

**FABIANA CAMPITELI MOREIRA**

**Análise do potencial de virulência de amostras de  
*Escherichia coli* do sorotipo O51:H40**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo

2009

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**FABIANA CAMPITELI MOREIRA**

**Análise do potencial de virulência de amostras de  
*Escherichia coli* do sorotipo O51:H40**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tânia A. T. Gomes do Amaral

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup> Mônica A. Midolli Vieira

São Paulo

2009

Moreira, Fabiana Campiteli

**Análise do potencial de virulência de amostras de *Escherichia coli* do sorotipo O51:H40-** São Paulo, 2009. xxiv, 120f.

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

Título em inglês: Analysis of potential virulence of strains of the *Escherichia coli* serotype O51: H40.

1- *Escherichia coli* 2- EPEC 3- Diarréia infantil 4- Translocação bacteriana

Este trabalho foi desenvolvido na Disciplina de Microbiologia do Departamento de Microbiologia, Parasitologia e Imunologia da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina (UNIFESP/EPM), com o auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e CNPq (Edital Universal).

*Ao, meu querido esposo Rodrigo  
Berzagui, agradeço todo amor e  
dedicação que desde o começo esteve  
presente na realização deste trabalho.*

*Aos meus pais, José Celso e Rosa, pelo  
exemplo de força e coragem e pelo amor  
incondicional dedicado em todos os  
momentos ,*

*Obrigada!*

## *Agradecimentos*

*À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Tânia A. T. Gomes do Amaral, pelo apoio, por toda sua paciência, pela confiança depositada, aos ensinamentos, ao carinho e respeito que foram fundamentais para a realização deste trabalho. É um exemplo de pesquisadora por quem tenho grande admiração e respeito.*

*À Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Mônica Aparecida Midolli Vieira, pela satisfação de trabalhar sob sua co-orientação, pelos valiosos auxílios e amizade dedicados durante estes anos.*

*À vocês, minha eterna gratidão .....*

*Ao Prof. Dr. Ivan Hong Jun Koh, pela amizade, atenção, pelos seus preciosos ensinamentos clínicos e suas contribuições que foram muito importantes e enriqueceram este trabalho.*

*À Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Ana Maria A. Liberatore e Prof. Dr. José Luis Menchaca Diaz, pela amizade, pelo importante apoio técnico, cuja ajuda inestimável possibilitou a realização deste trabalho .*

*Ao Prof. Dr. Antônio José P. Ferreira, Dr<sup>ª</sup>. Terezinha Knobl, pela colaboração na realização dos experimentos em coelhos.*

*Ao Prof. Dr. Rodrigo T. Hernandez e Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Suely C. F. Sampaio, queridos amigos, pela disposição e apoio técnico na realização dos ensaios de biologia molecular.*

*Às minhas queridas amigas Dr<sup>ª</sup>. Fábria Salvador e Dr<sup>ª</sup>. Denise Yamamoto, pelo apoio científico e principalmente pela amizade ao longo de todos estes anos de convívio.*

*Aos meus amigos da pós-graduação, Flávia Bastos, Michelle Rabello, Evanilde Gonçalves, Cecília Cergole, Franciele Tafarello, Kathelin Lascowski, Mirian Guirro, Bruna Gil, Luís Fernando dos Santos, Ana Carolina Mello, Ana Carolina Zidko, Cristina Viana, pelo incentivo e pelos agradáveis momentos de descontração.*

*Aos colegas Marjorie Taki, Ricardo L. de Souza, Ricardo K.Toma e Tarso Koh, pelo grande auxílio durante os experimentos com ratos.*

*Aos docentes do Departamento de Microbiologia e Imunologia, que de diferentes formas contribuíram na minha formação científica.*

*À Magda Nisti, Paola Rossi, pela colaboração durante todos estes anos.*

*À Cristina Santos, Darcy Silva e Maria Zoraide, Vitória, e Zé Carlos por toda cooperação, que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.*



## SUMÁRIO

### LISTA DE FIGURAS

### LISTA DE TABELAS

### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

### RESUMO

### ABSTRACT

INTRODUÇÃO.....	18
OBJETIVOS.....	38
MATERIAL E MÉTODOS.....	39
1 - AMOSTRAS BACTERIANAS.....	39
2- MÉTODOS GENÉTICOS.....	41
2.1. Extração de DNA genômico.....	41
2.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	42
2.3. Extração de DNA plasmidial em pequena escala.....	42
2.4. Reação de precipitação do DNA.....	42
2.5. Reações de digestão de DNA.....	43
2.6. Eletroporação.....	43
2.7.Obtenção da amostra mutada 1711-4: <i>escN</i> .....	45
2.8. Técnica de <i>Southern-blot</i> .....	47
2.9. Pesquisa de genes de virulência.....	48
2.10. Técnica de <i>Southern-blot</i> para localização do gene <i>toxB</i> .....	49
3- MÉTODO DE ANÁLISE DE PROTEÍNAS.....	50
3.1 Detecção da expressão da proteína EspA	
3.1.1- Preparo das amostras para obtenção de extrato total de proteínas	50
3.1.2- Imunoblot.....	50
4. ENSAIOS FENOTÍPICOS DE VIRULÊNCIA.....	53
4.1. Ensaio de interação com células cultivadas <i>in vitro</i> .....	54
4.1.1. Linhagens celulares utilizadas.....	55
4.1.2. Preparo das microplacas e condições de cultivo.....	55
4.2. Teste de adesão as células HeLa e HEp-2 (ensaio de 6 horas).....	55
4.3. Teste de FAS ( <i>Fluorescent actin-staining</i> ).....	56
4.4. Detecção da Fosforilação de Tirosina.....	57
4.5. Ensaio de alça ileal ligada de coelhos <i>in vivo</i> .....	58

4.5.1. Amostras testadas.....	58
4.5.2. Procedimento.....	58
4.6. Ensaio de Translocação Bacteriana <i>in vivo</i> .....	59
4.6.1. Animais.....	59
4.6.2. Preparo do inóculo 10 <sup>10</sup> UFC/ml.....	61
4.6.3. Procedimentos.....	62
4.7. Ensaio de Perfusão Tecidual em ratos.....	62
4.8. Análise Estatística.....	63
5. ANÁLISE DA RESISTÊNCIA AO SORO DAS AMOSTRAS BACTERIANAS.....	64
6. MICROSCOPIA INTRAVITAL.....	65
<b>RESULTADOS</b> .....	68
1. O sorotipo O51:H40 de <i>E. coli</i> compreende amostras de tEPEC e aEPEC potencialmente patogênicas.....	68
1.2. Localização da seqüência do gene <i>toxB</i> na amostra 0151-1/89.....	72
1.3. Detecção da fosforilação de resíduo de tirosina em Tir.....	74
1.4. Amostras de <i>E. coli</i> do sorotipo O51:H40 colonizam e provocam lesão A/E em alça ileal ligada de coelhos <i>in vivo</i> .....	77
1.5. Análise da expressão da proteína EspA em amostras de O51:H40.....	80
2. ANÁLISE DO POTENCIAL DE TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA <i>IN VIVO</i> E DOS EFEITOS DA PERFUSÃO TECIDUAL EM DIFERENTES ÓRGÃOS, EXIBIDO PELAS AMOSTRAS DE TEPEC (E2348/69) E AEPEC (1711-4) NO MODELO DE ALÇA INTESTINAL DE RATOS.....	82
2.1. Confirmação e análise do mutante em EscN (amostra 1711-4: <i>escN</i> ).....	82
2.1.1. Análise do mutante 1711-4: <i>escN</i> .....	
2.1.1.1. <i>Southern-blot</i> .....	84
2.1.1.2. Alteração no padrão de aderência .....	86
2.1.1.3. Alteração da capacidade de promover lesão AE <i>in vitro</i> .....	87
2.1.1.4. Pesquisa da sequênciã genética associada à mutagênese da amostra 1711-4 no gene <i>escN</i> .....	88

