

DENISE YAMAMOTO

**Ocorrência e caracterização de eventos de invasão de
linhagens celulares cultivadas *in vitro* por amostras de
Escherichia coli enteropatogênica (EPEC) atípica**

**Tese apresentada à
Universidade Federal de São
Paulo – Escola Paulista de
Medicina para a obtenção de
título de Doutor em Ciências.**

**São Paulo
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DENISE YAMAMOTO

**Ocorrência e caracterização de eventos de invasão de
linhagens celulares cultivadas *in vitro* por amostras de
Escherichia coli enteropatogênica (EPEC) atípica**

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo – Escola Paulista de
Medicina para a obtenção de título de
Doutor em Ciências pelo Programa de Pós
Graduação em Microbiologia e Imunologia.

Orientadora:

Profa. Dra. Tânia A. T. Gomes do Amaral

Co-orientador:

Prof. Dr. Rodrigo Tavanelli Hernandes

São Paulo

2009

Yamamoto, Denise

Ocorrência e caracterização de eventos de invasão de linhagens celulares cultivadas in vitro por amostras de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) atípica. São Paulo, 2009. xv 94 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Imunologia.

Título em inglês: Occurrence and characterization of invasion events on cell lineages cultivated in vitro by atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC).

1. *Escherichia coli* 2. EPEC atípica 3. Intimina 4. Invasão 5. diarreia

Este trabalho foi desenvolvido na Disciplina de Microbiologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e no Institut für Infektiologie, Zentrum für Molekularbiologie der Entzündung, Westfälische Wilhelms-Universität Universität Münster (UniMüster), com o auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico Pesquisa (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e Programa Brasil Alemanha (CAPES - Probral 281/07) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) .

*Aos meus amados pais, Jandira e Pedro, e irmã Suzie,
exemplos constantes de força, honestidade, perseverança e determinação,
por me ensinarem a viver dignidade e respeito,
por todo apoio e paciência, carinho e amor incondicionais*

Dedico

Agradecimentos

Deus, pelas oportunidades pessoais e profissionais, pelas graças diárias e pelos desafios que trazem superação.

À Profa. Dra. Tânia A. T. Gomes do Amaral, pela confiança, apoio e pela oportunidade de trabalhar sob sua orientação, sempre com respeito e gentileza, características fundamentais para o meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. Rodrigo T. Hernandez, “Chefinho” e querido amigo, por todo apoio e disposição na orientação do trabalho, sem deixar de lado a alegria e o bom humor.

Ao Prof. Dr. José Daniel Lopes, pela orientação e apoio nas etapas iniciais deste trabalho.

Às Profas. Dras. Sylvia Mendes Carneiro e Cecília M. Abe, pelas contribuições na execução deste trabalho, todo apoio e gentileza.

À Dra. Ana Carolina Padovan, pelo auxílio na condução dos experimentos de seqüenciamento pela amizade.

Paloma Hernandez pelo auxílio na condução dos experimentos de seqüenciamento

Profa. Dra. Elaine Rodrigues e doutoranda Fabiana do Amaral Serrano, pelas sugestões na condução deste trabalho e auxílio técnico.

Às Profas. Dras. Rosa M. Silva e Profa. Dra. Beatriz Guth, pela constante disposição em ensinar, sempre com humor.

Aos Profs. do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia e Biologia Celular, por direta ou indiretamente participarem na execução deste trabalho e na minha formação científica.

Profs. Drs. Anita Strauss e Hélio Takahashi, Departamento de Bioquímica UNIFESP, por disponibilizar o laboratório e pelo apoio técnico nas etapas iniciais deste trabalho.

À equipe da secretaria, Magda Nisti, Paola Rossi, Frederico Baami, Mércia Maia e Regiane Tacconi pela colaboração durante todos esses anos.

À Cristina Santos, D. Darcy, Zoraide, Victória, Zé Carlos por toda cooperação técnica essenciais para a conclusão deste trabalho.

Dr. Michel Rabinovitch - Por todo apoio, constantes ensinamentos (científico e pessoal), amizade e incentivo.

As queridas amigas, Fábila Salvador, Mônica Vieira, Fabiana Moreira, Flávia Bastos e Michelle Rabello, pessoas tão diferentes e tão complementares, grandes exemplos de força, serenidade, coragem, gentileza, educação, humor e bondade.

Aos queridos, Bruna Gil, Suely Sampaio, Cecília Cergole, Evanilde Gonçalves (Nilde), Luís Fernando dos Santos, Franciele Tafarello, Kathelin Lascowski, Mirian Guirro, Lucília S. Nishimura, Martín Roffé, Ana Carolina Mello, Ana Carolina Zidko e Cristiana Viana, pelos momentos científicos, de descontração e incentivo dentro do "fantástico mundo da ciência".

Aos colegas do Departamento que direta ou indiretamente participaram da execução deste trabalho, da minha formação científica e de momentos de descontração.

Für liebe M. Alexander Schmidt, Waltraud Waltz-Schmidt, Lilo Greune, Inga Benz, Herbert Weiss, Shanti Liebrecht, Ariane Liebchen, Bojan Sutinowski, Nadia Kramko, Christian Rüter, Christoph Buss, Christoph Cichron, Gerd Geussip, pelo apoio científico, emocional e amizade vielen Danke für alle!

Às queridas amigas Vanessa Coimbra e Rita Ruiz, pelo convívio agradável nos anos anteriores, e pela torcida e incentivos constantes.

Ao querido Alberto Dudena, amigo há mais de "200 anos" e para a vida inteira, pelo apoio no período de expatriada e pela calorosa acolhida no retorno.

Aos queridos amigos Carlos Alves Pierre, Vinício Reis, Douglas Santana, Eduardo Reimberg, Aldirene Dantas, Semírames Tavares, Ronaldo Caetano, Steve Ramos Bautista, pela amizade e carinho todos estes anos.

À família Bergamine, D. Terezinha, Ana Paula, "tio" Paschoal, Isabela, pela calorosa recepção e convivência agradável.

Ao querido namorado Eliezer Bergamine Moura, pelo amor, apoio e incentivo constantes.

À minha família, pais e irmã, por todo apoio, amor e confiança. Muito obrigada por me ensinarem a sempre enfrentar desafios e por compartilharem mais este importante momento da minha vida.

Muito obrigada! Sem vocês seria impossível!

*... mas os que esperam no Senhor, renovarão as suas forças:
subirão com asas como águias, correrão e não se cansarão,
caminharão e não se fatigarão...*

(Is. 40:31)

Sumário

	Página
Lista de Figuras	
Lista de Tabela	
Lista de Abreviaturas e Siglas	
Resumo	
Abstract	
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	18
MATERIAIS E MÉTODOS	
1. Meios de cultura, reagentes e soluções.	19
2. Culturas bacterianas.	19
3. Cultivos celulares.	20
4. Teste de adesão bacteriana às culturas celulares.	22
5. Teste de identificação da polimerização da actina: Fluorescence Actin Staining - FAS	23
6. Teste de invasão bacteriana às culturas celulares.	23
7. Testes de inibição da invasão.	24
7.1. Inibição da invasão por Citocalasina D.	24
7.2. Inibição da invasão por Colchicina.	24
8. Interação da amostra 1551-2 com células T84.	25
8.1. Interação com monocamadas de células T84 não diferenciadas.	25
8.2. Interação como monocamadas de células T84 diferenciadas após o rompimento das <i>tight junctions</i> .	25
9. Análise estatística	25
10. Microscopia Eletrônica de Transmissão.	25
10.1. Células T84 cultivadas em filtro Transwell	25
10.2. Células T84 cultivadas em poços de 35 mm de diâmetro.	26
11. Métodos moleculares:	26
11.1. Caracterização das amostras por PCR Multiplex.	26
11.2. Sequenciamento do gene <i>tir</i>	30

11.3. Identificação dos subtipos de intimina	30
11.4. Eletroporação	31
11.5. Estratégias de mutagênese dos genes <i>tir</i> e <i>escN</i> da amostra 1551-2.	31
RESULTADOS	
Confirmação do patotipo aEPEC por PCR Multiplex (MPCR).	37
Sequenciamento do gene <i>tir</i> da amostra 1551-2.	39
Três novos subtipos de intimina identificados entre amostras de aEPEC selecionadas.	39
Amostras de aEPEC portadoras de diferentes subtipos de intimina são capazes de invadir células HeLa.	40
Processo de invasão de aEPEC 1551-2 em células HeLa é dependente de polimerização de actina.	42
Processo de invasão de aEPEC 1551-2 em células HeLa é independente da participação de microtúbulos.	45
aEPEC induzem a formação de lesão AE em células T84 diferenciadas.	48
aEPEC, portadoras de diferentes subtipos de intimina, são capazes de invadir células intestinais.	51
Interação da amostra de aEPEC 1551-2 com a superfície de células T84 não polarizadas e não diferenciadas aumenta a eficiência do processo de invasão.	54
Rompimento de <i>tight junctions</i> de monocamadas de células T84 aumenta a eficiência da invasão da amostra aEPEC 1551-2.	57
aEPEC 1551-2 é capaz de invadir células intestinais Caco-2	61
Obtenção de amostra 1551-2 mutante em <i>tir</i> com vetor suicida pJP5603	65
Obtenção de amostra 1551-2 mutante em <i>tir</i> por λ Red.	66
Obtenção de amostra 1551-2 mutante em <i>escN</i> com vetor suicida pJP5603	67
DISCUSSÃO	69
CONCLUSÕES	76
REFERÊNCIAS	77
ANEXOS	
I) Reagente e soluções	88
II) Tabela: Relação genética entre os novos subtipos de intima em amostras de aEPEC.	92
III) Aprovação do projeto no comitê de Ética	93
IV) Publicações	

Lista de Figuras

		Página
Figura 1	Lesão A/E mostrando apagamento de microvilosidade (mv) e formação de pedestal (estrela) no sitio de aderência de uma amostra de EPEC	4
Figura 2	Organização do <i>locus for enterocyte effacement</i> – LEE de EPEC/EHEC.	6
Figura 3	Representação esquemática do SST3 de EPEC/EHEC.	8
Figura 4	Estratégia de invasão de enteropatógenos.	15
Figura 5	Análise por MCPR de amostras de referência.	27
Figura 6	Delineamento experimental	36
Figura 7	Comparação da sequência de aminoácidos deduzida de Tir de amostras de tEPEC (O127:H6) , EHEC (O157:H7) e aEPEC (4051-6 e 1551-2).	39
Figura 8	Adesão das amostras selecionadas para estudo em células HeLa. As células foram incubadas por 6 h com as amostras bacterianas	41
Figura 9	Índices de invasão de células HeLa por amostras de aEPEC.	42
Figura10	Efeito do tratamento das células HeLa com diferentes concentrações de agente despolimerizante de filamentos de actina na adesão da aEPEC 1551-2.	43
Figura 11	Índice de invasão da amostra de aEPEC 1551-2 em células HeLa tratadas com diferentes agentes despolimerizantes de filamentos de actina.	44
Figura 12	Efeito do tratamento de agente despolimerizante de microtúbulos na adesão da aEPEC 1551-2.	46
Figura 13	Índice de invasão de aEPEC 1551-2 em células HeLa tratadas com diferentes agentes despolimerizantes de microtúbulos.	47
Figura 14	Interação de amostras aEPEC e tEPEC E2348/69 com células T84 diferenciadas.	49
Figura 15	Acúmulo de actina promovido por amostras de aEPEC em células T84 diferenciadas correspondentes à formação da lesão AE.	50
Figura 16	Índices de invasão de células T84 polarizadas e diferenciadas por amostras de aEPEC.	51
Figura 17	Interação de amostras aEPEC e tEPEC E2348/69 pela superfície apical de células T84 diferenciadas.	53
Figura 18	Interação da amostra de aEPEC 1551-2 em células T84 em diferentes estágios de diferenciação.	55
Figura 19	Índice de invasão da amostra de aEPEC 1551-2 em células T84 em diferentes estágios de diferenciação.	56

Figura 20	Interação da amostra de aEPEC 1551-2 em células T84 diferenciadas e tratadas por EGTA que promove o rompimento de <i>tight junctions</i> .	58
Figura 21	Índice de invasão da amostra de aEPEC 1551-2 em células T84 diferenciadas e tratadas por EGTA, o que promove o rompimento de <i>tight junctions</i> .	59
Figura 22	Interação de amostras aEPEC e tEPEC E2348/69 após infecção da superfície basolateral de células T84 diferenciadas.	60
Figura 23	Interação de células Caco-2 diferenciadas e aEPEC 1551-2 e tEPEC E2348/69.	61
Figura 24	Índices de invasão de células Caco-2 diferenciadas por aEPEC 1551-2.	62
Figura 25	Interação de amostras aEPEC com células dendríticas XS52.	63
Figura 26	Interação de amostras aEPEC e tEPEC E2348/69 com células HL60 diferenciadas em macrófagos.	64
Figura 27	PCR para confirmação da mutação em <i>escN</i> .	68
Figura 28	Interação da amostra 155-2:: <i>escN</i> com células HeLa.	68

Lista de Tabelas

		Página
Tabela 1	Amostras controles e hospedeiras utilizadas neste estudo.	19
Tabela 2	Condições de amplificação utilizadas na análise por PCR Multiplex.	27
Tabela 3	Pares de <i>primers</i> utilizados na análise por PCR Multiplex.	28
Tabela 4	Pares de <i>primers</i> e condições de amplificação de genes de virulência utilizados neste estudo.	34
Tabela 5	Plasmídeos utilizados neste estudo.	35
Tabela 6	Características das amostras utilizadas neste estudo.	38
Tabela 7	Efeito do tratamento das monocamadas de células HeLa por diferentes concentrações de citocalasina D na capacidade invasora de aEPEC 1551-2	44
Tabela 8	Efeito do tratamento das monocamadas de células HeLa por diferentes concentrações de Colchicina.	47
Tabela 9	Índices de invasão de células HeLa e células intestinais T84 e Caco-2 polarizadas e diferenciadas por amostras de aEPEC.	52
Tabela 10	Efeito do estágio de diferenciação de células T84 na ocorrência do processo de invasão	56
Tabela 11	Efeito do tratamento das monocamadas de células T84 diferenciadas por diferentes concentrações de EGTA.	59

Lista de Abreviaturas e Siglas

AA	Aderência agregativa
AD	Aderência difusa
A/E	<i>Attaching and effacing</i>
AL	Aderência localizada
BFP	<i>Bundle forming pilus</i>
DAEC	<i>Escherichia coli</i> difusamente aderente
DMEM	Meio mínimo essencial de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EAF	<i>EPEC adherence factor</i>
EAST	<i>Enterogregative Stable Toxin</i>
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasora
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
EGTA	Ethylene Glycol Tetraacetic Acid
LB	Luria Bertani
LEE	<i>Locus of enterocyte effacement</i>
LT	Toxina termo-lábil
MEM	Meio mínimo de Eagle
PBS	Solução tampão salina fosfato
PCR	Reação de polimerização em cadeia
SFB	Soro fetal bovino
ST	Toxina termo-estável
STEC	<i>Escherichia coli</i> produtora de toxina Shiga
Stx	Toxina de Shiga
UV	Ultra violeta

Escherichia coli Enteropatogênica (EPEC) produz lesão attaching/effacing (A/E) em células eucarióticas mediada pela adesina de membrana externa intimina. EPEC são sub-agrupadas em típica (tEPEC) e atípica (aEPEC). Recentemente demonstramos que a amostra de aEPEC 1551-2 (sorotipo O não-tipável, não-móvel) invade células HeLa por um processo dependente da expressão de intimina do subtipo omicron. Neste estudo, avaliamos se amostras de aEPEC expressando diferentes subtipos de intimina também são invasoras utilizando ensaios quantitativos de proteção com gentamicina. Também avaliamos se aEPECs invadem células intestinais diferenciadas T84 e Caco-2. Cinco das seis amostras testadas invadiram células HeLa e T84 numa faixa de 13.3%-20.9% e 5.8%-17.8%, respectivamente, do total de bactérias associadas às células. As amostras estudadas foram significativamente mais invasoras que a amostra protótipo de tEPEC E2348/69 (1.4% e 0.5% em células HeLa e T84, respectivamente). A amostra 1551-2 foi ainda testada em células Caco-2 diferenciadas, o que resultou num índice de invasão semelhante àqueles obtidos em células T84 (7,5%±1,7) e também significativamente maior que a tEPEC E2348/69 (1,8%±0,6). A invasão de células T84 foi confirmada por microscopia eletrônica de transmissão. Mostramos ainda que a invasão de células HeLa por aEPEC 1551-2 depende de filamentos de actina, mas não de microtúbulos. Além disso, a infecção de monocamadas não diferenciadas e o rompimento das *tight junctions* aumentaram a eficiência da invasão de células T84, sugerindo uma via de invasão preferencial pela superfície não diferenciada. Em resumo, amostras de aEPEC podem invadir cultura de células *in vitro* com eficiência variável e independentemente de subtipo de intimina.

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) produce attaching/effacing (A/E) lesions on eukaryotic cells mediated by the outer membrane adhesin Intimin. EPEC are sub-grouped into typical (tEPEC) and atypical (aEPEC). We have recently demonstrated that aEPEC strain 1551-2 (serotype O non-typable, non-motile) invades HeLa cells by a process dependent on the expression of intimin subtype omicron. In this study, we evaluated whether aEPEC strains expressing other intimin subtypes are also invasive using the quantitative gentamicin protection assay. We also evaluated whether aEPEC invade intestinal differentiated T84 cells. Five of six strains invaded HeLa and T84 cells in a range of 13.3%-20.9% and 5.8%-17.8%, respectively, of the total cell-associated bacteria. The strains studied were significantly more invasive than prototype tEPEC strain E2348/69 (1.4% and 0.5% in HeLa and T84 cells, respectively). aEPEC strain 1551-2 was also tested in differentiated Caco-2 cells, resulting in an invasion index similar to that obtained in T84 cells (7.5%±1.7%). This strain was also significantly more invasive than prototype tEPEC strain E2348/69 (1.8%±0.6%). Invasiveness of T84 cells was confirmed by transmission electron microscopy. We also showed that invasion of HeLa cells by aEPEC 1551-2 depended on actin filaments, but not on microtubules. In addition, infection of non-differentiated monolayers and disruption of tight junctions enhanced its invasion efficiency in T84 cells, suggesting preferential invasion via a non-differentiated surface. In summary, aEPEC strains may invade intestinal cells *in vitro* with varying efficiencies and independently of the intimin subtype.

Como um habitante comum do trato gastrointestinal da maioria dos animais, incluindo os seres humanos, *Escherichia coli* e seu hospedeiro usualmente beneficiam-se mutuamente. Raramente causam doenças, exceto em hospedeiros imunocomprometidos ou quando a barreira intestinal é comprometida, como na peritonite, por exemplo. Entretanto, algumas amostras de *E. coli* adquiriram características de virulência específicas e são responsáveis por um largo espectro de doenças intestinais e extra-intestinais incluindo diarreia, infecções do trato urinário, septicemia, e meningite neonatal (Ørskov e Ørskov, 1992; Nataro e Kaper, 1998; Kaper et al., 2004).

Entre as diarreias de etiologia bacteriana, destacam-se como agentes as *E. coli* diarreiogênicas (DEC). De acordo com o conjunto de marcadores de virulência e os sinais e sintomas que geram no hospedeiro, as DEC são classificadas em seis patotipos diferentes: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* produtora da toxina Shiga (STEC) ou *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* que adere difusamente (DAEC) e *E. coli* enteropatogênica (EPEC) (Nataro e Kaper, 1998; Kaper et al., 2004).

ETEC

É a principal causa de “diarreia dos viajantes” de países industrializados em viagem a países em desenvolvimento, bem como uma importante causa de diarreia infantil nos países emergentes. ETECs são importantes agentes de diarreia numa variedade de espécies animais e os mecanismos patogênicos envolvem toxinas termo-lábil (LT) e termo-estável (ST) e fatores de colonização que são únicos para as diferentes espécies animais (Kaper et al., 2004).

EIEC

São bioquímica e geneticamente relacionadas com *Shigella*, mais similares à *S. flexneri* ou à *S. sonnei*, uma vez que elas não produzem toxinas Shiga (Stx) como a *S. dysenteriae*. *E. coli* e *Shigella* são taxonomicamente indistinguíveis ao nível de espécie e EIEC/*Shigella* causam diarreia e disenteria por meio de um mecanismo de patogenicidade que se inicia com a invasão das células epiteliais e espalhamento para células vizinhas (Kaper et al., 2004).

EHEC/ STEC

As primeiras infecções por EHEC ocorreram em 1982 nos Estados Unidos. Ao contrário das demais DEC, as EHEC devem ser classificadas como agentes causadores de zoonoses uma vez que essa categoria pode infectar várias espécies, mas não é o principal patógeno; o maior significado da infecção animal por EHEC é que ela representa um reservatório para doença humana (Kaper et al., 2004).

Em pacientes e animais infectados, EHEC produzem uma lesão histopatológica denominada *attaching/effacing* (A/E) e Stx, uma potente citotoxina, que aumenta o espectro da doença, incluindo diarreia não sanguinolenta, diarreia sanguinolenta, síndrome hemolítica urêmica (SHU) (Kaper et al., 2004; Karch et al., 2005). EHECs formam um subgrupo da categoria STEC, que produz Stx e albergam os genes da lesão A/E (Kaper et al., 2004).

EAEC

As bactérias dessa categoria foram inicialmente descritas baseadas no seu padrão de aderência agregativo em células epiteliais em cultura (Nataro e Kaper, 1998), mas desde então têm sido descritas a produção de toxinas e a capacidade de formar biofilmes. EAEC são reconhecidas como uma causa de diarreia persistente em

crianças e adultos em países desenvolvidos ou em desenvolvimento e têm sido a causa de inúmeros grandes surtos em vários países (Kaper et al., 2004).

DAEC

Esta categoria é definida com base no padrão de aderência difusa em cultura de células epiteliais (Scaletsky et al., 1984). Amostras de DAEC podem ativar cascatas de sinalização em células epiteliais, impedindo a função e a biossíntese das enzimas associadas ao “brush border” e também pode ter ação pró-inflamatória (Kaper et al., 2004). Apesar de amostras de DAEC apresentarem potenciais genes de virulência, seu papel como agente de diarreia é discutível (Kaper et al., 2004).

EPEC

O termo “*E. coli* enteropatogênica - EPEC” foi criado por Neter et al. (1955) para designar determinados sorogrupos de *E. coli* associados a casos de diarreia na Inglaterra, distinguindo-os assim dos sorogrupos de *E. coli* encontrados em indivíduos normais ou pacientes com processo de infecção extra-intestinal. A classificação em sorogrupos baseia-se no tipo de antígeno O (antígeno somático), que corresponde à porção polissacarídica da molécula de lipopolissacarídeo presente na membrana externa. Com base nesse antígeno, as linhagens de *E. coli* tradicionalmente categorizadas como EPEC compreendem doze diferentes sorogrupos: O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 e O158 (W.H.O., 1987).

A infecção por EPEC ocorre principalmente em crianças menores de um ano (Gomes et al., 1989; Nataro e Kaper, 1998). O principal sintoma clínico das infecções por EPEC é a diarreia aguda, embora alguns casos de diarreia persistente também tenham sido relatados (Levine e Edelman, 1984; Fagundes-Neto et al., 1996).

A característica principal da patogenicidade das EPECs compreende a produção da lesão A/E (Fig.1), na qual se observa a destruição das microvilosidades e a aderência íntima da bactéria à membrana do enterócito, apoiada sobre uma estrutura semelhante a um pedestal, cuja base é rica em actina e outros elementos do citoesqueleto (Moon et al., 1983, Knutton et al., 1989). Presumivelmente, estas estruturas favorecem uma aderência potente de EPEC à superfície celular, prevenindo que EPEC seja deslocada e garantindo assim as alterações posteriores que levam à diarreia (Vallance e Finlay, 2000).

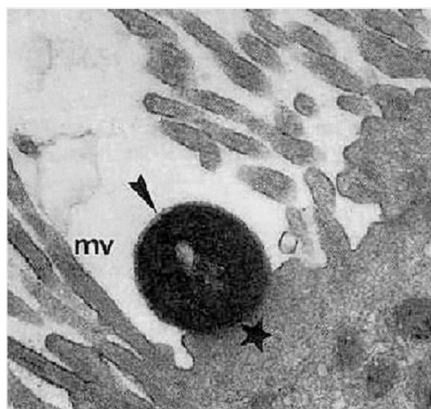


Fig. 1. Lesão A/E mostrando apagamento de microvilosidade (mv) e formação de pedestal (estrela) no sitio de aderência de uma amostra de EPEC (seta) (Pedroso et al., 1993)

O contato inicial da bactéria com células hospedeiras e entre as bactérias seria mediado por uma fímbria do tipo IV denominada *bundle-forming pilus*, BFP (Girón et al., 1991), codificada por um plasmídeo de 60 MDa denominado "EPEC adherence factor" (pEAF). BFP confere o padrão de adesão localizada (AL), caracterizado pela formação de microcolônias sobre a superfície de células HeLa e HEp-2, após 3 horas de contato (Scaletsky et al., 1984). Simultaneamente com BFP, a adesina recentemente descrita *E. coli* Common Pilus – ECP (Saldaña et al., 2009), também

promove a formação de AL *in vitro*. Por outro lado, estudos realizados em cultura *ex vivo* de intestino delgado humano concluíram que BFP não está envolvido nas etapas iniciais da aderência bacteriana e sim no estágio mais tardio de formação de microcolônias Hicks et al., 1998).

pEAF também codifica o ativador transcricional denominado *Plasmid encoded regulator* (Per), que ativa o operon *bfp* e muitos genes contidos na região LEE (*locus for enterocyte effacement*) *in trans*. Esta região, que na amostra protótipo de tEPEC E2348/69 compreende aproximadamente 35 kb (McDaniel et al., 1995) (Fig. 2), consiste em uma ilha de patogenicidade que contém vários genes cromossômicos responsáveis pelo estabelecimento da lesão A/E.

A região LEE está organizada em cinco regiões: LEE1, LEE2, LEE3, LEE5 e LEE4. Os genes distribuídos nas regiões LEE1, LEE2 e LEE3 codificam as proteínas que formam uma “agulha molecular” chamada Sistema de Secreção Tipo Três (SST3, Fig. 3) (Garmendia et al., 2005a). Em LEE5 estão agrupados os genes que codificam a adesina afimbrial intimina (*eae*), o receptor de intimina denominado Tir (*tir*) e CesT (*cesT*, chaperona essencial para a secreção e translocação de Tir). Em LEE 4 estão contidos os genes que codificam as proteínas secretadas, denominadas EPEC-secreted proteins (Esp).

