros grupos. Neste caso, estes produtos são provenientes da degradação espontânea de C4 e não estão relacionados à presença da Pet na incubação.

Na figura 10, observa-se o padrão de degradação obtido no teste realizado com C4b. Em 5 horas, observa-se o aparecimento de um produto de degradação de aproximadamente 50 kDa, enquanto que em 24 horas, observam-se produtos de degradação de aproximadamente 50, 37 e 25 kDa. Neste caso, também foi possível observar produtos inespecíficos provenientes da degradação espontânea do componente C4b utilizado, que não estão relacionados à incubação com o sobrenadante de HB101 (pCEFN).



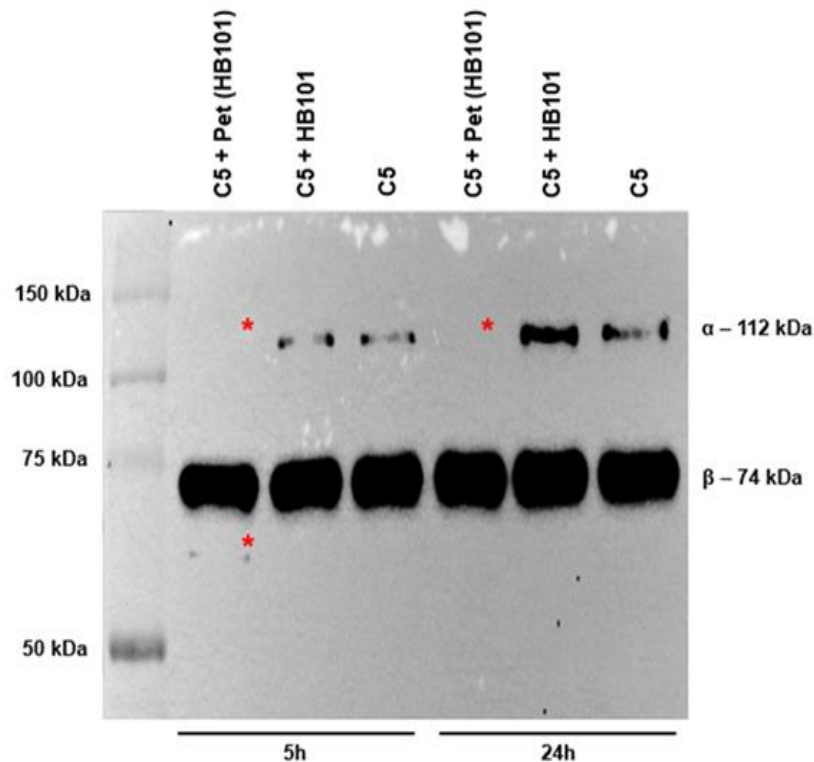
**Figura 10** - Degradação de C4b após a incubação com sobrenadante de HB101 pCEFN



Para a realização dos ensaios proteolíticos, um gel SDS-PAGE 10% contendo bandas das reações foi transferido para uma membrana de nitrocelulose. Após a transferência, a membrana foi incubada com anticorpos específicos e revelada por ECL (*enhanced chemiluminescent*) em um transiluminador. A molécula de C4b possui três cadeias, a cadeia  $\alpha$  de 75 kDa, a cadeia  $\beta$  de 72 kDa e a cadeia  $\gamma$  de 33 kDa. Marcados em vermelho, observa-se o aparecimento de produtos de degradação específicos de C4b na incubação com o sobrenadante de HB101 (pCEFN) que não aparecem na incubação com sobrenadante de *Escherichia coli* HB101 e no controle negativo. Novamente, observa-se que a degradação em 24h foi mais intensa que em 5h, com o aparecimento de produtos de degradação que só aparecem em 24h. Observam-se também produtos de degradação inespecíficos que aparecem tanto na presença do sobrenadante do clone mínimo quanto nos outros grupos. Neste caso, estes produtos são provenientes da degradação espontânea de C4b e não estão relacionados à presença da Pet na incubação.

Na figura 11, observa-se o padrão de degradação obtido no teste realizado com C5. Em 5 horas, observa-se o aparecimento de um produto de degradação de aproximadamente 75 kDa, enquanto que em 24 horas, não foi possível observar produtos de degradação. Em ambos os tempos de incubação, nota-se desaparecimento total da cadeia  $\alpha$ . Não foi possível observar degradações espontâneas da molécula.

**Figura 11** - Degradação de C5 após a incubação com sobrenadante de HB101 pCEFΝ



Para a realização dos ensaios proteolíticos, um gel SDS-PAGE 10% contendo bandas das reações foi transferido para uma membrana de nitrocelulose. Após a transferência, a membrana foi incubada com anticorpos específicos e revelada por ECL (*enhanced chemiluminescent*) em um transiluminador. A molécula de C5 possui duas cadeias, a cadeia  $\alpha$  de 112 kDa e a cadeia  $\beta$  de 74 kDa. Marcados em vermelho, observa-se o aparecimento de produtos de degradação específicos de C5 na incubação com o sobrenadante de HB101 (pCEFΝ) que não aparecem na incubação com sobrenadante de *Escherichia coli* HB101 e no controle negativo. Em ambos os tempos, houve desaparecimento total da cadeia  $\alpha$ .