3. ENSAIOS DE TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA TB <i>IN VIVO</i> , NO MODELO DE ALÇA INTESTINAL DE RATOS.....	90
4. ÍNDICE DA PERFUSÃO TECIDUAL.....	94
5. ANÁLISE DA RESISTÊNCIA AO SORO DAS AMOSTRAS BACTERIANAS.....	96
6. ANÁLISE DA MICROCIRCULAÇÃO MESENTÉRICA.....	96
<b>DISCUSSÃO</b> .....	98
<b>CONCLUSÕES</b> .....	108
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	109
<b>ANEXOS</b> .....	126
Reagentes e soluções	
Aprovação do projeto no Comitê de Ética	
Publicações	

## Lista de Abreviaturas e Siglas

<b>AA</b>	Aderência agregativa
<b>A/E</b>	<i>Attaching and effacing</i>
<b>AL</b>	Aderência localizada
<b>ATV</b>	Solução de associação Tripsina-Versene
<b>BFP</b>	<i>Bundle forming pilus</i>
<b>BSA</b>	Soroalbumina bovina
<b>CNF</b>	Fator Necrotizante Citotóxico
<b>DAEC</b>	<i>Escherichia coli</i> difusamente aderente
<b>DMEM</b>	Meio mínimo essencial de Eagle modificado por Dulbecco
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>dNTPs</b>	Desoxinucleotídeos Trifosfatos
<b>EAEC</b>	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
<b>EAF</b>	<i>EPEC Adherence Factor</i>
<b>EAST</b>	<i>Enteraggregative Stable Toxin</i>
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetracético
<b>EHEC</b>	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
<b>EIEC</b>	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasora
<b>EPEC</b>	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
<b>ETEC</b>	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
<b>ExPEC</b>	<i>Escherichia coli</i> extra-intestinal
<b>LB</b>	(caldo ou ágar) Luria Bertani
<b>LEE</b>	<i>Locus of enterocyte effacement</i>
<b>LT</b>	Toxina termo-lábil
<b>ORF</b>	<i>Open reading frame</i>
<b>PBS</b>	Solução tampão salina fosfato
<b>PCR</b>	Reação de polimerização em cadeia
<b>q.s.p</b>	quantidade suficiente para
<b>SDS-PAGE</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
<b>SSC</b>	Solução tampão cloreto de sódio/citrato de sódio
<b>ST</b>	Toxina termo-estável
<b>STEC</b>	<i>Escherichia coli</i> produtora de toxina Shiga
<b>Stx</b>	<i>Shiga toxin</i>
<b>TEMED</b>	N,N, N', N'- Tetrametil-etilenodiamino
<b>TB</b>	<i>Translocação bacteriana</i>
<b>TSB</b>	<i>Tryptic Soy Broth</i>
<b>UV</b>	Ultra-violeta

## LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Fotomicrografia eletrônica ilustrativa da lesão A/E	21
Figura 2	Representação esquemática dos genes que compõe a região LEE	22
Figura 3	Diagrama esquemático do SST3 de EPEC/EHEC	26
Figura 4	<i>Southern – blotting</i> de DNA plasmidial das amostras de <i>E. coli</i> O51:H40 0151-1/85 e 1711-4 com a seqüência da sonda <i>toxB</i> . <b>A</b> , gel de agarose a 0,8% contendo extrato de DNA plasmidial. <b>B</b> , filme de raios X, após a exposição de membrana submetida à hibridação. Canaletas: <b>1 e 6</b> , <i>E. coli</i> 39 R861 (marcador de massa molecular); <b>2</b> , amostra de tEPEC protótipo E2348/69 (controle negativo); <b>3</b> , amostra EHEC protótipo EDL933 (controle positivo); <b>4</b> , tEPEC 0151-1/85; <b>5</b> , aEPEC 1711-4/89 (controle negativo). A seqüência <i>toxB</i> está presente apenas na amostra 0151-1/85 e localiza-se em uma banda plasmidial de ~93 kb, sendo essa massa compatível com a do plasmídio de virulência da amostra protótipo de EHEC EDL933	72
Figura 5	Ensaio de fosforilação de tirosina com amostra representativa de <i>E. coli</i> do sorotipo O51:H40 em células HeLa. A e B, amostra 1711-4/89; C e D, amostra protótipo de tEPEC (E2348/69), controle positivo, e E e F, amostra protótipo de EHEC (EDL 933), controle negativo.	75
Figura 6	Microscopia eletrônica de transmissão de alça ileal ligada de coelho inoculada com culturas de amostras do sorotipo O51:H40. A e B: <i>E. coli</i> 21075, amostra representativa do sorotipo, produzindo lesão A/E, em A, bactéria internalizada; C, amostra protótipo de tEPEC (E2348/69), produzindo lesão A/E e internalização; D, <i>E. coli</i> HB101, controle negativo. A- 15.600 X; B- 26.000 X; C- 31.200X, e D- 27.000X.	78
Figura 7	Reatividade do soro anti-EspA com extrato protéico de amostras de <i>E. coli</i> do sorotipo O51:H40. <b>(A)</b> , Gel de SDS-PAGE a 15% contendo extratos protéicos purificados. Canaletas: <b>1</b> , padrão de peso molecular; <b>2</b> , tEPEC E2348/69; <b>3</b> , aEPEC 3102-1/89; <b>4</b> , aEPEC 3062-1/89; <b>5</b> , aEPEC 1711-4/89; <b>6</b> , tEPEC 0151-1/85 (controle positivo); <b>7</b> , <i>E. coli</i> HB101. <b>(B)</b> Membrana de nitrocelulose contendo as bandas protéicas purificadas em gel tratadas com soro anti- EspA.	80
Figura 8	Curva de Crescimento. Amostras 1711-4/89 e 1711-4/89 mutada no gene <i>escN</i> .	82
Figura 9	PCR para a confirmação da mutação em <i>escN</i> .	84

## LISTA DE TABELA

		Página
Tabela 1	Origem das amostras e dados clínicos e microbiológicos dos pacientes portadores de <i>E. coli</i> O51:H40	65
Tabela 2	Pares de <i>primers</i> e condições de amplificação dos genes utilizados neste estudo.	66
Tabela 3	Seqüências nucleotídicas dos <i>primers</i> utilizado para a pesquisa de fatores de virulência associados às categorias patogênicas de <i>E. coli</i>	67
Tabela 4	Propriedades genotípicas das amostras de <i>E. coli</i> do sorotipo O51:H40	70
Tabela 5	Capacidade de fosforilar resíduos de tirosina em Tir em amostras de <i>E. coli</i> do sorotipo O51:H40, evidenciada pelo teste de fosforilação em células HeLa e T84.	74
Tabela 6	Alterações macroscópicas e ultra-estruturais da alça ileal de coelho inoculada <i>in vivo</i> com amostras do sorotipo O51:H40	77

