



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARCELLY CHUE GONÇALVES

**NOVO MÉTODO PARA DETECÇÃO DE INVASÃO
DE *Escherichia coli* A CÉLULAS HeLa**

Londrina
2018

MARCELLY CHUE GONÇALVES

**NOVO MÉTODO PARA DETECÇÃO DE INVASÃO
DE *Escherichia coli* A CÉLULAS HeLa**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do Título de Mestre em Microbiologia.

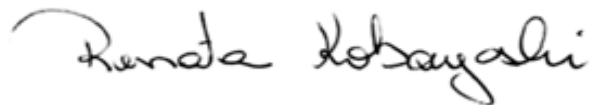
Londrina
2018

MARCELLY CHUE GONÇALVES

**NOVO MÉTODO PARA DETECÇÃO DE INVASÃO
DE *Escherichia coli* A CÉLULAS HeLa**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do Título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA



Orientadora Prof^a Dr^a Renata Katsuko
Takayama Kobayashi
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a Dr^a Lígia Carla Faccin Galhardi
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a Dr^a Jacinta Sanchez Pelayo
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 27 de fevereiro de 2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Chue Gonçalves, Marcellly .
NOVO MÉTODO PARA DETECÇÃO DE INVASÃO DE Escherichia coli A CÉLULAS HeLa / Marcellly Chue Gonçalves. - Londrina, 2018.
37 f. : il.

Orientador: Renata Katsuko Takayama Kobayashi.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2018. Inclui bibliografia.

1. Invasão Bacteriana - Tese. 2. Escherichia coli - Tese. 3. Infecção do Trato Urinário Tese. 4. Mecanismo de Patogenicidade - Tese. I. Katsuko Takayama Kobayashi, Renata . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram para a realização deste trabalho e para a minha formação, tanto pessoal quanto acadêmica. Em especial, agradeço aqueles que estavam mais envolvidos no desenvolvimento deste trabalho:

À Profa. Dra. Renata K. T. Kobayashi pela orientação, dedicação e amizade. Obrigada por sempre me incentivar, me aconselhar e me dar esperanças, por confiar em mim, por me fazer crescer tanto nesses anos do seu lado, e por ser uma orientadora e uma pessoa tão querida, amo você Renatinha!

Ao Prof. Dr. Gerson Nakazato, por ajudar a realizar os experimentos, me aconselhar, me ajudar a pensar nos próximos passos e também confiar no meu trabalho. Por ser tão espontâneo e alegrar o ambiente com suas piadas!

À Profa. Dra. Jacinta S. Pelayo que me ajudou a melhorar o método e prontamente disponibilizava materiais quando eu precisava.

As amigas Érica, Carol Galdino, Paula, Isadora e Larissa, por todo o suporte, principalmente quando eu me desestabilizava. Obrigada por me manter firme e forte, e obrigada pela amizade que vou levar para vida toda. E aos colegas do Laboratório NIP3, o melhor da Via Láctea, obrigada pelo companheirismo, amizade e principalmente pela paciência de me aguentar todo dia.

À minha avó Nena, que lá de Curitiba sempre me dá forças para continuar seguindo em busca do que eu quero.

Ao meu pai e minha madrastra, Miguel e Marilsa, que são minha base emocional e espiritual, que além de me incentivarem também me colocam nos trilhos quando eu preciso.

À minha mãe, padrasto e irmãs, Michelle e Fabian, AP e Gigi, por serem os maiores incentivadores dos meus estudos, providenciando muito mais do que o necessário para eu alcançar meus objetivos.

À minha irmã e melhor amiga, Nátally. Obrigada por me fazer acreditar em mim, por passar horas ruins juntas, por crescer e caminhar junto comigo, eu te amo muito!

E por fim, aos meus avós Zoraide e Miguel, que fazem de tudo por mim. Espero um dia poder compensá-los de alguma forma, eu amo vocês.

Obrigada!

GONÇALVES, Marcellly Chue. **Novo método para detecção de invasão de *Escherichia coli* a células HeLa**. 2017. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2017.

RESUMO

Para estabelecer uma infecção bem-sucedida, os microrganismos desenvolveram estratégias para invadir as células do hospedeiro. Esse mecanismo de patogenicidade garante um nicho patogênico privilegiado para a multiplicação do patógeno, protegendo-o de antimicrobianos e das respostas defensivas do hospedeiro. Um dos mais importantes patógenos humano e o maior causador de infecções do trato urinário, *Escherichia coli*, ainda não possui seus mecanismos de invasão integralmente compreendidos. O estudo dessas estratégias é fundamental para o desenvolvimento de alternativas de prevenção e tratamento desse tipo de infecções, e para isso o primeiro passo na pesquisa é detectar se a bactéria é capaz de invadir a células hospedeira. As técnicas para a detecção de invasão bacteriana utilizadas hoje possuem desvantagens que atrasam o andamento das pesquisas, sendo laboriosas, demandando longa espera para obtenção de resultados e/ou de alto custo financeiro. Assim, esse trabalho teve como propósito apresentar uma nova forma de detecção de invasão bacteriana em células de linhagem, baseada em um método enzimático fluorogênico. O foco dessa técnica foi a detecção de invasão de *E. coli* a células HeLa, explorando a β -glucuronidase, enzima constitutiva específica dessa bactéria. Essa enzima faz a hidrólise do substrato chave desse trabalho, 4-metilumbeliferil- β -D-glucuronídeo (MUG), produzindo um composto fluorogênico, o 4-metilumbeliferona (4-MU). A curva de fluorescência criada através do método, analisada pelos teste estatísticos, demonstrou que a detecção de invasão pode ser feita após 5 horas de incubação com o MUG. Quando amostras de *E. coli* Uropatogênica e *E. coli* provinda de microbiota de pessoas saudáveis foram testadas, o método proposto nesse trabalho apresentou resultados mais coerentes do que os resultados obtidos por detecção de invasão por contagem de colônias, utilizado na pesquisa atualmente. A detecção pelo método enzimático fluorogênico, em comparação com outras técnicas de detecção de invasão bacteriana existentes, demonstrou ser uma alternativa mais acessível por ser menos laboriosa, com obtenção mais rápida de resultados, mais sensível.

GONÇALVES, Marcellly Chue. **New method for detection of *Escherichia coli* invasion to HeLa cells**. 2017. Dissertation (Master in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2017.

ABSTRACT

To establish a well-succeeded infection, microorganisms have developed strategies to invade host cells. This pathogenicity mechanism ensures a privileged pathogenic niche for multiplication of the microorganism, protecting it against the action of antimicrobials and host immune response. One of the most important human pathogens and the greatest cause of urinary tract infections, *Escherichia coli*, still do not have its invasion mechanisms fully understood. Thus, the study of these strategies is essential for developing prevention and treatment alternatives aiming this type of infection, and for that, the first step in research is to detect whether or not the bacterium is capable to invade the host cell. The techniques used today to detect bacterial invasion to cells have disadvantages, being laborious, demanding long waiting for results and/or high financial cost, which delay research progress. This work aims to present a new approach for detecting bacterial invasion to lineage cells, based on an enzymatic-fluorogenic method. The focus of this technique is the detection of *E. coli* invasion to HeLa cells, exploring β -glucuronidase, the specific constitutive enzyme of this bacterium. This enzyme hydrolyses the key substrate of this work, 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG), producing a fluorogenic compound, 4-methylumbelliferone (4-MU). The fluorescence curve created by this method, analyzed by Tukey statistical test, demonstrated that this detection can be efficiently realized after 5 hours incubation with MUG. When testing uropathogenic *E. coli* and *E. coli* isolated from human gastrointestinal microbiota, the proposed method presented results that were more logical than the results exhibited from detection by plate counting. Detection by this enzymatic-fluorogenic method compared to other existing bacterial invasion detection techniques is less burdensome, faster, highly sensitive and an affordable alternative, due to not require high financial investment.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	6
1.1	Invasão de microrganismos a células hospedeiras	6
1.2	Invasão de <i>Escherichia coli</i> a células eucarióticas	7
1.3	Técnicas para detecção da invasão bacteriana	13
2.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
3.	OBJETIVOS	22
4.	ARTIGO CIENTÍFICO	23
	Abstract	24
4.1	INTRODUCTION	25
4.2	MATERIALS AND METHODS	26
4.2.1	Bacterial lineages	26
4.2.2	Cell culture and 96 well plate preparation	26
4.2.3	Bacterial invasion test with detection by counting of colony-forming units	26
4.2.4	Bacterial invasion test with detection by enzymatic-fluorogenic approach	27
4.2.5	Statistical analysis	28
4.2	RESULTS AND DISCUSSION	28
4.3.1	Fluorescence curve and determination of the best incubation period of bacterial controls with MUG	28
4.3.2	Invasion tests of nonpathogenic <i>E. coli</i> and UPEC, with detection by colony-forming units counting and by the enzymatic-fluorogenic method	30
4.3.3	Intensity range of bacterial invasion	32
4.4	CONCLUSION	33
4.5	ACKNOWLEDGMENTS	33
4.6	REFERENCES	33
5.	ANEXO	36

1. INTRODUÇÃO

1.1 Invasão de microrganismos a células hospedeiras

Em muitos sistemas biológicos, um organismo invade outro, geralmente a nível celular. As consequências são diversas, como por exemplo, um vírus infectando uma bactéria levando-a a lise celular ou uma bactéria infectando o hospedeiro, fazendo com que esse adoença. O resultado nem sempre é prejudicial. Relações mutualísticas também podem ser estabelecidas gerando ótimos resultados para todo o ecossistema: relação simbiótica entre plantas e microrganismos fixadores de nitrogênio só acontece graças a bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* (coletivamente conhecidos como Rhizobium), vivendo dentro de células nodulares da raiz de leguminosas (GAGE, 2004). Descrita hoje como “*root microbiome*”, ou microbioma de raiz (LAREEN, BURTON & SCHÄFER, 2016), essa é uma relação endossimbionte, gerada por invasão bacteriana (JONES et al., 2007). Com várias pesquisas a seu favor (RIVIERA & LAKE 2004), a própria teoria endossimbionte mostra que invasão a nível microbiológico é tão importante que pode ser a chave na evolução das células eucarióticas (DYALL, BROWN & JOHNSON, 2004).