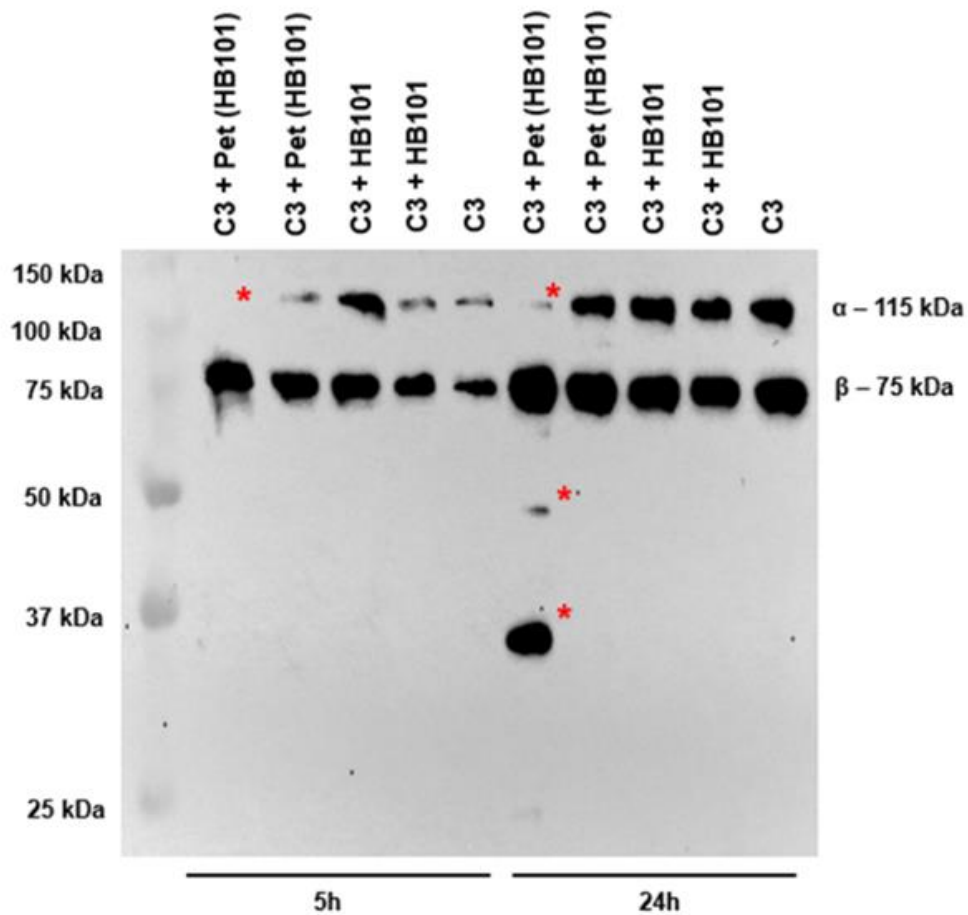
#### 4.3 Inibição da degradação dos componentes do complemento por PMSF

Para confirmar que as degradações observadas nos primeiros ensaios foram causadas pela Pet, um segundo ensaio foi realizado com PMSF que inibe a ação de serino proteases.

Na figura 12, observa-se o padrão de degradação obtido no teste realizado com C3. Em 5 horas, não foi possível observar produtos de degradação, enquanto que em 24 horas, observa-se produtos de degradação de aproximadamente 50 e 37 kDa apenas na presença do sobrenadante de HB101 (pCEFΝ). Em ambos os tempos de incubação, novamente nota-se desaparecimento total da cadeia  $\alpha$  na presença do sobrenadante de HB101 (pCEFΝ). Nenhum outro produto de

degradação específico foi observado nas incubações com sobrenadante de HB101 (pCEF<sub>N</sub>) tratado com PMSF, sobrenadante de *Escherichia coli* HB101, sobrenadante de *Escherichia coli* HB101 tratado com PMSF e no controle negativo.

**Figura 12** – Inibição da degradação de C3 por PMSF

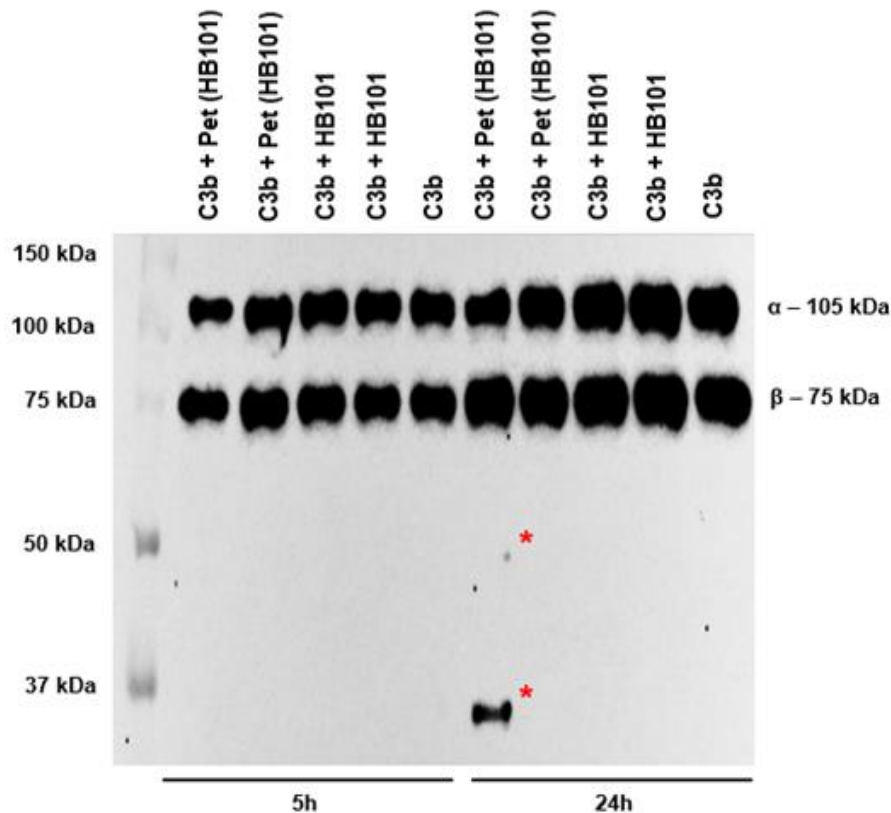


Para a realização dos ensaios proteolíticos, um gel SDS-PAGE 10% contendo bandas das reações foi transferido para uma membrana de nitrocelulose. Após a transferência, a membrana foi incubada com anticorpos específicos e revelada por ECL (*enhanced chemiluminescent*) em um transiluminador. A ordem das incubações consiste em: sobrenadante de HB101 (pCEF<sub>N</sub>), sobrenadante de HB101 (pCEF<sub>N</sub>) tratado com PMSF, sobrenadante de *Escherichia coli* HB101, sobrenadante de *Escherichia coli* HB101 tratado com PMSF e o controle negativo. Marcados em vermelho, observa-se o aparecimento de produtos de degradação específicos de C3 na incubação com o sobrenadante de HB101 (pCEF<sub>N</sub>) que não aparecem nas outras incubações, confirmando o papel da Pet na degradação da molécula.