## RESUMO

*Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) constitui um importante patotipo de *E. coli* envolvido com doença diarréica. EPEC é dividida em dois sub-grupos, EPEC típica (tEPEC), portadora do plasmídio EAF (EPEC *adherence factor*), e EPEC atípica (aEPEC), desprovida desse plasmídio. EPEC produz lesão *attaching-effacing* (A/E) em células intestinais, determinada por genes contidos no *locus of enterocyte effacement* (LEE). LEE codifica um sistema de secreção tipo 3 (SST3), a adesina de membrana externa Intimina e várias proteínas efetoras que incluem Tir (receptor translocado de intimina). Entre as amostras de aEPEC isoladas em nosso meio, aquelas pertencentes ao sorotipo O51:H40 têm sido as mais frequentes. Em estudo anterior, analisamos 11 amostras de *E. coli* do sorotipo O51:H40 que apresentavam a região LEE aparentemente completa, 70% das quais foram capazes de produzir a lesão A/E, conforme indicado pela positividade em um teste *in vitro*, que avalia o acúmulo de actina decorrente da lesão A/E. Para ampliar o conhecimento do potencial enteropatogênico dessas amostras, neste estudo, foram investigadas diversas propriedades genóticas e fenóticas, bem como o comportamento *in vivo* de amostras selecionadas em coelho e em rato. Foram pesquisados genes recém descritos em *E. coli* (*lpfA1*, *cifA*, *ldaG*, *espJ*, *toxB*, *espM* e *espT*) e a ocorrência de fosforilação de resíduos de tirosina na molécula Tir, em cultivos de células HeLa e células intestinais diferenciadas T84. Os resultados obtidos confirmam que o sorotipo O51:H40 contém amostras com potencial enteropatogênico, uma vez que 75% das amostras testadas produziram lesão A/E em alça ileal de coelhos *in vivo*. Além disto, a

aEPEC 1711-4, como a tEPEC E2348/69, apresentou capacidade significativa de translocar a mucosa intestinal em ensaios de translocação bacteriana (TB) em ratos, sendo que a aEPEC 1711-4 provocou também danos à perfusão tecidual. A ausência de translocação observada com mutante defeutivo na montagem do SST3 (1711-4:escN) sugeriu que proteínas efetoras secretadas são importantes para a ocorrência do fenômeno. Em conclusão, o sorotipo O51:H40 de *E. coli* compreende amostras potencialmente enteropatogênicas, a maioria das quais deve ser classificada como aEPEC; o sobre crescimento de pelo menos uma amostra de aEPEC, em intestino de rato, pode levar à translocação e a danos à microcirculação sistêmica.



## ABSTRACT

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is an important pathotype of *E. coli* involved in diarrheal disease. EPEC is divided into two groups, typical EPEC (tEPEC), carrier of plasmid EAF (EPEC adherence factor), and atypical EPEC (aEPEC), devoid of the plasmid. EPEC produces injury attaching-effacing (A/E) in intestinal cells, determined by genes in the locus of enterocyte effacement (LEE). LEE encodes a type 3 secretion system (SST3), the outer membrane adhesin of Intimin and several effector proteins including Tir (translocated receptor for intimin). Among aEPEC strains of isolated in our midst, those belonging to serotype O51: H40 have been the most frequent. In a previous study, we analyzed 11 strains of *E. coli* of serotype O51: H40 that had an apparently LEE region complete, 70% of which were of them was able to produce the lesion A/E, as indicated by a positive *in vitro* assay, which assesses the accumulation of actin due to the injury A/E. To increase the knowledge of the enteropathogenic potential of these strains in this study, we investigated several genotypic and phenotypic properties and the behavior of strains selected *in vivo* in rabbit and rat. We studied genes recently described in *E. coli* (*lpfA1*, *cifA*, *ldaG*, *espJ*, *toxB*, *espM* and *espT*) and the occurrence of residues of tyrosine phosphorylation in Tir molecule in cultures of HeLa cells and T84 intestinal cells differentiated. The results confirm that serotype O51: H40 includes strains with enteropathogenic potential, since 75% of the strains tested produced lesion A/E in the rabbit ileal loop *in vivo*. Moreover, the aEPEC 1711-4/89, as tEPEC E2348/69, showed significant ability translocation of the

intestinal mucosa in bacterial translocation (BT) assays in rats, and the aEPEC 1711-4/89 also caused damage to tissue perfusion. The lack of translocation observed with mutant defect in the assembly of SST3 (1711-4: *escN*) suggested that secreted effector proteins are important for the occurrence of the phenomenon. In conclusion, serotype O51:H40 of *E. coli* includes potentially enteropathogenic strain, most of which should be classified as aEPEC; the overgrowth of at least one strain of aEPEC in intestine of rats, can lead to damage to the translocation and systemic microcirculation.

## INTRODUÇÃO

*Escherichia coli* é um bastonete anaeróbio facultativo, membro da família *Enterobacteriaceae*, que coloniza o trato gastrointestinal humano e de outros animais. Amostras comensais de *E. coli* podem causar doença apenas em indivíduos imunodeprimidos e em imunocompetentes, quando há quebra da barreira gastrointestinal, sendo geralmente desprovidas de marcadores específicos de virulência (RUSSO; JOHNSON, 2000). Algumas amostras de *E. coli*, no entanto, são ditas patogênicas, pois possuem um conjunto específico de genes de virulência que as capacitam a causar infecções intestinais ou extra-intestinais, como infecção urinária, septicemias ou meningite, dentre outros quadros infecciosos (NATARO; KAPER, 1998). Esses fatores são freqüentemente codificados por elementos genéticos com capacidade de se mover dentro da própria bactéria ou entre bactérias diferentes, criando novas combinações, das quais apenas aquelas bem sucedidas irão persistir e, em consequência, determinar os designados patotipos de *E. coli* (KAPER *et al.*, 2004).

Doenças extra-intestinais por *E. coli* são comuns em várias faixas etárias e podem envolver qualquer órgão ou sítio anatômico. Para causar doença, as *E. coli* envolvidas com infecção extra-intestinal (ExPEC) (RUSSO; JOHNSON, 2000) devem apresentar uma combinação de genes que codificam adesinas, sistemas de aquisição de ferro, toxinas e mecanismos de escape (cápsulas, resistência ao soro) (FINLAY; FALKOW, 1997; DONNENBERG; WELCH, 1996). Entretanto, nenhuma linhagem, contendo um conjunto de genes

determinados ou fator de virulência de ExPEC é restrito ou indispensável para infecção em um determinado sítio extra-intestinal.