A habilidade de invadir células epiteliais e endoteliais é um mecanismo de patogenicidade de uma variedade de bactérias patogênicas. Bactérias invasoras são aquelas com a capacidade de induzir sua própria fagocitose em células não-fagocíticas, explorando a maquinaria da célula hospedeira, e são capazes também de sobreviver e se multiplicar nesse ambiente intracelular (COSSART & SANSONETTI, 2004). Esse processo requer duas etapas: adesão bacteriana à superfície da célula hospedeira seguida de internalização da bactéria na célula (TANG et al. 1993). Na perspectiva do patógeno, esse mecanismo de patogenicidade é muito importante: embora o habitat intracelular seja muitas vezes escasso em recursos e nutrientes, é um local privilegiado onde o patógeno pode se proliferar, protegendo-se contra as defesas do hospedeiro. Além disso, a invasão celular facilita disseminação do patógeno através das barreiras teciduais (LEWIS, RICHARDS & MULVEY, 2016).

As estratégias moleculares envolvidas na entrada à célula hospedeira variam amplamente entre os patógenos. O mecanismo inicial de entrada de *Yersinia*,

Listeria, *Neisseria* e *Streptococcus* ocorre via endocitose "zipper-like" mediada por receptor (MEYER, 1998; DOMBEK et al., 1999). A interação entre as proteínas bacterianas e os receptores celulares, ativa uma cascata de sinais, como fosforilação de proteínas, recrutamento de moléculas e o estímulo de componentes do citoesqueleto que culminam na fagocitose e internalização bacteriana (Figura 1a). Patógenos como *Shigella* e *Salmonella* interagem diretamente com a maquinaria celular que regula a dinâmica do citoesqueleto de actina, injetando moléculas através de um sistema de secreção (T3SS, sistema de secreção do tipo três) (Figura 1b). Essas moléculas causam mudanças drásticas no citoesqueleto que ativam a formação de um bolso macropinocítico, frouxamente ligado à bactéria (COSSART & SANSONETTI, 2004).

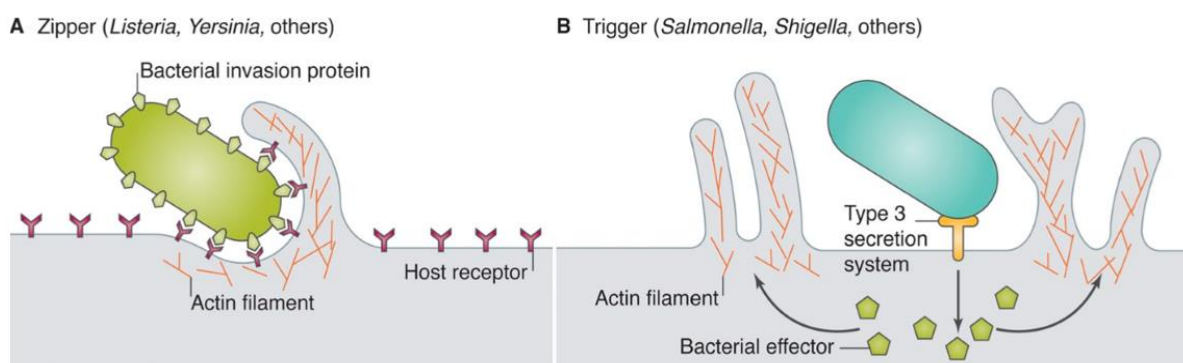


FIGURA 1: Mecanismos *Zipper* e *Trigger* de entrada do patógeno à célula. Bactéria "Zippering" (A) expressa proteínas de invasão na sua superfície, as quais se ligam no receptor do hospedeiro que forma extensões envolvendo a bactéria, e inicia fagocitose dependente de actina. Bactéria "Triggering" (B) funciona como um gatilho: injeta proteínas efetoras através da membrana celular do hospedeiro, via T3SS, levando a uma macropinocitose dependente de actina. Fonte: adaptado de Haglund e Welch (2011).

1.2 Invasão de *Escherichia coli* a células eucarióticas

A bactéria *Escherichia coli* é um dos microrganismos comensais que fazem parte da microbiota do trato gastrointestinal e um dos mais importantes patógenos humanos, sendo o causador mais frequente de infecções do trato urinário e infecções sanguíneas entre as bactérias Gram negativas (VILA et al.,

2016). Existem várias categorias de *E. coli* que adquiriram a habilidade de causar processos patogênicos no hospedeiro (LEIMBACH, HACKER & DOBRINDT, 2013), sendo classificadas em dois grandes grupos: *E. coli* diarreiogênica (DEC) (NATARO & KAPER, 1998), causadora de doenças gastrointestinais (enterite, diarreia ou disenteria) e *E. coli* patogênica extraintestinal (EXPEC) (RUSSO & JOHNSON, 2000). Para causar infecção, *E. coli* patogênica deve interagir com a mucosa da célula hospedeira através de adesão e/ou invasão, e como essas interações são as etapas iniciais de uma infecção, é necessário entender a nível molecular os mecanismos mediadores dessas etapas (KALITA, HU & TORRES, 2014).

Escherichia coli Enteroinvasiva (EIEC), um patótipo classificado dentro de DEC, é uma bactéria bioquimicamente, geneticamente e patogenicamente relacionada a *Shigella* spp. A fase inicial da patogênese de EIEC e *Shigella* compreende penetração da célula epitelial seguida de lise do vacúolo endocítico, multiplicação intracelular, movimento direcional através do citoplasma e extensão em direção a células adjacentes. Além da invasão e disseminação, *Shigella* (e presumidamente EIEC) também induz apoptose de macrófagos infectados (KAPER, NATARO & MOBLEY, 2004). Os genes necessários para essa invasão estão presentes em um grande plasmídeo de virulência encontrado em EIEC e em todas as espécies de *Shigella*. O plasmídeo pWR100 possui 213 kb e os genes relacionados com a entrada do patógeno à célula hospedeira estão agrupados em uma região de 31 kb, designada como “região de entrada” (tabela 1).

Tabela 1: Genes do plasmídeo pWR100, encontrado em EIEC e *Shigella*, e a função das proteínas codificadas. Fonte: adaptado de Buchrieser et al., 2000.

Genes	Proteínas codificadas/Função
<i>mxi</i> e <i>spa</i>	Componentes do Sistema de Secreção do Tipo Três (T3SS), secreta IpaA, B, C e D na célula hospedeira
<i>ipaA</i>	Ligação à vinculina do hospedeiro e indução da despolimerização de actina
<i>ipaB</i>	Liga-se a receptores CD44 do hospedeiro ativando a entrada e o rearranjo do citoesqueleto; ligação a caspase 1 de macrófagos resultando em apoptose em liberação de IL-1.
<i>ipaC</i>	Chaperona citoplasmática necessária para estabilidade de IpaB e IpaC; induz polimerização de actina e formação de extensões de membrana ativando GTPases, Cdc42 e Rac.
<i>ipgD</i>	Inositol-4-fosfatase. Reorganiza morfologia da célula hospedeira, desconectando a membrana citoplasmática do citoesqueleto na célula hospedeira
<i>ipgE</i>	Chaperona citoplasmática necessária para estabilidade de IpgD
<i>virB</i>	Proteína necessária para transcrição dos genes <i>mxi</i> , <i>spa</i> e <i>ipa</i>
<i>virF</i>	Gene localizado fora da região de entrada, controle da expressão de <i>icsA</i> e <i>virB</i>
<i>icsA</i>	Gene localizado fora da região de entrada, proteína IcsA (VirG), responsável pela habilidade da bactéria em se mover dentro do citoplasma da célula hospedeira

Ainda englobando a espécie *Escherichia coli*, *E. coli* aderente e invasiva (AIEC), *E. coli* associada com meningite/sepsis (MNEC) e *E. coli* uropatogênica (UPEC) são também estudadas pela capacidade de invasão em células do hospedeiro. Vinculada com doença inflamatória intestinal (ou doença de Crohn), AIEC tem habilidade de aderir e invadir células epiteliais do intestino e

sobreviver dentro de macrófagos (DARFEUILLE-MICHAUD, 2002). Sua aderência depende do pili tipo 1 e da presença de um antígeno carcinoembriogênico CEACAM6 como receptor na célula hospedeira. AIEC também interage com placas de Peyer e células M do intestino do hospedeiro (KALITA, HU & TORRES, 2014). MNEC, associada meningite neonatal, é disseminada via hematogênica, e atinge o sistema nervoso central sem danificação aparente da barreira hematoencefálica (BHE), em um processo de transcitose. A entrada à célula hospedeira acontece por mecanismo *zipper* e não afeta a resistência elétrica transepitelial das células do hospedeiro, implicando que a membrana celular não é rompida durante a entrada da bactéria. Essa invasão requer proteína de membrana externa OmpA, para ligação com a o epítipo GlcNAc β 1-4GlcNAc de receptores glicoproteicos em células endoteliais do cérebro. Outras proteínas, como IbeA, IbeB, IbeC, Fator Necrotizante Citotóxico tipo 1 (CNF1) e cápsula K1 também são necessárias para penetração efetiva em células microvasculares cerebrais do hospedeiro (KAPER, NATARO & MOBLEY, 2004; CROXEN & FINLAY, 2010).