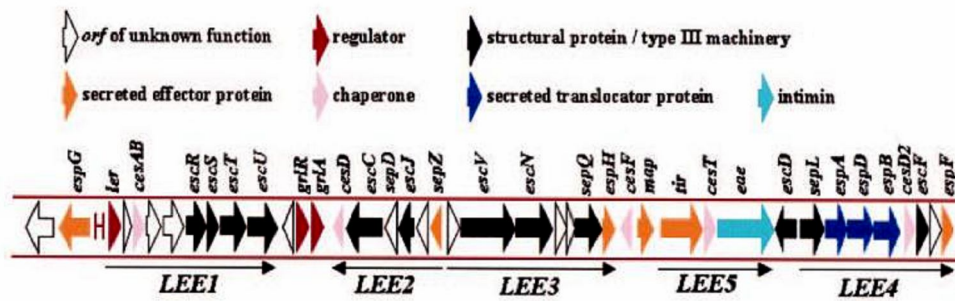


Fig. 2. Organização do locus for enterocyte effacement – LEE de EPEC/EHEC. (adaptado de Garmendia et al., 2005a).

Intimina, uma proteína de membrana externa de 94 kDa codificada pelo gene *eae* (“*E. coli* attaching-effacing”), é um fator de aderência que tem papel fundamental na colonização intestinal (Jerse e Kaper, 1991; Frankel et al., 2001). Essa proteína medeia ligação íntima às células epiteliais pela ligação a outra proteína codificada por LEE, o receptor translocado de íntimina (Tir), que é injetado na célula do hospedeiro por meio do SST3 (Kenny et al., 1997; Deibel et al., 1998). A região 5’ do gene *eae* é conservada, enquanto a região 3’ é heterogênea. Esta observação levou à construção de pares de iniciadores universais para PCR e desenho de pares de iniciadores alelo-específico, os quais têm possibilitado a diferenciação de pelo menos 21 variantes do gene *eae*, que codificam 27 diferentes subtipos de íntimina ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\gamma 1$, $\gamma 2$, δ , $\epsilon 1$, $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$, $\epsilon 5$ (ξ), ζ , $\eta 1$, $\eta 2$, $\theta 1$, $\iota 1$, $\iota 2$, κ , λ , μ , ν , \omicron , π , ρ , σ) (Adu-Bobie et al., 1998; Blanco et al., 2004; Blanco et al., 2004a; Blanco et al., 2005; Garrido et al., 2006; Jenkins et al., 2003; Oswald et al., 2000; Ramachandran et al., 2003; Tarr et al., 2002; Zhang et al., 2002, Blanco et al., 2006).

A porção C-terminal da íntimina (altamente variável) é responsável pela ligação ao receptor (Tir), e tem sido sugerido que diferentes íntiminas podem ser

responsáveis por diferenças no tropismo às diversas regiões intestinais (Phillips e Frankel, 2000).

Também são codificados por LEE os reguladores transcricionais (Ler, GrIA, GrIR) e as proteínas translocadoras (EspA, EspB, EspD) e efetoras (Map, EspF, EspG, EspH e SepZ) (revisado em Garmendia et al., 2005; Dean e Kenny, 2009).

EspA compreende um filamento que conecta a superfície bacteriana e a membrana da célula hospedeira (Knutton et al., 1998), enquanto EspB e EspD (Fig. 3) formam um poro na membrana plasmática eucarionte permitindo a injeção de proteínas bacterianas efetoras (Ide et al., 2001). A energia necessária para a montagem da agulha molecular e a injeção de proteínas efetoras é proveniente da hidrólise de ATP realizada por EscN, proteína citoplasmática de 49 kDa, também codificada pelo SST3 (Gauthier et al., 2003).

Uma vez injetado no citoplasma, Tir é inserido na membrana da célula hospedeira, dispondo-se em forma de grampo. Seus domínios N- e C-terminal são intracelulares e o domínio extracelular é o sítio de ligação à intimina (Kenny et al., 1999). A interação Tir-intimina promove a fosforilação do resíduo de tirosina 474 do domínio C-terminal de Tir; esse resíduo apresenta sítio de ligação para as proteínas adaptadoras Nck (1 e 2) encontradas nas células do hospedeiro. Posteriormente a essa interação, ocorre o recrutamento e ativação da proteína da síndrome neural de Wiskott-Aldrich (N-WASP), iniciando a polimerização da actina através do complexo protéico Arp2/3, o que promove a formação do pedestal (Kenny et al., 1999; DeVinney et al., 2001).

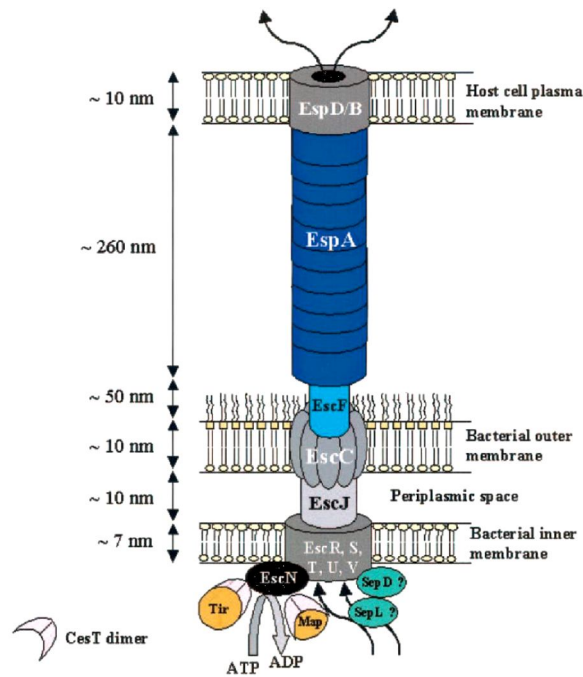


Fig. 3. Representação esquemática do SST3 de EPEC/EHEC. (Garmendia et al., 2005a)

Alternativamente, amostras da categoria EHEC utilizam a proteína TccP (Tir-cytoskeleton coupling protein) (Garmendia et al., 2004), também denominada EspF_U (Campellone et al., 2004), ao invés de Nck. O gene *tccP/espF_U* está localizado fora da região LEE, no prófago CP-933U/Sp14, e codifica uma proteína composta por uma única região N-terminal e vários resíduos repetidos de prolina (Garmendia et al., 2006).

Depois de translocada, TccP/EspF_U ativa N-WASP, estimulando a polimerização de actina e conseqüente formação de pedestal (Garmendia et al., 2004). Inicialmente demonstrada somente em amostras de EHEC do sorotipo O157:H7, a polimerização de actina dependente de TccP/EspF_U foi posteriormente descrita em amostras de EHEC não-O157:H7 e em algumas amostras de EPEC, típica e atípica (Garmendia et al., 2005b; Whale et al., 2007; Ooka et al., 2007). Além

disso, duas variantes do gene *tccP* foram descritas: *tccP* (carreado pelo prófago CP-933U/Sp14) e *tccP2* (carreado pelo prófago Sp4/CP-933M). Estudos de caracterização de EPEC mostraram a presença de *tccP* e *tccP2*, e tem sido demonstrado que amostras de EPEC podem iniciar a polimerização de actina pelas vias Tir-Nck (que depende da fosforilação de Y474) e/ou Tir-TccP (Garmendia et al., 2005b; Whale et al., 2006; Whale et al., 2007; Ooka et al., 2007).

Assim como Tir, as demais proteínas efetoras também são translocadas para o citoplasma da célula hospedeira.

Map apresenta 3 funções: (i) interfere com a habilidade celular de manter o potencial de membrana das mitocôndrias, promovendo deformidades na membrana, inchaço e por fim dano a estas organelas; (ii) é responsável pela formação transiente de estruturas semelhantes a filopódios, no sítio de infecção bacteriana, num processo dependente de Cdc42; e (iii) participa do rompimento da função da barreira intestinal e alteração das *tight junctions*, de maneira independente da ação em mitocôndria (revisado por Garmendia et al., 2005; Dean e Kenny, 2009).

EspF: as atividades têm sido descritas como: (I) rompimento da função da barreira intestinal, de maneira independente de Map, porém ambas requerem a ligação de intimina ao enterócito para sua atividade; (II) assim com Map, promove a permeabilização de mitocôndrias; (III) induz morte celular por apoptose; (IV) remodela diretamente o “brush border” (revisado por Garmendia et al., 2005; Dean e Kenny, 2009).

EspG: interage com tubulina e estimula a desestabilização de microtúbulos *in vitro* e colocaliza com tubulina durante a infecção de células Caco-2. EspG apresenta 21% de identidade de aminoácidos com VirA de *Shigella flexneri*, que promove a

desestabilização de microtúbulos, levando a estimulação de Rac-1 e eficiente internalização bacteriana (revisado por Garmendia et al., 2005; Dean e Kenny, 2009).

EspH: depois de injetado, se localiza na membrana celular e modula a estrutura de citoesqueleto de actina, afetando a formação de pedestal e filopódio. A função precisa de EspH não é conhecida (revisado por Garmendia et al., 2005; Dean e Kenny, 2009).

SepZ: sua translocação ainda não foi relacionada a uma função ou um fenótipo específico (revisado por Garmendia et al., 2005; Dean e Kenny, 2009).

Além das proteínas codificadas em LEE, 3 proteínas codificadas em região externamente a LEE utilizam o SST3 para sua translocação e podem alterar processos celulares quando interagem com as células hospedeiras: CIF (*Cycle-inhibiting factor*), responsável pela interrupção da divisão celular (Marchès et al., 2003), EspI, também denominada NleA (*non-LEE encoded factor*) (Mundy et al., 2004; Gruenheid et al., 2001), essencial para virulência *in vivo* e EspJ, que atua modulando a dinâmica da infecção (Dahan et al., 2005) e também apresenta atividade antifagocítica *in trans* (Marchès et al., 2008).

Atualmente, as EPEC têm sido divididas em típicas (tEPEC) e atípicas (aEPEC) tendo por base a presença de pEAF (e expressão do operon *bfp*) nas tEPEC e ausência deste nas aEPEC (Kaper 1996; Trabulsi et al., 2002). Tanto tEPEC como aEPEC não produzem enterotoxinas LT ou ST, como ocorre com as ETEC, ou Stx, propriedade das STEC (Kaper, 1996; Trabulsi et al., 2002).

Resultados de Gärtner e Schmidt (2004) e Bielaszewska et al., (2007) indicam que variações na região LEE de amostras de aEPEC são principalmente restritas a genes que codificam proteínas efetoras e as regiões flanqueadoras de LEE, enquanto genes que codificam os constituintes do SST3 são amplamente conservados.

Além da homologia das ilhas de patogenicidade LEE analisadas (Gärtner e Schmidt, 2004), a região LEE da amostra protótipo tEPEC E2348/69 representa, na verdade, um caso incomum, uma vez que foram observadas regiões flanqueadoras extensas nos sítios de inserção cromossômicos 5' e 3' de quase todos os isolados de aEPEC/tEPEC analisados por seu laboratório e pelo de outros pesquisadores (Schmidt, comunicação pessoal).

Atualmente, as rotinas de identificação e diferenciação das *E. coli* diarreiogênicas baseiam-se na combinação de testes bioquímicos, sorotipagem, testes fenotípicos baseados nas características de virulência e métodos de detecção molecular. A fim de simplificar e acelerar a identificação e o diagnóstico diferencial, no laboratório do nosso colaborador Dr. Alexander Schmidt, foi desenvolvida uma PCR Multiplex (MPCR) de um só passo que permite uma diferenciação eficiente das amostras diarreiogênicas e de isolados ambientais de *E. coli* (Müller et al., 2007). Essa metodologia permitiu identificar amostras portadoras de combinações de genes de virulência não convencionais, que representam exemplos da extraordinária plasticidade do genoma de *E. coli* (Müller et al., 2007).

Uma vez que amostras de aEPEC são detectadas também em indivíduos saudáveis, o papel dessas amostras em doenças diarreicas permanece controverso. Entretanto, estudos epidemiológicos recentes têm mostrado um aumento na prevalência de aEPEC nos países desenvolvidos e em desenvolvimento (Galane e LeRoux, 2001; Afset et al., 2004; Regia Mangia et al., 2004; Robins-Browne et al., 2004; Cohen et al., 2005; Frazolin et al., 2005; Nguyen et al., 2006; Araujo et al., 2007; Bueris et al., 2007). Isto também indica que pEAF não é, aparentemente, essencial para causar doença (Levine et al., 1985). Nosso grupo tem demonstrado que algumas amostras de aEPEC carregam uma combinação de genes de virulência

dos diferentes patótipos diarreio gênicos de *E. coli* (Vieira et al., 2001, Gomes et al., 2004).

Como descrito anteriormente, em ensaios de aderência em células HeLa ou HEP-2 cultivadas *in vitro*, as tEPEC produzem o padrão AL. A maioria das amostras de aEPEC produz um padrão de aderência com microcolônias mais frouxas (adesão semelhante à localizada ou AL-like), que são visualizadas somente em períodos de ensaios mais prolongados (6 h) (Rodrigues et al., 1996). Entretanto, estudando uma coleção de aEPEC, Vieira et al. (2001) identificaram 9 amostras que formavam o padrão AL típico (microcolônias compactas) em células HeLa e HEP-2, embora fossem desprovidas do operon *bfp* (que codifica BFP). Estudos posteriores mostraram que essas 9 amostras são heterogêneas e desprovidas das adesinas já descritas em diferentes categorias de DEC, que pudessem conferir a capacidade de promover AL na ausência de BFP (Hernandes et al., 2006). Entre essas 9 amostras, a aEPEC 1551-2 (sorotipo ONT:H⁻) foi selecionada para a identificação de uma eventual nova adesina associada à formação de microcolônias compactas na ausência de BFP, uma vez que ela havia sido isolada de uma criança diarreica desprovida de outros potenciais enteropatógenos e não era portadora de plasmídeos (Hernandes et al., 2006). Curiosamente, a análise por microscopia eletrônica de transmissão da interação da aEPEC 1551-2 com células HeLa revelou que as microcolônias compactas da AL, na realidade, correspondiam a um processo de invasão, com bactérias contidas em vacúolos, algumas das quais estando apoiadas em estruturas semelhantes a pedestais. Em experimentos quantitativos de invasão em células HeLa, foi demonstrado que o potencial invasor da amostra aEPEC 1551-2 é ~ 3 vezes maior que o da amostra de tEPEC protótipo E2348/69 (sorotipo O127:H6) (Hernandes et al., 2008). Além disto, foi verificado que um mutante no gene *eae* (que

codifica intimina), 1551-2(*eae*::pRT2), perdeu a capacidade invasora, embora permanecesse aderente. Estes dados sugeriram que a interação Tir-intimina na aEPEC 1551-2 é, aparentemente, responsável pela invasão de células HeLa. O seqüenciamento do gene *eae* da aEPEC 1551-2 revelou que essa amostra expressa o subtipo de intimina omicron, previamente descrito por Blanco et al., (2006) em 2 amostras de aEPEC dos sorotipos O129:H⁻ e O84:H⁻.

Infecção bacteriana intracelular

A adaptação ao ambiente intracelular auxilia as bactérias a evitar os estresses físicos tais como pH ácido ou fluxo de secreções das mucosas ou sangue e muitos outros mecanismos de defesa do hospedeiro, que incluem exfoliação celular, deposição de complemento, opsonização por anticorpo e subsequente reconhecimento por macrófagos e células T citotóxicas (Pizarro-Cerdá e Cossart, 2006). Assim, o desenvolvimento de mecanismos para invasão de células hospedeiras, escape de resposta imune, replicação intracelular e/ou disseminação para células vizinhas é uma importante estratégia para bactérias intracelulares (Pizarro-Cerdá e Cossart, 2006).

Os processos de invasão são geralmente estudados em culturas de células. Eles dependem, entre outros fatores, da espécie, cepa, sorotipo e genes de virulência do patógeno, e da célula hospedeira (tipo celular, grau de diferenciação e estado funcional). Nas etapas iniciais da invasão, os microorganismos enfrentam mecanismos eficientes de defesa inata que reconhecem padrões estruturais relativamente inespecíficos (Hoffmann et al., 1999; Naumann et al., 2000; Medzhitov e Janeway et al., 2000; Takeda et al., 2003). Se a resistência inata não controlar a

invasão, a carga microbiana pode aumentar substancialmente, levando à destruição de células hospedeiras.

Algumas bactérias asseguram sua internalização pelas células hospedeiras, secretando fatores que, inseridos nas membranas ou injetados no citosol, induzem a macropinocitose. São exemplos clássicos: *Shigella flexneri* e *Salmonella enterica* sv Typhimurium.

A invasão de patógenos como *S. flexneri* e *Listeria monocytogenes*, seu direcionamento para o citosol, ou sua adaptação aos componentes e às propriedades dos fagossomos de forma a favorecer a aquisição dos substratos e fatores de crescimento necessários à sobrevivência e a multiplicação dos patógenos, são determinados por fatores de virulência codificados por genes plasmidiais ou cromossômicos agrupados em ilhas de patogenicidade (Hacker e Kaper, 2000), e seqüencialmente ativados por sinais ambientais entre os quais a temperatura, pH, concentração de oxigênio, de cálcio iônico ou de ferro, reconhecidos por sensores microbianos. Muitos destes fatores modulam importantes cascatas de sinalização que atuam sobre diferentes funções celulares, estabelecendo assim, em nível bioquímico, um diálogo entre os patógenos e as células hospedeiras. Várias destas cascatas envolvem fatores de transcrição que modulam a atividade de numerosos genes (Ramakrishnan e Falkow, 1999; Relman e Falkow, 2000).

EIEC e *S. flexneri* carregam o mesmo gene, *inv* e *ipaH*, respectivamente, que codifica uma invasina, a qual é injetada na célula hospedeira através do SST3 e induz um processo de macropinocitose. Em seguida, as bactérias escapam da digestão no vacúolo, multiplicam-se no citosol e finalmente invadem as células vizinhas (Kaper et al., 2004; Menard et al., 1996). De maneira semelhante, *S. enterica* sv Typhimurium promove sua captação pela célula do hospedeiro por macropinocitose embora, ao

contrário de EIEC e *S. flexneri*, permaneça em um vacúolo (Fig.4) que apresenta algumas características endossomais, impedindo a fusão com lisossomos, evitando assim a sua digestão e permitindo sua multiplicação intracelular (Abrahams et al., 2006).

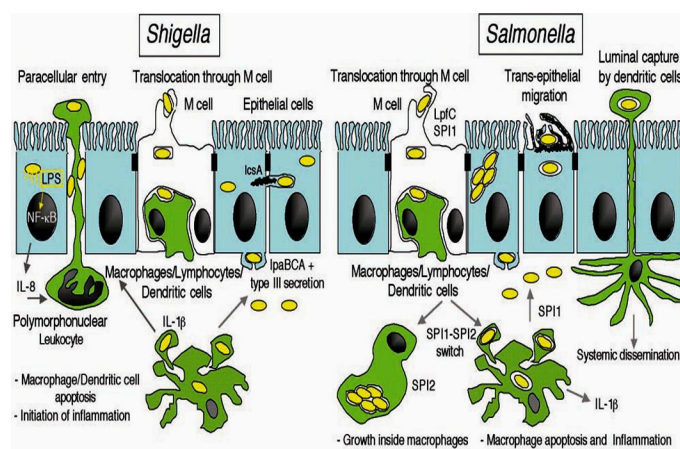


Fig. 4. Estratégia de invasão de enteropatógenos. (Adaptado de Cossart e Sansonetti, 2004).

Embora as tEPEC sejam consideradas patógenos extracelulares, alguns estudos *in vivo* demonstraram a presença desses patógenos dentro de enterócitos humanos e de animais (Polotsky et al., 1977; Tzipori et al., 1985; Pedroso et al., 1993). Além disso, vários estudos já demonstraram que determinadas amostras de tEPEC e aEPEC são capazes de invadir diferentes linhagens celulares *in vitro* (Andrade et al., 1989; Miliotis et al., 1989; Donnenberg et al., 1989; Donnenberg et al., 1990; Francis et al., 1991; Rosa et al., 2001; Scaletsky et al., 1996). Entretanto, variações nos protocolos de determinação do índice de invasão bem como grandes variações nos índices de invasão entre amostras de um mesmo estudo têm sido observadas, o que dificulta uma análise sobre o verdadeiro significado do potencial de invasão nos patótipos tEPEC e aEPEC.

Apesar de estar bem estabelecido na literatura que tEPEC tem como sítio preferencial de infecção o intestino delgado (Phillips e Frankel, 2000), ainda não há estudos sobre este aspecto da interação com amostras de aEPEC. A maioria dos estudos de invasão com amostras de tEPEC empregou linhagens celulares não diferenciadas e não intestinais, como células HEp-2 (Andrade e Santa Rosa, 1986), ou células intestinais como Henle 407 (Miliotis et al., 1989) e Caco-2 (Rosa *et al.*, 2001; Donnenberg et al., 1989; Francis et al., 1991), que expressam microvilosidades nas quais há atividade enzimática semelhante à dos enterócitos do intestino delgado (Gaillard e Finlay, 1996). No entanto, não encontramos estudos de invasão de aEPEC que tenham empregado a linhagem intestinal T84, que é fenotipicamente semelhante às células das criptas do cólon humano, (Nataro et al., 1996).

Adicionalmente, foi demonstrado que uma amostra de EPEC de coelhos (RDEC-1) produziu lesão A/E na membrana de células M (Celli et al., 2001), sugerindo que a formação dessa lesão poderia prevenir a internalização bacteriana ao bloquear o processo de transcitose e apresentação de antígenos pelas células M e assim retardar o início da resposta imune.

Foi descrito que a tEPEC E2348/69 inibe sua fagocitose por macrófagos murinos J774 e LMm^v. Este fenômeno foi correlacionado com eventos de desfosforilação de tirosina de proteínas de célula hospedeira, dependentes do SST3, incluindo EspA, EspB e EspD (Goosney et al., 1999; Celli et al., 2001). Posteriormente, esse fenômeno de anti-fagocitose foi descrito como um processo dependente de intimina, Tir e Map (Celli et al., 2001) e que ocorreria pela inibição do rearranjo dos filamentos de actina, mediada pela inibição da capacidade de PI3 quinase fosforilar Akt. Por último, foi demonstrado que EspF também participa da inibição da fosforilação de Akt (Quitard et al., 2006) e, conseqüentemente, inibe a

fagocitose. Essa condição poderia explicar a baixa eficiência da invasão de tEPEC E2348/69. Nada se conhece sobre a interação de amostras de aEPEC com células fagocitárias.

Com base nos eventos de interação e invasão observados com a amostra de aEPEC 1551-2, é necessário expandir esses estudos afim de se identificar se sua capacidade invasora é uma característica restrita a esta amostra ou se ocorre em outras amostras de aEPEC, pertencentes a diferentes sorogrupos e portadoras de diferentes subtipos de intimina. Além disto, é preciso que se analise se a capacidade invasora de amostras selecionadas pode ocorrer também em células intestinais, Caco-2 e T84, que apresentam características do epitélio intestinal humano, e depende da participação de proteínas do citoesqueleto, bem como de estruturas da membrana da célula hospedeira no processo de internalização.

Para essas finalidades, o tratamento de monocamadas celulares com agentes despolimerizantes de actina e tubulina poderia impedir a reorganização da membrana celular e assim comprometer a eficiência da invasão. A obtenção de mutante no gene *tir* impossibilitaria a interação Tir-intimina, permitindo a avaliação da ocorrência de interação da intimina com outras proteínas celulares (como β -1 integrina e/ou nucleolina), de modificação no processo de invasão e do estabelecimento da infecção intracelular. Por outro lado, a obtenção de um mutante no gene *escN*, que impediria a montagem da agulha molecular, permitiria a avaliação da participação do SST3 e/ou de proteínas efetoras dependentes desse sistema, na aderência e invasão da célula hospedeira.

Objetivo Geral

Avaliar a ocorrência e caracterizar eventos de invasão de linhagens celulares cultivadas *in vitro* por amostras de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) atípica.

Objetivos específicos

1. Avaliar a capacidade invasora da amostra aEPEC 1551-2, portadora de intimina omicron, e de amostras de aEPEC contendo diversos subtipos de intimina em diferentes linhagens celulares.
2. Analisar a participação de elementos do citoesqueleto na invasão da amostra aEPEC 1551-2.
3. Comparar a invasão da aEPEC 1551-2 em diferentes estágios de diferenciação das células intestinais T84.
4. Verificar o papel de Tir e do SST3 na interação da amostra aEPEC 1551-2 com linhagens celulares intestinais.

1. Meios de cultura, reagentes e soluções.

Os meios de cultura, reagentes e soluções estão descritos em “Anexos”.

2. Culturas bacterianas.

As amostras selecionadas para o estudo estão descritas na Tabela 6. O perfil de virulência destas amostras foi previamente caracterizado por Vieira et al., 2001. As amostras controle e hospedeiras utilizadas nos ensaios estão listadas na Tabela 1.

De acordo com a análise a ser empregada, estas amostras foram cultivadas em caldo Luria Bertani (LB) por 18 h a 37°C, sem agitação, ou semeadas em Agar LB por 18 h a 37°C para obtenção de colônias isoladas. Antibióticos foram adicionados para a seleção de amostras resistentes.

Tabela 1. Amostras controles e hospedeiras utilizadas neste estudo.

Amostras	Características	Referência
<i>E. coli</i> E2348/69	Amostra protótipo de tEPEC (O127:H6)	Levine <i>et al.</i> , 1985
<i>Shigella flexneri</i> 5a M90T	Plasmídeo de virulência – genes SST3 e invasão.	Doador por Dra. Rosa Silva (UNIFESP)
<i>Samonella enterica</i> sv Typhimurium	Ilha de patogenicidade SPI1 – genes SST3 e invasão	Doador por Dr. João Andrade (UERJ)
<i>E. coli</i> JM109	<i>recA1</i> Δ (<i>lac-proAB</i>)	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
<i>E. coli</i> DH5α λpir	DH5α lisogenizada com λpir (Nal)	Elliot and Kaper, 1997
<i>E. coli</i> S17 λpir	Pro, res ^r , mod ⁺ , RP4-2, Tc::UM-Km::Tn7 (SM)	Simon et al., 1983

3. Cultivos celulares.

Células HeLa (Instituto Adolfo Lutz): foram cultivadas a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco Life Technologies) contendo 2 g/L de bicarbonato de sódio, 15 mM de HEPES (3-(N-morpholino) propanesulfonic acid, Sigma Chemical Co. St Louis, MO, USA) 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco Life Technologies) e acrescido de 10% de soro bovino fetal (SBF, Gibco Life Technologies) Após repique, foram inoculadas 1x10⁵ células/poço, em placas de 24 poços, as quais permaneceram em cultura por 24 h.