Amostras de *E. coli* constituem os principais patógenos associados a doenças entéricas em diversas partes do mundo (NATARO; KAPER, 1998), embora haja diferenças geográficas na ocorrência dos diferentes patotipos diarreiogênicos dessa espécie bacteriana. As *E. coli* que causam infecções intestinais são raramente encontradas na microbiota fecal de hospedeiros saudáveis e podem ser agrupadas em cinco diferentes patotipos de acordo com o mecanismo de virulência e os sinais e sintomas que provocam. Esses patotipos compreendem: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC) e *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (NATARO; KAPER, 1998). Um sexto patotipo, de papel ainda controverso como agente etiológico de diarreia, compreende a *E. coli* produtora de adesão difusa (DAEC) (NATARO; KAPER, 1998).

Embora existam algumas amostras de *E. coli* que albergam marcadores de mais de um patotipo, de modo geral, cada patotipo enteropatogênico possui uma combinação de marcadores de virulência (KAPER *et al.*, 2004).

## **1. EPEC**

Em 1955, NETER *et al.* criaram o termo “*E. coli* enteropatogênica-EPEC” para nomear determinados sorogrupos de *E. coli* associados à diarreia, distinguindo-os assim dos sorogrupos de *E. coli* encontrados em indivíduos sem diarreia.

EPEC foi inicialmente caracterizada como um grupo de amostras pertencentes a sorotipos específicos dentro de 12 sorogrupos (classificação

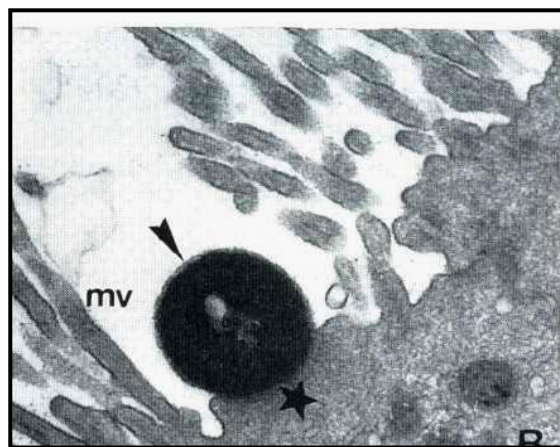
baseada no antígeno O) de *E. coli*: O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 e O158 (W.HO, 1987). Posteriormente, por meio de análises utilizando a técnica de *Multilocus Enzyme Electrophoresis* (MLEE), as amostras de EPEC foram divididas em dois grupos principais de clones relacionados, denominados clone 1 (amostras de EPEC que expressam tipicamente os antígenos flagelares H6 e H34) e clone 2 (amostras de EPEC que expressam antígeno H2) (WHITTAM; McGRAW, 1996).

As EPEC foram responsáveis por um grande número de casos de diarreia infantil no Brasil por várias décadas (TOLEDO *et al.*, 1983; TRABULSI *et al.*, 1985; GOMES *et al.*, 1991; ROSA *et al.*, 1998; SCALETSKY *et al.*, 1999) e em vários países em desenvolvimento (NATARO; KAPER, 1998). A diarreia por EPEC é tipicamente aquosa e normalmente acompanhada de vômito e febre (BLAKE *et al.*, 1993).

## **2. Lesão *Attaching and Effacing* (A/E)**

A patogenicidade das EPEC é desencadeada por um mecanismo que promove a formação da lesão A/E, na qual se observam aderência bacteriana íntima ao epitélio intestinal, destruição das microvilosidades do enterócito e acúmulo de actina polimerizada e de outros elementos do citoesqueleto. Esses eventos levam à formação de estruturas semelhantes a pedestais na superfície apical dos enterócitos, sobre as quais se encontram bactérias aderidas e onde podem ser observados desorganização e apagamento das microvilosidades (MOON *et al.*, 1983; DONNENBERG *et al.*, 1997; VALLANCE; FINLAY, 2000) (Figura 1). Essas lesões foram primeiramente observadas e descritas por STALEY *et al.* (1969) e MOON *et al.* (1983), em modelos animais, e

posteriormente, em culturas de células (KNUTTON *et al.*, 1989), bem como em fragmentos de biópsias intestinais mantidas *in vitro* (KNUTTON *et al.*, 1987; HICKS *et al.*, 1996). Uma identificação indireta da expressão da lesão A/E pode ser realizada pelo teste de FAS (*Fluorescent-actin staining*). Esse teste detecta o acúmulo de actina (F-actina) polimerizada, no local onde ocorrem as lesões A/E, por meio de faloidina marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC), que se liga especificamente a esses filamentos (KNUTTON *et al.*, 1989).

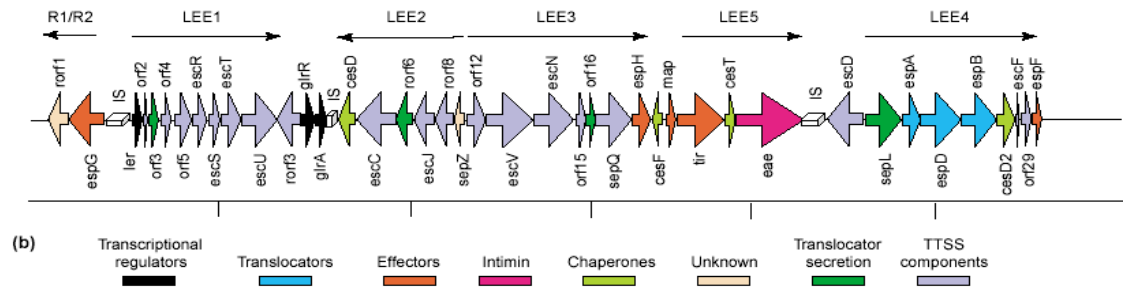


**Figura 1.** Microscopia eletrônica ilustrativa da lesão A/E (PEDROSO *et al.*, 1993).

mv, microvilosidade.

### **3. Ilha de patogenicidade LEE (*locus of enterocyte effacement*)**

No cromossomo bacteriano podem existir determinadas regiões que contêm genes que codificam fatores de virulência e são conhecidas como Ilhas de patogenicidade (PAI). Em 1995, Mc DANIEL *et al.* demonstraram a existência de uma PAI cromossômica de aproximadamente 35 kb na amostra protótipo E2348/69, a qual foi denominada *locus of enterocyte effacement* (LEE) (Figura 2).



**Figura 2.** Representação esquemática dos genes que compõe a região LEE (adaptado de Dean *et al.*, 2005).

Os genes que compreendem a região LEE estão organizados em cinco principais regiões com funções determinadas: LEE 1, LEE 2, LEE 3, LEE 4 e LEE 5 (MELLIES *et al.*, 1999; SANCHES-SANMARTIN *et al.*, 2001). As regiões LEE 1, LEE 2 e LEE 3 contêm genes que codificam um Sistema de Secreção tipo 3 (SST3), enquanto LEE 4 codifica diversas proteínas efetoras (EPEC-*secreted proteins* ou Esps), secretadas por esse sistema (DONNENBERG *et al.*, 1993; FOUBISTER *et al.*, 1994; KENNY *et al.*, 1996; LAI *et al.*, 1997; SEKIYA *et al.*, 2001). Em LEE 5, encontram-se os genes *eae* (*E. coli attaching-and-effacing*), *tir* e *ces T*, os quais codificam as proteínas intimina, Tir (*Translocated intimin receptor*) e CesT, respectivamente (SANCHES-SANMARTIN *et al.*, 2001). As regiões LEE 1, LEE 2 e LEE 3 estão localizadas *upstream* em relação ao gene *eae* enquanto LEE 4 localiza-se *downstream* a esse gene. A ativação da região LEE 1 por uma proteína heterodimérica que se liga ao DNA (IHF, Integration host factor) resulta na expressão de *ler*, o primeiro gene do operon LEE 1 (FRIEDBERG *et al.*, 1999). Ler é um regulador positivo de outros genes da região LEE ( MELLIES *et al.*, 1999).