Considerada por muito tempo como um patógeno extracelular e sendo o principal agente etiológico de infecções urinárias, hoje é provado que UPEC tem capacidade de invadir células do trato urinário em ambos experimentos *in vitro* e *in vivo* (BOWER; ETO; MULVEY, 2005). A invasão de células do hospedeiro por UPEC contribui significativamente para a patogênese da infecção do trato urinário (ITU), o que mostra a atuação da bactéria como um patógeno intracelular oportunista (DHAKAL; KULESUS; MULVEY, 2008). Após a aderência, UPEC pode invadir o tecido celular através de vários processos e vias diferentes, com o auxílio da expressão de genes de virulência (Figura 2). Os mecanismos específicos de algumas vias de invasão à célula hospedeira não são totalmente esclarecidos (BOWER; ETO; MULVEY, 2005; ETO et al., 2007). No entanto, existem fatores de virulência amplamente pesquisados por mediar a entrada da bactéria à célula do hospedeiro: Pili tipo 1 associado à adesina FimH (LEWIS, RICHARDS & MULVEY, 2016) e o fator necrotizante citotóxico tipo 1 (CNF1) (BOWER; ETO; MULVEY, 2005).

Pilus tipo 1 é um fator de virulência consideravelmente ubíquo, sendo expresso por grande maioria de isolados de UPEC, comensais e outras

espécies patogênicas (BUCHANAN et al., 1985). Ligada a esse pilus, a adesina FimH, maior facilitadora da entrada de UPEC em células do hospedeiro, se liga a receptores manosídicos UP1 (uropiaquinas 1^a) na célula hospedeira. Além de aderência, FimH parece também atuar como invasina, promovendo entrada bacteriana em células epiteliais da bexiga, mastócitos e macrófagos. A invasão mediada por FimH requer rearranjo do citoesqueleto que levam a membrana plasmática do hospedeiro a projetar-se em uma configuração *zipper-like*, eventualmente fagocitando a UPEC aderente (LEWIS, RICHARDS & MULVEY, 2016). Internalização por FimH em mastócitos e macrófagos acontece através de interações com CD48, proteína expressa por células de linhagem hematopoiética. Por outro lado, em células epiteliais de bexiga em humanos, outros receptores associado à FimH envolvidos com a invasão ainda são desconhecido, embora algumas evidências tenham proposto que UP1 é potencialmente o principal candidato (BAORTO et al., 1997; DHAKAL; KULESUS; MULVEY, 2008).

CNF1 é uma exotoxina expressada por aproximadamente um terço das cepas de UPEC, que estimula a formação de fibras de estresse de actina e projeções do citoesqueleto de actina através da ativação de GTPases da família Rho (regulador dinâmico de actina intracelular) (MILLS; MEYSICK; O'BRIEN, 2000). CNF1 pode indiretamente promover entrada de UPEC nas células da bexiga através da ativação e inativação de GTPases da família Rho (LERM et al., 2002). É proposto também que CNF1 e α -hemolisina trabalhem juntos, interrompendo junções celulares para disseminação no tecido, modulando sinais da célula hospedeira, induzindo resposta inflamatória e morte celular, promovendo acesso a células onde a bactéria pode estabelecer reservatórios intracelulares duradouros (SMITH et al., 2006; ULETT et al., 2013; VILAS et al. 2016). Como CNF1 é secretado e como essa toxina age na patogênese de ITU ainda não são inteiramente esclarecidos (BOWER; ETO; MULVEY, 2005).

Uma vez internalizada, a bactéria é inicialmente transportada para compartimentos envoltos por membranas similares a endossomos tardios. Dentro desse ambiente, o crescimento de UPEC é restrito e o patógeno entra em um estado quase quiescente. Ocasionalmente, UPEC pode sair desse estado, lisar o endossomo e se multiplicar no citosol das células superficiais (células *umbrella*),

formando um complexo similar a um biofilme conhecido como Comunidade Intracelular Bacteriana (IBC), estrutura que fornece um ambiente protetor contra o fluxo urinário e células de defesa do hospedeiro. No entanto, a integridade das células epiteliais é comprometida e IBC se desfaz, liberando bactéria que geralmente é potentemente móvel, e pode continuar infectando células vizinhas ou são então empurradas do seu nicho patogênico com o fluxo urinário (LEWIS, RICHARDS & MULVEY, 2016).

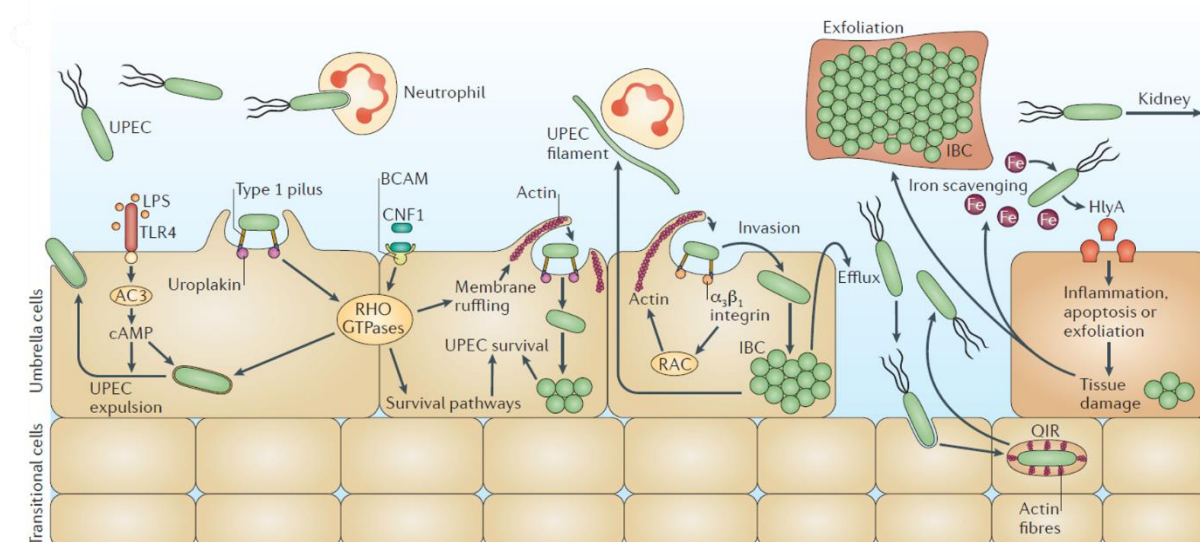


FIGURA 2: Mecanismos e fatores de virulência de *E. coli* Uropatogênica que contribuem na infecção do trato urinário. O principal fator de virulência e mais estudado é o pili tipo 1, essencial na colonização, invasão e persistência de UPEC na bexiga de modelo murino. A adesina FimH reconhece uroplaquinas manossiladas do hospedeiro ou integrinas alfa e beta. Essa ligação ativa uma família de Rho GTPases que causam um rearranjo de actina e internalização de UPEC. Uma vez internalizada, na cistite murina, comunidades bacterianas intracelulares (ou IBCs) podem ser formadas, tomando um aspecto cocóide e altamente organizado. Ocasionalmente, bactérias dessas comunidades recuperam a forma bacilar e motilidade, e se desanexam das IBCs, escapando para o lúmen da bexiga para se aderir a células mais jovens, se disseminando para outros órgãos ou sendo eliminadas no fluxo urinário. A exfoliação de células superficiais do epitélio da bexiga acontece nos estágios mais tardios da infecção aguda, um esforço para aliviar a carga bacteriana. Após exfoliação, UPEC estabelece um reservatório quiescente intracelular, possivelmente responsável pela recorrência de infecção urinária. CNF1 também é um potencial candidato responsável por iniciar o processo de invasão. A interação de LPS com receptores toll-like da célula leva a expulsão da bactéria e recrutamento de células do sistema imunológico, por isso, acredita-se que a mudança na morfologia de UPEC em filamentos é uma estratégia de evasão do sistema imune a partir dessa interação. Fonte: Flores-Meireles et al., 2015.

1.3 Técnicas para detecção da invasão bacteriana

Existem variadas formas de estudar a invasão de um microrganismo em um modelo experimental. O teste de invasão bacteriana reportado mais antigo é o Teste de Serény (Serény, 1955), que utiliza, originalmente, o porquinho-da-índia (*Cavia porcellus*) como modelo experimental. Esse também é o modelo mais antigo para teste de patogenicidade de *Shigella* (shigelose), inferindo o fenótipo invasivo da bactéria. No experimento, uma suspensão bacteriana é inoculada na córnea dos animais. *Shigella* patogênica é capaz de invadir o epitélio conjuntivo e causar ceratoconjuntivite e ceratite, enquanto bactérias não patogênicas são incapazes de produzir essa infecção, inferindo assim, um fenótipo não invasivo. Posteriormente, o teste foi realizado também em coelhos e ratos com a mesma eficácia. Apesar de ser o padrão ouro para investigar o perfil invasivo de espécies de *Shigella* (LIU, 2017), essa técnica apresenta a grande desvantagem do uso de animais, que além de cara, é trabalhosa e demanda tempo para o cuidado e tratamento dos animais.

Detectando a invasão bacteriana de forma indireta, a infecção celular por *Salmonella typhimurium* aumenta os níveis celulares de cálcio, sendo o cálcio então mensurado para inferir uma análise invasiva. A invasão bacteriana pode ser bloqueada quando esse cálcio intracelular é quelado (BALDWIN *et al.*, 1991). Outro exemplo é o citoesqueleto das células de linhagem, que também é um alvo de estudo para experimentos de invasão bacteriana, pois seus componentes podem ser corados para análise em microscopia e observação dos padrões celulares quando há uma internalização microbiana (LHOCINE *et al.* 2015). Experimentos como esses mensuram componentes da célula hospedeira para inferir a invasão bacteriana.