Na figura 13, observa-se o padrão de degradação obtido no teste realizado com C3b. Em 5 horas, não foi possível observar produtos de degradação, enquanto que em 24 horas, observa-se produtos de degradação de aproximadamente 50 e 37 kDa apenas na presença do sobrenadante de HB101 (pCEF<sub>N</sub>). Nenhum outro

produto de degradação específico foi observado nas incubações com sobrenadante de HB101 (pCEF<sub>N</sub>) tratado com PMSF, sobrenadante de *Escherichia coli* HB101, sobrenadante de *Escherichia coli* HB101 tratado com PSMF e no controle negativo.

**Figura 13** - Inibição da degradação de C3b por PMSF

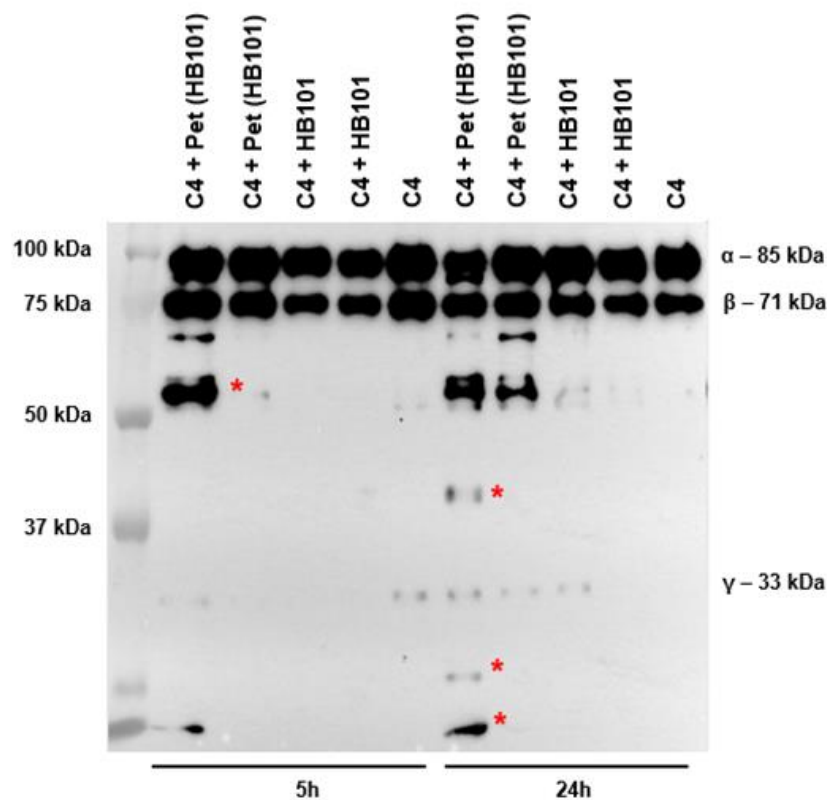


Para a realização dos ensaios proteolíticos, um gel SDS-PAGE 10% contendo bandas das reações foi transferido para uma membrana de nitrocelulose. Após a transferência, a membrana foi incubada com anticorpos específicos e revelada por ECL (*enhanced chemiluminescent*) em um transiluminador. A ordem das incubações consiste em: sobrenadante de HB101 (pCEF<sub>N</sub>), sobrenadante de HB101 (pCEF<sub>N</sub>) tratado com PMSF, sobrenadante de *Escherichia coli* HB101, sobrenadante de *Escherichia coli* HB101 tratado com PSMF e o controle negativo. Marcados em vermelho, observa-se o aparecimento de produtos de degradação específicos de C3b na incubação com o sobrenadante de HB101 (pCEF<sub>N</sub>) que não aparecem nas outras incubações, confirmando o papel da Pet na degradação da molécula.

Na figura 14, observa-se o padrão de degradação obtido no teste realizado com C4. Em 5 horas, observa-se produtos de degradação de aproximadamente 75, 50 e 20-10 kDa, enquanto que em 24 horas, observa-se produtos de degradação de aproximadamente 75, 50, 37, 25 e 20-10 kDa. Os produtos de degradação foram observados apenas na presença do sobrenadante de HB101 (pCEF<sub>N</sub>).

Nenhum outro produto de degradação específico foi observado na incubação com sobrenadante de HB101 (pCEF<sub>N</sub>) tratado com PMSF, sobrenadante de *Escherichia coli* HB101, sobrenadante de *Escherichia coli* HB101 tratado com PSMF e no controle negativo. Alguns produtos de degradação inespecíficos podem ser observados nas incubações, por conta de possível degradação espontânea da molécula que pode ter sido potencializada pela presença da Pet na incubação com o sobrenadante de HB101 (pCEF<sub>N</sub>).