Intimina é uma proteína de membrana externa de 94 kDa (JERSE *et al.*,1990), muito bem caracterizada, responsável pela aderência íntima observada na lesão A/E. Ela é constituída por 939 aminoácidos (aa) altamente conservados na região N- terminal (aa 330 a 659) (YU ; KAPER, 1992), embora a atividade de ligação à célula hospedeira esteja localizada nos 280 resíduos de aminoácidos da sua porção carboxi-terminal (Int280) (FRANKEL *et al.*, 1994). Foram descritos pelo menos 21 variantes do gene *eae*, que codificam 27 diferentes subtipos de intimina ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2,  $\delta$ ,  $\epsilon$ 1,  $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3,  $\epsilon$ 4,  $\epsilon$ 5 ( $\xi$ ),  $\zeta$ ,  $\eta$ 1,  $\eta$ 2,  $\theta$ 1,  $\theta$ 2,  $\iota$ 1,  $\iota$ 2,  $\kappa$ ,  $\lambda$ ,  $\mu$ ,  $\nu$ ,  $\omicron$ ,  $\pi$ ,  $\rho$ ,  $\sigma$ ) (ABU-BOBIE *et al.*,1998; BLANCO *et al.*, 2004; BLANCO *et al.*, 2004a; BLANCO *et al.*, 2005; BLANCO *et al.*, 2006; GARRIDO *et al.*, 2006; JENKINS *et al.*, 2006; OSWALD *et al.*, 2000; RAMACHANDRAN *et al.*, 2003; TARR *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2002).

Tir (78 kDa), por sua vez, é secretada pela bactéria pelo SST3 e translocada para o citoplasma da célula hospedeira, onde é fosforilada de maneira tirosina-quinase independente e inserida na membrana celular (KENNY *et al.*,1997). Além do papel de receptor para intimina, Tir tem uma importante função sinalizadora em células epiteliais. Sua porção exposta ao citosol (domínio citoplasmático) induz a nucleação das proteínas do citoesqueleto, ligando-se inicialmente à proteína adaptadora Nck (1 e 2) que, por sua vez, se liga à porção amino-terminal de N-WASP (*Wiskott-Aldrich syndrom protein*) e ao complexo Arp 2/3 (*Actin related protein 2/3*), resultando na nucleação de filamentos de actina e de outros elementos do citoesqueleto, e culminando com a formação do pedestal característico (KALMAN *et al.*,1999; KENNY, 1999; DeVINNEY *et al.*, 2001). GARMENDIA *et al.* (2004) mostraram que, alternativamente, amostras de EHEC translocam, além de seu receptor

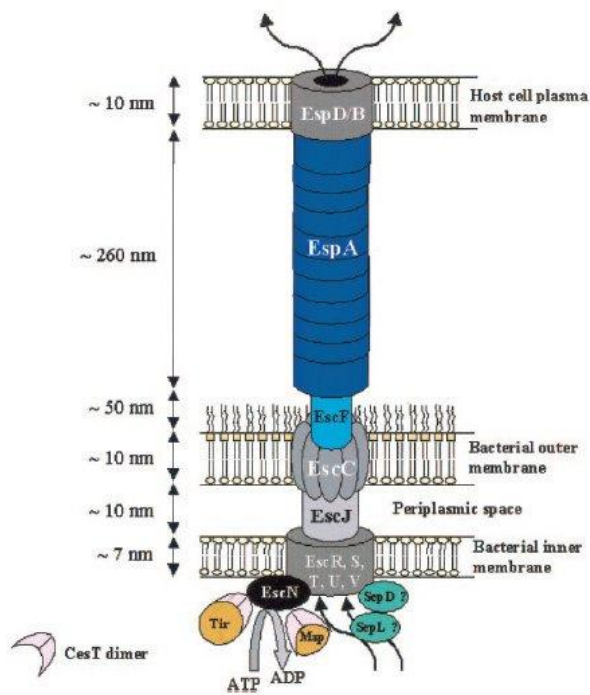


Tir, uma proteína com função adaptadora semelhante a Nck, denominada TccP (“Tir cytoskeleton coupling protein”), também denominada EspF<sub>u</sub>, (CAMPELLONE *et al.*, 2004). Depois de translocada, TccP/EspF<sub>u</sub> ativa a N-WASP, estimulando a polimerização de actina. A polimerização de actina dependente de TccP/EspF<sub>u</sub> foi, inicialmente, descrita apenas para amostras de EHEC (um sub-grupo de STEC) do sorotipo O157:H7. Posteriormente, a ocorrência de *tccP* foi também demonstrada, 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). Outra variante do gene *tccP* foi descrita: além de *tccP*, carregado pelo prófago CP-933/Sp14 foi descrito *tccP2*, carregado pelo prófago Sp4/CP-933M. A presença de *tccP* e *tccP2* em amostras de EPEC demonstra que a polimerização de actina nessas amostras pode ocorrer pelas 2 vias (Tir-Nck e/ou Tir-TccP) (GARMENDIA *et al.*, 2005b; WHALE *et al.*, 2006; WHALE *et al.*, 2007; OOKA *et al.*, 2007).

#### **4. Sistema de Secreção Tipo 3 (SST3) e formação de lesão A/E**

O SST3 é complexo, estando nele envolvidas proteínas presentes na membrana interna, no espaço periplasmático, na membrana externa, no espaço extracelular e na membrana da célula do hospedeiro (GERLACH; HENSEL, 2007). A montagem desse complexo protéico depende de um conjunto de genes que são responsáveis pela formação de um canal (agulha) que conecta a célula bacteriana à célula do hospedeiro (EspA, EscV, EcsJ, EscF, EscB e EscD), e da montagem do aparato de secreção determinado pelos genes *esc* (*E. coli secretion - escRSTU, escCJ e escN*) e *sep* (*secretion of E. coli proteins*) (DEAN *et al.*, 2005; FRANKEL *et al.*, 1998).

Na formação do SST3, EscF é polimerizada, formando uma estrutura semelhante a uma agulha na membrana externa da bactéria (SEKIYA *et al.*, 2001; WILSON *et al.*, 2001) (Figura 3). EspA, então, é secretada e montada sobre EscF, formando uma estrutura filamentosa que ligará a bactéria à célula hospedeira (KNUTTON *et al.*, 1998; FRANKEL *et al.*, 1998). O aparato é completado com a translocação de EspB e EspD para a membrana da célula do hospedeiro, através de EspA; nesse local, essas proteínas formam um complexo, sob a forma de poro. A proteína EscN é uma ATPase citoplasmática de 49 kDa, associada com a membrana interna, que atua como um importante componente do SST3, fornecendo energia para o processo da secreção, já que possui homologia com F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATPase e apresenta um sítio de ligação de ATP (GAUTHIER, *et al.*, 2003; ZARIVACH *et al.*, 2007). Além disso, mutações no gene *escN* anulam a secreção de EspA, EspB e EspD, e, conseqüentemente, interferem na transdução de sinal e o estabelecimento da lesão A/E (ZARIVACH *et al.*, 2007).