Outro exemplo, é mensurar a resistência elétrica transepitelial da monocamada celular polarizada, o que fornece uma inferência das junções entre as células (junções ou zonas de oclusão), ou seja, a integridade da monocamada celular pode ser determinada com um medidor de resistência após a adição de bactérias (TANG *et al.* 1993). No entanto, bactérias como MNEC atravessam células da BHE sem causar interferência na resistência elétrica transepitelial dessas células, tornando o experimento inviável nesse caso (KAPER, NATARO & MOBLEY, 2004). Inferências como essas são feitas, geralmente, junto com experimentos de penetração bacteriana através da monocamada celular, também chamados de

experimentos de transcitose. Na transcitose, as células são cultivadas em poços de duas vias, em que na interface delas há uma membrana porosa que permite a passagem de bactérias, mas não das células. Assim, a monocamada é formada nessa membrana, e quando se adicionam bactérias invasoras na via apical, elas atravessam a monocamada celular sendo possível plaqueá-las a partir do meio que se encontra na via basal (BURNS et al., 2001). É um método que tem como resultados o crescimento bacteriano em placas de cultivo, sendo menos indireto que os métodos citados acima pelo fato de observar-se resultados pela bactéria e não por componentes celulares.

As técnicas mais diretas envolvem as que usufruem da microscopia eletrônica, principalmente, de transmissão. Contudo, além de caras, essas técnicas são laboriosas, e muitas vezes não diferenciam bactéria internalizada de uma que se localiza em invaginações da membrana celular (TANG et al., 1993). As abordagens mais utilizadas atualmente são métodos que diferenciam a bactéria extracelular da intracelular, como o ensaio de proteção de gentamicina e a marcação/coloração diferencial de imunofluorescência de bactérias extracelulares e intracelulares.

Em 1981, Hale e Formal fizeram um estudo da síntese proteica de bactérias do gênero *Shigella* e *Salmonella* quando infectavam HeLa. Para o processo de invasão, as células eram cultivadas em placas de plástico de 35mm e as bactérias adicionadas sobre a monocamada, e então as placas eram centrifugadas para facilitar a incorporação das bactérias invasivas pelas células e incubadas por 30 minutos (37°C/5% CO₂). Em seguida, as placas eram lavadas com solução salina para remoção das bactérias extracelulares, para então seguir com os processos de fixação, coloração e análise microscópica das células infectadas. Além da microscopia, os pesquisadores também realizaram plaqueamento quantitativo, e ao invés de fixação e coloração, essas placas foram incubadas por mais 30 minutos (37°C) com canamicina, para posterior lise celular e plaqueamento das bactérias invasoras. Como resultados, consideraram como não invasivas quando os resultados mostravam menos de 0,01 UFC/célula hospedeira (unidades formadoras de colônias por célula hospedeira) e invasivas quando havia pelo menos 10 UFC/célula hospedeira.

A partir desse estudo, Sansonetti et al. (1986) pesquisou a multiplicação de *Shigella flexneri* dentro de células HeLa. Para isso, usou o protocolo de Hale e Formal (1981) e adaptou o plaqueamento quantitativo usando gentamicina para matar as bactérias extracelulares no experimento e prevenir a reinfecção das células, dando origem ao teste chamado de ensaio de proteção de gentamicina (*gentamicin protection assay*) que é extensivamente usado para estudos de invasão e adaptado para as bactéria e célula nas quais se quer trabalhar. Hoje, existem diferentes versões desse teste que, predominantemente, utilizam placas de 24 poços, nas quais cultivam-se as células no fundo dos poços ou em lamínulas aplicadas nesses poços.

Ensaio de proteção de antibióticos permitem uma quantificação conveniente de bactéria intracelular. No entanto, essa abordagem é baseada na recuperação de bactérias viáveis após a internalização pelas células eucarióticas, assim, não distingue uma invasão bacteriana eficiente combinada com baixa sobrevivência intracelular de uma baixa invasividade acompanhada de efetiva sobrevivência intracelular (BOOTH et al. 2003). Por isso, muitos artigos escolhem essa abordagem seguida de microscopia para certificação dessas variáveis.

A microscopia de imunofluorescência é um método que confirma os resultados dos ensaios de invasão, sendo mais confiável a microscopia que diferencia os microrganismos extracelulares dos intracelulares. O teste se baseia na fraca capacidade de difusão de anticorpos pela membrana de células viáveis. No entanto, os mesmos anticorpos se tornam capazes de difusão através da membrana após a fixação das células em lâminas. Esse tratamento deve ser feito com fixadores fracos, como por exemplo, metanol puro. Para detecção de invasão bacteriana, imunoglobulinas antibacterianas ligadas a um marcador fluorescente (ex. fluoresceína) são adicionadas, ligando-se em todas as bactérias extracelulares. Em seguida, a monocamada celular é permeabilizada, para a ligação das bactérias invasoras com novas imunoglobulinas marcadas com outro tipo de marcador fluorescente (ex. rodamina), diferenciando as bactérias extracelulares das intracelulares (MERIEN, BARANTON e PEROLAT, 1997). No entanto, abordagem como essa depende de ciclos de coloração, necessita de quantias consideráveis de imunoglobulinas específicas aos microrganismos de estudo e também consome

tempo. Por isso, protocolos de coloração por fluorescência diferencial foram criados para substituir o uso de imunoglobulinas. Agerer, Waeckerle e Hauck (2004) propuseram uma abordagem de quantificação da invasão bacteriana por um protocolo de coloração de apenas um ciclo, independente de anticorpos, que utilizava complexo fluoresceína-biotina-avidina (*FITC-biotin-avidin*), através da exploração do processo de biotilação (biotina é responsável pela ligação da avidina às bactérias). Antes do teste de invasão, as bactérias são marcadas com FITC-biotina para então infectar as células eucarióticas. Após a invasão e fixação (sem permeabilização das células), uma única etapa de coloração, no caso, com estreptavidina (liga-se fortemente à biotina) ligado ao corante Alexa647 (apresenta fluorescência azul) é feita. Assim, todas as bactérias são positivas para FITC (fluorescência verde), mas como não houve permeabilização das células, apenas as extracelulares são positivas para Alexa647 (azul) (AGERER, WAECKLERLE & HAUCK, 2004).

Outro modelo experimental usado para testes de invasão é a membrana corioalantóide de ovos de aves (CAM). Parte da casca do ovo é gentilmente retirada, de forma asséptica, expondo a membrana corioalantóide, sem danificar a membrana e seu interior. Então, uma alíquota de cultura bacteriana em caldo é inoculada diretamente na membrana para o teste de invasão. Após o tempo de incubação para invasão, o fluido alantóico é extraído e semeado em meio de cultura solidificado, e o crescimento de colônias é o resultado positivo do teste (ADAM et al., 2002).

Alguns estudos bacteriológicos aqui demonstrados, demandam tempo, são laboriosos ou exigem alto custo financeiro. Outros, dependem, em alguma etapa, da quantificação de microrganismos viáveis ou contagem de colônias. Esses métodos limitam o número de amostras e as condições em que elas podem ser testadas, pois além de tornar-se extremamente trabalhoso na investigação um grande número de bactérias, os resultados frequentemente apresentam diferenças entre as repetições, devido a amostragem ou erros de plaqueamento. Há uma carência na comunidade científica atual de testes rápidos, eficazes e que não exijam grande investimento financeiro.

Esse trabalho tem como propósito apresentar uma nova forma de detecção de invasão bacteriana em células de linhagem, baseada em um método

enzimático fluorogênico. Esse método é uma ótima alternativa aos métodos de detecção de invasão bacteriana existentes hoje, é mais acessível pelo fato de ser uma técnica simples, com obtenção de resultados em menos de 10 horas, e principalmente por ser mais sensível. O foco dessa técnica é a detecção de invasão de *E. coli* a células HeLa, explorando a β -glucuronidase, enzima constitutiva específica dessa bactéria, amplamente utilizada para a identificação desse microrganismo (MANAFI, KNEIFEL E BASCOMB, 1991). Aproximadamente 97% das bactérias *E. coli* testadas são positivas para essa enzima, enquanto a mesma enzima não é tão prevalente em outros microrganismos da família *Enterobacteriaceae* (FENG & HARTMAN, 1982). Essa enzima faz a hidrólise do substrato chave desse trabalho, 4-metilumbeliferil- β -D-glucuronídeo (MUG), produzindo um composto fluorogênico, 4-metilumbeliferona (4-MU), que emite fluorescência quando irradiado com comprimento de onda de luz ultravioleta (MANAFI, KNEIFEL & BASCOMB, 1991).