Células Caco-2 (Instituto Adolfo Lutz): (células intestinais humanas), foram cultivadas a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ em meio DMEM contendo 2 g/L de bicarbonato de sódio, 15 mM de HEPES, 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco Life Technologies), 1% aminoácidos não essenciais (Sigma Chemical Co.) e acrescido de 10% de SBF (Gibco Life Technologies). Após repique, em placas de 24 poços, 1x10⁵ células/poço permaneceram em cultura por 10 dias, tempo necessário para a polarização e diferenciação. Durante este período o meio de cultura foi trocado a cada 2 dias.

Células T84 (ATCC e doado por Dr. James Nataro): (células intestinais humanas) foram mantidas a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂, em meio DMEM-F12 (Gibco Life Technologies) contendo 2 g/L de bicarbonato de sódio, 15 mM de HEPES e acrescido de 10% de SBF (Gibco Life Technologies). Após o repique em placas de 24 poços, 1x10⁵ células/poço permaneceram em cultura por 5-7 dias (monocamada não polarizada e não diferenciada) ou por 14 dias, tempo necessário para a polarização e diferenciação. Durante este período o meio de cultura foi trocado a cada 2 dias.

Para análise por microscopia eletrônica de transmissão, as células T84 foram cultivadas por 14 dias em membrana de filtro “Transwell” (3415 - Corning Costar Corporation, Cambridge, MA, USA). Para essa finalidade, as membranas foram pré-tratadas com solução de matriz extracelular (1:1000 em PBS) (Sigma Chemical Co.) por 2 h, em temperatura ambiente, e 1×10^5 células/300 μ L foram semeadas por filtro. De acordo com o tipo de interação a ser analisada, a superfície escolhida para o cultivo foi modificada: para os ensaios de interação bacteriana com a superfície apical, as células foram semeadas na câmara superior; já, para os ensaios de interação bacteriana com a superfície basolateral, as células foram semeadas nos filtros mantidos invertidos e incubadas por 24 h nessa posição. Ao final desse período, os filtros foram postos em orientação normal e acondicionados em placas de 24 poços; dessa maneira, a monocamada aderida foi cultivada de forma pendente, sendo que as câmaras, superior e inferior, foram preenchidas com o meio descrito acima. As monocamadas foram mantidas por 14 dias para polarização e diferenciação. Alternativamente 3×10^5 células T84 foram cultivadas em placas de poços de 35 mm de diâmetro por 14 dias.

Células XS52 (ATCC): (células dendríticas humanas) foram cultivadas a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ em meio DMEM contendo 2 g/L de bicarbonato de sódio, 15 mM de HEPES, 1% de penicilina/estreptomicina, 1% aminoácidos não essenciais (Sigma Chemical Co.) e 10% de SBF. Após repique, com auxílio de *cell scraper*, foram inoculadas 1×10^5 células/poço, em placas de 24 poços, as quais permaneceram em cultura por 24 h.

Células HL60 (ATCC): (células precursoras de macrófagos humanos, Huebner, *et al.*, 1985) não aderentes foram cultivadas a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ em meio RPMI 1640 (GIBCO Life Technologies) contendo 2 g/L de

bicarbonato de sódio, 15 mM de HEPES, 1% de penicilina/estreptomicina (GiBCO Life Technologies), 1% aminoácidos não essenciais (Sigma Chemical Co.) e acrescido de 10% de SBF (GiBCO Life Technologies). Para diferenciação em macrófagos, as células foram suspensas em meio contendo PMA (phorbol diester 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate [phorbol 12-myristate 13-acetate, Sigma Chemical Co.) diluído a 1:1000, distribuídas em placas de 24 poços e incubadas por 24 h.

4. Teste de adesão bacteriana às culturas celulares.

Os testes de aderência das amostras selecionadas às células XS-52, HL60, T84, Caco-2 e HeLa aderidas em lamínulas foram realizados segundo Cravioto et al., (1979). As amostras da coleção foram inoculadas na diluição 1:50, em microplacas de 24 orifícios, contendo monocamadas polarizadas/diferenciadas contidas em DMEM contendo 0,3 g/L de bicarbonato de sódio, 15 mM de HEPES, 2% de SBF e 1% D-manose. Após 3 h de incubação a 37°C, em atmosfera normal, a microplaca foi lavada com PBS e reincubada por mais 3 h. Em seguida, foram novamente lavadas e, então, as preparações foram fixadas com metanol, coradas com Giemsa e analisadas quanto ao padrão de aderência por microscopia óptica de imersão.

Nos ensaios com células T84 cultivadas em câmaras Transwell, a suspensão bacteriana foi adicionada à câmara superior de modo a permitir o contato das amostras com a superfície basolateral (células cultivadas na face inferior e invertidas no momento do uso) ou apical (células cultivadas na face superior do filtro). A incubação foi realizada como descrito anteriormente. Após 6 h de contato, os filtros foram fixados com 1 mL de glutaraldeído para posterior processamento para microscopia eletrônica de transmissão.

5. Teste de identificação da polimerização da actina: Fluorescence Actin Staining - FAS

O Teste de identificação da polimerização da actina foi realizado segundo Knutton *et al.*, (1989): ao final do ensaio descrito no item 4, as células foram fixadas em formaldeído a 3% em PBS, permeabilizadas com 1% de Triton X-100 e incubadas, no escuro, com faloidina marcada com fluoresceína por 20 min (Sigma Chemical Co.). As lamínulas foram lavadas em PBS, montadas em glicerol (Merck) contendo 0,1% de ρ -fenilenediamina (Sigma Chemical Co.) e observadas ao microscópio de fluorescência em aumento de 1.000x.

6. Teste de invasão bacteriana às culturas celulares.

Para realização do teste de invasão às células HeLa, XS-52, HL60, Caco-2 e T84, as amostras foram inoculadas na diluição 1:50, em microplacas de 24 orifícios contendo monocamadas celulares, em DMEM contendo 0,3 g/L de bicarbonato de sódio, 15 mM de HEPES e acrescido de 2% de SBF. Após 3 h de incubação a 37°C, em atmosfera normal, a microplaca foi lavada com PBS e reincubada por mais 3 h. Ao final desse período, metade das lamínulas foi lavada e incubada com solução de lise (Triton X-100 a 1% em PBS) por 30 min a 37°C, seguida de vigorosa homogeneização e coleta do sobrenadante; um segundo grupo foi incubado por mais 1 hora, na presença de gentamicina (100 μ g/mL, Sigma Chemical Co) e, posteriormente, submetido a lise celular descrita acima. Alíquotas de 100 μ L dos sobrenadantes obtidos foram diluídas em PBS (razão 10) e volumes de 10 μ L foram semeados na forma de "spots", em triplicata, em ágar McConkey, para posterior contagem de unidades formadoras de colônia (U.F.C.) nos diferentes períodos. Os resultados

foram expressos pela razão dos números de U.F.C. provenientes dos grupos celulares tratados e não tratados por antibiótico x 100 (%).

7. Testes de inibição da invasão.

Os testes de inibição da invasão foram realizados pelo tratamento das culturas celulares, em microplaca de 24 orifícios contendo monocamadas celulares com diferentes concentrações de agentes químicos:

7.1. Inibição da invasão por Citocalasina D.

A participação de filamentos de actina foi avaliada pelo tratamento prévio das culturas celulares por citocalasina D (Sigma Chemical Co.), agente despolimerizante de filamentos de actina.

As monocamadas semiconfluentes de células HeLa foram incubadas com 1 e 5 $\mu\text{g/mL}$ de citocalasina D em DMEM contendo 0,2 g bicarbonato de sódio/L, HEPES 15 mM, SFB a 2%, por 1 hora, seguida de lavagem e realização do teste de invasão descrito no item 12.

7.2. Inibição da invasão por Colchicina.

A participação de microtúbulos foi avaliada pelo tratamento prévio das culturas celulares por colchicina, agente despolimerizante de microtúbulos.

As monocamadas semiconfluentes de células HeLa foram incubadas com 1 e 5 $\mu\text{g/mL}$ de colchicina (Sigma Chemical Co.) em DMEM contendo 0,2 g bicarbonato de sódio/L, HEPES a 15 mM, SFB a 2%, por 1 hora, seguida de lavagem e realização do teste de invasão descrito no item 12.

8. Interação da amostra 1551-2 com células T84.

8.1. Interação com monocamadas de células T84 não diferenciadas.

O teste de invasão foi realizado como descrito no item 12, em monocamadas de células T84 cultivadas por 7 dias, tempo insuficiente para sua polarização e diferenciação.

8.2. Interação com monocamadas de células T84 diferenciadas após o rompimento das *tight junctions*.

As monocamadas de células T84 diferenciadas, obtidas conforme item 3, foram incubadas com 1 e 5 mM em EGTA (Sigma Chemical Co.) em Minimal essencial medium (MEM, GibCO Life Technologies) por 1 hora, seguida de lavagem e realização do teste de invasão descrito no item 12.

9. Análise estatística

As diferenças nas porcentagens de invasão foram analisadas quanto a sua significância pelo teste *t*, de duas caudas, não pareado (GraphPad Prism 4.0).

10. Microscopia Eletrônica de Transmissão.

10.1. Células T84 cultivadas em filtro Transwell

Após a fixação com glutaraldeído, os filtros foram lavados 3 vezes com PBS (10 min), pós-fixados com 1% de tetróxido de ósmio (Plano) e removidos do sistema de sustentação com auxílio de um bisturi. As células foram desidratadas em gradiente de etanol (30%, 50% e 70%), então os filtros foram cortados do sistema de sustentação e tratados com etanol (90%, 96% e 99.8%) e, em seguida, com óxido de propileno (100%), Epon: óxido de propileno (1:1, Serva), e Epon (100%). Em seguida,

os filtros foram embebidos em resina e incubados por 2 dias para polimerização. Cortes ultrafinos foram preparados, corados com 4% de acetato de uracila (Merck) e citrato de Reynold (Merck) e, então, foram examinados ao microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2 Spirit Twin, Fei Company (80 kV) por Lilo Greune (UniMünster).

10.2. Células T84 cultivadas em poços de 35 mm de diâmetro.

A infecção, fixação e desidratação foram realizadas conforme descrito acima (item 10.1). Subsequentemente, as células foram examinadas com o microscópio eletrônico de transmissão LEO 906E (Zeiss, Germany) à 80 kV por Dra. Sylvia Mendes Carneiro (Instituto Butantan).

11. Métodos moleculares:

11.1. Caracterização das amostras por PCR Multiplex.

Os pares de *primers* utilizados estão listados na tabela 3 e as combinações de genes de virulência de cepas de referência na figura 5.

A reação PCR Multiplex foi realizada de acordo com Müller et al., 2007. Tubos contendo 25 µL da mistura: 2 unidades de Taq DNA polymerase (Segetec, Borken, Germany), 84 mM Tris HCl (pH 8.5), 2,1 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 14 mM 2-mercaptoetanol, 0,14% Triton X-100, 0,3 mM de cada desoxinucleotídeo e os pares de *primers* como indicado na tabela 2.

Como molde, colônias isoladas foram coletadas de culturas frescas em LB ágar e ressuspendidas por um minuto na mistura da reação mantida em banho de gelo.

As condições do ciclo foram as seguintes: 94°C por 5 minutos e 30 ciclos descritos abaixo e seguido 72 °C por 5 min:

Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose a 2% (m/vol) a 130 mV e visualizados em luz ultravioleta depois de corados com brometo de etídio (0,5 mg/mL).

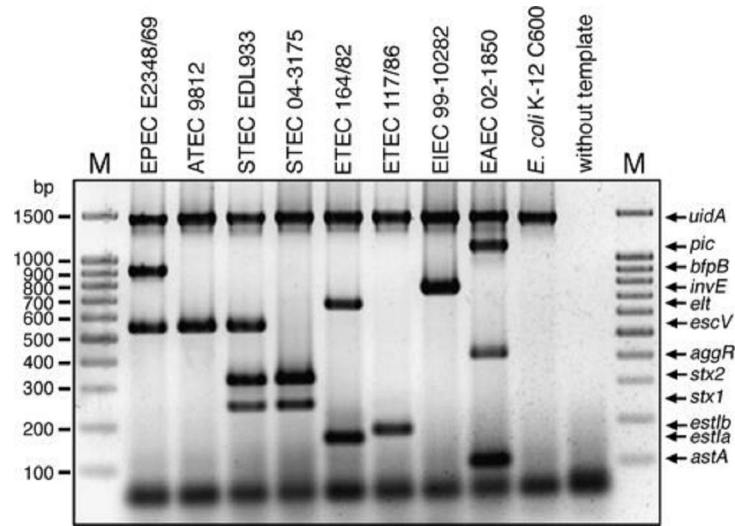


Fig. 5. Análise por MPCR de amostras de referência. Canaleta M contém marcadores de tamanho molecular. As outras canaletas contêm amostras de: tEPEC E2348/69 (uidA +, LEE+, bfp+), aEPEC 9812 (uidA +, LEE+), STEC EDL933 (uidA +, LEE +, stx1+, stx2 +), STEC 04-3175 (uidA+, stx1+, stx2+), ETEC 164/82 (uidA+, elt +, estIa +), ETEC 117/86 (uidA+, estIb +), EIEC 99- 10282 (uidA+, invE +), EAEC 02-1850 (uidA+, astA +, aggR+, pic+), *E. coli* C600 (uidA+), e um controle negativo (sem DNA). Muller et al., 2007.

Tabela 2: Condições de amplificação utilizadas na análise por PCR Multiplex.

	Desnaturação	Anelamento	Extensão
Temperatura (°C)	94	63	72
Incubação	30 s	30 s	1 min 30 s

Tabela 3. Pares de *primers* utilizados na análise por PCR Multiplex. (Müller et al., 2007)

Patotipos: Gene de interesse	Primers	Seqüência (5'- 3')	Concentração (µM)	Tamanho do fragmento (pb)
(tEPEC, aEPEC, STEC): LEE positivo - <i>escV</i>	MP3- <i>escV</i> -F	ATTCTGGCTCTCTTCTTTATGGCTG	0,4	544
	MP3- <i>escV</i> -R	CGTCCCCTTTTACAACTTCATCGC	0,4	
tEPEC: <i>bfpB</i>	MP3- <i>bfpB</i> -F	GACACCTCATTGCTGAAGTCG	0,1	910
	MP3- <i>bfpB</i> -R	CCAGAACACCTCCGTTATGC	0,1	
STEC: <i>stx</i> ₁ <i>stx</i> ₂	MP4- <i>stx</i> ₁ -F	CGATGTTACGGTTTGTACTGTGACAGC	0,2	244
	MP4- <i>stx</i> ₁ -R	AATGCCACGCTTCCCAGAATTG	0,2	
	MP3- <i>stx</i> ₂ -F	GTTTTGACCATCTTCGTCTGATTATTGA G	0,4	324
	MP3- <i>stx</i> ₂ -R	AGCGTAAGGCTTCTGCTGTGAC	0,4	
ETEC: <i>elt</i>	MP2-LT-F	GAACAGGAGGTTTCTGCGTTAGGTG	0,1	655
	MP2-LTv-R	CTTCAATGGCTTTTTTTGGGAGTC	0,1	
<i>estIa</i>	MP4-STIa-F	CCTCTTTTAGYCAGACARCTGAATCAST TG	0,4	157
	MP4-STIa-R	CAGGCAGGATTACAACAAAGTTCACAG	0,4	
<i>estIb</i>	MP2-STI-F	TGTCTTTTTACCTTTCGCTC	0,2	171
	MP2-STI-R	CGGTACAAGCAGGATTACAACAC	0,2	

Tabela 3. Pares de *primers* utilizados na análise por PCR Multiplex (continuação).

Patotipos: Gene de interesse	Primers	Sequência (5'- 3')	Concentração (µM)	Tamanho do fragmento (pb)
EIEC <i>invE</i>	MP2- <i>invE</i> -F	CGATAGATGGCGAGAAATTATATCCCG	0,2	766
	MP2- <i>invE</i> -R	CGATCAAGAATCCCTAACAGAAGAATCAC	0,2	
EAEC <i>astA</i> <i>aggR</i> <i>pic</i>	MP- <i>astA</i> -F	TGCCATCAACACAGTATATCCG	0,4	102
	MP- <i>astA</i> -R	ACGGCTTTGTAGTCCTTCCAT	0,4	
	MP2- <i>aggR</i> -F	ACGCAGAGTTGCCTGATAAAG	0,2	400
	MP2- <i>aggR</i> -R	AATACAGAATCGTCAGCATCAGC	0,2	
	MP2- <i>pic</i> -F	AGCCGTTTCCGCAGAAGCC	0,2	1.111
	MP2- <i>pic</i> -R	AAATGTCAGTGAACCGACGATTGG	0,2	
<i>E. coli</i> <i>uidA</i>	MP2- <i>uidA</i> -F	ATGCCAGTCCAGCGTTTTTGC	0,2	1.487
	MP2- <i>uidA</i> -R	AAAGTGTGGGTCAATAATCAGGAAGTG	0,2	
ShET2 homólogo <i>ent</i>	<i>ent</i> -F-F	TGGGCTAAAAGAAGACACACTG	0,4	629
	<i>ent</i> -F-R	CAAGCATCCTGATTATCTCACC	0,4	

11.2. Sequenciamento do gene *tir*

O gene *tir* (1700 pares de base) foi amplificado (*primers* TirEH F/R, Vieira et al., 2001) e quantificado por comparação com padrão Low Mass (Invitrogen). A banda foi cortada do gel e eluída de acordo com protocolo do “kit Wisard Clean-up Gel” (Promega, Madison, WI, USA).

O seqüenciamento foi realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, a partir de produtos de PCR, no sequenciador MegaBACE 1000 (GE Healthcare) utilizando o DYEnmic ET Dye Terminator Kit (com Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase) código US81090 e no laboratório do Dr. Marcelo Briones, utilizando BigDye Terminator dideoxi-nucleotideo, modificado por Sanger et al., (1977), no sequenciador ABI377/96. Os contigues foram montados utilizando o programa Phred-Phrap-Consed (Gordon *et al.*, 1998; Ewing et al., 1998; Ewing e Green, 1998). A seqüência derivada das análises foi depositada no GenBank (EU057954).

11.3. Identificação dos subtipos de intimina

A subtipagem de intimina foi realizada pelo sequenciamento um fragmento da região variável 3' do gene *eae* das outras 4 amostras não identificadas por PCR foi realizada no laboratório do Dr. Jorge Blanco (Laboratório de Referência de *E. coli* (LREC), Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Faculdade de Veterinária, Universidade de Santiago de Compostela, Lugo, Espanha). A seqüência de nucleotídeos dos produtos da amplificação, purificados com o *kit* QIAquick DNA purification (Quiagen Inc., EUA), foi determinada pelo método de Sanger (dideoxynucleotide triphosphate chain-termination), com o BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit e o ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Bio-Systems).

11.4. Eletroporação

O DNA recombinante foi transformado em células bacterianas competentes através de eletroporação. As células competentes foram preparadas segundo metodologia descrita por Ausubel et al., (1995), aliqüotadas em volumes de 40 μ L e mantidas à -70°C.

Para a transformação, as células competentes foram descongeladas em gelo e 1 μ L de suspensão de DNA plasmidial foi adicionado à alíquota de células competentes. Essa mistura foi transferida para cubetas apropriadas de 0,2 cm (Biorad, EUA), previamente resfriadas. Para eletroporação, foi utilizado um eletroporador *GenePulse* (Biorad, EUA), a 2,5 kV, 25 μ F e controle de pulso de 200 Ω .

Imediatamente após a eletroporação, foi adicionado 1 mL de meio SOC à reação e a mesma foi incubada à 37°C, durante 1 h, sob agitação a 250 r.p.m. Em seguida, diferentes volumes dos cultivos foram plaqueados em agar LB contendo antibióticos apropriados e as placas, incubadas à 37°C por 18 h.

11.5. Estratégias de mutagênese dos genes *tir* e *escN* da amostra 1551-2.

Iniciamos os experimentos de mutagênese não-polar pela técnica que utiliza o vetor suicida, pJP5603, clonado com parte do gene a ser nocauteado (Penfold e Pemberton, 1992). Os pares de *primers* e plasmídeos utilizados nesta abordagem estão descritos nas tabelas 5 e 6.

O segmento interno do gene (*escN* ou *tir*) foi preparado por PCR usando os pares de *primers* (*escN* ou *tirEPEC*) (Tabela 5) e clonado no vetor pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI, USA). Após a ligação, células competentes de *E. coli* JM109 foram transformadas por eletroporação e plaqueadas em Agar LB contendo ampicilina (100 μ g/mL), IPTG (0,5 mM) e X-Gal (80 μ g/mL), conforme descrito pelo fabricante.

As colônias brancas (resistentes a ampicilina, Amp^R), foram selecionadas para confirmação da presença do inserto por PCR e extração por reações de digestão com EcoRI; o segmento de interesse foi eluído do gel (Wisard® Plus SV Miniprep DNA Purification System - Promega, Madison, WI, USA) e clonado no sítio correspondente, no vetor suicida pJP5603 (resistente a canamicina, Penfold e Pemberton, 1992), resultando no plasmídeo recombinante (Tabela 6). Depois da transformação de DH5a(λ pir) por eletroporação, os transformantes foram selecionados em placas de ágar LB contendo canamicina, IPTG e X-Gal e as colônias brancas (resistentes a canamicina, Km^R), foram selecionadas para confirmação da presença do inserto por PCR. As colônias que apresentavam o inserto foram armazenadas a -70°C em LB-glicerol (20%) contendo canamicina. A amostra S17 (λ pir) foi então transformada com DNA recombinante e a amostra transformante foi utilizada para a conjugação com a amostra 1551-2 resistente a ácido nalidíxico em membranas de nitrocelulose (0,45 μ m). O crescimento foi ressuspensão em 10 mL de caldo LB e 50, 100 e 150 μ L da suspensão foram semeados em placas de ágar McConkey contendo canamicina e ácido nalidíxico como descrito anteriormente (Elliott e Kaper, 1997; Elias et al., 1999; Keller et al., 2002).

Durante o estágio sanduíche a técnica de mutagênese do gene *tir* foi substituída pelo sistema de mutagênese por λ Red (Datsenko e Wanner, 2000).

Primeiramente, a amostra selvagem 1551-2 foi transformada por eletroporação com o plasmídeo contendo o fago lambda pKD46 (Amp^R). Foi então realizada uma PCR com o plasmídeo pKD4 (Km^R), utilizando os *primers* dTirF e dTirR (tabela 5). O produto dessa PCR (1,5 Kb) foi então eluído do gel, purificado e quantificado. Posteriormente a amostra 1551-2/pKD46 foi cultivada em 20 mL de meio SOB

(Sambrook e Russel, 2001) contendo ampicilina, L-arabinose (6%) e $MgCl_2$ a $30^\circ C$ com agitação até $DO_{600} = 0,6$. A cultura foi concentrada, lavada em 2 mL de água bidestilada e ressuspensa em 40 μL de água bidestilada. A amostra 1551-2/pKD46 competente foi transformada por eletroporação com diferentes concentrações do produto de PCR, semeada em 1 mL de meio SOC (Sambrook e Russel, 2001) e incubada por 1 h a $37^\circ C$. A suspensão bacteriana foi concentrada em 50 μL e semeada em ágar contendo 50 $\mu g/mL$ de canamicina. As colônias obtidas foram submetidas a uma PCR de verificação (*primers* dTIR-Nearby, tabela 5).

Tabela 4. Pares de primers e condições de amplificação de genes alvos utilizados neste estudo.

Gene alvo	Primers	Seqüência de nucleotídeos (5'-3')	Ciclos de amplificação	Fragmento (pb)
	Tir EPEC F	TAA AAG TTC AGA TCT TGA TGA CAT		
	Tir EPEC R	CAT ATT TAT GAT GAG GTC GCT C	94°C 51°C 72°C 1 min 1 min 1 min	500
	Tir Y474	GTG GCG GGG TAA ACT CTG CTG		
	TirDy EPEC- F	AAC ACC AAG ACC AAT TCC TCC	94°C 60°C 72°C 1 min 1 min 1 min	500
	TirDy EPEC- R	GGA ATT CAT GCC TAT TGG TAA		
	Tir EH-F	CGG GAT CCT TAG ACG AAA CGA TGG G	94°C 48°C 72°C 1 min 1 min 2 min	1700
	Tir EH-R	GGA ATT CAT GCC TAT TGG TAA		
<i>Tir</i>	dTIR-F	ATC CTA AAC TTT GGC TGT CGC TGG GGA GTA TTG CCG GTG TAG GCT GGA GCT GCT TC	98°C 53°C 72°C 10 seg 30 seg 30seg	1600
	dTIR-R	GCT CTT CTA CTA TTT GTG CAA CAA CAT CAT CTT TTA ATA CAT ATG AAT ATC CTC CTT AG		
	dTIR-Nearby-F	CTT CTA CAC TCC GTT CAG	98°C 53°C 72°C 30 seg 30 seg 1 m	1000
	dTIR-Nearby-R	CCC CGG CAG CTT TAG CCT		
	TirSeq-F	AAG CAT TCC AGA ACC CAG		
	TirSeq-R	TCC GTA CTC ATC GAT AGC	98°C 58°C 72°C 10 seg 30 seg 1min	2500
	T7	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GG		
<i>map</i>	MAPDY	AGT TGA TGA GCA GTG TGG	98°C 63°C 72°C 30seg 30seg 45seg	2500
<i>cesT</i>	cesT	CGC GGA TCC TTT ATC TTC CGG CGT AAT AATG		
<i>eae</i>	Omicron – F	AGC GTT AGC AAT GCC GCA GTT GAT	94°C 55°C 72°C 1 min 1 min 1 min	200
	Omicron - R	CAA CGG TAA TTG TTG TTT CC		
<i>escN</i>	EscN – F	CGA CGA CTA TTG CAG AGT	94°C 53°C 72°C 1 min 1 min 1 min	480
	EscN – R	GCC TTA TCT GCT TCA GGA		
<i>escC</i>	escC-Nearby-F	TCA GAT ACA ATG ACG CCA CC	98°C 63°C 72°C 30seg 30 seg 45 seg	1700
	escC-Nearby-R	GAT TTC TAC CAG GAT GGT GG		

Tabela 5: Plasmídeos utilizados neste estudo.