**Figura 3.** Diagrama esquemático do SST3 de EPEC/EHEC (Garmendia *et al.*, 2005a).

Diversas proteínas efetoras, translocadas pelo SST3 foram descritas até o momento. EspH é um regulador da formação de filopódio e atua positivamente na formação do pedestal (TU *et al.*, 2003), pois modula a dinâmica das moléculas de actina do citoesqueleto, produzindo alterações (DEAN; KENNY, 2009). Além desses elementos, LEE codifica outras proteínas efetoras também translocadas pelo SST3 (Map, EspF, EspG, EspH, EspZ), chaperoninas (CesAB, CesD, CesD2 e CesF) e proteínas reguladoras (Ler, GrIA, GrIR) (DEAN *et al.*, 2005; DENG *et al.*, 2004). A proteína Map (*Mitochondrial-associated protein*) atua na mitocôndria da célula hospedeira causando uma alteração no potencial da membrana (KENNY; JEPSON, 2000). EspF é secretada no interior da célula hospedeira e atua induzindo apoptose (CRANE *et al.*, 2001), alterando as junções oclusivas do epitélio intestinal e, conseqüentemente, levando à perda de resistência elétrica trans-epitelial, culminando com a morte celular por apoptose (McNAMARA *et al.*, 2001). Além

disso, Map e EspF atuam sinergicamente, alterando a mitocôndria, causando disfunções nesta organela, tais como a permeabilização e morte celular por apoptose (DEAN; KENNY 2009). A proteína EspG atua interagindo com a proteína tubulina, estimulando a desestabilização de microtúbulos *in vitro* (GARMENDIA *et al.*, 2005a) e o papel da proteína secretada EspZ ainda não está esclarecido (CLARKE *et al.*, 2003; KAPER *et al.*, 2004 ; KANACK *et al.*, 2005, DEAN; KENNY, 2009).

CLARKE *et al.* (2003) descreveram um modelo de quatro estágios para a formação da lesão A/E de EPEC. No primeiro estágio, sob condições apropriadas, EPEC expressaria uma fimbria tipo IV, denominada *Bundle-forming pilus* (BFP), intimina e alguns filamentos de EspA. No segundo estágio, a bactéria aderiria de uma forma não íntima à célula epitelial por meio de BFP e filamentos de EspA e um número indeterminado de moléculas efetoras, como, Tir, Esps, e Map, seria injetado pelo SST3 para o interior da célula hospedeira. Essas moléculas efetoras transmitiriam sinais, causando alterações no citoplasma da célula hospedeira, o que resultaria na despolarização da actina e na destruição das microvilosidades. Tir seria, então, fosforilada e inserida na membrana da célula epitelial. No terceiro estágio, os filamentos de EspA seriam eliminados da superfície bacteriana, a adesina intimina ligar-se-ia à porção central, extracelular, de Tir fosforilada, resultando na adesão íntima entre EPEC e célula epitelial e no acúmulo de actina e de outros elementos do citoesqueleto, sob o sítio no qual a bactéria se encontra aderida. Durante o quarto estágio, haveria um grande acúmulo de proteínas do citoesqueleto, nesse local, resultando na formação da do pedestal.

##### **5. Plasmídeo EAF (*EPEC adherence factor*)**

As amostras de EPEC apresentam um plasmídeo de virulência denominado EAF (pEAF), que contém os genes envolvidos com a biogênese da fímbria BFP, que se localizam em uma região de 11 kb de pEAF (DONNENBERG, 1996; DONNENBERG *et al.*, 1997), responsável pelo fenótipo de aderência localizada (adesão em grupos compactos) (SCALETISKY *et al.*, 1984), e ainda o operon *per* (*plasmid encoded regulator*), o qual codifica um complexo regulador de vários genes de virulência de EPEC (*per A, B, C*) (TOBE *et al.*, 1999). Recentemente, foi descrito que o sistema de transporte de fosfato está envolvido na regulação positiva da colonização de EPEC, por aumentar a expressão de *perA* e *perC*. Como consequência, determina um aumento na transcrição dos genes que codificam BFP e Intimina (FERREIRA; SPIRA, 2008).

Portanto, embora o plasmídeo EAF não seja essencial para a formação das lesões A/E, sua presença aumenta a eficiência com que elas ocorrem, possivelmente por influência do operon *per* (GOMEZ-DUARTE; KAPER, 1995). Além disto, este plasmídeo alberga uma seqüência genética críptica (EAF) (NATARO *et al.*, 1985) que é utilizada como sonda genética (sonda EAF) na identificação de EPEC típica (KAPER, 1996; TRABULSI *et al.*, 2002).

## **6. Fatores de virulência cromossomais localizados fora da região LEE**

As EPEC possuem genes de virulência adicionais que são codificados fora da região LEE, utilizam o SST3 para serem translocadas e podem alterar processos celulares quando da interação com as células hospedeiras. EspC, uma proteína auto-transportadora, é translocada via SST3 para o citoplasma da célula hospedeira, onde exerce efeito citopático, destruindo o citoesqueleto

(VIDAL; NAVARRO-GARCIA, 2008). EspG2 é uma proteína que desestrutura a rede de microtúbulos na célula hospedeira (SHAW *et al.*, 2005). Outro efector, NleA (*non-LEE encoded factor A*), também conhecido como EspI, possui um importante papel na colonização de cólon em modelo murino com *Citrobacter rodentium* (MUNDY *et al.*, 2004); além disso, nas EPEC, o gene *espI* localiza-se em um profago (MUNDY *et al.*, 2004).

O efector NleD desempenha papel importante na colonização de intestinos de bezerros (DENG *et al.*, 2004), enquanto os demais efetores, NleB, NleC, NleE, NleH, não possuem, até o momento, uma função esclarecida. A proteína CIF (*Cycle inhibiting factor*) é uma molécula efectora, translocada através do SST3, que bloqueia a transição G<sub>2</sub>/M do ciclo celular, impedindo a ativação de quinase ciclina-dependente (MARCHES *et al.*, 2003). O efector EspJ, atua modulando a dinâmica da infecção (DAHAN *et al.*, 2005), e em um recente estudo (MARCHES, *et al.*, 2008), demonstrou atividade anti-fagocítica por promover uma *trans*- inibição da fagocitose de macrófagos opsonizados com EPEC e EHEC. Outro fator também codificado fora da região LEE, mas que não utiliza o SST3, denomina-se *lymphostatin* (LifA) e é uma proteína de ~ 385 kDa que age como toxina, inibindo a ativação de linfócitos (KLAPPROTH *et al.*, 2000).