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM, R.; MUSSA, S.; LINDERMANN, D.; OELSCHLAEGER, T., A.; DEADMAN, M.; FERGUSON, D., J., P.; MOXON, R.; SCHROTEN, H. The avian chorioallantoic membrane in ovo – a useful model for bacterial invasion assays. **Indian Journal of Medical Microbiology**. 292: 267-275. 2002.
- AGERER, F.; WAECKERLE, S.; HAUCK, C. R. Microscopic quantification of bacterial invasion by a novel antibody-independent staining method. **Journal of Microbiological Methods**. 59: 23-32. DOI: 10.1016/j.mimet.2004.05.008. 2004.
- BALDWIN, T.J., WARD, W., AITKEN, A., KNUTTON, S. AND WILLIAMS, P.H. Elevation of intracellular free calcium levels in HEp-2 cells infected with enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**. 59(5): 1599-1604. 1991.
- BAORTO, D. M.; GAO, Z.; MALAVIYA, R.; DUSTIN, M. L.; VAN DER MERWE, A.; LUBLIN, D. M.; ABRAHAM, S. N. Survival of FimH-expressing enterobacteria in macrophages relies on glycolipid traffic. **Nature**. 389 (6651): 636–639. 1997
- BOOTH, J. W.; TELIO, D.; LIAO, E. H.; MCCAWE, S. E.; MATSUO, T.; GRINSTEIN, S.; GRAY-OWEN, S. D. Phosphatidylinositol 3-kinases in carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule-mediated internalization of *Neisseria gonorrhoeae*. **The Journal of Biological Chemistry**. 278, 14037-14045. 2003.
- BOWER, J. M.; ETO, D. S.; MULVEY, M. A. Covert operations of uropathogenic *Escherichia coli* within the Urinary Tract. **Traffic**. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2004.00251.x. 2005.
- BUCHANAN, K.; FALKOW, S.; HULL, R. A.; HULL, S. I. Frequency among *Esnterobacteriaceae* of the DNA sequences encoding typr 1 pili. **Journal of Bacteriology**. 162(2): 799-803. 1985.
- BUCHRIESER, C.; GLASER, P.; RUSNIOK, C.; NEDJARI, H.; D'HAUTEVILLE, H.; KUNST, F.; SANSONETTI, P.; PARSOT, C. The virulence plasmid pWR100 and the repertoire of proteins secreted by the type III secretion apparatus of *Shigella flexneri*. **Molecular Microbiology**. 38(4): 760-771. 2000.
- BURNS, J. L.; GRIFFITH, A.; BARRY, J. J.; JONAS, M.; CHI, E. Y. Transcytosis of gastrointestinal epithelial cells by *Escherichia coli* K1. **Pedriatric Research**. 49(1): 30-37. DOI: 10.1203/00006450-200101000-00010. 2001.
- COSSART, P.; SANSONETTI, P. J. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. **Science**. 304, 242-248. DOI: 10.1126/science.1090124. 2004.
- CROXEN, M. A; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**. 8(1): 26–38. DOI: 10.1038/nrmicro2265. 2010.

DARFEUILLE-MICHAUD, A. Adherent-invasive *Escherichia coli*: a putative new *E. coli* pathotype associated with Crohn's disease. **International Journal of Medical Microbiology**. 292, 185–193. 2002.

DHAKAL, B. K.; KULESUS, R. R.; MULVEY, M. A. Mechanisms and consequences of bladder cell invasion by uropathogenic *Escherichia coli*. **European Journal of Clinical Investigation**. 38(2): 2–11. DOI: 10.1111/j.1365-2362.2008.01986.x. 2008.

DOMBEK, P. E.; CUE, D.; SEDGEWICK, J.; LAM, H.; RUSCHKOWSKI, S.; FINLAY, B., B.; CLEARY, P. P. High-frequency intracellular invasion of epithelial cells by serotype M1 group A streptococci: M1 protein-mediated invasion and cytoskeletal rearrangements. **Molecular Microbiology**. 31(3): 859-870. 1999.

DYALL, S. D.; BROWN, M. T.; JOHNSON, P. J. Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. **Science American Association for the Advancement of Science**. 304: 253-257. 2004.

FENG, P. C. S.; HARTMAN, P. A. Fluorogenic assays for immediate confirmation of *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**. 43(6): 1320-1329. 1982.

FLORES-MEIRELES, A. L.; WALKER, J. N.; CAPARON, M.; HULTGREN, S. J. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatments options. **Nature Reviews Microbiology**. 13(5):269-84. DOI:10.1038/nrmicro3432. 2015.

GAGE, D. Infection of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 68.2:280-300. DOI: 10.1128/MMBR.68.2.280–300. 2004.

HAGLUND, C. M.; WELCH, M. D. Pathogens and polymers: microbe-host interactions illuminate the cytoskeleton. **The Journal of Cell Biology**. 195(1): 7-17. DOI: 10.1083/jcb.201103148. 2011.

HALE, T. L.; FORMAL, S. B. Protein synthesis in HeLa or Henle 407 cells infected with *Shigella dysenteriae* 1, *Shigella flexneri* 2a, or *Salmonella thyphimurium* W118. **Infection and Immunity**. 32(1): 137 -144. 1981.

JONES, K. M.; KOBAYASHI, H.; DAVIES, B. W.; TAGA, M. E.; WALKER, G. C. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. **Nature Reviews Microbiology**. 5(8): 619–633. doi:10.1038/nrmicro1705. 2007.

KALITA, A.; HU, J.; TORRES, A. G. Recent advances in adherence and invasion of pathogenic *Escherichia coli*. **Current Opinions in Infectious Diseases**. 27(5): 459-464. DOI: 0.1097/QCO.0000000000000092. 2014.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**. 2(2): 123–140. DOI: 10.1038/nrmicro818. 2004.

LAREEN, A.; BURTON, F.; SCHÄFER, P. Plant root-microbe communication in shaping root microbiomes. **Plant Molecular Biology**. 90:575–587. DOI 10.1007/s11103-015-0417-8. 2016.

LEIMBACH A, HACKER J, DOBRINDT U. *E. coli* as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity. **Current Topics of Microbiology and Immunology**. 358:3–32. [PubMed: 23340801]. 2013.

LERM, M.; POP, M.; FRITZ, G.; AKTORIES, K.; SCHMIDT, G. Proteasomal Degradation of Cytotoxic Necrotizing Factor 1-Activated Rac. **Infection and Immunity**. 70(8): 4053–4058. 2002.

LEWIS, A. J.; RICHARDS, A. C.; MULVEY, M. A. Invasion of host cells and tissues by uropathogenic bacteria. **Microbiology Spectrum**. 4(6):UTI-0026. doi:10.1128/microbiolspec.UTI-0026-2016. 2016.

LHOCINE, N.; ARENA, E. T.; BOMME, P.; UBELMANN, F.; PRÉVOST, M.; ROBINE, S.; SANSONETTI, P. J. Apical invasion of intestinal epithelial cells by *Salmonella typhimurium* requires vilin to remodel the brush border actin cytoskeleton. **Cell Host & Microbe**. 17:164-177. 2015.

LIU, D. Laboratory models for foodborne infections. Primeira edição. **CRC press**. 27.2.1, 401-412. 2017.

MANAFI, M.; KNEIFEL, W.; BASCOMB, S. Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostics. **Microbiological Reviews**. 55(3): 335-348. 1991.

MERIEN, F.; BARANTON, G.; PEROLAT, P. Invasion of Vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic *Leptospira interrogans* are correlated with virulence. **Infection and Immunity**. 65(2): 729-738. 1997.

MEYER, T. F. Pathogenic *Neisseriae* - interplay between pro and eukaryotic worlds. **Folia Microbiology**. 43:311–319. 1998.

MILLS, M.; MEYSICK, K. C.; O'BRIEN, A. D. Cytotoxic necrotizing factor type 1 of uropathogenic *Escherichia coli* kills cultured human uroepithelial 5637 cells by an apoptotic mechanism. **Infection and Immunity**. 68(10): 5869–80. 2000.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**. 11(1):142–201. 1998.

RIVIERA, M. C.; LAKE, J. A. The ring of life provides evidence for a genome fusion origin of eukaryotes. **Nature**. 431, 152-155. DOI: 10.1038/nature02848. 2004.

RUSSO, T. A; JOHNSON, J. R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **The Journal of Infectious Diseases**. 181(5):1753–1754. 2000.

SANSONETTI, P. J.; RYTER, A.; CLERC, P.; MAURELLI, A. T.; MOUNIER, J. Multiplication of *Shigella flexneri* within HeLa cells: Lysis of the phagocytic vacuole

and plasmid-mediated contact hemolysis. **Infection and Immunity**. 51(2): 461–469. 1986.

SÉRENY, B. Experimental *Shigella* keratoconjunctivitis, a preliminary report. **Acta Microbiological Hungarian Academy of Sciences**. 2: 293-296. 1955.

SMITH, Y. C.; GRANDE, K. K.; RASMUSSEN, S. B.; O'BRIEN, A. D. Novel three-dimensional organoid model for evaluation of the interaction of uropathogenic *Escherichia coli* with terminally differentiated human urothelial cells. **Infection and Immunity**. 74(1): 750–7. DOI: 10.1128/IAI.74.1.750-757. 2006.

TANG, P.; FOUBISTER, V.; PUCCIARELLI, M. G.; FINLAY, B. B. Methods to study bacterial invasion. **Journal of Microbiological Methods**. 18: 227-240. 1993.

ULETT, G. C.; TOTSIKA, M.; SCHAAL, K.; CAREY, A. J.; SWEET, M. J.; SCHEMBRI, M. A. Uropathogenic *Escherichia coli* virulence and innate immune responses during urinary tract infection. **Current Opinion in Microbiology**. 16(1): 100–107. 2013.

VILA, J.; SÁEZ-LÓPEZ, E.; JOHNSON, J. R.; RÖMLING, U.; DOBRINT, U.; CANTÓN, R.; GISKE, C. G.; NAAS, T.; CARATTOLI, A.; MARTÍNEZ-MEDINA, M.; BOSCH, J.; RETAMAR, R.; RODRÍGUEZ-BAÑO, J.; BAQUERO, F.; SOTO, S. M. *Escherichia coli*: na old friend with new tidings. **FEMS Microbiology Reviews**. 40:437-463. DOI: 10.1093/femsre/fuw005. 2016.

3. OBJETIVOS

Aprimoramento do método de detecção de invasão de *Escherichia coli* a células de linhagem, especificamente em células HeLa, utilizando um método de detecção enzimático/fluorogênico através da enzima β -Glucuronidase de *E. coli* e o substrato 4-metilumbeliferil- β -D-glucuronídeo (MUG)

4. ARTIGO CIENTÍFICO

New approach for detection of *Escherichia coli* invasion to HeLa cells

Chue-Gonçalves, Marcelly^{1*}; Custódio, Carla Caloni ²; Nakazato, Gerson¹; Kobayashi, Renata Katsuko Takayama ¹.

¹ Laboratory of basic and applied bacteriology (LBBA - NIP3)

² Laboratory of alternative methods to animal testing (LAMEA – NIP9)

^{1 2} Department of Microbiology, Center of Biological Sciences, Universidade Estadual de Londrina. Rodovia Celso Garcia Cid, Campus Universitário, Londrina, Paraná, Brazil, 86057-970.