Plasmídeo	Características	Referência
pGEM-T Easy	Vetor de clonagem AmpR, f1 ori, lacZ	Promega
pJP5603	3.1 kb vetor suicida baseado em R6K, KmR	Penfold e Pemberton (1992)
pKD46	Gene de resistência a Ampicilina	Datsenko e Wanner, (2000)
pKD43	Gene de resistência a gentamicina	Datsenko e Wanner, (2000)
pKD4	Gene de resistência a canamicina	Datsenko e Wanner, (2000)
pKD3	Gene de resistência a cloranfenicol	Datsenko e Wanner, (2000)
pBlueScript	Vetor de Clonagem com gene de resistência a Ampicilina	Stratagene
pDY1	Plasmídeo recombinante Tir	Este estudo
pDY1.1	Plasmídeo recombinante Tir	Este estudo
pDY2	Plasmídeo recombinante escN	Este estudo
pDY3	Plasmídeo recombinante escN	Este estudo

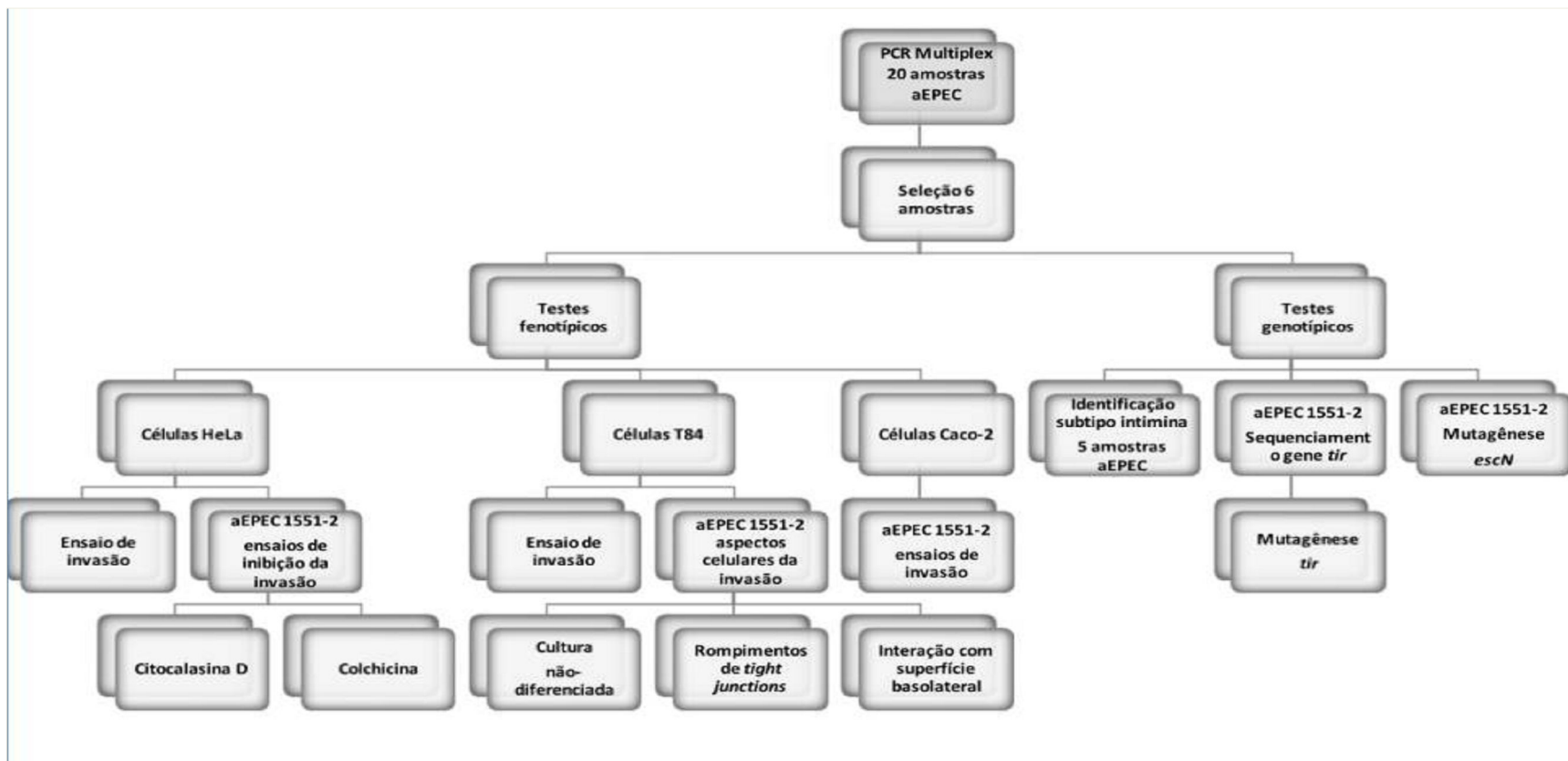


Fig.6: Delineamento experimental.

Confirmação do patotipo aEPEC por PCR Multiplex (MPCR).

De acordo com Müller et al., 2007, as amostras portadoras do gene *escV* e desprovidas dos genes *bfpB* e *stx1/stx2* são classificadas como aEPEC. Todas as amostras testadas neste estudo apresentaram o perfil característico de aEPEC. Esta análise confirmou os dados obtidos anteriormente durante a caracterização genotípica dessas amostras em nosso laboratório por Vieira et al., (2001) (Tabela 1).

Para prosseguimento deste estudo, além da aEPEC 1551-2, foram selecionadas aleatoriamente as amostras de aEPEC 0621-6, 1632-7, 1871-1 e 4281-7. A amostra protótipo de tEPEC E2348/69 foi adicionada aos ensaios de interação bactéria - células para comparação.

Tabela 6. Características das amostras utilizadas neste estudo.

Amostra	Sorotipo ^a	Intimina	FAS (HeLa) ^a	Padrão aderência ^a	Perfil Virulência ^a	Multiplex PCR ^d
0811-4	NT:H-	**	+	DA	<i>αhly daaC astA irp2 pet afa tccP2</i>	<i>escV, uidA</i>
1871-1	O34:H-	θ ^b	+	AL like	<i>αhly daaC astA shf irp2 pet afa sfa pap paa</i>	<i>escV, uidA</i>
3391-3	NT:H40	**	+	AL like	<i>astA efa1 efa5' paa</i>	<i>escV, uidA</i>
3941-1	NT:H34	**	+	AL like	<i>efa1 efa5' paa</i>	<i>escV, uidA</i>
4281-7	O104:H-	τ ^b	+	AL like	<i>efa1 efa5' paa</i>	<i>escV,</i>
2922-2	O98:H8	γ	+	AL like	<i>ehly bfpA paa tccP2</i>	<i>escV, uidA</i>
1551-2	NT:H-	o	+	AL	<i>eae</i>	<i>escV,</i>
2252-4	NT:H8	γ	+	AL like	<i>per bfp astA efa1 efa5' paa</i>	<i>escV, uidA</i>
2932-2	O153:H7	β	+	AL like	<i>efa1 efa5' tccP</i>	<i>escV, uidA</i>
21075	O51:H40	θ	+	AL like	<i>shf ler cifA</i>	<i>escV, uidA</i>
1931-2	O51:H40	θ	+	AL like	<i>ler cifA</i>	<i>escV, uidA</i>
1331-2	O70:H2	**	+	AL like	<i>tccP2 irp2</i>	<i>escV, uidA</i>
1112-6	R:H11,21	**	+	AL like	<i>αhly astA irp2 pet</i>	<i>escV, uidA</i>
2071-1	NT:H-	**	+	DA	<i>αhly astA irp2 pet</i>	<i>escV, uidA</i>
252	O70	NR	NR	Esporádico	<i>pil fimH daaC agg3C iha saa eae</i>	<i>escV, uidA</i>
1632-7	O26:NT	Υ ^b	+	DA	<i>αhly daaC afa astA</i>	<i>escV</i>
4632-3	NT:H-	β	+	AL like	<i>astA irp2 tccP2</i>	<i>escV, uidA</i>
0621-6	O41:H-	σ ^c	+	AL	<i>irp tccP2</i>	<i>escV</i>
3281-6	NT:H-	ι	+	AL like	<i>αhly astA irp tccP2</i>	<i>escV</i>
3481-4	NT:H33	**	+	AL like	<i>αhly astA irp</i>	<i>escV, uidA, astA</i>
4051-6	O104:H12	o ^c	+	AA	<i>eae astAA, irp2, tccp2,</i>	NR

** : amostras negativas para os subtipos testados: α, β, ε, γ, ι, σ, o ou θ. NR: não realizado. (a): Vieira et al., 2001. (b) subtipo de intimina identificado por Blanco (Universidade de Santiago de Compostela) neste estudo (c) subtipo de intimina identificado neste estudo. (d) Dados obtidos neste estudo.

Sequenciamento do gene *tir* da amostra 1551-2.

O sequenciamento do gene correspondente à região da molécula Tir da aEPEC 1551-2 contendo o resíduo de tirosina Y474 foi realizado no início deste estudo com o objetivo de auxiliar na mutagenese desta molécula (publicado em Hernandez et al., 2008). Com esse seqüenciamento, verificou-se que a sequência de aminoácidos deduzida é idêntica à sequência de aminoácido de aEPEC 4051-6, sorotipo O104:H12, de nossa coleção (Fig. 7) (Ooka et al., 2007). Assim a aEPEC 4051-6 foi também incluída nos ensaios de invasão de culturas celulares.

		474	
		↓	
Tir _{EPEC} (O127:H6)	... Q P E E H I	Y D E V A A D	
Tir _{EHEC} (O157:H7)	... T S N S N T S V Q N M G N		
Tir ₄₀₅₁₋₆ (O104:H12)	... L P E E H I	Y D Q V A A D	
Tir ₁₅₅₁₋₂ (ONT:H)	... L P E E H I	Y D Q V A A D	

Fig. 7: Comparação da sequência de aminoácidos deduzida de Tir de amostras de tEPEC (O127:H6) , EHEC (O157:H7) e aEPEC (4051-6 e 1551-2). Resíduos de tirosina fosforilados em destaque. Somente os resíduos de tirosinas Y474 ou equivalentes de Tir de tEPEC e aEPEC são fosforiladas (Hernandez et al., 2008).

Três novos subtipos de intimina foram identificados entre amostras de aEPEC selecionadas.

Como a proposta deste estudo era verificar o potencial invasor de amostras de aEPEC portadoras de diferentes subtipos de intimina, decidimos pela tentativa de subtipar intiminas de amostras da coleção portadoras de intiminas não tipáveis pelos métodos disponíveis na literatura. A pesquisa do subtipo omicron de intimina de 5 amostras selecionadas para os ensaios de invasão foi realizada primeiramente por PCR, em nosso laboratório. Com essa abordagem, verificamos que somente a amostra aEPEC 4051-6 era portadora desse subtipo (tabela 9). Um fragmento da

região variável 3' do gene *eae* de cada uma das outras 4 amostras foi identificado por PCR, amplificado e enviado para seqüenciamento no laboratório do Dr. Jorge Blanco (Universidade de Santiago de Compostela, Lugo, Espanha). Entre as amostras avaliadas, 4 subtipos de intiminas foram identificados: sigma (σ), upsilon (Υ), Teta-2 (θ -2) e Tau (τ), sendo que os 3 últimos correspondem a novos subtipos de intimina (tabela 9).

As novas seqüências nucleotídicas do gene *eae* das amostras analisadas foram depositadas no European Bioinformatics Institute (EMBL Nucleotide Sequence Database) como: *eae*- τ (FM872416), *eae*- υ (FM872417) e *eae*- θ 2 (FM872418). O cálculo da porcentagem de identidades dos novos subtipos de intiminas descritos em aEPEC neste estudo está em “Anexos”, item II.

Amostras de aEPEC portadoras de diferentes subtipos de intimina são capazes de invadir células HeLa.

O teste de aderência das amostras da coleção (Fig. 8) confirmaram os resultados obtidos por Vieira et al., 2001.

Devido ao achado de Hernandez et al., (2008) da capacidade da aEPEC 1551-2 de invadir células HeLa, neste estudo, amostras de aEPEC apresentando diferentes subtipos de intimina foram avaliadas quanto a sua capacidade de invadir essa linhagem celular. Os índices de invasão apresentados a seguir representam a média das porcentagens de invasão de pelo menos 3 experimentos em duplicata e os respectivos erros padrões. A significância dos índices foi calculada pela comparação com o índice de invasão da amostra protótipo de tEPEC E2348/69. Essa análise revelou que 5 das 6 amostras de aEPEC testadas apresentaram índices de invasão significativamente maiores do que aqueles obtidos com a amostra tEPEC E2348/69, que variaram de $13,3\% \pm 2,9$ (4051-6) a $20,9\% \pm 2,4$ (0621-6), (Fig. 9 e Tabela 9).

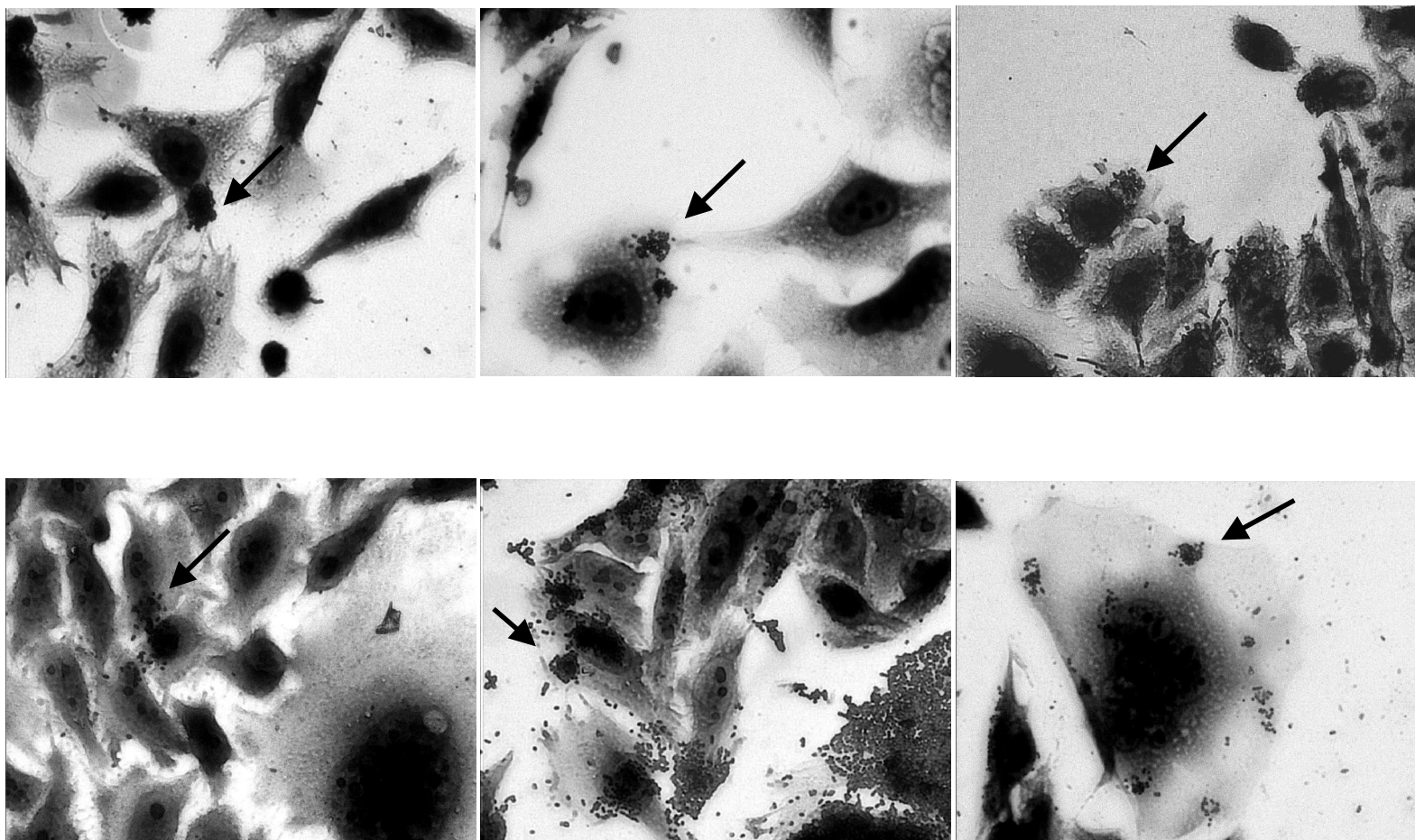


Fig. 8: Adesão das amostras selecionadas para estudo em células HeLa. As células foram incubadas por 6 h com as amostras bacterianas (Coloração May-Grünwald Aumento microscópico 400x)

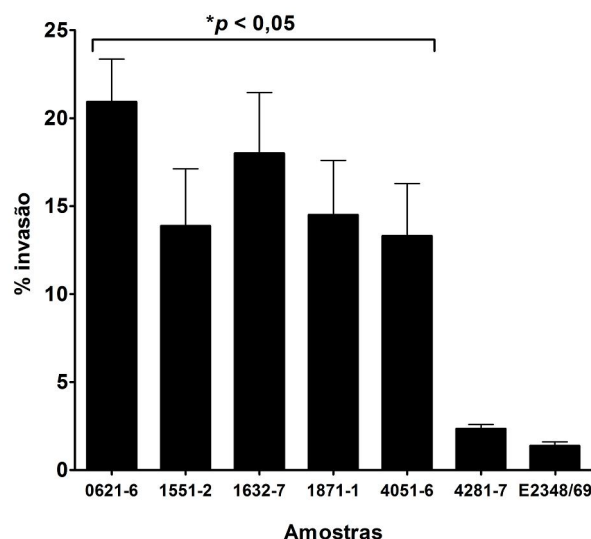


Fig.9. Índices de invasão de células HeLa por amostras de aEPEC. As células foram incubadas por 6 h com as amostras bacterianas; ao final desse período, um grupo foi lavado e incubado com solução Triton X-100 a 1%, por 30 min a 37°C, seguida de homogeneização e coleta do sobrenadante. Um segundo grupo foi incubado por mais 1 hora, na presença de gentamicina, e, posteriormente, submetido à lise celular descrita acima. Aliquotas de 100 μ L dos sobrenadantes foram diluídas e volumes de 10 μ L foram semeados na forma de “spots”, em triplicata, em ágar MacConkey, para posterior contagem de unidades formadoras de colônia (U.F.C.). Os resultados foram expressos pela razão dos números de U.F.C. provenientes dos grupos celulares tratados ou não tratados por antibiótico x 100 (%) \pm erro padrão.

Processo de invasão de aEPEC 1551-2 em células HeLa é dependente de polimerização de actina.

A participação dos filamentos de actina no processo de invasão da amostra de aEPEC 1551-2 foi avaliada pelo tratamento prévio das monocamadas de células HeLa por Citocalasina D (1 e 5 μ g/mL). O tratamento modificou o padrão de aderência (figura 10) que resultou na diminuição intensa do índice de invasão da amostra 1551-2 (de 13,3% \pm 4,1 para 1,2% \pm 1,0 e 0,4% \pm 0,3, respectivamente, fig. 11 e Tabela 7), bem como das amostras controles, *S. flexneri* e *S. enterica* sv Typhimurium (Tabela 7), porém não interferiu no número de unidades formadoras de colônias (UFC) recuperadas (Tabela 7).

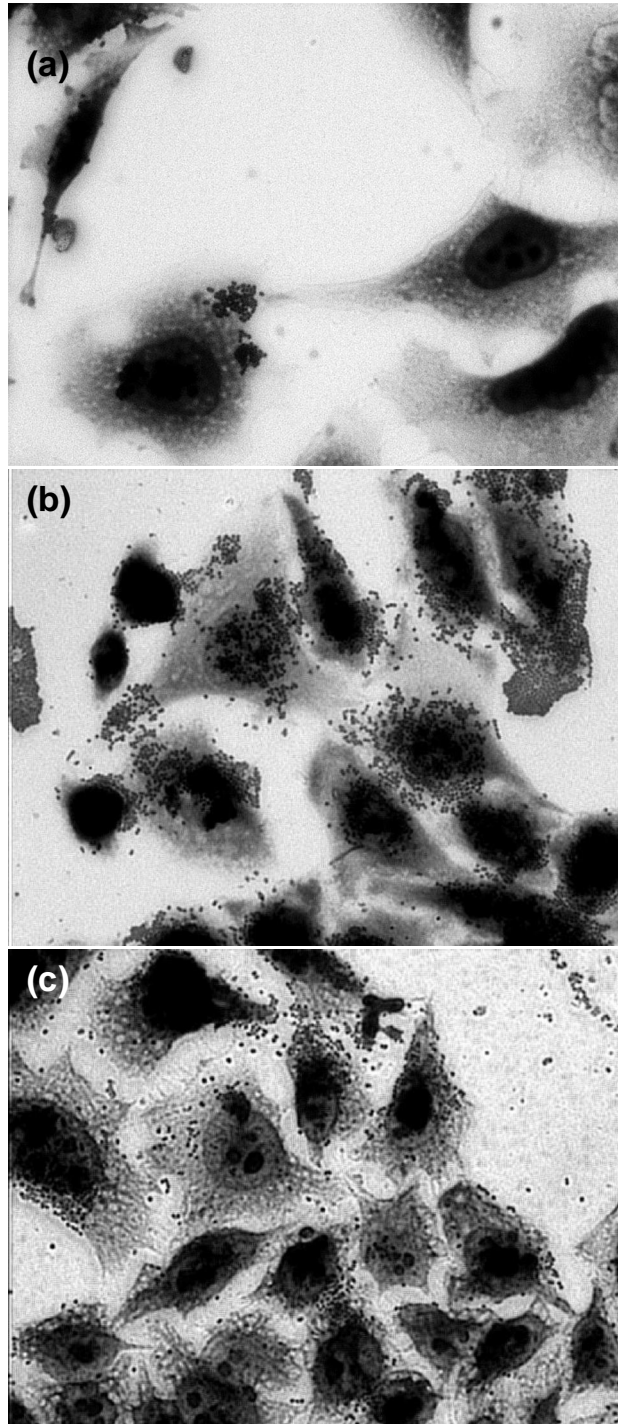


Fig. 10: Efeito do tratamento das células HeLa com diferentes concentrações de agente despolimerizante de filamentos de actina na adesão da aEPEC 1551-2. As células HeLa foram incubadas na presença de Citocalisina D por 1 h, lavadas com PBS e incubadas por 6 h com a amostra bacteriana. (a) controle negativo, (b) 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e (c) 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. (Coloração May-Grünwald Giemsa. Aumento microscópico 400x)

Tabela 7. Efeito do tratamento das monocamadas de células HeLa por diferentes concentrações de citocalasina D na capacidade invasora de aEPEC 1551-2

Amostras	Citocalasina D ($\mu\text{g/mL}$)					
	0		1		5	
	UFC (*)	%	UFC (*)	%	UFC (*)	%
aEPEC 1551-2	3,3 \pm 0,8	13,4 \pm 4,1	2,7 \pm 0,7	1,1 \pm 1,0	2,9 \pm 0,9	0,4 \pm 0,3
<i>S. enterica</i> sv Typhimurium	1,2 \pm 0,2	81,2 \pm 4,1	1,5 \pm 0,3	55,8 \pm 4,9	1,4 \pm 0,2	35,0 \pm 7,0
<i>S. flexneri</i>	0,1 \pm 0,04	68,9 \pm 10,7	0,1 \pm 0,03	15,9 \pm 9,5	0,7 \pm 0,4	11,2 \pm 5,1

Valores correspondem a % de invasão \pm erro padrão. $p < 0,05$. (*) As contagens de UFC recuperadas após o tratamento com citocalasina D não apresentaram diferenças estatisticamente significantes.

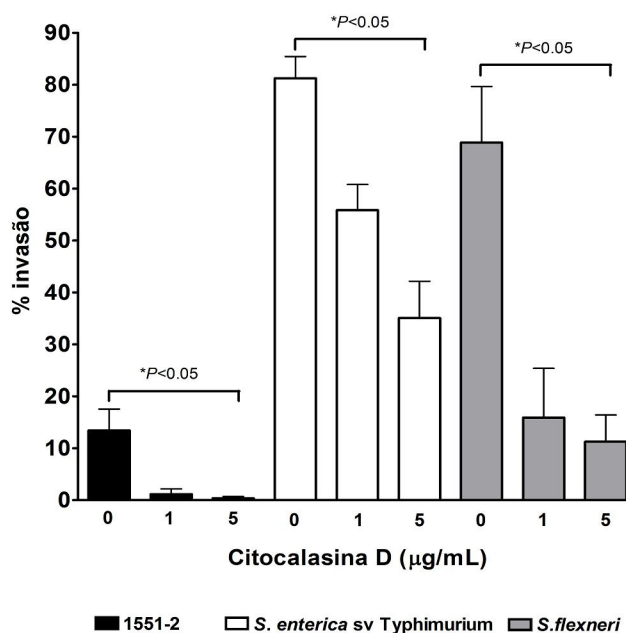


Fig.11. Índice de invasão da amostra de aEPEC 1551-2 em células HeLa tratadas com diferentes concentrações de agente despolimerizante de filamentos de actina. Células foram incubadas por 1 h com citocalasina D, lavadas e incubadas por 6 h com as amostras bacterianas. Ao final desse período, um grupo foi lavado e incubado com solução Triton X-100 a 1%, por 30 min a 37°C, seguida de homogeneização e coleta do sobrenadante. Um segundo grupo foi incubado por mais 1 hora, na presença de gentamicina, e, posteriormente, submetido à lise celular descrita acima. Alíquotas de 100 μL dos sobrenadantes foram diluídas e volumes de 10 μL foram semeados na forma de “spots”, em triplicata, em ágar MacConkey, para posterior contagem de unidades formadoras de colônia (U.F.C.). Os resultados foram expressos pela razão dos números de U.F.C. provenientes dos grupos celulares tratados ou não tratados por antibiótico x 100 (%) \pm erro padrão. $P < 0,05$.

Processo de invasão de aEPEC 1551-2 em células HeLa é independente da participação de microtúbulos.

A participação de microtúbulos no processo de invasão da amostra de aEPEC 1551-2 foi avaliada pelo tratamento prévio das monocamadas de células HeLa por Colchicina (1 e 5 $\mu\text{g/mL}$). Este tratamento não alterou o padrão de aderência da amostras aEPEC 1551-2 (Fig. 12) bem como os índices de invasão das amostras de 1551-2, *S. flexneri* e *S. enterica* sv Typhimurium (Fig. 13; tabela 8) e também não interferiu no número de unidades formadoras de colônias (UFC) recuperadas (Tabela 8).