## **7. Barreira do Trato Gastrointestinal**

A barreira intestinal representa a principal interface entre o hospedeiro e o meio ambiente. O trato gastrointestinal é exposto a incontáveis antígenos estranhos e está embebido em uma complexa e exclusiva rede de mecanismos imunológicos e não imunológicos (barreira mucosa gastrointestinal) que

protege o hospedeiro de microorganismos potencialmente patogênicos, enquanto tolera outros micróbios residentes e permite absorção e utilização de nutrientes.

O muco é uma secreção epitelial composta de uma variedade de proteínas e sais, ancorados dentro de um gel viscoso formado por uma única proteína rica em carboidratos, com propriedades que permitem emaranhar bactérias e facilitar a limpeza pelo peristaltismo intestinal. Os constituintes do muco podem mudar durante a inflamação (SAVKOVIC *et al.*, 1997) e o estado de indivíduos secretores e não secretores é de interesse particular em relação à susceptibilidade a infecções (OFEK *et al.*, 2003). Outros eventos fisiológicos, como a acidez gástrica (pH < 4,0), atuam como uma linha de defesa inicial contra bactérias ingeridas e a propagação peristáltica de conteúdos luminiais, em um fluxo distal estável em direção ao cólon, são de grande importância na redução do crescimento bacteriano no intestino proximal (SHERMAN *et al.*, 1987). Assim, o epitélio intestinal tem importante papel como uma barreira que inibe a translocação de microorganismos no hospedeiro. A habilidade de certos patógenos em escapar ou superar as defesas imunológicas e/ou utilizar essas respostas do hospedeiro a seu favor, ditará seu sucesso em promover doença e em sobreviver (ACHESON *et al.*, 2004; GUARNER *et al.*, 2003).

Baseado nos conhecimentos atuais da interação entre o sistema de defesa e os microorganismos, sabe-se que a partir de um estímulo o hospedeiro ativa o sistema de amplificação pró-inflamatório gerando variados mediadores indutores da resposta imune, tais como citocinas especializadas e quimiocinas.

O termo translocação bacteriana (TB) foi criado por WOLOCHOW *et al.* (1966) para descrever a passagem de bactérias do trato intestinal para os sítios extra-intestinais (BERG; GARLINGTON, 1979). Posteriormente, BERG e GARLINGTON (1979) usaram este termo para descrever a passagem de micróbios viáveis e não viáveis bem como de seus produtos (ex. endotoxinas) do lúmen intestinal para os linfonodos mesentéricos e migração para outros órgãos.

O mecanismo de espalhamento sistêmico de bactéria luminal pelo processo de TB tem sido relacionado a três condições principais: sobrecrecimento bacteriano intestinal, rompimento da barreira intestinal e deficiência imunológica do hospedeiro (BERG; GARLINGTON, 1979). Embora essas três condições tenham sido delineadas durante algum tempo, necessita-se ainda de um melhor conhecimento entre TB e seu papel patológico relacionado à instalação de sepse, choque séptico e falência múltipla de órgãos. Além disto, crescentes evidências científicas têm alertado para uma resposta imune deficiente contra antígenos não próprios em pacientes com infecção severa ao invés de uma resposta imune exacerbada (TRANTAFILOU; TRIANTAFILOU, 2004; HOTCHKISS; KARL, 2003). Em vigência de TB, as bactérias alcançariam a via sistêmica por dois caminhos: via sangüínea e via linfática. A via sangüínea da TB ocorreria pela passagem das bactérias da luz intestinal para a microcirculação intestinal e desta para a veia porta, alcançando a circulação sistêmica (KOH *et al.*, 1996 ; MOORE *et al.*, 1991). A via linfática da TB ocorreria pela passagem das bactérias da luz intestinal para os ductos linfáticos aferentes e destes até os linfonodos mesentéricos (LNM), processo este amplamente estudado e aceito por diversos autores (DEITCH,



1989; MAINOUS *et al.*, 1991; WOLOCHOW *et al.*, 1966; BERG; GARLINGTON, 1979; KOH *et al.*, 1996). Uma vez alcançado o LNM, as bactérias seguiriam pela linfa mesentérica, pelos ductos linfáticos eferentes, e destes para o ducto torácico e circulação sistêmica (MAINOUS *et al.*, 1991; KOH *et al.*, 1996; SÁNCHEZ-GARCIA *et al.*, 1997).

Diversas desordens gastrointestinais, tais como obstruções intestinais, estados inflamatórios avançados, doenças hepáticas colestáticas bem como intoxicações alimentares e terapias prolongadas com antibióticos, têm sido relacionadas com o desequilíbrio da microbiota intestinal com conseqüente promoção de TB (WIEST; RATH, 2003). A literatura mostra que a correlação entre microbiota intestinal e agente infeccioso isolado em pacientes com sepse é de 30 a 80% (MACFIE *et al.*, 1999).

Os principais agentes infecciosos relacionados com a sepse são as bactérias Gram-negativas, sendo a *E. coli* a mais freqüentemente encontrada (MARSHALL *et al.*, 1988; O'BOYLE *et al.*, 1998; MACFIE *et al.*, 1999). Entretanto, os mecanismos ou vias que as bactérias utilizam no processo de translocação ainda não estão claramente elucidados e, até onde se conhece, o fenômeno não foi pesquisado em amostras de *E. coli* relacionadas com diarreia.

Embora o entendimento atual seja de que os patótipos enteropatogênicos são incapazes de causar doença fora do trato intestinal (NATARO; KAPER, 1998) muito pouco se conhece sobre a ocorrência de capacidade de translocação bacteriana entre as *E. coli* ditas patogênicas, particularmente entre aquelas que promovem infecções intestinais, muitas das

quais sabidamente evocam processos inflamatórios como parte da gênese das diarreias.

## **8. EPEC Típica (tEPEC) e EPEC Atípica (aEPEC)**

As amostras de EPEC podem ser divididas em dois grupos: EPEC típica (tEPEC) e EPEC atípica (aEPEC). Pode-se definir as tEPEC como amostras que apresentam o plasmídeo EAF e não produzem a toxina Shiga (Stx) (KAPER,1996), esta última sendo uma característica do patotipo EHEC. As aEPEC são desprovidas desse plasmídeo.

Vários estudos epidemiológicos mostram que as aEPEC são muito heterogêneas em relação aos sorotipos e fatores de virulência que apresentam (SCALETSKY *et al.*, 2002; DULGUER *et al.*, 2003; VIEIRA *et al.*, 2001; GOMES *et al.*, 2004; ROBINS-BROWNE *et al.*, 2004., AFSET *et al.*, 2008). As aEPEC podem ou não pertencer aos denominados sorogrupos clássicos de EPEC (CAMPOS *et al.*, 2004) e quando o sorogrupo pertence àqueles clássicos de EPEC, geralmente diferem das tEPEC em relação ao antígeno H (HERNANDES *et al.*, 2009).