**Figura 14** - Inibição da degradação de C4 por PMSF



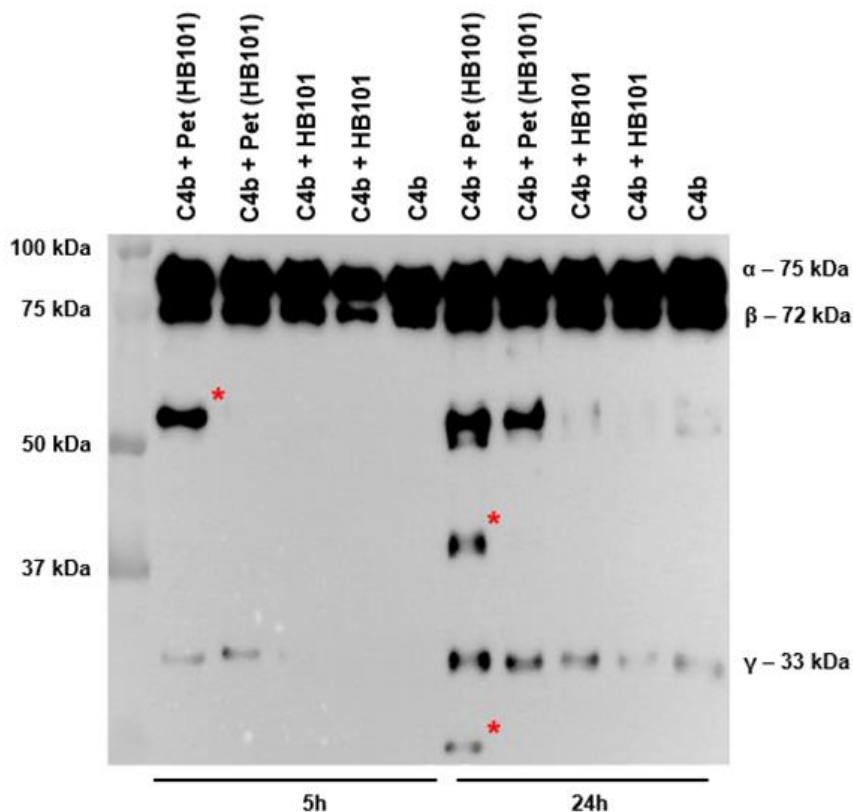
Para a realização dos ensaios proteolíticos, um gel SDS-PAGE 10% contendo bandas das reações foi transferido para uma membrana de nitrocelulose. Após a transferência, a membrana foi incubada com anticorpos específicos e revelada por ECL (*enhanced chemiluminescent*) em um transiluminador. A ordem das incubações consiste em: sobrenadante de HB101 (pCEF<sub>N</sub>), sobrenadante de HB101 (pCEF<sub>N</sub>) tratado com PMSF, sobrenadante de *Escherichia coli* HB101, sobrenadante de *Escherichia coli* HB101 tratado com PSMF e o controle negativo. Marcados em vermelho, observa-se o aparecimento de produtos de degradação específicos de C4 na incubação com o sobrenadante de HB101 (pCEF<sub>N</sub>) que não aparecem nas outras incubações, confirmando o papel da Pet na degradação da molécula.

Na figura 15, observa-se o padrão de degradação obtido no teste realizado com C4b. Em 5 horas, observa-se produtos de degradação de aproximadamente 50 kDa, enquanto que em 24 horas, observa-se produtos de degradação de

aproximadamente 50, 37 e 25 kDa. Os produtos de degradação foram observados apenas na presença do sobrenadante de HB101 (pCEF<sub>N</sub>).

Nenhum outro produto de degradação específico foi observado na incubação com sobrenadante de HB101 (pCEF<sub>N</sub>) tratado com PMSF, sobrenadante de *Escherichia coli* HB101, sobrenadante de *Escherichia coli* HB101 tratado com PSMF e no controle negativo. Alguns produtos de degradação inespecíficos podem ser observados, por conta de possível degradação espontânea da molécula que pode ter sido potencializada pela presença da Pet na incubação com o sobrenadante de HB101 (pCEF<sub>N</sub>).

**Figura 15** - Inibição da degradação de C4b por PMSF

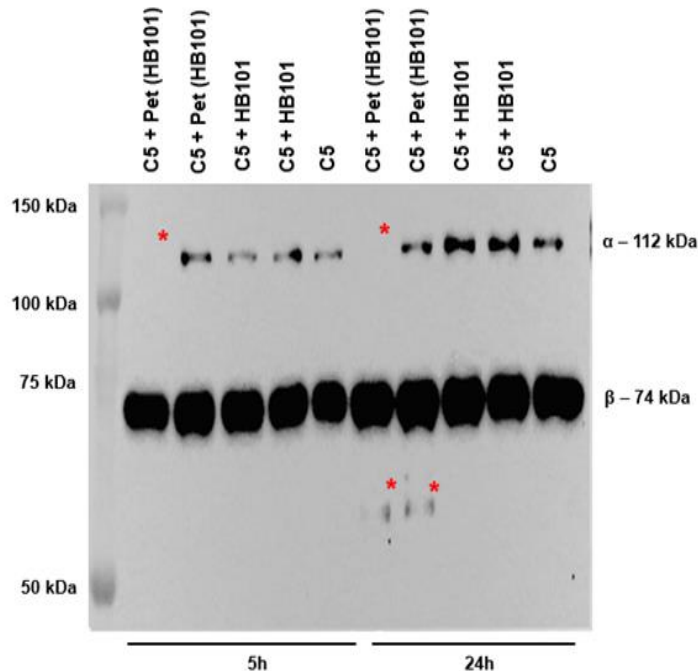


Para a realização dos ensaios proteolíticos, um gel SDS-PAGE 10% contendo bandas das reações foi transferido para uma membrana de nitrocelulose. Após a transferência, a membrana foi incubada com anticorpos específicos e revelada por ECL (*enhanced chemiluminescent*) em um transiluminador. A ordem das incubações consiste em: sobrenadante de HB101 (pCEF<sub>N</sub>), sobrenadante de HB101 (pCEF<sub>N</sub>) tratado com PMSF, sobrenadante de *Escherichia coli* HB101, sobrenadante de *Escherichia coli* HB101 tratado com PSMF e o controle negativo. Marcados em vermelho, observa-se o aparecimento de produtos de degradação específicos de C4b na incubação com o sobrenadante de HB101 (pCEF<sub>N</sub>) que não aparecem nas outras incubações, confirmando o papel da Pet na degradação da molécula.