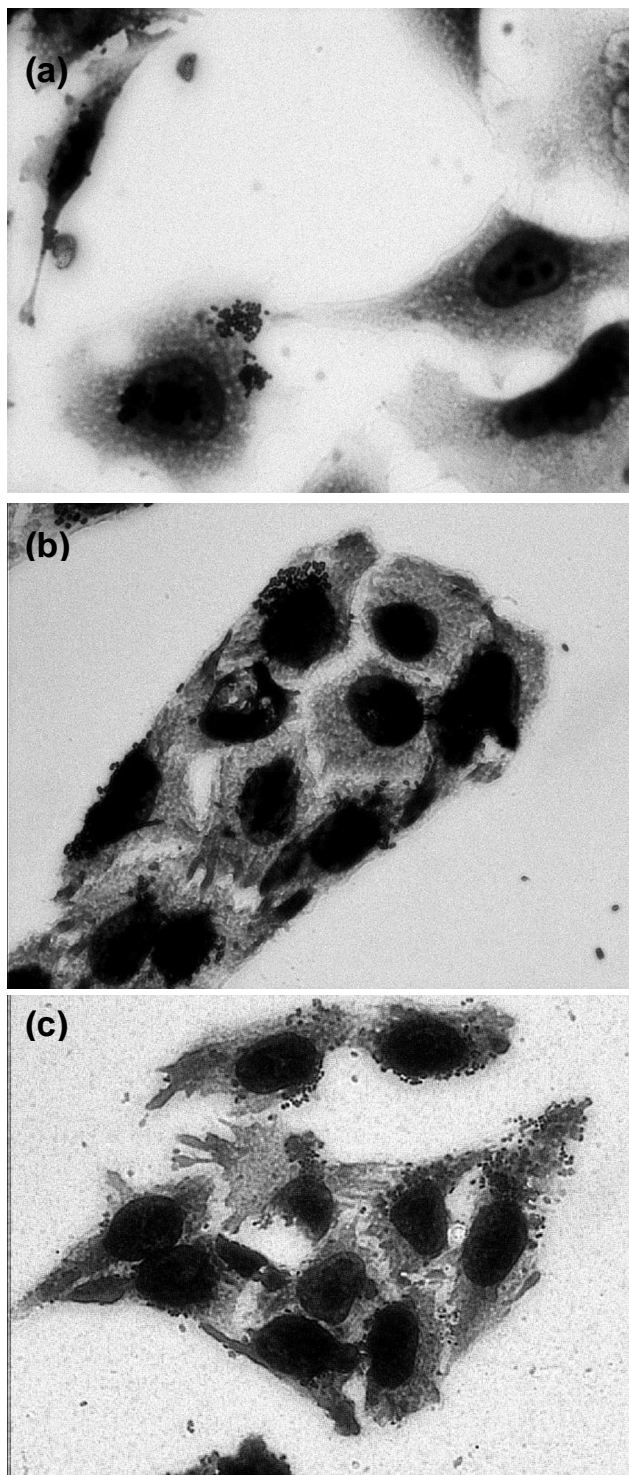


Fig. 12: Efeito do tratamento de agente despolimerizante de microtúbulos na adesão da aEPEC 1551-2. As células HeLa foram incubadas na presença de Colchicina por 1 h, lavadas com PBS e incubadas por 6 h com a amostra bacteriana. (a) controle negativo, (b) 1 µg/mL e (c) 5 µg/mL. (Coloração May-Grünwald Giemsa. (Aumento microscópico 400x)

Tabela 8. Efeito do tratamento das monocamadas de células HeLa por diferentes concentrações de Colchicina.

Amostras	Colchicina ($\mu\text{g/mL}$)					
	0		1		5	
	UFC (*)	%	UFC (*)	%	UFC (*)	%
aEPEC 1551-2	6,0 \pm 1,5	6,2 \pm 0,8	5,4 \pm 1,8	6,0 \pm 1,2	4,6 \pm 1,4	7,8 \pm 0,5
<i>S. enterica</i> sv Typhimurium	12,5 \pm 3,4	24,9 \pm 10,6	4,9 \pm 1,9	21,3 \pm 13,9	9,5 \pm 2,6	17,5 \pm 10,1
<i>S. flexneri</i>	0,8 \pm 0,5	22,0 \pm 4,8	1,3 \pm 0,8	12,8 \pm 3,5	0,5 \pm 0,17	33,2 \pm 7,1

Valores correspondem a % de invasão \pm erro padrão. $p < 0,05$. (*) As contagens de UFC recuperadas após o tratamento com colchicina não apresentaram diferenças estatisticamente significantes.

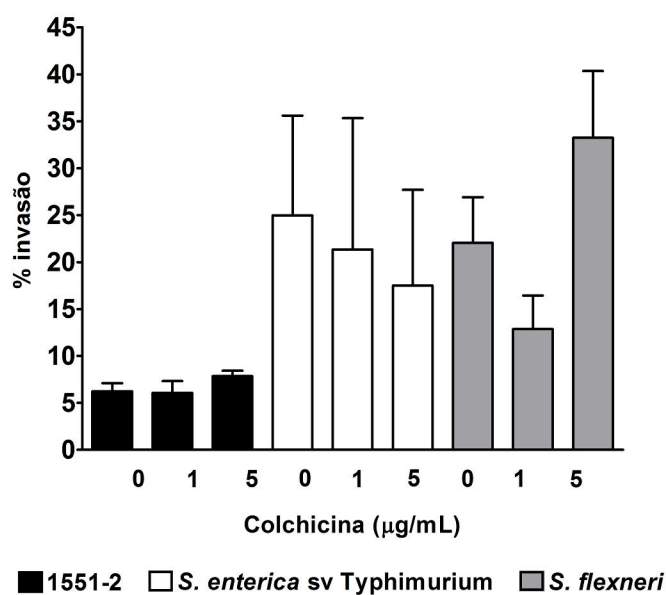


Fig.13: Índice de invasão de aEPEC 1551-2 em células HeLa tratadas com diferentes concentrações de agente despolimerizante de microtúbulo. Células foram incubadas por 1 h com colchicina, lavadas e incubadas por 6 h com as amostras bacterianas. Ao final desse período, um grupo foi lavado e incubado com solução Triton X-100 a 1%, por 30 min a 37°C, seguida de homogeneização e coleta do sobrenadante. Um segundo grupo foi incubado por mais 1 hora, na presença de gentamicina, e, posteriormente, submetido à lise celular descrita acima. Aliquotas de 100 μL dos sobrenadantes foram diluídas e volumes de 10 μL foram semeados na forma de "spots", em triplicata, em ágar MacConkey, para posterior contagem de unidades formadoras de colônia (U.F.C.). Os resultados foram expressos pela razão dos números de U.F.C. provenientes dos grupos celulares tratados ou não tratados por antibiótico $\times 100$ (%) \pm erro padrão. $P < 0,05$.

aEPEC induzem a formação de lesão AE em células T84 diferenciadas.

A ocorrência da capacidade invasoras das amostras de aEPEC foi em seguida avaliada em células intestinais cultivadas *in vitro*.

Inicialmente, células T84 foram submetidas a ensaios de aderência, que demonstrou a tendência das amostras de aEPEC estudadas de formar microcolônias na superfície de células T84 diferenciadas (Fig. 14).

As amostras estudadas haviam sido previamente avaliadas quanto à capacidade de promover a lesão AE em monocamadas de células HeLa e Caco-2 (Vieira *et al.*, 2001). Estudos em nosso laboratório têm demonstrado que as células intestinais T84 são mais sensíveis que HeLa e Caco-2 para detecção de amostras de aEPEC do sorotipo O51:H40; estas amostras foram capazes de causar lesão AE *in vivo* (Moreira *et al.*, 2008). Neste trabalho, demonstramos indiretamente, pela detecção de acúmulo de actina (teste FAS), que todas as aEPEC estudadas também são capazes de formar lesão AE em monocamadas de células T84 diferenciadas e infectadas por 6 h, confirmando o potencial de virulência destas amostras (Fig. 15)

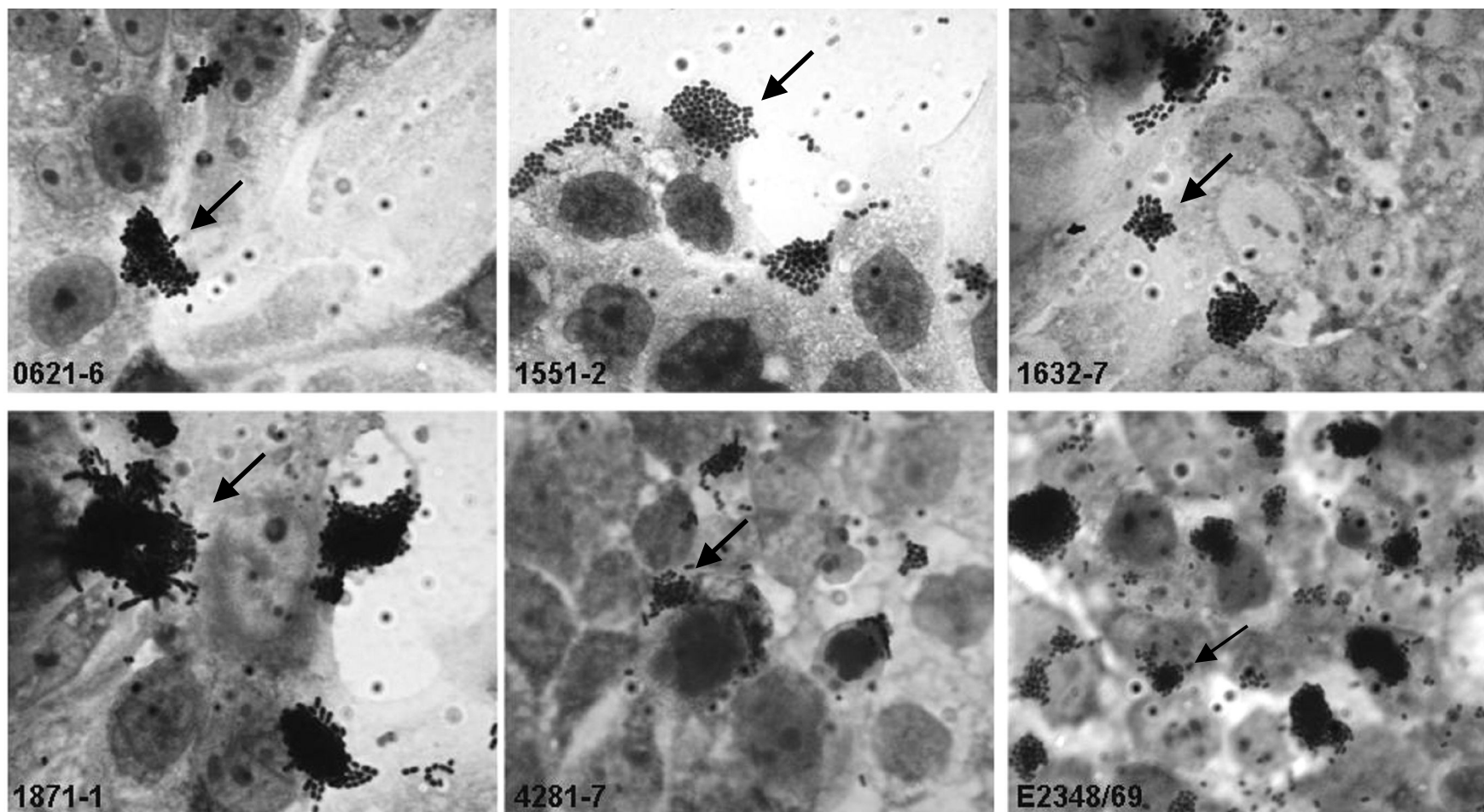


Fig. 14. Interação de amostras aEPEC e tEPEC E2348/69 com células T84 diferenciadas. Células foram cultivadas por 14 dias, incubadas por 6 h com as amostras bacterianas, lavadas com PBS, fixadas com metanol e coradas por Giemsa. (Aumento ao microscópio óptico 1000x). Setas indicam a formação de microcolônias compactas na superfície das células

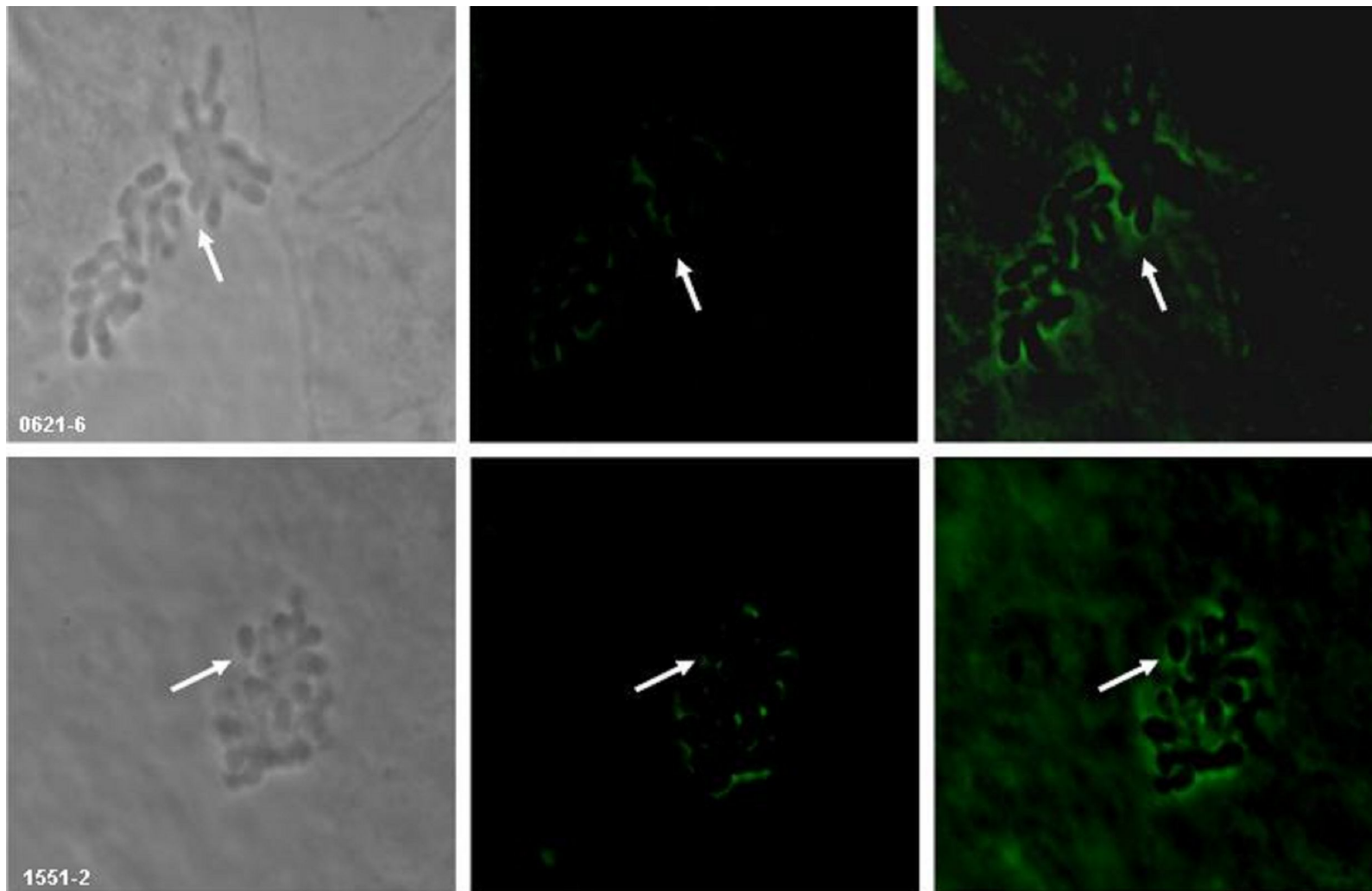


Fig. 15: Acúmulo de actina promovido por amostras de representativas da coleção de aEPEC estudada (0621-6 e 1551-2) em células T84 diferenciadas correspondentes à formação da lesão AE. Células foram cultivadas por 14 dias, incubadas por 6 h com as amostras bacterianas, lavadas com PBS, fixadas com formaldeído e marcadas pelo método de FAS. Setas indicam a formação de lesão AE (aumento microscópico 2500x).

aEPEC, portadoras de diferentes subtipos de intimina, são capazes de invadir células intestinais.

Os ensaios de invasão realizados em células T84 polarizadas e diferenciadas, demonstraram que 5 das 6 amostras de aEPEC testadas apresentaram índices de invasão significativamente maiores que a amostra protótipo tEPEC E2348/69 (Fig. 16). Estes índices variaram de 5,8% ± 1,7 (aEPEC 4281-7) a 17,8% ± 3,1 (aEPEC 1632-7). A amostra 4051-6 apresentou índices de 1,5% ± 1,2, tendo sido a única amostra da coleção que não apresentou índice de invasão significativo. Esses resultados demonstraram que amostras de aEPEC portadoras de subtipos distintos de intimina são capazes de invadir células epiteliais de origem intestinal humanas *in vitro* em diferentes níveis (tabela 9).

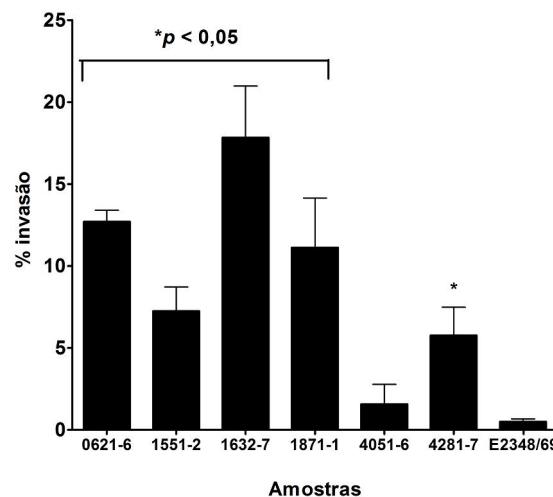


Fig.16. Índices de invasão de células T84 polarizadas e diferenciadas por amostras de aEPEC. As células foram incubadas por 6 h com as amostras bacterianas. Ao final desse período, um grupo foi lavado e incubado com solução Triton X-100 a 1%, por 30 min a 37°C, seguida de homogeneização e coleta do sobrenadante. Um segundo grupo foi incubado por mais 1 hora, na presença de gentamicina e, posteriormente, submetido à lise celular descrita acima. Alíquotas de 100 µL dos sobrenadantes foram diluídas e volumes de 10 µL foram semeados na forma de “spots”, em triplicata, em ágar MacConkey, para posterior contagem de unidades formadoras de colônia (U.F.C.). Os resultados foram expressos pela razão dos números de U.F.C. provenientes dos grupos celulares tratados e não tratados por antibiótico x 100 (%) ± erro padrão. $P < 0,05$.

Tabela 9. Índices de invasão de células HeLa e células intestinais T84 e Caco-2 polarizadas e diferenciadas por amostras de aEPEC.

Amostras	Intimina	HeLa	T84	Caco-2
0621-6	$\sigma^{(b)}$	20,9 ± 2,4	12,7 ± 0,7	NR
1551-2	$o^{(a)}$	13,8 ± 1,4	7,2 ± 1,4	7,5±1,7
1632-7	$u^{(b)}$	18 ± 3,4	17,8 ± 3,1	NR
1871-1	$\theta 2^{(b)}$	14,5 ± 3,1	11,1 ± 3,02	NR
4051-6	$o^{(c)}$	13,3 ± 2,9	1,5 ± 1,2	NR
4281-7	$t^{(b)}$	2,3 ± 0,2	5,7 ± 1,7	NR
E2348/69	$\alpha 1$	1,3 ± 0,2	0,5 ± 0,1	1,8±0,6

(a) Hernandez et al., 2008; (b) Subtipo identificado neste estudo pelo laboratório de Dr. Jorge Blanco. (c) Subtipo identificado em nosso laboratório neste estudo. NR, não realizado. Valores correspondem a % de invasão ± erro padrão. $p < 0,05$

Para confirmar a ocorrência de invasão, nós examinamos células T84 diferenciadas infectadas com as amostras de aEPEC por MET. Esta abordagem confirmou que as amostras testadas promoveram lesão AE e invadiram células T84 (Fig. 17). Nas mesmas condições, embora algumas células de tEPEC E2348/69 estivessem internalizadas, a maioria permaneceu extracelular, intimamente aderidas à superfície celular.

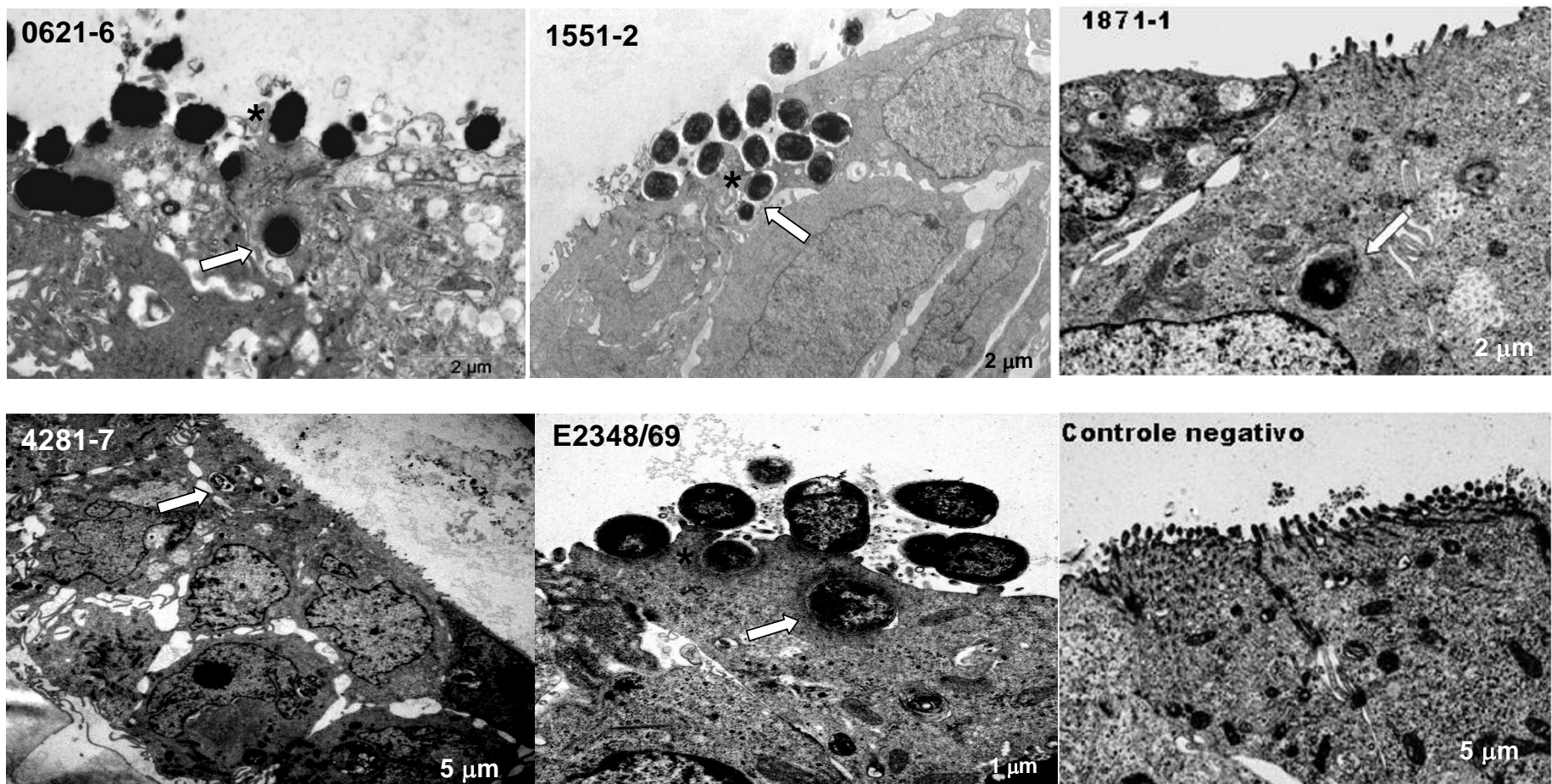


Fig.17. Interação de amostras aEPEC e tEPEC E2348/69 pela superfície apical de células T84 diferenciadas. Células foram cultivadas por 14 dias em filtro *Transwell* e incubadas por 6 h com as amostras bacterianas. Setas indicam bactérias internalizadas e asteriscos indicam lesão AE.

Interação da amostra de aEPEC 1551-2 com a superfície de células T84 não polarizadas e não diferenciadas aumenta a eficiência do processo de invasão.

Os testes de invasão com a amostra de aEPEC 1551-2 foram realizados em monocamadas não confluentes de células T84. Amostras *S. enterica* sv Typhimurium, *S. flexneri* e E2348/69 foram utilizadas como controles.

A observação da aderência da aEPEC 1551-2 às culturas celulares em diferentes estágios de diferenciação demonstrou uma aderência mais intensas às células mais jovens (Fig. 18). Os ensaios de proteção com gentamicina demonstraram que o índice de invasão da amostra 1551-2 diminuiu de $17 \pm 0,9$ para $6,8 \pm 1,8$ (tabela 10 e Fig. 19) quando o teste é realizado em monocamadas cultivadas por 5 e 14 dias, respectivamente, bem como do controle *S. flexneri* (de $34,0\% \pm 3,9$ para $11,0\% \pm 2,5$). Este tratamento promoveu um significativo aumento da invasão de *S. enterica* sv Typhimurium (de $31,6\% \pm 2,4$ para $53,9\% \pm 0,7$), mas os índices de invasão de tEPEC E2348/69 não foram afetados (de $1,5\% \pm 0,3$ para $0,6\% \pm 0,3$).