All authors contributed equally to this work.

Keywords: Bacterial invasion, *Escherichia coli*, UPEC, HeLa.

*Corresponding author. Email address: marcelly.chue@gmail.com (Marcelly Chue Gonçalves)

ABSTRACT

To establish a well-succeeded infection, microorganisms have developed strategies to invade host cells. One of the most important human pathogens and the greatest cause of urinary tract infections, *Escherichia coli*, still do not have its invasion mechanisms fully understood. This work aims to present a new approach for detecting bacterial invasion to lineage cells, based on an enzymatic-fluorogenic method. The focus of this technique is the detection of *E. coli* invasion to HeLa cells, exploring β -glucuronidase, a specific constitutive enzyme of this bacterium. This enzyme hydrolyses the key substrate of this work, 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG), resulting in a fluorogenic molecule, 4-methylumbelliferone. The fluorescence curve created by this method, analyzed by Tukey statistical test, demonstrated that this detection can be efficiently realized after 5 hours incubation with MUG. When testing uropathogenic *E. coli* and *E. coli* isolated from human gastrointestinal microbiota, the proposed method presented results that were more logical than results exhibited by plate counting invasion detection. Data examination by Duncan statistical test allowed the creation of an intensity range of bacterial invasion, which is part of the process of results interpretation. Detection by this enzymatic-fluorogenic method, compared to other existing bacterial invasion detection techniques, is less burdensome, faster with high sensitivity.

4.1 INTRODUCTION

The ability of invading epithelial and endothelial cells is a pathogenic mechanism of several bacteria. Although the intracellular environment is generally limited in resources and nutrients, host cell invasion represents an important step for microbial pathogenicity, ensuring a privileged habitat for multiplication and protection against host defenses, facilitating microbial dissemination into adjacent tissues (Lewis et al., 2016). The invasion mechanisms of some bacteria, as *Yersinia*, *Listeria*, *Salmonella* and *Shigella* are well described (Cossart and Sansonetti, 2004), however, for *Escherichia coli*, one of the most important human pathogens and the major cause of urinary tract infections (UTI) (Vila et al., 2016), these mechanisms are not integrally understood.

Considered for a long time as an extracellular pathogen, now it is proven by *in vitro* and *in vivo* experiments that uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) is capable of invading urinary tract cells (Bower et al., 2005). After adherence, UPEC can invade epithelial cells through many processes and different paths, controlled by a variety of virulence genes. Once internalized, UPEC is capable to multiply and form intracellular communities or enter in a quiescent state, which can lead to recurrent or chronic infections, significantly contributing for its pathogenesis in UTI (Lewis et al., 2016, Dhakal et al., 2008). Thus, the investigation of this host-parasite interaction results in a better bacterial pathogenicity comprehension, crucial for research of prevention and treatment alternatives for UTI. With this in mind, the first step is to detect whether or not the bacterium is capable of invading the host cell.

The techniques for bacterial invasion detection usually involve methods that distinguish extracellular from intracellular bacteria. Electronic microscopy, for example, is one of the most used techniques for this type of detection, however, it is a laborious and time consuming method. Other approaches generally depend at some point, of quantification of viable microorganisms, what limits the number of samples and conditions in which they can be tested. Consequently, these techniques become extremely laborious when investigating a great number of samples, and results frequently show great differences between repetitions due to variables added by the dilution and plating steps, required for quantification. Therefore, there is a lack of capable tests to provide trustworthy results in such a short period of time, without

requiring burdensome work. In this manner, our work presents a new way approach to detect *E. coli* invasion to HeLa cells, based on enzymatic-fluorogenic activity.

4.2 MATERIALS AND METHODS

4.2.1 Bacterial lineages

Samples of *E. coli*, isolated from stool of healthy patients (gut microbiota), and UPEC used in this work were previously characterized (Koga et al., 2014, Cyoia et al., 2015). We also tested enteroinvasive *E. coli* (EIEC), EIEC O124 and two others diarrheagenic *E. coli*, EIEC 1 and EIEC 2, identified as EIEC by agglutination with anti EIEC A (*E. coli* O28Ac, O29, O136, O144 and O152) and B (*E. coli* O112Ac, O124, O143, O164, O167) polyvalent sera (according to manufacturer's recommendations – Probac do Brasil), and both of them agglutinated with anti EIEC B serum. These bacterial strains were stocked in Brain-Heart infusion broth (Neogen®) supplemented with 25% of glycerol (Sigma-Aldrich®) at -20 °C e -80 °C. For bacterial invasion tests, samples were inoculated in Luria Bertani broth (KASVI®) for approximately 18 hours, at 37 °C under constant agitation. All bacteria utilized in this work are susceptible to gentamicin. *Escherichia coli* K12 HB101 (Boyer and Roulland-Dussoix, 1969) and EIEC O152 (Beutin et al., 1997) were used as negative and positive controls for invasion, respectively.

4.2.2 Cell culture and 96 well plate preparation

HeLa cells were cultivated in 96 well plates with Dulbecco modified eagle medium (DMEM Gibco®, 10⁴ cells/well), supplemented with 10% fetal bovine serum (SFB- Gibco®) and 1% of antimicrobial solution (penicillin 100 IU/mL, streptomycin 100 µg/mL and amphotericin B 2,5 µg/mL - Gibco®). Cells were maintained at 37 °C under atmosphere with 5% CO₂, until cell monolayer total confluence was reached for bacterial invasion tests.

4.2.3 Bacterial invasion test with detection by counting of colony-forming units

The gentamicin protection assay, based on Sansonetti and collaborators (1986) was performed with controls and samples. Bacterial cultures were washed, by centrifugation at 5000g for 5 minutes to withdraw any potential toxins produced over incubation that could disturb the cell monolayer (Edwards and Massey, 2011). The 96

well plate with HeLa cells was washed with phosphate saline buffer 0,01 M (PBS) and 95 μL of DMEM were added in each well. 5 μL from bacterial cultures (approximately 10^8 CFU/mL) were seeded in each well, reaching a multiplicity of infection of 50 bacteria per cell. Bacterial cultures were seeded in triplicates in each experiment. Next, the plate was incubated for 3 hours at 37 °C under atmosphere with 5% CO_2 . After incubation, 100 μL of DMEM supplemented with gentamicin were added, with gentamicin final concentration of 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ per well. The plate was incubated for 1 hour at 37 °C for antibiotic action. After incubation, the plate content was removed and wells were washed with PBS, and 50 μL of Triton™ X 100 1% were added. After five minutes, 10 μL from each well were plated to MacConkey agar, in triplicates, for invasion detection by counting of colony-forming units after incubation overnight.

4.2.4 Bacterial invasion test with detection by enzymatic-fluorogenic approach

The invasion detection by enzymatic-fluorogenic method is based on the action of an *E. coli* constitutive enzyme, the β -D-glucuronidase, widely used for *E. coli* identification (Manafi et al., 1991). Approximately 97% of *E. coli* are positive for this enzyme, while the same enzyme is not as prevalent in others microorganisms from *Enterobacteriaceae* family (Feng and Hartman, 1992). A substrate commonly utilized in enzymatic tests for *E. coli* detection is the 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG, $\geq 98\%$ purity, SIGMA®), which when hydrolyzed by β -D-glucuronidase releases 4-methylumbelliferone (4-MU), a fluorogenic molecule that emits fluorescence when irradiated with ultraviolet light wavelength (Manafi et al., 1991). Gentamicin protection assay was carried out as described above, but after Triton addition, 100 μL of nutrient broth supplemented 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of MUG were added to each well. The minimal concentration of MUG for an efficient distinction of fluorescence after its cleavage is 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in culture medium (Manafi et al., 1991). The plate was then incubated at 37°C and the fluorescence readings were realized at each one hour interval for a period of 8 hours, with both excitation and emission wavelengths of 365 nm, and fluorescence expressed in relative fluorescence units (RFU) (Perry et al., 2006). For fluorescence reading it is necessary to alkalinize the content in each well (minimum of pH=10), as 4-MU fluorescence is pH dependent (Manafi et al., 1991). Therefore, 50 μL of NaOH 1N were added to each well, followed by the transference of 100 μL from each well to a black 96 well plate. The

fluorescence reading was executed with the *Synergy HT* - BioTek® spectrophotometer, with the Gen5™ software. Thus, a fluorescence curve of the bacterial controls invasion was constructed. The curve enabled the determination of the best period of incubation of bacterial controls with MUG, for an efficient detection of bacterial invasion. With this result, *E. coli* isolated from gut microbiota and UPEC samples were tested for invasion, and these results compared with those given by the invasion detection by counting of colony-forming units. For comparison purposes, both invasion tests, with detection by CFU counting and detection by fluorescence, were always performed at the same day, using the same conditions for lineage cells and bacteria.

4.2.5 Statistical analysis

The determination of the best period of incubation of bacterial controls with MUG to detect invasion was calculated using Tukey test. The answer for bacterial invasion to HeLa cells was given by statistical comparisons between values of samples and controls, using Duncan statistical test in both types of detections. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$ (confidence level of 95%, $\alpha = 0.05$). Statistical analysis were performed with the R software, version 3.4.2. All data are expressed as mean values based on triplicate assays.