Na figura 16, observa-se o padrão de degradação obtido no teste realizado com C5. Em 5 horas, não foi possível observar produtos de degradação, enquanto que em 24 horas, observa-se um produto de degradação entre 75 e 50 kDa apenas na presença do sobrenadante de HB101 (pCEFN). Em ambos os tempos de incubação, novamente nota-se desaparecimento total da cadeia  $\alpha$  na presença do sobrenadante de HB101 (pCEFN).

Nenhum outro produto de degradação específico foi observado nas incubações com sobrenadante de HB101 (pCEFN) tratado com PMSF, sobrenadante de *Escherichia coli* HB101, sobrenadante de *Escherichia coli* HB101 tratado com PSMF e no controle negativo. Um produto de degradação inespecífico foi observado na incubação com o sobrenadante de HB101 (pCEFN) tratado com PSMF. Neste caso, a inibição em 24 horas possa ter sido insuficiente ou outro fator causou o aparecimento deste produto de degradação inespecífico.

**Figura 16** - Inibição da degradação de C5 por PMSF

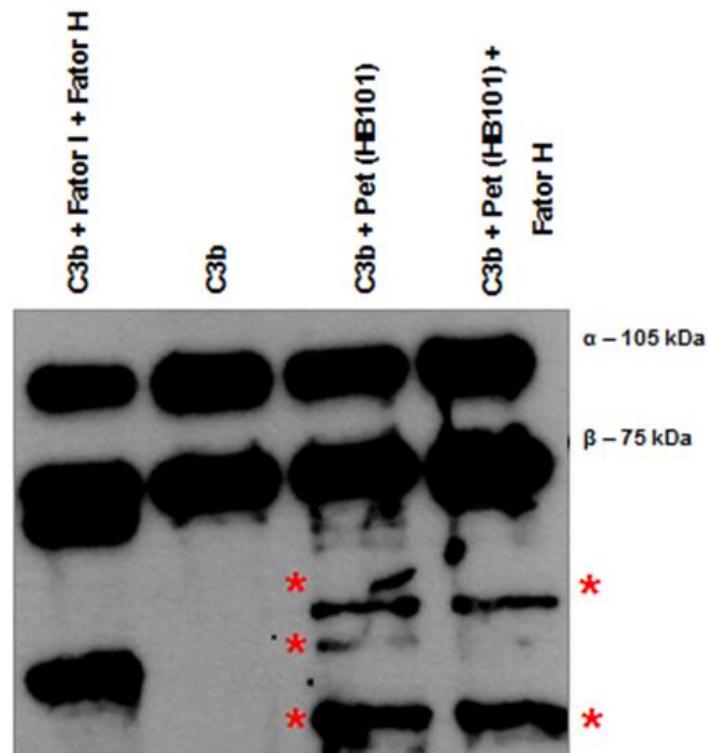


Para a realização dos ensaios proteolíticos, um gel SDS-PAGE 10% contendo bandas das reações foi transferido para uma membrana de nitrocelulose. Após a transferência, a membrana foi incubada com anticorpos específicos e revelada por ECL (*enhanced chemiluminescent*) em um transiluminador. A ordem das incubações consiste em: sobrenadante de HB101 (pCEFN), sobrenadante de HB101 (pCEFN) tratado com PMSF, sobrenadante de *E. coli* HB101, sobrenadante de *E. coli* HB101 tratado com PSMF e o controle negativo. Marcados em vermelho, observa-se o aparecimento de produtos de degradação específicos de C5 na incubação com o sobrenadante de HB101 (pCEFN) que não aparecem nas outras incubações, confirmando o papel da Pet na degradação da molécula.

#### 4.4 A degradação por Pet não necessita do Fator I

Para verificar se a degradação dos componentes do sistema complemento por Pet dependeria de um cofator, novas incubações foram realizadas contendo os Fatores I e H, importantes reguladores negativos do sistema complemento. Na figura 17, observa-se o padrão obtido.

**Figura 17 - Degradação de C3b por Pet na presença de um cofator**



Para a realização dos ensaios proteolíticos, um gel SDS-PAGE 10% contendo bandas das reações foi transferido para uma membrana de nitrocelulose. Após a transferência, a membrana foi incubada com anticorpos específicos e revelada por ECL (*enhanced chemiluminescent*) em um transiluminador. A ordem das incubações consiste em: C3b com fatores I e H, controle negativo, C3b com sobrenadante de HB101 (pCEFV) e C3b com sobrenadante de HB101 (pCEFV) e fator H. Marcados em vermelho, observa-se o padrão de degradação obtido na ausência e presença do fator H na incubação, comparando com o padrão de degradação conhecido de C3b pelos fatores I e H e o controle negativo.