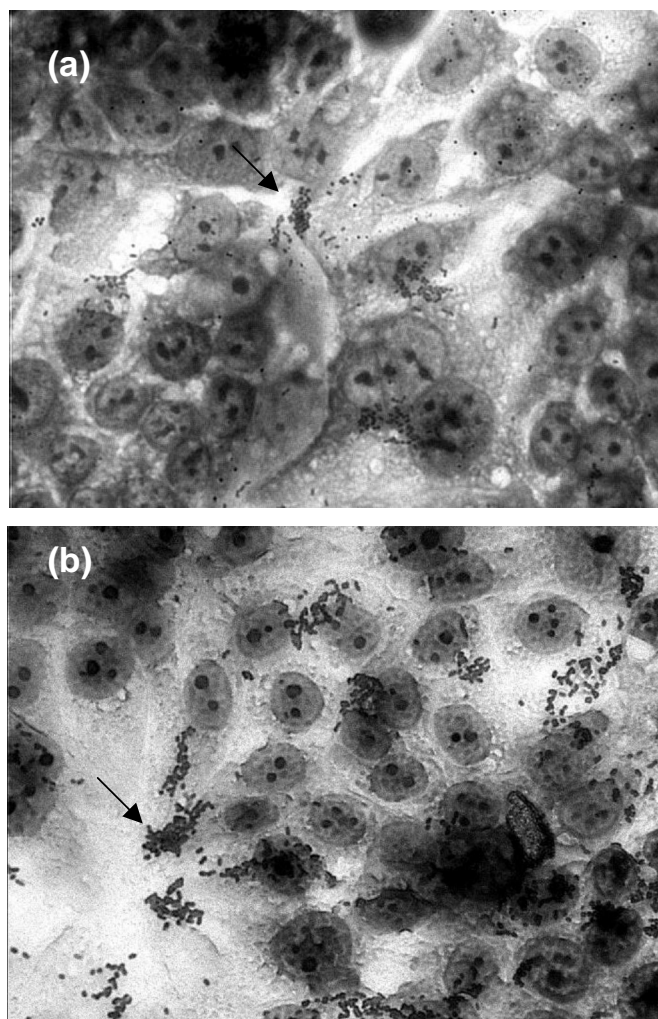


Fig. 18: Interação da amostra de aEPEC 1551-2 em células T84 em diferentes estágios de diferenciação. (a) 14 dias cultivo e (b) 5 dias de cultivo. (Coloração May-Grünwald Giemsa. (Aumento microscópico 400x). Setas indicam a formação de microcolônias preferencialmente na superfície de células não diferenciadas.

Tabela 10. Efeito do estágio de diferenciação de células T84 na intensidade do processo de invasão.

Amostras	Período de cultivo celular (dias)	
	5	14
aEPEC 1551-2	17,0 ± 0,09	6,8 ± 1,8
<i>S. enterica</i> sv Typhimurium	31,6 ± 2,4	53,9 ± 0,7
<i>S. flexneri</i>	34,0 ± 3,9	11,0 ± 2,5
E2348/69	1,5 ± 0,3	0,6 ± 0,3

Valores correspondem a % de invasão ± erro padrão. $p < 0,05$

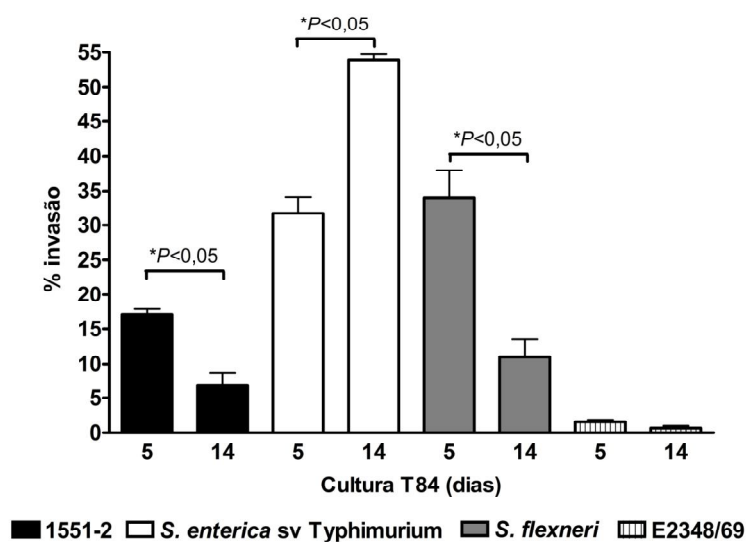


Fig. 19. Índice de invasão da amostra de aEPEC 1551-2 em células T84 em diferentes estágios de diferenciação. As células foram incubadas por 6 h com as amostras bacterianas. Ao final desse período, um grupo foi lavado e incubado com solução Triton X-100 a 1%, por 30 min a 37°C, seguida de homogeneização e coleta do sobrenadante. Um segundo grupo foi incubado por mais 1 hora, na presença de gentamicina, e, posteriormente, submetido à lise celular descrita acima. Alíquotas de 100 µL dos sobrenadantes foram diluídas e volumes de 10 µL foram semeados na forma de “spots”, em triplicata, em ágar MacConkey, para posterior contagem de unidades formadoras de colônia (U.F.C.). Os resultados foram expressos pela razão dos números de U.F.C. provenientes dos grupos celulares tratados ou não tratados por antibiótico x 100 (%) ± erro padrão. $P < 0,05$.

Rompimento de *tight junctions* de monocamadas de células T84 aumenta a eficiência da invasão da amostra aEPEC 1551-2.

A avaliação da invasão de enterócitos pela superfície basolateral foi realizada pelo pré-tratamento das células T84 diferenciadas com EGTA. Depois deste procedimento, as células foram infectadas com aEPEC 1551-2 e tEPEC E2348/69. *S. enterica* sv Typhimurium e *S. flexneri* foram utilizadas como controles.

O tratamento por EGTA resultou no aumento da intensidade da adesão bacteriana às monocamadas (Fig. 20)

Este tratamento promoveu um significativo aumento da invasão de aEPEC 1551-2 (de 5,4%±1,5 para 13,7%±2,3 e 22,6%±5,4) e *S. flexneri* (de 11,0% ± 2,5 para 47,8%± 8 e 42,9%± 3,6) (tabela 11 e Fig. 21), mas os índices de invasão de *S. enterica* sv e tEPEC E2348/69 não foram afetados pelo rompimento das *tight junctions* (Tabela 11).

As células T84 também foram cultivadas por 14 dias na superfície inferior de filtro *Transwell*. Desta maneira, foi possível o contato bacteriano com a superfície basolateral de monocamada diferenciada sem tratamento químico. As preparações foram examinadas por MET e as imagens sugeriram invasão bacteriana com formação mais intensa de vacúolos (Fig. 21).

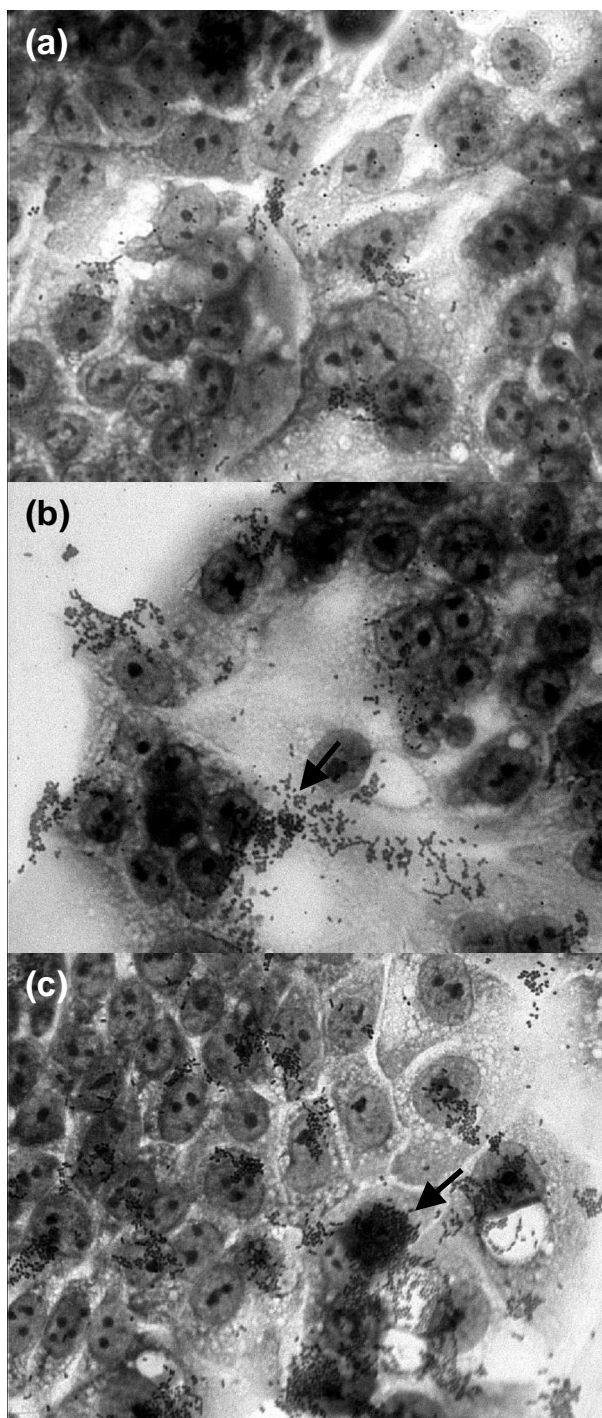


Fig. 20: Interação da amostra de aEPEC 1551-2 em células T84 diferenciadas e tratadas por EGTA que promove o rompimento de *tight junctions*. As células T84 foram incubadas na presença de EGTA por 1 h, lavadas com PBS e incubadas por 6 h com a amostra bacteriana. (a) controle não tratado, (b) 1 mM e (c) 5 mM. (Coloração May-Grünwald Giemsa. Aumento microscópico 400x) Setas indicam o aumento a interação bacteriana após o rompimento das *tight junctions*.

Tabela 11. Efeito do tratamento das monocamadas de células T84 diferenciadas por diferentes concentrações de EGTA.

Amostras	EGTA (mM)		
	0	1	5
aEPEC 1551-2	5,4 ± 1,5	13,7 ± 2,2	22,6 ± 5,4
<i>S. enterica</i> sv Typhimurium	76,4 ± 8,0	68,3 ± 8,5	72,8 ± 7,8
<i>S. flexneri</i>	11 ± 2,5	47,0 ± 8,1	42,9 ± 3,6
E2348/69	0,6 ± 0,3	4,9 ± 2,6	5,3 ± 3,0

Valores correspondem a % de invasão ± erro padrão. $p < 0,05$

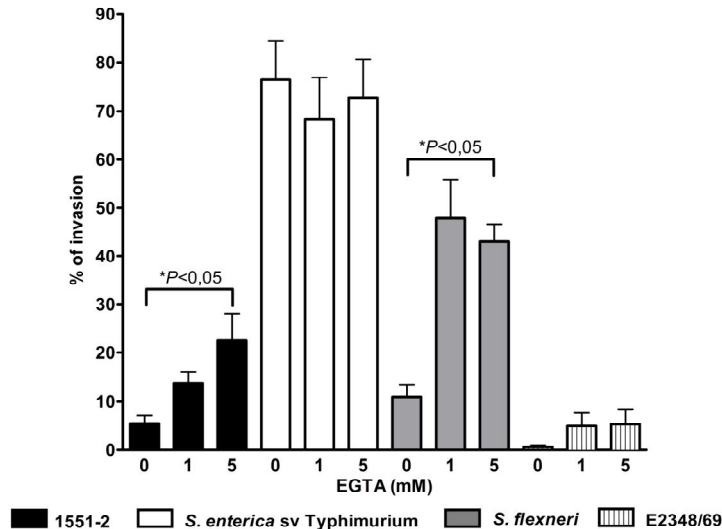


Fig. 21: Índice de invasão da amostra de aEPEC 1551-2 em células T84 diferenciadas e tratadas por EGTA, o que promove o rompimento de *tight junctions*. As monocamadas foram tratadas com diferentes concentrações de EGTA por 1 h, lavadas com PBS e incubadas por 6 h com as amostras bacterianas. Ao final desse período, um grupo foi lavado e incubado com solução Triton X-100 a 1% 30 min a 37°C, seguida de homogeneização e coleta do sobrenadante. Um segundo grupo foi incubado por mais 1 hora, na presença de gentamicina, e, posteriormente, submetido à lise celular descrita acima. Alíquotas de 100 µL dos sobrenadantes foram diluídas e volumes de 10 µL foram semeados na forma de “spots”, em triplicata, em ágar MacConkey, para posterior contagem de unidades formadoras de colônia (U.F.C.). Os resultados foram expressos pela razão dos números de U.F.C. provenientes dos grupos celulares tratados ou não tratados por antibiótico x 100 (%) ± erro padrão. $P < 0,05$.

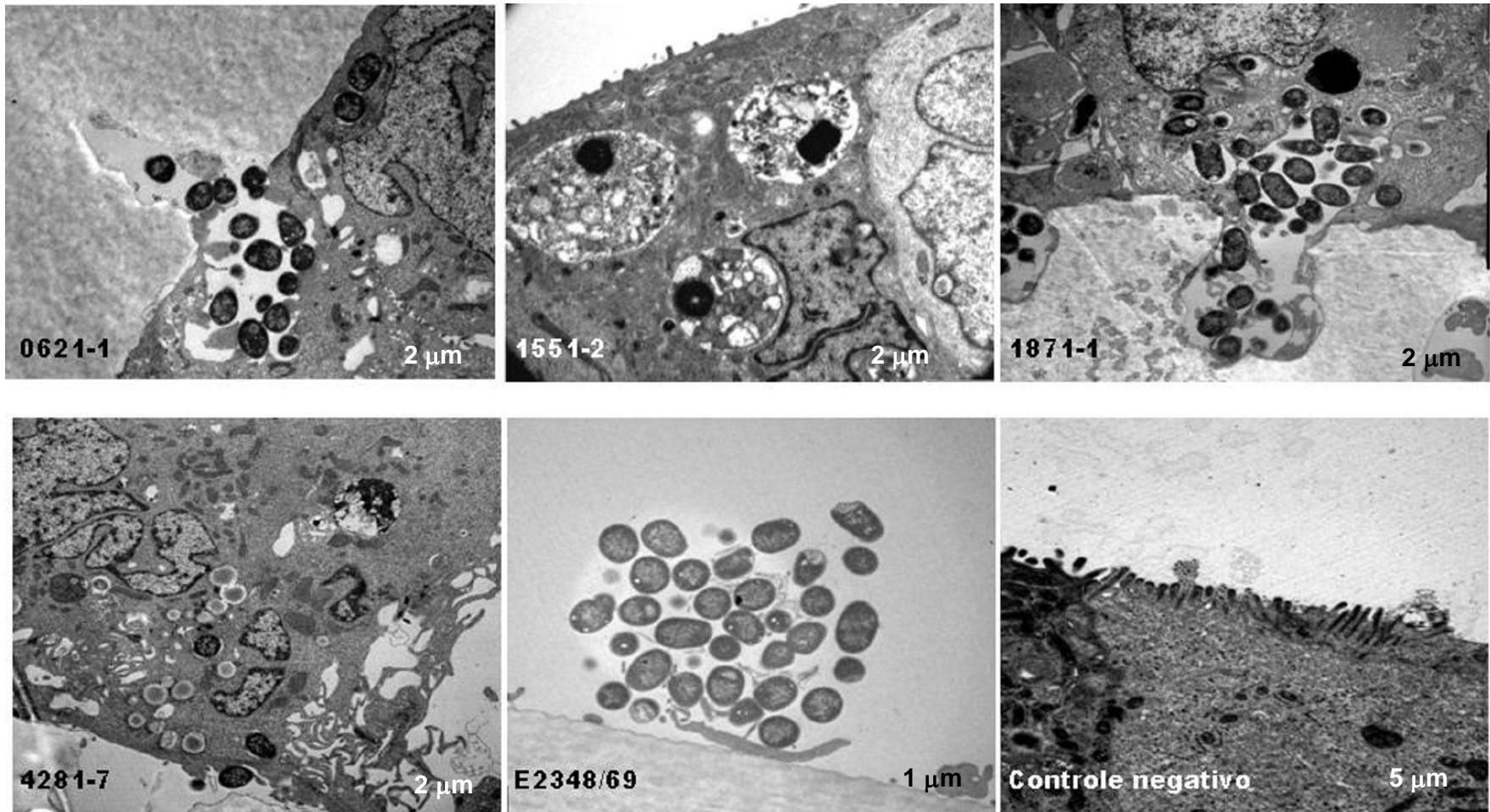


Fig.22. Interação de amostras aEPEC e tEPEC E2348/69 após infecção da superfície basolateral de células T84 diferenciadas. Células foram cultivadas por 14 dias em filtro *Transwell* e incubadas por 6 h com as amostras bacterianas.

aEPEC 1551-2 é capaz de invadir células intestinais Caco-2

O estudo da ocorrência de invasão de células Caco-2 polarizadas e diferenciadas foi feito somente com a amostra aEPEC 1551-2. A figura 23 demonstra a característica da adesão da aEPEC 1551-2 e tEPEC E2348/69.

Os experimentos de proteção com gentamicina demonstraram índices de invasão de $7,5 \pm 1,7$ e $1,8 \pm 0,6$ para as amostras aEPEC 1551-2 e tEPEC E2348/69, respectivamente (tabela 8 e Fig. 24).

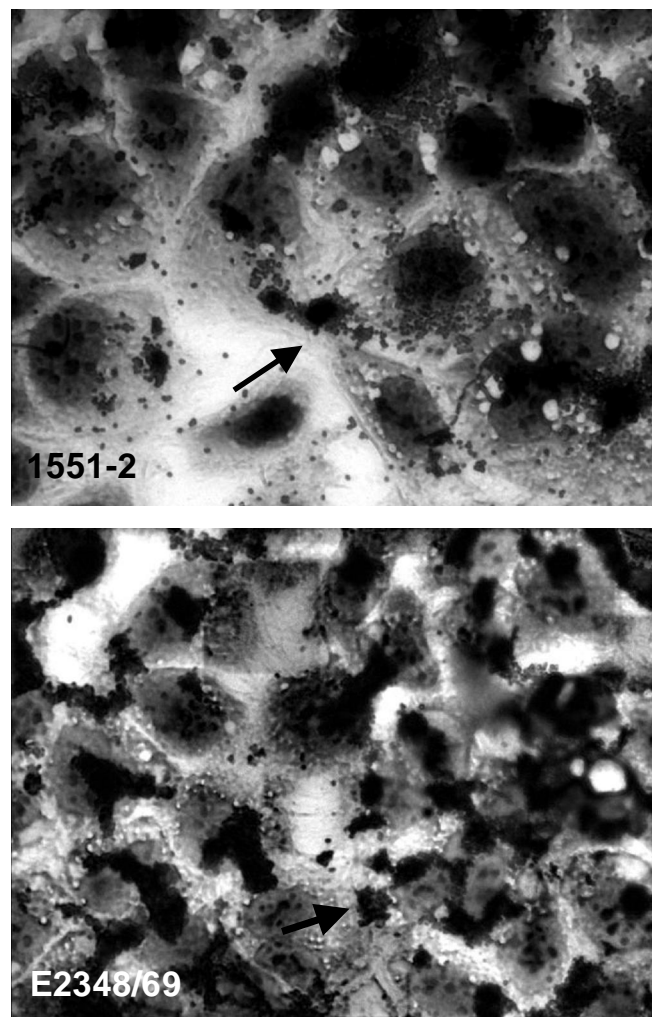


Fig. 23: Interação de células Caco-2 diferenciadas e aEPEC 1551-2 e tEPEC E2348/69. As células foram incubadas por 6 h com as amostras bacterianas. (Coloração May-Grünwald Giemsa. (Aumento microscópico 400x) Setas indicam a formação de microcolônias na superfície celular.

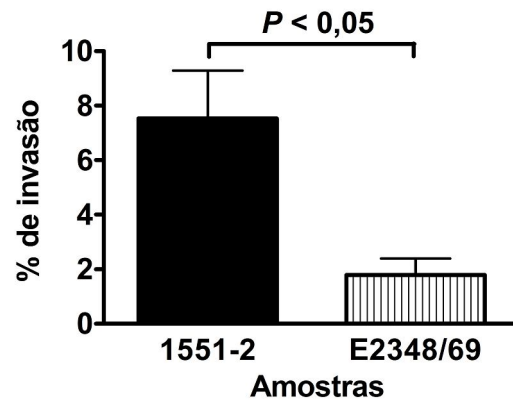


Fig.24. Índices de invasão de células Caco-2 diferenciadas por aEPEC 1551-2. As células foram incubadas por 6 h com as amostras bacterianas. Ao final desse período, um grupo foi lavado e incubado com solução Triton X-100 a 1%, por 30 min a 37°C, seguida de homogeneização e coleta do sobrenadante. Um segundo grupo foi incubado por mais 1 hora, na presença de gentamicina, e, posteriormente, submetido à lise celular descrita acima. Aliquotas de 100 μ L dos sobrenadantes foram diluídas e volumes de 10 μ L foram semeados na forma de "spots", em triplicata, em ágar MacConkey, para posterior contagem de unidades formadoras de colônia (U.F.C.). Os resultados foram expressos pela razão dos números de U.F.C. provenientes dos grupos celulares tratados ou não tratados por antibiótico x 100 (%). $P < 0,05$.

A observação do aumento da intensidade de invasão pela superfície basolateral das células T84, a exemplo das Shigellas, sugeriu que *in vivo* aEPEC poderia alcançar a região contendo células fagocitárias.

Dessa forma, os ensaios foram realizados também em células dendríticas XS52 e macrófagos HL60. A interação com células XS52 não foi muito eficiente devido à baixa aderência dessa linhagem ao substrato (Fig. 25); os ensaios de aderência com as células HL60 sugeriram a formação de vacúolos (Fig. 26).

Entretanto, os ensaios de invasão nestas duas linhagens celulares não foram concluídos, pois o protocolo do ensaio inclui várias lavagens, o que promoveu sistematicamente o destacamento das monocamadas dessas duas linhagens, sendo que o tratamento das lamínulas por poli-L-lisina não foi eficiente para solucionar esse problema.

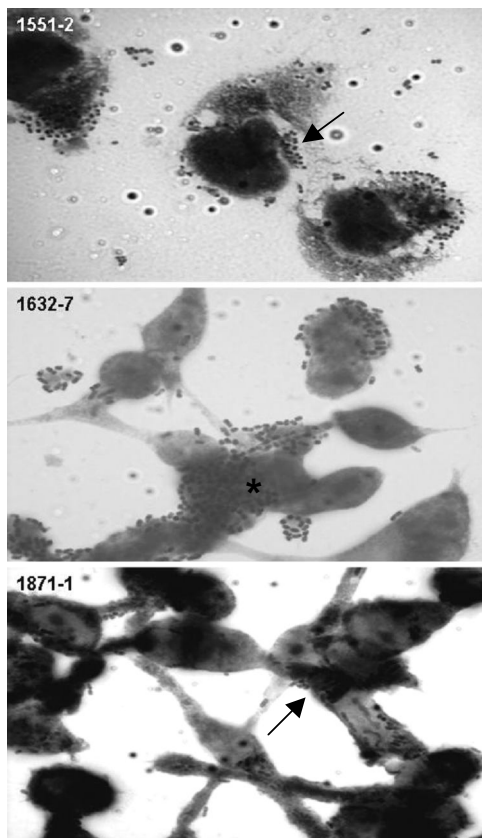


Fig. 25. Interação de amostras aEPEC com células dendríticas XS52. Células foram cultivadas por 24 h e incubadas por 6 h, a 37°C, com as amostras bacterianas. (Giemsa – aumento ao microscópio óptico 1000x). Note a formação de microcolônia (setas) e aderência localizada-like (*).

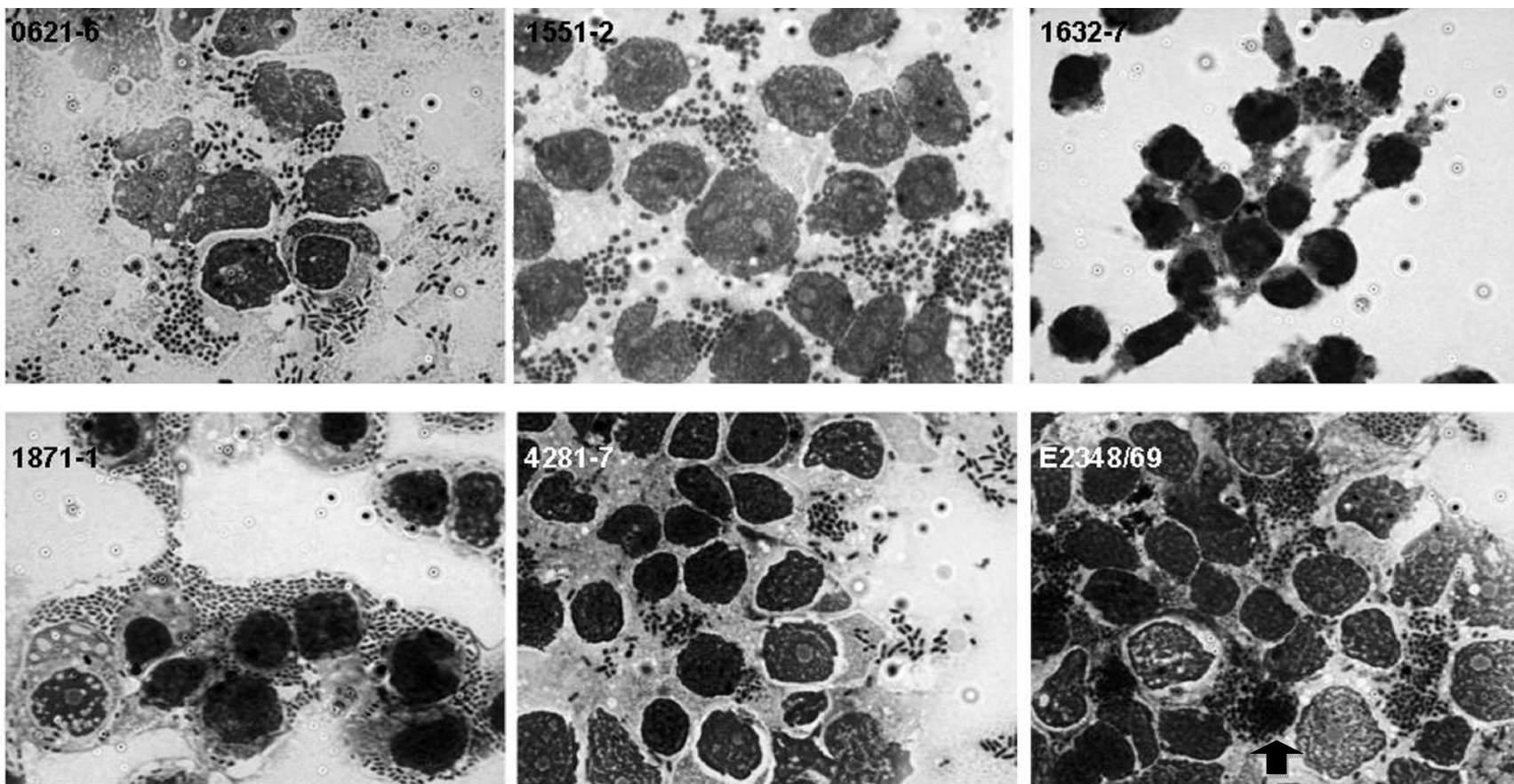


Fig.26: Interação de amostras aEPEC e tEPEC E2348/69 com células HL60 diferenciadas em macrófagos. Células foram cultivadas por 24 h e incubadas por 6 h com as amostras bacterianas. (Giemsa – aumento ao microscópio óptico 1000x). Note que não há formação de microcolônias nas amostras de aEPEC e a distribuição sugere internalização bacteriana. Seta indica formação de microcolônias de tEPEC E2348/69.