4.2 RESULTS AND DISCUSSION

4.3.1 Fluorescence curve and determination of the best incubation period of bacterial controls with MUG.

For bacterial invasion detection by the enzymatic-fluorogenic method, MUG was added at the final stage of the test, so the researcher can determine whether the sample is capable or not to invade HeLa cells by reading fluorescence. In this manner, it was necessary to establish the best period of incubation of the invading bacteria with MUG, in other words, establish the period of incubation in which fluorescence reading was coherent with results expected from bacterial controls. Thus, an invasion test was performed only with controls and the fluorescence was read in different timings, so a fluorescence curve could be created (Figure 1). This curve shows that the fluorescence, predominantly, increases along with the

incubation timing of bacteria with MUG, and presents a fluorescence boost between 7 and 8 hours of incubation. This boost arise because of the relativity of fluorescence, particularly when one sample presents an excessive fluorescence in comparison with others of the same experiment, what tends to decrease others intermediary fluorescence values making them equivalent to negative control fluorescence values. The curve pattern corroborates with results demonstrated by Perry et al. (2006). Statistics reveal that in 5 hours of incubation, fluorescence of the positive control EIEC O152 differs significantly from the negative control *E. coli* K12 HB101. Not at any moment, did the negative control differ from the control without bacteria (with only HeLa cells). The modest increase of fluorescence by the control without bacteria and the negative control is due the fact that lineage cells have the enzyme β -glucuronidase stoked in lysosomes (Nyhan et al., 2005), that is also capable to hydrolyze MUG (Sperker et al., 1997). The period of incubation of 5 hours, for being the first to demonstrate differences between controls, was considered the best incubation timing of tested bacteria with MUG for bacterial invasion detection. This incubation timing of 5 hours was then chosen to be used for invasion tests of *E. coli* isolated from microbiota and UPEC.

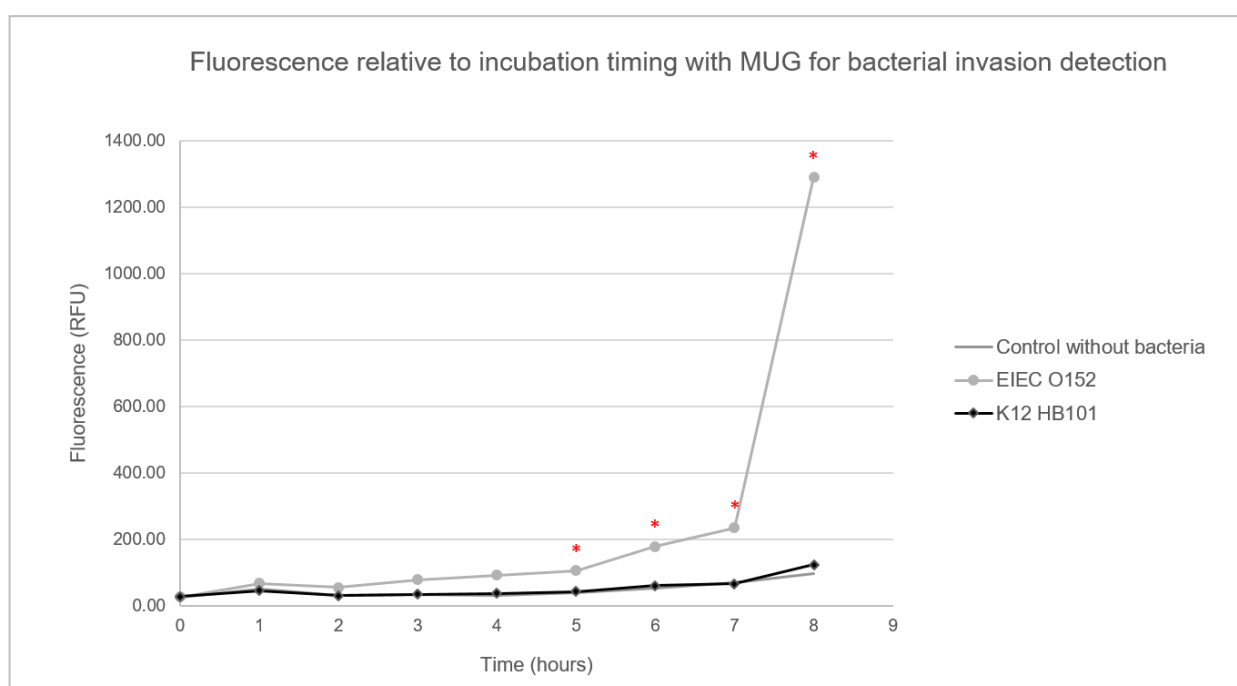


Figure 1: Graph showing the fluorescence curve related to the fluorescence reading after different incubation timings of bacterial controls with MUG substrate, for bacterial invasion detection. In general, RFU (relative fluorescence units) increases along with time (in hours). Controls are represented: control without bacteria, EIEC O152 as the positive control and K12 HB101 as the negative control. Asterisks indicate statistically significant differences between

positive control and negative control. There were no significant differences between control without bacteria and the negative control.

To test invasion of samples by CFU counting, a previous bacterial invasion experiment was accomplished with controls and different concentrations of gentamicin, to optimize the gentamicin concentration of the invasion test, in a way that the negative control growth in MacConkey was inhibited. This growth represents a portion of bacteria that survived the antibiotic treatment, probably by being protected by non-specific interactions with the cell monolayer, and in some way, hiding the bacteria from antibiotic action (Shaw and Falkow, 1988). Thus, the gentamicin concentration of 200 µg/mL was chosen, as it stopped *E. coli* K12 HB101 growth without interfering with the positive control growth, inferring that this antibiotic concentration was capable to reach all the negative control (Chue-Gonçalves et al., 2016). In contrast, results given by the enzymatic-fluorogenic method showed that *E. coli* K12 HB101 presented a slight increase of fluorescence, but not sufficient for statistical differences with the control without bacteria. Therefore, this result demonstrate that the enzymatic-fluorogenic method is more sensitive than the results obtained by CFU counting.

4.3.2 Invasion tests of *E. coli* isolated from gut microbiota and UPEC, with detection by colony-forming units counting and by the enzymatic-fluorogenic method

With the period of incubation for fluorescence reading determined, samples of *E. coli* isolated from gut microbiota and UPEC were submitted to invasion test with both detections, CFU counting and enzymatic-fluorogenic methods. The CFU counting is represented in invasion percentage, as described by Tang et al. (1993). For better comprehension and normalization of results, fluorescence results were transformed in an invasion index: after subtraction of all data by the fluorescence result of the control without bacteria, all resulting values were divided by the positive control EIEC O152 value. Negative values (lower than zero) were considered as zero.

Table 1: Controls and samples invasion detected by counting of colonies-forming units, based on Duncan statistical test, done with the invasion percentage. Positive and negative controls are expressed as “EIEC O152” e “K12 HB101”, respectively. UPEC samples are represented by UPEC V27, UPEC 16, UPEC 17 and UPEC 19, and nonpathogenic samples represented by M 12.1, M 6.4 and M14.3. Standard variation, statistical results and the

Controls and Samples	EIEC O152	UPEC 16	UPEC 20	UPEC V27	UPEC 17	UPEC 19	M 12.1	M 6.4	M 14.3	K12 HB101
Invasion percentage	3.77%	1.56%	1.41%	0.70%	0.28%	0.25%	0.22%	0.12%	0.06%	0.00%
Standard deviation	0.000	0.059	0.031	0.039	0.006	0.023	0.047	0.031	0.055	0.000
Duncan	a	b	b	c	d	d	de	def	ef	f
Invasion	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	No	No

answer of invasion are also represented.

Results by CFU counting show that all UPEC samples are capable of invading HeLa cells. In other words, results differ significantly between samples value and the negative control, including the sample M 12.1, which is an *E. coli* isolated from the stool of a healthy patient. M 6.4 and M 14.3 are statistically equivalent to the negative control, representing the non-invasive phenotype.

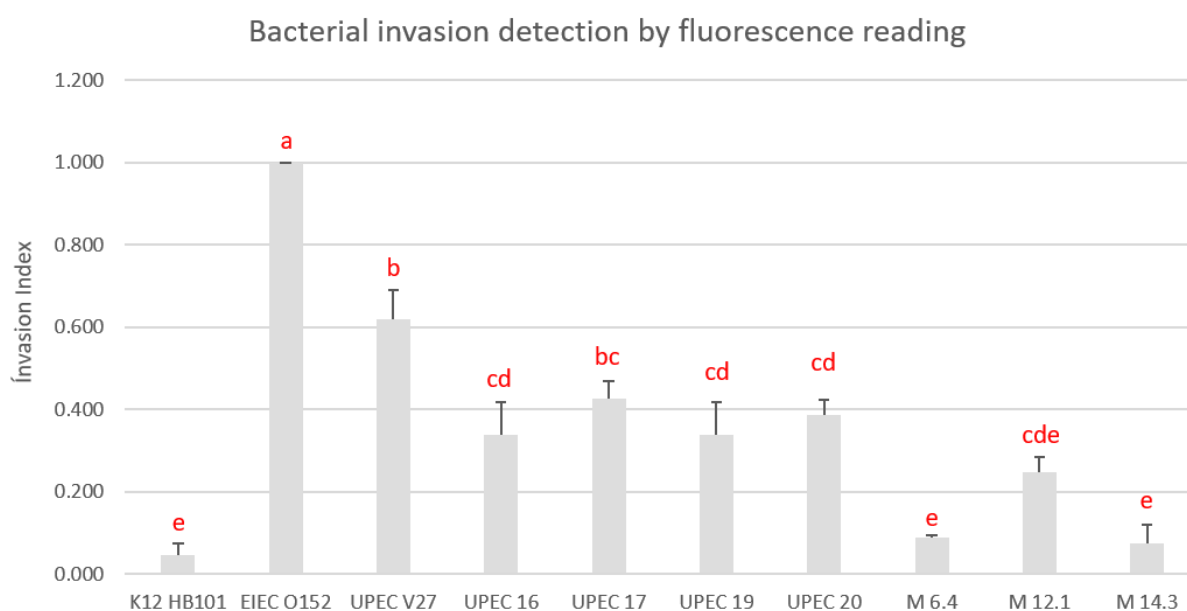


Figure 2: Bacterial invasion detection by fluorescence: controls and sample invasion according to the invasion index. Bars representing a sample or control show the invasion

index with their respective standard deviations and the Duncan statistics. Controls are represented by EIEC O152 (positive control) and K12 HB101 (negative control). Samples are represented as UPEC V27, UPEC 16, UPEC 17, UPEC 19, UPEC 20, M 6.4, M12.1 and M 14.3.