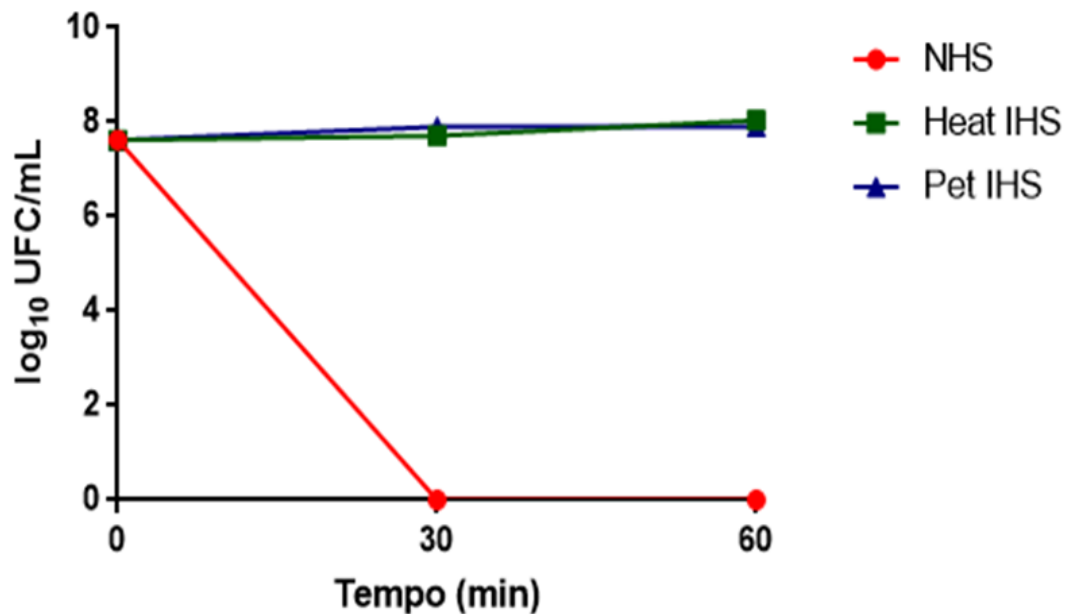
Observa-se que o padrão de degradação, na presença de um cofator na incubação com o sobrenadante de HB101 (pCEFV), é bastante similar. Portanto, Pet por si só é capaz de degradar o sistema complemento.



#### 4.5 Sobrevivência de bactérias quando incubadas em soro humano pré-tratado com Pet

Para verificar a ação da Pet sobre os componentes do sistema complemento, foi realizado um ensaio de resistência à atividade bactericida do soro humano, incubando as bactérias *E. coli* HB101 com o soro humano comercial em diferentes condições. Na figura 18, os resultados obtidos após a contagem das colônias estão representados em um gráfico.

**Figura 18** - Sobrevivência da *E. coli* HB101 ao soro humano



Observa-se que na presença do soro humano normal, houve morte total das bactérias em 30 minutos, confirmando a ação bactericida do soro humano. Na presença do soro humano inativado pelo calor, houve sobrevivência das bactérias em ambos os tempos de incubação, confirmando a inativação do soro humano. Na presença do soro humano pré-tratado com Pet, houve sobrevivência das bactérias em ambos os tempos de incubação, em um padrão próximo ao soro humano inativado, confirmando a ação da Pet na resistência à atividade bactericida do soro humano e sua atividade proteolítica sobre os componentes do sistema complemento.

## 5 DISCUSSÃO

*Escherichia coli* são bactérias que colonizam naturalmente a microbiota intestinal e raramente causam doenças em seus hospedeiros. No entanto, as *Escherichia coli* podem, eventualmente, adquirir fatores de virulência específicos que as permitem causar doenças em indivíduos saudáveis (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Entre estas cepas patogênicas, encontram-se as extraintestinais, relacionadas com casos de infecção urinária, meningite e sepse (RUSSO; JOHNSON, 2000). O sistema complemento, mecanismo da resposta imune inicial contra patógenos, apresenta componentes em circulação na corrente sanguínea que são ativados em cascata e formam produtos importantes na eliminação do microrganismo invasor, como o MAC (RICKLIN *et al.*, 2010). A presença de mecanismos de resistência contra a ação do sistema complemento por estes patógenos permite que os mesmos sobrevivam em presença do soro humano, podendo facilitar a disseminação pelo organismo, agravando, portanto, o quadro de infecção (BERENDS *et al.*, 2014).

Os ensaios proteolíticos demonstraram que Pet foi capaz de degradar todos os componentes do sistema complemento testados: C3, C3b, C4, C4b e C5. A capacidade de clivagem dos referidos componentes pode ser atribuída ao motivo de serino protease da proteína, uma vez que a degradação foi inibida por PMSF, cuja ação sobre essa enzima já é bem conhecida (TURINI *et al.*, 1969). A ação de várias proteases que degradam estes componentes, em uma infecção, pode agravar o quadro extraintestinal. Nos estudos de Pic (ABREU *et al.* 2015) e EspP (ORTH *et al.* 2010), e, outros membros das SPATEs, também demonstram atividade proteolítica sobre os componentes do sistema complemento. No caso da Pic, houve degradação de C3, C3b, C4 e C2, reduzindo significativamente a ativação pelas três vias; no caso da EspP, houve degradação de C3, C3b e C5. Pet apresenta em comum, portanto, a degradação de C3, C3b, C4 e C5 (ABREU *et al.*, 2015).

A degradação de C3, o componente mais abundante na corrente sanguínea, implica não só na interrupção da via alternativa como também na convergência das três vias de ativação e na formação de C3b, uma importante opsonina, e C3a, uma importante anafilotoxina (SARMA; WARD, 2011). A degradação de C3b, além de interromper a convergência das três vias de ativação, também interfere no importante processo de opsonização, por C3b ser uma importante molécula

fagocítica (SARMA; WARD, 2011). A degradação de C4 e C4b interrompem a via clássica e a via das lectinas e também interfere na formação de C3b e C3a (SARMA; WARD, 2011). A degradação de C5, além de interromper a via terminal, também interfere na formação de C5a, outra importante anafilotoxina (SARMA; WARD, 2011). Em todas as situações, a formação do Complexo de Ataque à Membrana pode ser afetada (SARMA; WARD, 2011). Como Pet promoveu degradação de C3, C3b, C4, C4b e C5, houve interferência na ativação das 3 vias de ativação do sistema complemento e na formação de C3b, C3a, C5a e MAC, o que poderia interferir não apenas no processo de lise bacteriana, como também em outros processos importantes envolvendo a resposta inflamatória contra a *E. coli*.