Obtenção de amostra 1551-2 mutante em *tir* com vetor suicida pJP5603

De acordo com as observações de Hernandez *et al.*, (2008) intimina (omicron) da amostra aEPEC 1551-2 é responsável pela formação de microcolônias compactas e invasão. Para avaliar o envolvimento de Tir neste processo, optamos pela mutagênese do gene *tir* com a técnica de vetor suicida pJP5603.

O produto da amplificação de um fragmento interno ao gene *tir* de 500 pb da amostra selvagem 1551-2 (*primers* TirEPEC F/R) foi clonado no vetor pGEM-T Easy (Promega). O clone (pDY1) foi digerido com a enzima EcoRI para extração do fragmento de *tir* que foi, em seguida, clonado no sítio de EcoRI do vetor pJP5603, resultando no plasmídeo (pDY1.1). Este plasmídeo foi utilizado para transformar a amostra de *E. coli* DH5 α - λ Pir. Os clones assim obtidos foram avaliados por PCR, pDY2 foi extraído e transformado na *E. coli* S17- λ Pir; a amostra transformante foi utilizada como doadora nos experimentos de conjugação com a amostra selvagem 1551-2.

Os experimentos de conjugação não resultaram em transconjugantes. Esse protocolo de mutagênese foi repetido com alteração do par de *primers* (combinação do *primers* TirEPEC F/ TirY474; TirEH F/R) e desenho de novos pares de *primers* (TirDY F/R). Essa última alteração resultou em transconjugantes quem não perderam as características da amostra selvagem. Por essa razão, o protocolo de mutagênese foi substituído pela técnica de mutagênese com λ red.

Obtenção de amostra 1551-2 mutante em *tir* por λ Red.

Durante o estágio sanduíche, retomamos a obtenção da amostra mutante no gene *tir* pelo sistema de λ Red, como descrito em Material e Métodos.

Após várias tentativas sem sucesso, realizamos as seguintes modificações no protocolo:

1. Substituição do pKD46 por pKD43;
2. Substituição do pKD4 por pKD3 (cloranfenicol resistente);
3. Aumento da concentração de L-arabinose;
4. Diálise do produto de PCR (água) antes da eletroporação;
5. Transformação por choque térmico;
6. Substituição de Taq polimerase por Phusion (polimerase de alta fidelidade);
7. Sequenciamento das regiões mais externas do gene *tir* para síntese de novos *primers*.

Alternativamente, o protocolo original foi realizado também para a obtenção de mutante no gene *escC* (*primers* *escC-Nearby* e Δ *escC*) e de *map* a *cesT* (*primers* *MapDY* e *cesT*, tabela 4). Essas tentativas também não foram bem sucedidas. Entretanto, em virtude da finalização do estágio, os experimentos de mutagênese foram interrompidos.

Obtenção de amostra 1551-2 mutante em *escN* com vetor suicida pJP5603

A amostra 1551-2 tem por característica de aderência a formação de microcolônias compactas na superfície de células HeLa.

O produto da amplificação de um fragmento interno ao gene *escN* de 480 pb da amostra selvagem 1551-2 (*primers* EscN F/R) foi clonado no vetor pGEM-T Easy (Promega). O clone (pDY2) foi digerido com a enzima EcoRI para extração do fragmento de *tir* que foi, em seguida, clonado no sítio de EcoRI do vetor pJP5603, resultando no plasmídeo (pDY3). Este plasmídeo foi utilizado para transformar a amostra de *E. coli* DH5 α - λ Pir. Os clones assim obtidos foram avaliados por PCR, pDY3 foi extraído e transformado na amostra de *E. coli* S17- λ Pir; a amostra transformante foi utilizada como doadora nos experimentos de conjugação com a amostra selvagem 1551-2. A inserção do plasmídeo recombinante pDY3 em *escN* foi confirmada, através de PCR, utilizando-se como *forward* o *primer* M13 (presente no vetor suicida pJP5603) e como *reverse* o *primer* EscN-S-20 (presente no DNA cromossômico da amostra selvagem 1551-2 previamente descrito por Gauthier et al. (2003) (Fig. 27).

Nossos resultados, baseados em observações ao microscópio óptico (Fig. 28), sugerem que a mutagênese em *escN* preservou tendência à formação de microcolônias, ainda que raras, porém aboliu a capacidade de formar lesão AE (teste FAS).

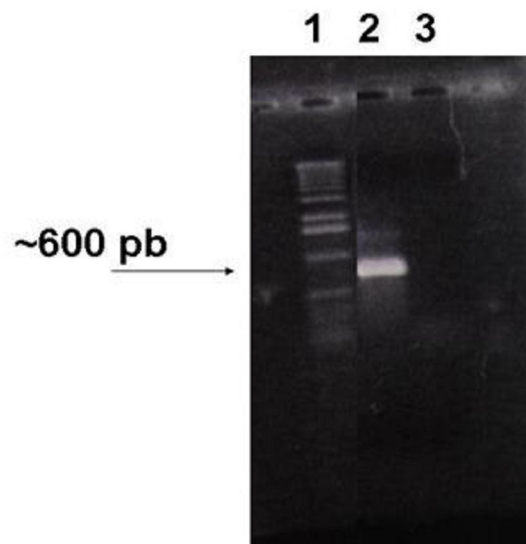


Fig. 27: PCR para confirmação da mutação em *escN*. Canaleta 1: padrão de peso molecular; canaleta 2: 1551-2(*escN*::pDY3), Canaleta 3: amostra selvagem 1551-2. Observa-se a presença de uma banda de aproximadamente 600 pb somente na amostra mutada em *escN* e a ausência dessa banda na amostra selvagem.

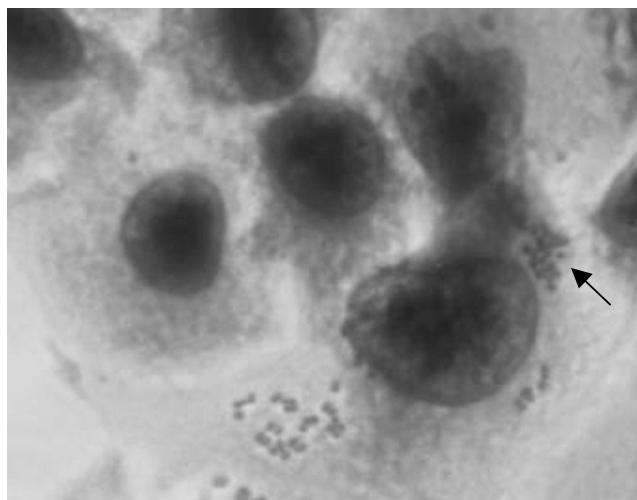


Fig. 28: Interação da amostra 155-2::*escN* com células HeLa. Seta indica formação de microcolônia na superfície de células HeLa. (Giemsa, aumento ao microscópio 2500x).

Ao caracterizar uma coleção de aEPEC, Vieira et al., (2001) identificaram 9 amostras com capacidade de formar microcolônias na superfície de células HeLa, em ensaios de 6 h, num padrão de aderência similar ao AL de tEPEC. Estudando uma dessas amostras, aEPEC 1551-2, Hernandez et al., (2008) demonstraram que essa microcolônia na verdade consistia em um processo de invasão. Nesse estudo, o índice de invasão da aEPEC 1551-2 foi cerca de 3 vezes maior que aquele da amostra protótipo tEPEC E2348/69 testada nas mesmas condições. Também nesse trabalho foi demonstrado que essa invasão é mediada por intimina do subtipo omicron e pela sua especificidade de interação com receptor Tir.

Neste estudo, investigamos se a amostra 1551-2 pode invadir outras linhagens celulares e se outra amostra de aEPEC expressando intimina omicron e amostras expressando diferentes subtipos de intimina também seriam invasoras.

Em colaboração com o grupo de Dr. Alexander Schmidt (Universität Münster), realizamos uma caracterização adicional de 20 amostras da nossa coleção, inicialmente pela análise por PCR Multiplex (Tabela 6). Essa metodologia confirmou o patótipo identificado anteriormente por meio de PCR convencional e hibridação com sondas radioativas (Vieira et al., 2001).

Assim, aleatoriamente, foram selecionadas as amostras 0621-6, 1551-2, 1632-7, 1871-1 e 4281-7 para os ensaios de interação com diferentes tipos celulares.

O sequenciamento do gene *tir* da amostra 1551-2 revelou que a sequência deste gene é idêntica à do gene que codifica Tir na amostra de aEPEC 4051-6, sorotipo O104:H12, de nossa coleção (Fig. 7) (Ooka et al., 2007). Surpreendentemente, essa amostra, quando testada por PCR, foi positiva para intimina do subtipo omicron. Interessantemente, aEPEC 4051-6 e 1551-2

apresentam o mesmo subtipo de intimina e a mesma sequência do gene *tir*. Com base nestas características semelhantes aEPEC 4051-6 foi incluída nos ensaios de interação

A identificação dos subtipos de intimina das outras 4 amostras selecionadas para o estudo foi realizada pelo grupo do Dr. Jorge Blanco (Universidade de Santiago de Compostela). O seqüenciamento do gene *eae* demonstrou que das 4 amostras, 3 são portadoras de 3 novos subtipos de intimina: upsilon, tau e teta-2 (Tabelas 6 e 9). O gene *eae-u* mostrou uma identidade de 94% com o gene *eae-11*. O gene *eae-θ2* é muito similar (99%) ao *eae-θ* descrito por Tarr e Whittam (2002) e *eae-γ2* descrito por Oswald *et al.* (2000) (Tabela em “Anexos” item II). Esta variedade de subtipos de intimina reflete a diversidade genética das aEPEC isoladas em nosso meio.

Além da 1551-2, entre as outras 5 amostras de aEPEC testadas, 4 invadiram células HeLa com índices significativamente maiores que a tEPEC E2348/69 (Fig. 10 e tabela 9). Estes dados confirmam que a invasão de células HeLa não é encontrada exclusivamente em amostras expressando intimina subtipo omicron. Entretanto, a aEPEC, 4281-7, portadora do subtipo T, não apresentou índice de invasão estatisticamente significativo.

A fim de identificar as estruturas celulares e os processos que estão envolvidos na invasão de células HeLa pela aEPEC 1551-2, nós tratamos estas células com agentes que afetam o citoesqueleto tais como citocalasina D (compromete a formação de microfilamentos de actina) ou colchicina (inibidor da função de microtúbulos) antes da infecção. A invasão diminuiu significativamente após o tratamento com citocalasina D, como observado com as amostras invasoras controles, *S. enterica* sv Typhimurium e *S. flexneri* (Tabela 7 e Fig. 12). Estes dados

mostram que o citoesqueleto funcional é necessário para a tomada de aEPEC 1551-2. Além disso, estes dados sugerem que a formação da lesão AE pode ser necessária para o processo de internalização, uma vez que a inibição da polimerização da actina previne a formação da lesão AE e diminui o índice de invasão. Esses resultados corroboram com as observações de Hernandes *et. al.*, (2008) que demonstraram que a mutagênese do gene *eae* da amostra aEPEC 1551-2 aboliu a formação da lesão AE e o processo de invasão. De maneira contrária, o índice de invasão da aEPEC 1551-2 não foi alterado pelo pré-tratamento da monocamada por colchicina (Tabela 8 e Fig. 14), indicando que não há participação de microtúbulos no processo de invasão.

Células HeLa são largamente utilizadas para estudar as interações bacterianas com células epiteliais, porém elas não representam um tipo celular adequado para mimetizar infecções do intestino humano. Para examinar se a amostra 1551-2 poderia invadir células intestinais, nós infectamos células Caco-2 e T84, cultivadas por 14 dias, tempo necessário para polarização e diferenciação.

Nos ensaios de proteção com gentamicina realizados nas células T84 diferenciadas, aEPEC 1551-2 e outras 4 amostras foram significativamente mais invasoras que a tEPEC E2348/69, somente a amostra 4051-6 (intimina omicron) não apresentou índice de invasão estatisticamente significante (Tabela 10 e Fig. 16). De fato, tem sido demonstrado que tEPEC não é capaz de invadir eficientemente células epiteliais totalmente diferenciadas (Gabastou *et al.*, 1995). Para confirmar a ocorrência da invasão dessas amostras, nós examinamos células T84 infectadas com as amostras de aEPEC por microscopia eletrônica de transmissão. Esta abordagem confirmou que 5 das 6 amostras invasoras nos testes de proteção com gentamicina promoveram a formação de lesão AE e também foram

internalizadas (Fig. 17). Nessas mesmas condições, embora algumas células de tEPEC E2348/69 estivessem internalizadas, a maioria delas permaneceu extracelular e intimamente associadas a superfície celular.

Tight junctions de células intestinais polarizadas usualmente representam uma barreira para a invasão bacteriana. Para avaliar se a invasão pela superfície basolateral seria mais eficiente, realizamos diferentes tratamentos das monocamadas de células T84.

Inicialmente cultivamos as células T84 por 5 ou 14 dias. Observamos que a invasão de aEPEC 1551-2 foi mais eficiente em células não diferenciadas do que nas células diferenciadas. O mesmo foi observado com a amostra de *S. flexneri*, outra espécie bacteriana cujo processo de invasão ocorre pela superfície basolateral (Tabela 10 e Fig. 19).

Alguns estudos mostraram índices de invasão bacteriana maiores quando células polarizadas são pré-tratadas com agente químico que rompe as *tight junctions* e expõe receptores da superfície basolateral (Rosa et al., 2001; Kim e Loessner, 2008). Observações similares têm sido feitas com bactérias infectando células eucarióticas não-diferenciadas (Rosa et al., 2001; Kim e Loessner, 2008). Estes estudos mostraram a associação do estágio de diferenciação celular e o estabelecimento da invasão (Gabastou et al.,1995; Rosa et al.,2001; Kim e Loessner, 2008). Portanto, a fim de examinar se a aEPEC 1551-2 poderia invadir pela superfície basolateral de células T84 diferenciadas, estas células foram tratadas com diferentes concentrações de EGTA para romper as *tight junctions*. Este tratamento promoveu um significativo aumento da invasão de 1551-2 e de *S. flexneri*, (Tabela 11 e Fig. 21), mas os índices de invasão de *S. enterica* sv Typhimurium e tEPEC E2348/69 não foram afetados pelo tratamento como foi

descrito previamente (Kim e Loessner, 2008). Células T84 foram também cultivadas por 14 dias, na superfície inferior de uma membrana de filtro Transwell. Desta maneira, o contato bacteriano com a superfície basolateral pode ser alcançado sem tratamento químico das células T84. As preparações foram examinadas por MET e as imagens sugerem uma invasão bacteriana aumentada e que as bactérias estavam dentro de vacúolos (Fig. 22), confirmando os resultados obtidos com células T84 tratadas com EGTA. Esta observação pode ser importante na diarreia infantil, uma vez que, em recém nascidos e crianças, a barreira intestinal não está totalmente desenvolvida (Kim e Loessner, 2008).

Como observado em *E. coli* uropatogênica (Mulvey et al., 2001), além de representar um mecanismo de escape da resposta imune, a invasão poderia também ser considerada uma estratégia para o estabelecimento de doença persistente. É possível, que a associação de aEPEC com diarreia persistente relatada previamente (Nguyen et al., 2006, Afset et al., 2004) seja resultado, entre outros fatores, de um processo de invasão.

O ensaio quantitativo de proteção com gentamicina confirmou a habilidade invasora das amostras aEPEC 1551-2 em células Caco-2 diferenciadas, cujo índice de invasão foi semelhante àquele encontrado nos ensaios com células T84 diferenciados (Tabela 9 e Fig. 24). Os dois tipos celulares correspondem às porções de intestino delgado e grosso, respectivamente. Este resultado pode sugerir que não haja um sítio preferencial de invasão para aEPEC 1551-2 *in vivo*.

Já foi relatado na literatura que a interação da adesina Afa/Dr (DAEC) e integrinas $\alpha 5 \beta 1$ também resulta em internalização bacteriana (Plancon et al., 2003). A adaptação ao ambiente intracelular pode ajudar as bactérias a evitar estresses físicos (tais como pH ácido ou o fluxo de secreções ou sanguíneo) e muitos outros

mecanismos de defesa do hospedeiro, incluindo esfoliação celular, deposição de complemento, opsonização e subsequente reconhecimento por macrófagos ou células T citotóxicas (Pizarro-Cerdá e Cossart, 2006). Assim, o desenvolvimento de mecanismos de invasão celular, escape do sistema imune, replicação intracelular e/ou disseminação para as células vizinhas é uma importante estratégia para bactérias intracelulares (Pizarro-Cerdá e Cossart, 2006).

Foi previamente descrito que os enteropatógenos podem acessar os receptores basolaterais e promover a invasão da célula hospedeira *in vivo* pela transcitose das células M (Grützkau et al.,1990). Alternativamente, alguns processos infecciosos podem causar perturbações no epitélio intestinal e, como consequência da desestabilização transitória da barreira epitelial, podem ocorrer exposição da superfície basolateral e invasão bacteriana (McCormick et al.,1998). Em relação à tEPEC, tem sido relatado que a molécula efetora, EspF está envolvida no rompimento das *tight junctions* e na redistribuição da ocludina, assegurando o aumento da permeabilidade das monocamadas de T84 (McNamara et al.,2001). Além disso, Gabastou et al.,(1995), Rosa et al.,(2001) e Kim e Loessner (2008) descreveram que a ocorrência da invasão pode ser dependente do estágio de diferenciação da célula hospedeira.

Embora todas as amostras estudadas fossem desprovidas de genes de invasão conhecidos em *E. coli* (Vieira et al., 2001), elas são heterogêneas com relação à presença de genes de virulência adicionais (Gomes et al., 2004). Contudo, a avaliação da participação de intimina no processo de invasão das outras amostras de aEPEC ainda será realizada. Além disso, as diferenças nos índices de invasão podem ser relacionadas à presença de outros fatores. Alternativamente, a afinidade tanto da intimina quanto a especificidade de Tir poderiam influenciar o nível de

manipulação da citoesqueleto assim favorecendo uma invasão mais ou menos intensa.

Adicionalmente, investigamos o envolvimento do SST3 no estabelecimento de invasão. Foi interessante observar que o mutante em *escN*, que codifica uma ATPase essencial para a montagem desse sistema, foi capaz de aderir às células epiteliais apenas raramente e em pequenos grupos muito frouxos, sendo essa característica diferente do observado no mutante em *eae*, que adere de maneira difusa (Hernandes et al., 2008). Essa observação pode sugerir que a proteína, ou o conjunto de proteínas, responsável por essa adesão é, de alguma forma, dependente do SST3 expresso pela aEPEC 1551-2.

O patotipo aEPEC é hererogêneo em várias características, mas tem sido associado, com frequência crescente, a diversos casos de diarreia em todo o mundo. Portanto, é possível que a identificação da capacidade invasora seja uma propriedade que venha a auxiliar na discriminação, dentro do patotipo, das amostras potencialmente enteropatogênicas. Para tanto, porém, é preciso que a capacidade invasora de amostras dentro do patotipo seja demonstrada *in vivo*. Além disso, análises adicionais do destino intracelular tais como persistência, multiplicação e espalhamento para células vizinhas são necessários.

Conclusões

Neste trabalho demonstramos que:

1. O processo de invasão de células HeLa por amostras aEPEC não é uma atividade restrita às amostras portadoras de intima omicron;
2. A invasão de células HeLa pela amostra aEPEC 1551-2, é um processo dependente de microfilamentos de actina mas não de microtúbulos.
3. Nas condições testadas, as amostras de aEPEC selecionadas podem também invadir células intestinais polarizadas e diferenciadas.
4. O aumento da invasão de células T84 não diferenciadas ou de culturas diferenciadas pré-tratadas por agente desestabilizador das *tight junctions* em relação às monocamadas diferenciadas sem tratamento pela aEPEC 1551-2 sugere a existência de receptores para a invasão na porção basolateral.

- Abrahams GL, Hensel M. Manipulating cellular transport and immune responses: dynamic interactions between intracellular *Salmonella enterica* and its host cells. *Cell Microbiol.* 2006; 8:728-737
- Adu-Bobie J, Frankel G, Bain C, Goncalves AG, Trabulsi LR, Douce G, Knutton S, Dougan G. Detection of intimins α , β , γ , and δ , four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. *J Clin Microbiol* 1998; 36:662-668
- Afset JE, Bevanger L, Romundstad P, Bergh, K. Association of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* with prolonged diarrhea. *J. Med. Microbiol.* 2004; 53:1137-1144.
- Andrade JRC, Santa Rosa MR. Attachment and intracellular penetration of classic enteropathogenic *Escherichia coli* into HEP-2 cells. *Revista de Microbiologia, São Paulo* 1986; 17: 116-125.
- Andrade JR, Veiga VF, Santa Rosa MR, Suassuna I. An endocytic process in HEP-2 cells induced by enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Med Microbiol* 1989; 28: 49-57.
- Araujo JM, Tabarelli GF, Aranda KR, Fabbriotti SH, Fagundes-Neto U, Mendes CM, Scaletsky IC. Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. *J Clin Microbiol.* 2007; 45:3396-9
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. *Current Protocols in Molecular Biology*, New York. 1995.
- Bielaszewska M, Middendorf B, Köck R, Friedrich AW, Fruth A, Karch H, Schmidt MA, Mellmann A. Shiga toxin-negative attaching and effacing *Escherichia coli*: distinct clinical associations with bacterial phylogeny and virulence traits and inferred in-host pathogen evolution. *Clin Infect Dis* 2008; 47: 208-217.
- Blanco M, Blanco JE, Dahbi G, Alonso MP, Mora A, Coira MA, Madrid C, Juárez A, Bernárdez MI, González EA & Blanco J. Identification of two new intimin types in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Int Microbiol* 2006; 9:103-110.
- Blanco M, Blanco JE, Dahbi G, Mora A, Alonso MP, Varela G, Gadea MP, Schelotto F, González EA, Blanco J. Typing of intimin (eae) genes from enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from children with diarrhoea in Montevideo, Uruguay: identification of two novel intimin variants (mB and jR/b2B) *J Med Microbiol.* 2006a; 55(Pt 9):1165-74.
- Blanco M, Blanco JE, Mora A, Dahbi G, Alonso MP, González EA, Bernárdez MI, Blanco J. Serotypes, virulence genes and intimin types of Shiga toxin (Verotoxin)-producing

- Escherichia coli* isolates from cattle in Spain: identification of a new intimin variant gene (eae-ξ). J Clin Microbiol 2004; 42:645-51.
- Blanco M, Podola NL, Krüger A, et al. Virulence genes and intimin types of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina. Int Microbiol 2004a; 7:269-76
- Blanco M, Schumacher S, Tasara T, Zweifel C, Blanco JE, Dahbi G, Blanco J, Stephan R. Serotypes, intimin variants and other virulence factors of eae positive *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle in Switzerland. Identification of a new intimin variant gene (eae-η2). BMC Microbiol 2005; 5:23
- Bueris V, Sircili MP, Taddei CR, dos Santos MF, Franzolin MR, Martinez MB, Ferrer SR, Barreto ML, Trabulsi LR. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102:839-44.
- Celli J, Olivier M, Finlay BB. Enteropathogenic *Escherichia coli* mediates antiphagocytosis through the inhibition of PI 3-kinase-dependent pathways. EMBO J. 2001 Mar 15;20(6):1245-58.
- Cohen MB, Nataro JP, Bernstein DI, Hawkins J, Roberts N, Staat MA. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in acute childhood enteritis: a prospective controlled study. J Pediatr. 2005; 146:54-61.
- Cravioto A., Gross, R.J., Scotland, S.M., Rowe, B. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. Curr. Microb. 1979; 3: 95-9.
- Dean P and Kenny B. The effector repertoire of enteropathogenic *E. coli*: ganging up on the host cell. Curr Opin Microbiol. 2009; 12:101-9.
- Deibel C, Krämer S, Chakraborty T & Ebel F. EspE, a novel secreted protein of attaching and effacing bacteria, is directly translocated into infected host cells, where it appears as a tyrosine-phosphorylated 90 kDa protein. Mol Microbiol 1998; 28: 463-74.
- Devinney R, Nisan I, Ruschkowski S, Rosenshine I, Finlay BB. Tir tyrosine phosphorylation and pedestal formation are delayed in enteropathogenic *Escherichia coli* sepZ::TnpHoA mutant 30-5-1(3). Infect Immun. 2001; 69:559-63.
- Donnenberg MS, Calderwood SB, Donohue-Rolfe A, Keusch GT, Kaper JB. Construction and analysis of TnpHoA mutants of enteropathogenic *Escherichia coli* unable to invade HEp-2 cells. Infect Immun 1990; 58: 1565-1571.