The enzymatic-fluorescence method (Figure 2) shows a different result: UPEC samples invade, meanwhile the microbiota isolates do not invade. These results, from a perspective of the place where samples were collected, are more coherent than the results from CFU counting, in which one microbiota sample (M 12.1) had a similar result as the clinical samples with invasive phenotype. A possible explanation is that the CFU counting method have more variables: the process of plating and pipetting, the bacterial growth on agar and the counting of colonies, variables that can decrease precision of results.

4.3.3 Intensity range of bacterial invasion

Techniques based on fluorescence detection are well known by the high sensibility and selectivity, along with advantages in spatial and temporal resolutions (Valeur, 2001), when one can work with several samples in one plate, with quick achievement and trustworthy results. Thus, the statistics make possible the creation of an “intensity range of bacterial invasion”, represented in the table 2.

Table 2: Intensity range of bacterial invasion from controls and samples, based on Duncan statistical test results.

Controls and samples	EIEC O152	UPEC V27	UPEC 17	UPEC 20	UPEC 16	UPEC 19	M 12.1	M 6.4	M 14.3	K12 HB101
Statistics (Duncan)	a	b	bc	cd	cd	cd	cde	e	e	e
Invasion intensity range	STRONGLY INVASIVE (≥ positive control)	INVASIVE (< Positive control and > negative control)					NON-INVASIVE (≤ negative control)			

The interpretation of this experiment will always depend of the statistical result. Tukey test also can be utilized when results show homogeneity (Shapiro’s test), normality (Bartlett’s teste) and significant result in analysis of variance (ANOVA). When results present no homogeneity and/or no normality, Duncan test must be applied. All tests have confidence level of 95%. In table 2, it is possible to observe a

range that classifies isolates as “strongly invasive”, “invasive” and “non-invasive”. Strongly invasive were those samples that results were statistically greater or equal to the positive control EIEC O152; non-invasive were those samples that did not differ statistically from the negative control *E. coli* K12 HB101. Any samples that statistically remained between positive and negative controls were categorized as invasive bacteria.

4.4 CONCLUSION

The enzymatic-fluorescence approach based on the hydrolysis of the MUG substrate by the β -Glucuronidase enzyme to *E. coli* invasion detection to HeLa cells is an accessible alternative less laborious compared to the bacterial invasion detection by CFU, is a method highly sensitive with fast achievement of trustworthy results.

4.5 ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and by the Coordination for the Improvement of higher education personnel (CAPES) of the Brazilian federal government.

4.6 REFERENCES

- BEUTIN, L.; GLEIER, K.; KONTNY, I.; ECHEVERRIA, P.; SCHEUTZ, F. Origin and characteristics of enteroinvasive strains of *Escherichia coli* (EIEC) isolated in Germany. **Epidemiology and Infection**. 118, 199-205. 1997.
- BOWER, J. M.; ETO, D. S.; MULVEY, M. A. Covert operations of uropathogenic *Escherichia coli* within the Urinary Tract. **Traffic**. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2004.00251.x. 2005.
- BOYER, H.W. & ROULLAND-DUSSOIX, D. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. **Journal of Molecular Biology**. 41: 459-472. 1969.
- CHUE-GONÇALVES, M.; NAKAZATO, G.; KOBAYASHI, R. K. T. Otimização da concentração de gentamicina no teste de invasão bacteriana em células vero com *Escherichia coli*. In: II Congresso Paranaense de Microbiologia - Simpósio Sul Americano de Microbiologia Ambiental. Anais ISSN: 2525-6831 v.1, #52557. Londrina. 2016.

COSSART, P.; SANSONETTI, P. J. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. **Science**. 304, 242-248. DOI: 10.1126/science.1090124. 2004.

CYOIA, P. S.; RODRIGUES, G. R.; NISHIO, E. K.; MEDEIROS, L.; PEREIRA, A. P. D.; VESPERO, E.C.; HOULE, S.; DOZOIS, C.; NAKAZATO, G.; KOBAYASHI, R.K.T. Presence of virulence genes and pathogenicity islands in Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* isolated in Brazil. **The Journal of Infection in Developing Countries**. 9(10):1068-75. DOI: 10.3855/jidc.6683. 2015.

DHAKAL, B. K.; KULESUS, R. R.; MULVEY, M. A. Mechanisms and consequences of bladder cell invasion by uropathogenic *Escherichia coli*. **European Journal of Clinical Investigation**. 38(2): 2–11. DOI: 10.1111/j.1365-2362.2008.01986.x. 2008.

EDWARDS, A. M; MASSEY, R. C. Invasion of human cells by a bacterial pathogen. **Journal of Visualized Experiments**. 49:e2693. doi:10.3791/2693. 2011.

FENG, P. C. S.; HARTMAN, P. A. Fluorogenic assays for immediate confirmation of *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**. 43(6): 1320-1329. 1982.

JOHNSON, J. R.; STELL, A L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. **The Journal of Infectious Diseases**. 181(1): 261–272. 2000.

KALITA, A.; HU, J.; TORRES, A. G. Recent advances in adherence and invasion of pathogenic *Escherichia coli*. **Current Opinions in Infectious Diseases**. 27(5): 459-464. DOI: 10.1097/QCO.0000000000000092. 2014.

KOGA, V. L.; TOMAZETTO, G.; CYOIA, P. S.; NEVES, M. S.; VIDOTTO, M. C.; NAKAZATO, G.; KOBAYASHI, R. K. T. Molecular screening of virulence genes in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from human blood culture in Brazil. **BioMed Research International**. V.2014, Article ID 465054, 9 pages. DOI: 10.1155/2014/465054. 2014.

LEWIS, A. J.; RICHARDS, A. C.; MULVEY, M. A. Invasion of host cells and tissues by uropathogenic bacteria. **Microbiology Spectrum**. 4(6): UTI-0026. doi:10.1128/microbiolspec.UTI-0026-2016. 2016.

MANAFI, M.; KNEIFEL, W.; BASCOMB, S. Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostics. **Microbiological Reviews**. 55(3): 335-348. 1991.

NYHAN, W. L.; BARSHOP B.A.; OZAND P.T. **Atlas of Metabolic Diseases**. 2 ed. London, UK: Hodder Arnold. pp. 501–503, 546–550. ISBN 0-340-80970-1. 2005

PERRY, J. D.; JAMES, A. L.; MORRIS, K. A.; OLIVER, M.; CHILVERS, K. F.; REED, R. H.; GOULS, F. K. Evaluation of novel fluorogenic substrates for the detection of glycosidases in *Escherichia coli* and enterococci. **Journal of Applied Microbiology**. 101: 977–985. DOI: 10.1111/j.1365- 2672.2006.03018.x. 2006.

SANSONETTI, P. J.; RYTER, A.; CLERC, P.; MAURELLI, A. T.; MOUNIER, J. Multiplication of *Shigella flexneri* within HeLa cells: Lysis of the phagocytic vacuole

and plasmid-mediated contact hemolysis. **Infection and Immunity**. 51(2): 461–469. 1986.

SHAW, J. H.; FALKOW, S. Model for invasion of human tissue culture cells by *Neisseria gonorrhoeae*. **Infection and Immunity**. 56(6):1625–1632. 1988.

SPERKER, B.; MÜRDTER, T. E.; SCHICK, M.; ECKHARDT, K.; BOSSLET, K.; KROEMER, H. K. Interindividual variability in expression and activity of human β -glucuronidase in liver and kidney: consequences for drug metabolism. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 281(2): 914-920. 1997.

VALEUR, B. Molecular fluorescence: principles and applications. Alemanha. Wiley-VCH. 1.5: p.15. ISBNs: 3-527-29919-X. 2001.

VILA, J.; SÁEZ-LÓPEZ, E.; JOHNSON, J. R.; RÖMLING, U.; DOBRINT, U.; CANTÓN, R.; GISKE, C. G.; NAAS, T.; CARATTOLI, A.; MARTÍNEZ-MEDINA, M.; BOSCH, J.; RETAMAR, R.; RODRÍGEZ-BAÑO, J.; BAQUERO, F.; SOTO, S. M. *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. **FEMS Microbiology Reviews**. 40:437-463. DOI: 10.1093/femsre/fuw005. 2016.

5. ANEXO

Tabela orçamentária para comparação dos preços entre as técnicas de detecção da invasão por contagem de colônias (plaqueamento) e por método enzimático fluorogênico proposto nesse trabalho. A diferença mostra a vantagem financeira do método proposto, com uma diferença de aproximadamente R\$27,00 do método de detecção da invasão bacteriana por plaqueamento.

Fonte: os valores apresentados são cotações da empresa Sigma-Aldrich® Merck online (<https://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>), com acesso em 20 de Novembro de 2017.

Orçamento	Contagem de Colônias	Enzimático Fluorogênico	Preço (Reais)	Valor		Quanto é usado por experimento
Placa 96	X	X	\$ 5.00	1 placa	5.00	1 placa
DMEM	X	X	\$ 4.80	500mL	120.00	20mL
Triton 1X	X	X	\$ 0.04	1L	361.00	100uL
PBS	X	X	\$ 3.40	300mL	10.00	100mL
MacConkey	X		\$ 37.20	500g	465.00	40g
Caldo Nutriente		X	\$ 0.10	500g	685.00	0.08g
MUG		X	\$ 3.64	25mg	91.00	0.002g
Placa fundo Preto		X	\$ 7.00	1 placa	7.00	1 placa
TOTAL	\$ 50.44	\$ 23.98	Diferença	\$ 26.46		