Como foi observado nos ensaios com os Fatores I e H, Pet não necessita de um cofator para degradar os componentes do sistema complemento. Uma vez que o perfil de degradação de C3b por Pet assemelha-se ao observado por Castiblanco-Valencia *et al.* (2012) em presença de *Leptospira interrogans* e os fatores I e H, seria interessante verificar se Pet poderia funcionar como um Fator I-like. Para tal, uma possibilidade seria realizar o sequenciamento amino terminal dos fragmentos de degradação do sistema complemento degradados por Pet, pelo método de degradação de Edman (EDMAN; BEGG, 1967). Outro ponto a ser investigado é se a adição dos fatores I e H na reação poderia potencializar a degradação de C3b por Pet, assim como ocorre em presença de Pic (ABREU *et al.* 2015).

Em relação aos ensaios com soro humano, foi possível observar que, quando o soro é pré-tratado com Pet, houve sobrevivência das bactérias em um padrão similar ao soro humano inativado pelo calor. Isso confirma os resultados obtidos nos ensaios proteolíticos, em que Pet foi capaz de degradar os componentes do sistema complemento presentes no soro humano, e assim, permitindo a sobrevivência da bactéria. No caso do estudo de Abreu *et al.* (2015), também foi observado que Pic degradou os componentes presentes no soro humano comercial, porém para alguns componentes o perfil de degradação foi mais eficiente no soro do que na molécula purificada. Para confirmar a degradação dos componentes do sistema complemento presentes no soro humano comercial, será necessário realizar futuramente um *Western Blot* utilizando anticorpos específicos contra estes componentes após a incubação com Pet.

Por conta da plasticidade genética das *Escherichia coli*, o gene *pet* pode ser encontrado em isolados extraintestinais, como observado nos casos de infecções

urinárias por UPEC (NAZEMI et al., 2011; PARK, et al., 2009, NUNES et al., 2017, ABE et al., 2008) e sepse (HERZOG et al., 2013). Recentemente, foi reportado um caso de Síndrome Hemolítica Urêmica causada por uma STEC (Stx-EAEC O59:NM [H19]) que albergava fatores de virulência de EAEC, dentre eles o gene *pet* (CARBONARI et al., 2019). Para se disseminar pelo organismo, as bactérias podem apresentar estratégias de sobrevivência à ação do sistema complemento por meio de mecanismos de resistência ao soro humano. Portanto, adquirir fatores de virulência capazes de protegê-las contra a resposta imunológica pode ser importantes para que a bactéria possa alcançar diversos órgãos, aumentando assim sua capacidade de disseminação e colonização do hospedeiro. Sendo assim, *Pet* pode ser um importante fator de virulência na patogênese de *E. coli*, uma vez que participa da evasão do sistema complemento e aumenta a capacidade de sobrevivência destas bactérias ao soro humano.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos, podemos concluir que:

- Pet degradou os componentes C3, C3b, C4, C4b e C5 do sistema complemento, podendo interromper as três vias de ativação da cascata.
- A *Escherichia coli* HB101 sobreviveu ao soro humano pré-tratado com a Pet.
- A toxina Pet pode ser, portanto, um importante fator de virulência relacionado à resistência ao soro.
- Pet é um dos fatores de virulência que pode contribuir para que as *Escherichia coli* causem infecções extraintestinais e sepse.

## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

- ABE, C. M. *et al.* Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*. **FEMS Immunol Med Microbiol**, 52, n. 3, p. 397-406, Apr 2008.
- ABREU, A. G. *et al.* The serine protease Pic as a virulence factor of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Gut Microbes**, 7, n. 2, p. 115-125, 2016.
- ABREU, A. G. *et al.* The Serine Protease Pic From Enteroaggregative *Escherichia coli* Mediates Immune Evasion by the Direct Cleavage of Complement Proteins. **The Journal of Infectious Diseases**, 212, n. 1, p. 106-115, 2015.
- BERENDS, E. T. *et al.* Bacteria under stress by complement and coagulation. **FEMS Microbiol Rev**, 38, n. 6, p. 1146-1171, Nov 2014.
- BETANCOURT-SANCHEZ, M.; NAVARRO-GARCIA, F. Pet secretion, internalization and induction of cell death during infection of epithelial cells by enteroaggregative *Escherichia coli*. **Microbiology**, 155, n. 9, p. 2895-2906, 2009.
- CANIZALEZ-ROMAN, A.; NAVARRO-GARCIA, F. Fodrin CaM-binding domain cleavage by Pet from enteroaggregative *Escherichia coli* leads to actin cytoskeletal disruption. **Mol Microbiol**, 48, n. 4, p. 947-958, May 2003.
- CARBONARI, C. C. *et al.* An Stx-EAEC O59:NM[H19] strain isolated from a hemolytic uremic syndrome case in Argentina. **Rev Argent Microbiol**, Jun 29 2019.
- CASTIBLANCO-VALENCIA, M. M. *et al.* Leptospiral immunoglobulin-like proteins interact with human complement regulators factor H, FHL-1, FHR-1, and C4BP. **J Infect Dis**, 205, n. 6, p. 995-1004, Mar 15 2012.
- CZECZULIN, J. R. *et al.* Phylogenetic Analysis of Enteroaggregative and Diffusely Adherent *Escherichia coli*. **Infection and immunity**, 67, p. 2692-2699, 1999.
- DALE, A. P.; WOODFORD, N. Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): Disease, carriage and clones. **J Infect**, 71, n. 6, p. 615-626, Dec 2015.
- DAUTIN, N. Serine protease autotransporters of enterobacteriaceae (SPATEs): biogenesis and function. **Toxins (Basel)**, 2, n. 6, p. 1179-1206, Jun 2010.
- DOBO, J.; KOCSIS, A.; GAL, P. Be on Target: Strategies of Targeting Alternative and Lectin Pathway Components in Complement-Mediated Diseases. **Front Immunol**, 9, p. 1851, 2018.