- Donnenberg MS, Donohue-Rolfe A, Keusch GT. Epithelial cell invasion: an overlooked property of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) associated with the EPEC adherence factor. *J Infect Dis* 1989; 160: 452-459.
- Donnenberg MS, Tacket CO, James SP, Losonsky G, Nataro JP, Wasserman SS, Kaper JB, Levine MM. Role of the *eaeA* gene in experimental enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *J Clin Invest.* 1993; 92:1412-7.
- Elliott SJ, Wainwright LA, McDaniel TK, Jarvis KG, Deng YK, Lai LC, McNamara BP, Donnenberg MS, Kaper JB. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol Microbiol.* 1998; 28: 1-4
- Ewing B, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res* 1998; 8: 186–194.
- Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res* 1998; 8: 175–185.
- Fagundes-Neto U, Freymüller E, Gandolfi Schimitz L, Scaletsky I. Nutritional impact and ultrastructural intestinal alterations in severe infections due to enteropathogenic *Escherichia coli* strains in infants. *J Am Coll Nutr* 1996; 15: 180-185.
- Francis CL, Jerse AE, Kaper JB, Falkow S. Characterization of interactions of enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6 with mammalian cells in vitro. *J Infect Dis* 1991; 164: 693-703.
- Frazolin M R, Alves RCB, Keller R, Gomes TAT, Beutin L, Barreto ML, Milroy C, Strina A, Ribeiro H, Trabulsi LR. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2005; 100 (4):359-363.
- Gabastou JM, Kernéis S, Bernet-Camard MF, Barbat A, Coconnier MH, Kaper JB, Servin AL. Two stages of enteropathogenic *Escherichia coli* intestinal pathogenicity are up and down-regulated by the epithelial cell differentiation. *Differentiation* 1995; 59: 127-134.
- Gaillard JL, Finlay BB. Effect of cell polarization and differentiation on entry of *Listeria monocytogenes* into the enterocyte-like Caco-2 cell line. *Infect Immun* 1996; 64: 1299-1308.
- Garmendia J, Phillips A, Chong Y, Schuller S, Marches O, Dahan S, Oswald E, Shaw RK, Knutton S, Frankel G. TccP is an enterohaemorrhagic *E. coli* O157:H7 type III

- effector protein that couples Tir to the actin-cytoskeleton. *Cell. Microbiol.* 2004; 6:1167-1183.
- Garmendia J, Frankel G, Crepin VF. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *E. coli* infections: translocation, translocation, translocation. *Infect Immun* 2005a; 73: 2586–2594.
- Garmendia J, Ren Z, Tennant S, Vieira MAM, Chong Y, Whale A, Azzopardi K, Dahan S, Sircili MP, et al. Distribution of *tccP* in clinical enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* isolates. *J Clin Microbiol* 2005b; 43, 5715–5720.
- Garrido P, Blanco M, Moreno-Paz M, Briones C, Dahbi G, Blanco JE, Blanco J, Parro V. STEC-EPEC oligonucleotide microarray: a new tool for typing genetic variants of the LEE pathogenicity island of human and animal Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) strains. *Clin Chem* 2006; 52:192-201
- Gärtner J, M A Schmidt. Comparative analysis of locus of enterocyte effacement pathogenicity islands of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 2004; 72:6722-28.
- Gauthier A, Puente JL, Finlay BB. Secretin of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system requires components of the type III apparatus for assembly and localization. *Infect Immun.* 2003; 71:3310-9.
- Gomes TA, Blake PA, Trabulsi LR. Prevalence of *Escherichia coli* strains with localized, diffuse, and aggregative adherence to HeLa cells in infants with diarrhea and matched controls. *J Clin Microbiol.* 1989; 27:266-9.
- Gomes TAT, Irino K, Girão DM, Girão VB, Guth BE, Vaz TM, et al. Emerging enteropathogenic *Escherichia coli* strains? *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 1851–1855
- Goosney DL, Celli J, Kenny B, Finlay BB. Enteropathogenic *Escherichia coli* inhibits phagocytosis. *Infect Immun.* 1999; 67:490-5.
- Gordon D, Abajian C, Green P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res* 1998; 8: 195–202.
- Grützkau A, Hanski C, Hahn H, Riecken EO. Involvement of M cells in the bacterial invasion of Peyer's patches: a common mechanism shared by *Yersinia enterocolitica* and other enteroinvasive bacteria. *Gut* 1990; 31:1011-1015.
- Guinée PAM, Jansen WH, Wadström T, Sellwood R *Escherichia coli* associated with neonatal diarrhoea in piglets and calves. In Leeww PW, Guinée PAM (ed) Laboratory

- Diagnosis in Neonatal Calf and Pig Diarrhoea: Current Topics in Veterinary and Animal Science, Martinus-Nijhoff, The Hague, Netherlands, 1981; pp. 126–162
- Hernandes RT, Vieira MA, Carneiro SM, Salvador FA, Gomes TA. Characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains that express typical localized adherence in HeLa cells in the absence of the bundle-forming pilus. J Clin Microbiol. 2006; 44:4214-7.
- Hernandes RT, Silva RM, Carneiro SM, Salvador FA, Fernandes MC, Padovan AC, Yamamoto D, Mortara RA, Elias WP, da Silva Briones MR and Gomes TA The localized adherence pattern of an atypical enteropathogenic *Escherichia coli* is mediated by intimin omicron and unexpectedly promotes HeLa cell invasion. Cell Microbiol 2008; 10: 415-425.
- Hicks S, Frankel G, Kaper JB, Dougan G, Phillips AD. Role of intimin and bundle-forming pili in enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion to pediatric intestinal tissue *in vitro*. Infect Immun 1998; 66:1570-8.
- Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA. Phylogenetic perspectives in innate immunity. Science 1999; 284:1313-8.
- Huebner K, Isobe M, Croce CM, Golde DW, Kaufman SE, Gasson JC The human gene encoding GM-CSF is at 5q21-q32, the chromosome region deleted in the 5q- anomaly. Science 1985; 230: 1282-1285.
- Ide T, Laarmann S, Greune L, Schillers H, Oberleithner H, Schmidt MA. Characterization of translocation pores inserted into plasma membranes by type III-secreted Esp proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. Cellular Microbiology 2001; 3: 669-679.
- Isberg RR, Leong JM. Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasin, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. Cell. 1990; 60:861-71.
- Jenkins C, Lawson AJ, Cheasty T, Willshaw GA, Wright P, Dougan G, Frankel G, Smith HR Subtyping intimin genes from enteropathogenic *Escherichia coli* associated with outbreaks and sporadic cases in the United Kingdom and Eire. Mol Cell Probes 2003; 17:149-156
- Jerse AE, Yu J, Tall BD, Kaper JB. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. Proc Natl Acad Sci 1990; 87: 7839–7843.
- Kaper JB Defining EPEC. Rev. Microbiol 1996; 27: 130-133.

-
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol. 2004; 2:123-40. Review
- Karch H, Tarr PI, Bielaszewska M. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. Int J Med Microbiol 2005; 295: 405-418.
- Kenny B, DeVinney R, Stein M, Reinscheid DJ, Frey EA, Finlay BB. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. Cell 1997; 91: 511-520
- Kenny B. Phosphorylation of tyrosine 474 of the enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule is essential for actin nucleating activity and is preceded by additional host modifications. Mol Microbiol 1999; 31:1229-1241.
- Kim K, Loessner MJ. *Enterobacter sakazakii* invasion in human intestinal Caco-2 cells requires the host cell cytoskeleton and is enhanced by disruption of tight junction. Infect Immun 2008; 76: 562–570.
- Knutton S, Baldwin T, Williams PH, McNeish AS. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Infect Immun. 1989; 57:1290-8.
- Knutton S, Rosenshine I, Pallen MJ, Nisan I, Neves BC, Bain C, et al. A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. EMBO J. 1998; 17: 2166-2176.
- Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. Brief Bioinform. 2004; 5: 150-163.
- Levine MM, Rennels MB. *Escherichia coli* colonisation factor antigen in diarrhoea. Lancet. 1978; 2:534
- Levine MM, Edelman R. Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. Epidemiol Rev. 1984; 6:31-51.
- Levine MM, Nataro JP, Karch H, Baldini MM, Kaper JB, Black RE, Clements ML, O'Brien AD. The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. J. Infect. Dis. 1985;152: 550-9
- Marchès O, Ledger TN, Boury M, Ohara M, Tu X, Goffauz F, Mainil J, Rosenshine I, Sugai M, de Rycke J, et al. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*

- deliver a novel effector called Cif, which blocks cell cycle G2/M transition. *Mol. Microbiol.* 2003; 50: 1553-1567.
- Marchès O, Covarelli V, Dahan S, Cougoule C, Bhatta P, Frankel G, Caron E. EspJ of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* inhibits opsonophagocytosis. *Cell Microbiol.* 2008; 10:1104–1115
- McDaniel TK, Jarvis KG, Donnenberg MS, Kaper JB. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 1664-1668.
- McNamara BP, Koutsouris A, O'Connell CB, Nougayrède JP, Donnenberg MS, Hecht G Translocated EspF protein from enteropathogenic *Escherichia coli* disrupts host intestinal barrier function. *J Clin Invest* 2001; 107:621-629.
- Medzhitov R, Janeway C Jr. Innate immunity. *N Engl J Med.* 2000; 343:338-44. Review.
- Menard R, Dehio C, Sansonetti PJ. Bacterial entry into epithelial cells: the paradigm of *Shigella*. *Trends Microbiol.* 1996; 4:220-6. Review.
- Miliotis MD, Koornhof HJ, Phillips JI. Invasive potential of noncytotoxic enteropathogenic *Escherichia coli* in an in vitro Henle 407 cell model. *Infect Immun* 1989; 57: 1928-1935.
- Moon HW, Whipp SC, Argenzio RA, Levine MM, Giannella RA Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infect Immun* 1983; 41: 1340-1351.
- Moreira FC, Vieira MAM, Ferreira AJP, Girão DM, Vaz TIM, Rosa ACP, Knobl T, Irino K, Freymüller E, Gomes TAT *Escherichia coli* strains of serotype O51:H40 comprise typical and atypical Enteropathogenic *E. coli* strains and are potentially diarrheagenic *J Clin Microbiol* 2008; 46: 1462–1465
- Müller D, Greune L, Heusipp G, Karch H, Fruth A, Tschäpe H, Schmidt MA Identification of unconventional intestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates expressing intermediate virulence factor profiles by using a novel single-step multiplex PCR. *Appl Environ Microbiol.* 2007; 73:3380-90.
- Mulvey MA, Schilling JD, Hultgren SJ. Establishment of a persistent *Escherichia coli* reservoir during the acute phase of a bladder infection. *Infect Immun* 2001; 69: 4572–4579.
- Nataro JP, Hicks S, Phillips AD, Vial PA, Sears CL. T84 cells in culture as a model for enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. *Infect Immun* 1996; 64: 4761-4768.

- Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 1998; 11: 142-201.
- Naumann M. Nuclear factor-kappa B activation and innate immune response in microbial pathogen infection. Biochem Pharmacol. 2000; 60:1109-14. Review.
- Nguyen RN, Taylor LS, Tauschek M, Robins-Browne RM. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* infection and prolonged diarrhea in children. Emerg Infect Dis 2006; 12:597-603.
- Ogura Y, Ooka T, Whale A, Garmendia J, Beutin L, Tennant S, Krause G, Morabito S, Chinen I, et al. TccP2 of O157: H7 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC): challenging the dogma of EHEC-induced actin polymerisation. Infect Immun. 2007; 75:604-12.
- Ooka T, Vieira MAM, Ogura Y, Beutin L, La Ragione R, van Diemen PM, et al. Characterization of tccP2 carried by atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett 2007; 271: 126–35.
- Ørskov F, I. Ørskov. *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. Can. J. Microbiol. 1992; 38:699-704.
- Oswald E, Schmidt H, Morabito S, Karch H, Marchès O, Caprioli A. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. Infect Immun 2000; 68:64-71
- Pedroso MZ, Freymuller E, Trabulsi LR, Gomes TA. Attaching-effacing lesions and intracellular penetration in HeLa cells and human duodenal mucosa by two *Escherichia coli* strains not belonging to the classical enteropathogenic *E. coli* serogroups. Infect Immun 1993; 61:1152-6.
- Penfold RJ, Pemberton JM. An improved suicide vector for construction of chromosomal insertion mutations in bacteria. Gene 1992; 118: 145–146.
- Phillips AD, Frankel G Intimin-mediated tissue specificity in enteropathogenic *Escherichia coli* interaction with human intestinal organ cultures. J Infect Dis 2000; 181: 1496-1500.
- Pizarro-Cerdá J, Cossart P. Bacterial adhesion and entry into host cells. Cell 2006; 124:715–727
- Plancon L, Du Merle L, Le Friec S, Gounon P, Jouve M, Guignot J, Servin A, Le Bouguenec C. Recognition of the cellular beta1-chain integrin by the bacterial AfaD invasin is implicated in the internalization of afa-expressing pathogenic *Escherichia coli* strains. Cell Microbiol 2003; 5:681–693.

- Polotsky YE, Dragunskaya EM, Seliverstova VG, Avdeeva TA, Chakhutinskaya MG, Kétyi I, Vertényi A, Ralovich B, Emödy L, Málovics I, Safonova NV, Snigirevskaya ES, Karyagina EI. Pathogenic effect of enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Escherichia coli* causing infantile diarrhoea. *Acta Microbiol Acad Sci Hung* 1977; 24: 221-236.
- Quitard S, Dean P, Maresca M, Kenny B. The enteropathogenic *Escherichia coli* EspF effector molecule inhibits PI-3 kinase-mediated uptake independently of mitochondrial targeting. *Cell Microb* 2006; 8:972-981.
- Ramachandran V, Brett K, Hornitzky MA, Dowton M, Bettelheim KA, Walker MJ, Djordjevic SP. Distribution of intimin subtypes among *Escherichia coli* isolates from ruminant and human sources. *J Clin Microbiol* 2003; 41:5022-5032
- Regua-Mangia AH, Gomes TA, Vieira MA, Andrade JR, Irino K, Teixeira LM. Frequency and characteristics of diarrhoeagenic *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhoea in Rio de Janeiro, Brazil. *J Infect*. 2004; 48:161-7.
- Rodrigues J, Scaletsky IC, Campos LC, Gomes TA, Whittam TS, Trabulsi LR Clonal structure and virulence factors in strains of *Escherichia coli* of the classic serogroup O55. *Infect Immun* 1996; 64: 2680-2686.
- Rodrigues D, Rassi V, Griffin PM, Toledo MRF, Gatti MSV, Vieira MAM, Ramos SRTS, Gomes TAT. Etiologia da diarréia aguda em crianças entre 1 e 5 anos de idade em São Paulo. XVI Congresso de Microbiologia, 1991, Santos. Anais do XVI Congresso Brasileiro de Microbiologia. São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1991.
- Rosa AC, Vieira MA, Tibana A, Gomes TA, Andrade JR Interactions of *Escherichia coli* strains of non-EPEC serogroups that carry *eae* and lack the EAF and *stx* gene sequences with undifferentiated and differentiated intestinal human Caco-2 cells. *FEMS Microbiol Lett* 2001; 200: 117-122.
- Saldaña Z, Erdem AL, Schüller S, Okeke IN, Lucas M, Sivananthan A, Phillips AD, Kaper JB, Puente JL, Girón JA. The *Escherichia coli* common pilus and the bundle-forming pilus act in concert during the formation of localized adherence by enteropathogenic *E. coli*. *J. Bact* 2009; 191:3451-3461.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74: 5463–5467.
- Scaletsky IC, Silva ML, Trabulsi LR. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichiacoli* to HeLa cells. *Infect Immun* 1984; 45: 534–536.

- Scaletsky IC, Pedroso MZ, Fagundes-Neto U. Attaching and effacing enteropathogenic *Escherichia coli* O18ab invades epithelial cells and causes persistent diarrhea. *Infect Immun* 1996; 64: 4876-4881.
- Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*. 2003; 21:335-76. Review.
- Tarr CL, Whittam S. Molecular evolution of the intimin gene in O111 clones of pathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2002; 184:479-487
- Thompson J D, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 4673-4680.
- Tzipori S, Robins-Browne RM, Gonis G, Hayes J, Withers M, McCartney E. Enteropathogenic *Escherichia coli* enteritis: evaluation of the gnotobiotic piglet as a model of human infection. *Gut* 1985; 26: 570-578.
- Torres AG, Zhou G, Kaper JB. Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. *Infect Immun* 2005; 73:18-29.
- Trabulsi LR, Keller R, Gomes TAT Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.* 2002; 8:508–513.
- Vieira MA, Andrade JR, Trabulsi LR, Rosa AC, Dias AM, Ramos SR, Frankel G, Gomes TA. Phenotypic and genotypic characteristics of *Escherichia coli* strains of non-enteropathogenic *E. coli* (EPEC) serogroups that carry EAE and lack the EPEC adherence factor and Shiga toxin DNA probe sequences. *J Infect Dis.* 2001; 183:762-72
- Whale AD, Garmendia J, Gomes TA, Frankel G.. A novel category of enteropathogenic *E. coli* simultaneously utilises the Nck and TccP pathways to induce actin remodelling. *Cell Microbiol* 2006; 8, 999–1008.
- Whale D, Hernandez RT, Tadasuke OBL, Schüller S, Garmendia J, Crowther L, Vieira MAM, Ogura Y, Krause G, Phillips AD, Gomes TAT, Hayashi T, Frankel G. TccP2-mediated subversion of actin dynamics by EPEC 2- a distinct evolutionary lineage of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* 2007;153:1743-1755.
- Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 1985; 33:103–119.

Zhang WL, Köhler B, Oswald E, Beutin L, Karch H, Morabito S, Caprioli A, Suerbaum S, Schmidt H. Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains. J Clin Microbiol 2002; 40: 4486-4492.

I) Reagente e soluções

1. Meios de cultura bacteriológicos

1.1 Caldo Luria Bertani (LB)

A mistura foi esterelizada por autoclavagem (121°C por 15min). Para a preparação de LB Agar, 2% de Bacto Ágar (Difco) foram adicionados à solução.

1.2 Ágar McConkey

De acordo com as instruções do fabricante, foi preparada uma solução 1,5% de Ágar MacConkey (Difco) em água bidestilada e esterelizada por autoclavagem (121°C por 15 min).

2. Soluções

2.1. Solução salina tampona com fosfato (PBS)

NaCl	136,9 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	8,1 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM

2.2. Solução tampão de Sørensen

Para a solução final, foram adicionados 69,6 mL da Solução A em 230,4 mL da solução B. Essa solução é armazenada a 4°C.

2.3. Solução corante de May-Grünwald

Em 100 mL de metanol (Merck), foram adicionadas 0,2 g do corante (Merck), a solução foi mantida a 65°C até dissolução completa e, posteriormente, filtrada em papel de filtro comum e armazenada em temperatura ambiente. Para uso a solução foi diluída em Tampão Sørensen e água destilada (v/v/v 2:1:1).

2.4. Solução corante de Giemsa

A solução comercial (Merck) foi diluída em Tampão Sørensen e água destilada (v/v/v 1:1:1).

2.5. Solução de Formaldeído a 3%

O formaldeído (Merck) foi diluído em PBS no momento do uso.

2.6. Solução de isoticianato de faloidina marcado com fluoresceína.

A solução foi preparada dissolvendo-se 100 µg de isoticianato de faloidina marcada com fluoresceína (Sigma Chemical Co.) em 2 mL de PBS estéril. Alíquotas de 100 µL foram armazenadas a -20°C. Para a solução foi diluída em PBS (5 µg/mL).

2.7. Solução de Triton X-100

Triton X-100 (Sigma Chemical Co.) foi diluído em PBS (1%) e esterelizado por autoclavação.

3. Soluções utilizadas para microscopia eletrônica de transmissão.

3.1. Solução fixadora

Solução de glutaraldeído a 1,5% (Sigma Chemical Co.), paraformaldeído a 1% (Sigma Chemical Co.) em solução fosfato a 0,1 M pH 7,3.

3.2. Solução de tampão cacodilato de sódio a 0,4 M pH 7,2.

O cacodilato de sódio foi dissolvido em água bidestilada e o pH ajustado com HCl a 0,2 M. A solução final foi conservada a 4°C.

Para as lavagens durante o processamento do material para microscopia eletrônica essa solução foi utilizada a 0,1 M.

3.3. Tetróxido de ósmio a 4%.

O tetróxido de ósmio (EMS – Electron Microscopy Science, Enc., USA) é vendido na forma de cristal embalado em ampolas contendo 1 g. A ampola foi lavada externamente para eliminação de gordura e sujidades. Dentro da capela, a ampola foi colocada em um frasco escuro contendo 25 mL de água destilada e foi quebrada com o auxílio de um bastão de vidro. A preparação foi homogeneizada e mantida à temperatura ambiente, durante 24 h, a fim de permitir a dissolução completa dos cristais. Após este período, a solução foi armazenada a 4°C. No momento do uso, esta solução foi diluída a 1% em tampão cacodilato de sódio a 0,1%.

3.4. Acetato de uranila aquosa a 2%

Para o preparo desta solução, 2 g de acetato de uranila foram diluídos em 100 mL de água bidestilada. A solução foi filtrada e armazenada em frasco escuro em temperatura ambiente.

3.5. Citrato de Chumbo

Um volume de 100 mL de água destilada foi fervido e resfriado imediatamente antes da sua utilização no preparo desta solução.

O nitrato de chumbo e citrato de sódio foram inicialmente dissolvidos em 30 mL de água destilada, em um balão volumétrico. A preparação foi vigorosamente agitada por 5 min e, posteriormente, agitada moderadamente por mais 30 min, até a dissolução completa dos reagentes e a formação de uma solução leitosa. Uma solução de NaOH a 1 M, preparada no momento do uso, foi adicionada à preparação, até que esta se tornasse transparente. Em seguida, adicionou-se um volume de água destilada suficiente para 50 mL. Esta solução corante foi mantida no mesmo frasco, em descanso, por pelo menos um dia antes de ser utilizada.

II) Tabela: Relação genética entre os novos subtipos de íntima em amostras de aEPEC.

Designação das íntimas (n= 27)	Amostra de referência	Sorotipo	Origem	Patotipo de <i>E. coli</i>	ORF (bp)	Número de acesso	Relação de identidade Genética		
							Íntima θ2 1871-1 O34:H- aEPEC FM872418	Íntima τ 4281-7 O104:H- aEPEC FM872416	Íntima υ 1632-7 O26:H- aEPEC FM872417
α1	E2348/69	O127:H6	Humana	tEPEC	2820	M58154	86%	84%	85%
α2	<i>E. coli</i>	O125:H6	Humana	aEPEC	2820	AF530555	85%	83%	85%
β1	RDEC1	O15:H-	Coelho	aEPEC	2820	AF200363	85%	84%	85%
β2 ^a	FV359	O119:H6	Humana	tEPEC	2820	AJ715407	85%	83%	85%
β3	H03/42584a	O128:H-	Humana	aEPEC	2820	AJ876653	85%	84%	85%
γ1	EDL933	O157:H7	Humana	STEC	2805	AF071034	91%	89%	86%
γ2 ^b	95NR1	O111:H-	Humana	STEC	2808	AF025311	99%	90%	89%
δ ^c	BL152.1	O86:H34	Humana	tEPEC	2820	AJ875027	85%	83%	85%
ε1	PMK5	O103:H2	Humana	STEC	2847	AF116899	84%	83%	84%
ε2 ^a	VR64/4	O2rel:H19	Ovina	aEPEC	2847	AF530554	86%	84%	86%
ε3	H03/31923a	O181:H-	Humana	aEPEC	2847	AJ876649	85%	82%	84%
ε4	H03/37159a	O109:H-	Humana	tEPEC	2847	AJ876651	85%	83%	84%
ε5 (ξ) ^d	STEC-B49	O80:H-	Bovina	STEC	2847	AJ705051	86%	84%	84%
ζ	4795/95	O84:H4	Humana	STEC	2816	AJ271407	84%	82%	84%
η1	CF11201	O125:H-	Humana	tEPEC	2847	AJ308550	83%	84%	83%
η2	H03/53199a	ONT:H45	Humana	aEPEC	2847	AJ876652	84%	83%	84%
θ1	CL-37	O111:H8	Humana	STEC	2808	AF449418	99%	90%	89%
ι1	7476/96	O145:H4	Humana	aEPEC	2814	AJ308551	87%	84%	94%
ι2 ^a	VR45	OR:H-	Ovina	aEPEC	2814	AF530553	83%	86%	88%
κ ^c	6044/95	O118:H5	Humana	tEPEC	2820	AJ308552	85%	83%	85%
λ	EPEC-68.4	O34:H-	Humana	aEPEC	2817	AJ715409	86%	83%	86%
μ ^e	EPEC-373	O55:H51	Humana	tEPEC	2808	AJ705049	91%	89%	86%
ν ^e	IH1229a	O10:H-	Humana	aEPEC	2823	AJ705050	83%	87%	83%
ο	IH2997f	O129:H-	Humana	aEPEC	2820	AJ876648	83%	87%	82%
π	191.2 (V91)	O14:H5	Humana	aEPEC	2847	AJ705052	84%	82%	84%
ρ	K226a	O149:H-	Cabra	aEPEC	2829	AJ748082	84%	87%	83%
σ	EC74699	O86:H-	Aviária	aEPEC	2808	AJ781125	92%	90%	86%

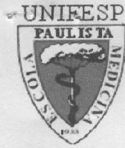
^a Íntimas β2, ε2 e ι2 descritas por Ramachandran et al., (2003) em ruminantes amostras de *E. coli* também foram denominadas ξR/β2B, νR/ε2 e μR/ι2, respectivamente (Blanco et al., 2006a, b).

^b A íntima θ de Tarr e Whittam (2002) é muito similar (99%) à íntima γ2 de Oswald et al. (2000).

^c A íntima δ de Adu-Bobie et al. (1998) também foi denominada β2 por Oswald et al. (2000). Assim, nos estudos anteriores esta íntima foi referida como δ/β2O. A íntima δ de Adu-Bobie et al., (1998) é muito similar (99%) à íntima κ de Zhan et al., (2002).

^d Íntima ε5 descrita por Blanco et al. (2004) foi inicialmente denominada ξB.

^e Íntimas μB e νB descritas por Blanco et al., (2006a,b).



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 23 de março de 2007
CEP 0304/07

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) DENISE YAMAMOTO
Co-Investigadores: Rodrigo Tavanelli Fernandes, Tania A T Gomes do Amaral (orientadora)
Disciplina/Departamento: Microbiologia/Micro, Imuno e Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
Patrocinador: CNPq/FAPESP.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref. Projeto de pesquisa intitulado: **“Caracterização dos eventos da invasão em linhagens de células intestinais e dos vacúolos contendo Escherichia coli enteropatogênica (EPEC) atípica”.**

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: experimental, categoria A.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: não se aplica.

OBJETIVOS: Estudar a invasão bacteriana e as características dos vacúolos contendo uma amostra de EPEC atípica com potencial invasor..

RESUMO: amostras de E coli 1551-2 será submetida a ensaios de cinéticas da invasão, persistência e multiplicação nas diferentes culturas celulares. As características composicionais dos vacúolos e as etapas do seu amadurecimento serão avaliadas por meio de marcações com anticorpos fluoescntes e visualizadas por microscopia confocal. Protocolos de mutagênese serão utilizados para a obtenção de mutantes nos genes tir e escN, confirmados por Southern blot. Serão realizados testes de adesão e invasão com os mutantes, e testes em presença de drogas despolimerizantes do citoesqueleto e/ou com soro anti-B-integrina e anti-nucleolina. As interações das amostras selvagens, mutantes e complementadas com as diferentes culturas celulares, serão analisadas por meio de microscopia eletrônica de transmissão..

FUNDAMENTOS E RACIONAL: Estudo fundamenado, visando avaliar a invasão bacteriana de uma amostra de E coli enteropatogênica atípica.

MATERIAL E MÉTODO: Estão descritos os procedimentos, utilizando metodologia de domínio da equipe envolvida, estando o projeto inserido na linha de pesquisa do orientador.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: CNPq, FAPESP - R\$ 300,00.

CRONOGRAMA: 24 meses.

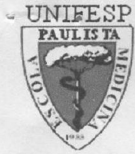
OBJETIVO ACADÊMICO: doutorado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: **22/3/2008 e 22/3/2009.**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU e APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.

Rua Botucatu, 572 - 1º andar – conj. 14 - CEP 04023-062 - São Paulo / Brasil
Tel.: (011) 5571-1062 - 5539.7162



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)