---

<sup>1</sup> De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: Informação e documentação - referências - elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2002.

DUTTA, P. R. *et al.* Functional comparison of serine protease autotransporters of enterobacteriaceae. **Infect Immun**, 70, n. 12, p. 7105-7113, Dec 2002.

EDMAN, P.; BEGG, G. A protein sequenator. **Eur J Biochem**, 1, n. 1, p. 80-91, Mar 1967.

ELIAS, W. P., JR. *et al.* Organization of biogenesis genes for aggregative adherence fimbria II defines a virulence gene cluster in enteroaggregative *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, 181, n. 6, p. 1779-1785, Mar 1999.

ESLAVA, C. *et al.* Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect Immun**, 66, n. 7, p. 3155-3163, Jul 1998.

GUERRIERI, C. G. *et al.* Typical and Atypical Enteroaggregative *Escherichia coli* Are Both Virulent in the *Galleria mellonella* Model. **Front Microbiol**, 10, p. 1791, 2019.

HARRINGTON, S. M.; DUDLEY, E. G.; NATARO, J. P. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **FEMS Microbiology Letters**, 254, n. 1, p. 12-18, 2006.

HENDERSON, I.; NATARO, J. Autotransporter Proteins. **EcoSal Plus**, 2005.

HERZOG, K. *et al.* Diarrheagenic enteroaggregative *Escherichia coli* causing urinary tract infection and bacteremia leading to sepsis. **Infection**, 42, n. 2, p. 441-444, Apr 2014.

JENKINS, C. Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Curr Top Microbiol Immunol**, 416, p. 27-50, 2018.

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

LACHMANN, P. J.; HALBWACHS, L. The influence of C3b inactivator (KAF) concentration on the ability of serum to support complement activation. **Clin Exp Immunol**, 21, n. 1, p. 109-114, Jul 1975.

LEE, M. S.; TESH, V. L. Roles of Shiga Toxins in Immunopathology. **Toxins (Basel)**, 11, n. 4, Apr 9 2019.

LEO, J. C.; GRIN, I.; LINKE, D. Type V secretion: mechanism(s) of autotransport through the bacterial outer membrane. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, 367, n. 1592, p. 1088-1101, Apr 19 2012.

MERLE, N. S. *et al.* Complement System Part I - Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. **Front Immunol**, 6, p. 262, 2015.

NATARO, J. P. *et al.* Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated in volunteers. **J Infect Dis**, 171, n. 2, p. 465-468, Feb 1995.

NATARO, J. P. *et al.* Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **Pediatr Infect Dis J**, 6, n. 9, p. 829-831, Sep 1987.

NAVA-ACOSTA, R.; NAVARRO-GARCIA, F. Cytokeratin 8 is an epithelial cell receptor for Pet, a cytotoxic serine protease autotransporter of Enterobacteriaceae. **MBio**, 4, n. 6, p. e00838-00813, Dec 10 2013.

NAVARRO-GARCIA, F. *et al.* Pet, a non-AB toxin, is transported and translocated into epithelial cells by a retrograde trafficking pathway. **Infect Immun**, 75, n. 5, p. 2101-2109, May 2007.

NAVARRO-GARCIA, F. *et al.* Intoxication of epithelial cells by plasmid-encoded toxin requires clathrin-mediated endocytosis. **Microbiology**, 153, n. Pt 9, p. 2828-2838, Sep 2007.

NAVARRO-GARCIA, F.; ELIAS, W. P. Autotransporters and virulence of enteroaggregative *E. coli*. **Gut Microbes**, 2, n. 1, p. 13-24, Jan-Feb 2011.

NAVARRO-GARCIA, F. *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Pathogenic Escherichia coli in Latin America**, p. 48-64, 2010.

NAZEMI, A. *et al.* Distribution of Pathogenic Genes *aatA*, *aap*, *aggR*, among Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) and Their Linkage with *StbA* Gene. **Indian J Microbiol**, 51, n. 3, p. 355-358, Jul 2011.

NUNES, K. O. *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* with uropathogenic characteristics are present in feces of diarrheic and healthy children. **Pathog Dis**, 75, n. 8, Nov 30 2017.

ORTH, D. *et al.* EspP, a serine protease of enterohemorrhagic *Escherichia coli*, impairs complement activation by cleaving complement factors C3/C3b and C5. **Infect Immun**, 78, n. 10, p. 4294-4301, Oct 2010.

PARK, H. K. *et al.* Comparison of *Escherichia coli* uropathogenic genes (*kps*, *usp* and *ireA*) and enteroaggregative genes (*aggR* and *aap*) via multiplex polymerase chain reaction from suprapubic urine specimens of young children with fever. **Scand J Urol Nephrol**, 43, n. 1, p. 51-57, 2009.

RICKLIN, D. *et al.* Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. **Nat Immunol**, 11, n. 9, p. 785-797, Sep 2010.

RUIZ-PEREZ, F.; NATARO, J. P. Bacterial serine proteases secreted by the autotransporter pathway: classification, specificity, and role in virulence. **Cell Mol Life Sci**, 71, n. 5, p. 745-770, Mar 2014.

RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **J Infect Dis**, 181, n. 5, p. 1753-1754, May 2000.



SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. xxxviii + 1546 pp. p. 0879693096.

SARMA, J. V.; WARD, P. A. The complement system. **Cell Tissue Res**, 343, n. 1, p. 227-235, Jan 2011.

TURINI, P. *et al.* THE ACTION OF PHENYLMETHYLSULFONYL FLUORIDE ON HUMAN ACETYLCHOLINESTERASE, CHYMOTRYPSIN AND TRYPSIN. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 167, n. 1, p. 98, 1969.

VILLASECA, J. M. *et al.* Pet toxin from enteroaggregative *Escherichia coli* produces cellular damage associated with fodrin disruption. **Infect Immun**, 68, n. 10, p. 5920-5927, Oct 2000.