Atualmente, aEPEC tem apresentado um maior significado na etiologia da diarreia em países desenvolvidos (TRABULSI *et al.*, 2002; HERNANDES *et al.*, 2009), pois estudos vêm sugerindo que uma variedade de amostras de *E. coli* podem ser enquadradas como aEPEC e já estão entre os principais agentes causadores de diarreia em nosso meio e em outros países (GOMES *et al.*, 2004; DULGUER *et al.*, 2003; REGUA-MANGIA *et al.*, 2004; SCOTLAND *et al.*, 1996; AFSET *et al.*, 2003; COHEN *et al.*, 2005; FRANZOLIN *et al.*, 2005; ORLANDI *et al.*, 2006). Recentes estudos epidemiológicos têm demonstrado

um maior número de casos de aEPEC em relação às tEPEC (AFSET *et al.*, 2004; ROBINS-BROWNE *et al.*, 2004; FRANZOLIN *et al.*, 2005; BUERIS *et al.*, 2007), posicionando as aEPEC como patógenos emergentes.

EPEC típicas e atípicas também apresentam padrões de aderência distintos quando em contato com células HeLa e HEp-2. Enquanto as tEPEC apresentam o padrão de aderência localizada (AL), que se caracteriza pela formação de microcolônias bacterianas compactas em um período de 3 horas de ensaio (SCALETSKY *et al.*, 1984), as aEPEC podem apresentar padrões de adesão semelhantes a AL (*localizada-like* ou ALL), no qual as bactérias aderem à superfície das células epiteliais, formando microcolônias com aspecto frouxo. Além disto, algumas amostras de aEPEC apresentam aderência agregativa ou aderência difusa (TRABULSI *et al.*, 2002; HERNANDES *et al.*, 2009).

O padrão AL está associado com a produção de BFP, que promove a agregação bactéria-bactéria dentro das microcolônias (GIRON *et al.*, 1991) e a aderência que precede a aderência íntima mediada pela intimina. Em um estudo que utilizou fragmentos de biópsia intestinal humana mantidos em cultura, foi demonstrado que BFP não inicia a colonização na superfície da mucosa (HICKS *et al.*, 1998). Por outro lado, CLEARY *et al.*, (2004) demonstraram que BFP parece ser um fator predominante na adesão inicial em células Caco-2, embora em sua ausência, filamentos de EspA possam assumir esse papel, mas com uma menor eficiência. Além disso, um estudo realizado com voluntários mostrou que, independentemente do mecanismo de ação de BFP na colonização, este é um importante fator de virulência *in vivo* (LEVINE *et al.*, 1985).

As relações entre as características genóticas e fenóticas de amostras de EPEC têm sido estudadas por meio de análises de estrutura clonal, utilizando-se diversas técnicas de tipagem bacteriana, tais como a análise de fragmentos de DNA amplificados correspondentes às seqüências repetitivas ERIC (ERIC-PCR), por ribotipagem e por *multilocus enzyme electrophoresis* (MLEE) (CAMPOS *et al.*, 1994, GONÇALVES *et al.*, 1997, DALLA-COSTA *et al.*, 1998; PEIXOTO *et al.*, 2001; GUILARD *et al.*, 2003). O uso dessas técnicas tem demonstrado a existência de uma estreita relação clonal em EPEC relacionada aos sorotipos que compõem o sorogrupo. Esses clones, que foram, de modo geral, definidos pelo sorotipo, são homogêneos com relação aos fatores de virulência que apresentam (TRABULSI *et al.*, 2002).

Estudos epidemiológicos sobre a diarreia endêmica, conduzidos em nosso laboratório, permitiram o isolamento de amostras de *E. coli* não pertencentes a sorogrupos de EPEC, mas que eram portadoras do gene *eae* e desprovidas das seqüências das sondas EAF e *stx* (*E. coli eae+* EAF- *stx*). Desse modo, essas amostras foram provisoriamente caracterizadas como aEPEC. Apesar de seus sorotipos serem muito diversificados, um deles (sorotipo O51:H40) havia sido identificado em nosso laboratório em 4 crianças com e 2 sem diarreia (VIEIRA *et al.*, 2001). A importância desse sorotipo foi ainda mais evidente quando detectamos, na coleção de nosso laboratório, uma amostra isolada em 1985 e, em estudos mais recentes, outras 5 amostras isoladas de pacientes com diarreia em Ribeirão Preto, S.P., e no Rio de Janeiro, R.J. pertencentes a esse mesmo sorotipo (GOMES *et al.*, 2004). Mais recentemente, amostras do sorotipo O51:H40 foram isoladas de crianças

diarréicas em Salvador, B.A (BUERIS, 2007) e em cães, no Rio de Janeiro (Cerqueira, A., comunicação pessoal).

Em uma avaliação preliminar da atividade de culturas totais em modelo de alça ileal de coelhos *in vivo*, que foi conduzida com uma das amostras do sorotipo O51:H40 (amostra 1711-4/89), Vieira (VIEIRA, 2001) verificou que, além de produzir lesão A/E, essa amostra invadiu e desorganizou o epitélio intestinal; além disto, sugestiva presença de bactérias no interior de células fagocitárias foi também verificada. Estas últimas observações não foram detectadas na infecção pela amostra protótipo de tEPEC (E2348/69), sugerindo que a amostra 1711-4/89 tem potencial enteropatogênico, com mecanismos adicionais ao da lesão A/E.

A capacidade invasora da aEPEC 1711-4/89 foi também detectada *in vitro*, em cultivos de células HeLa (VIEIRA, 2000) e em células Caco-2 polarizadas e diferenciadas (SAMPAIO, 2004). O estudo da cinética da infecção da amostra 1711-4/89 indicou que a população bacteriana intracelular permaneceu estável até 24 horas de infecção, sugerindo que a residência intracelular poderia lhe conferir vantagens em relação à resposta imune inata do hospedeiro (SAMPAIO, 2004). Entretanto, não sabemos se esta bactéria poderia translocar pela mucosa intestinal e ganhar sítios mais profundos do hospedeiro.

Recentemente, realizamos um estudo inicial com as 11 amostras do sorotipo O51:H40 de nossa coleção (MOREIRA, 2004; MOREIRA *et al.*, 2008). Nesse estudo, identificamos e comparamos alguns aspectos da interação dessas amostras com células intestinais cultivadas *in vitro* (Caco-2 e T84), a presença de 24 genes de virulência descritos nos diferentes patotipos de *E.*

*coli*, bem como suas relações genéticas por meio de técnicas de *fingerprinting*. Os padrões de aderência encontrados foram um pouco diversificados: apenas 1 amostra apresentou AL, enquanto as demais apresentaram variações de AL, detectadas apenas em experimentos mais prolongados (ensaios de 6 horas). Além disto, a capacidade de produzir a lesão A/E, pesquisada pelo teste de FAS, foi detectada em 8 amostras (~70%) que, conseqüentemente, se mostraram potencialmente enteropatogênicas. Naquele momento, desconhecíamos se essas lesões ocorrem *in vivo* (exceto na amostra 1711-4/89) e os fatores que impediram a formação de lesão A/E pelas amostras FAS negativas.

Ainda como resultado desse estudo anterior, verificamos que apenas uma amostra (0151-1/85), entre as 11 estudadas, apresentou as sequências relacionadas ao pEAF, isto é, *perA* e *bfpA*, e 4 amostras apresentaram a seqüência *shf*, que codifica uma proteína críptica em *Shigella* e cujo papel na patogenicidade bacteriana ainda não foi esclarecido. Como a amostra 0151-1/85 expressou a pilina da fímbria BFP, conforme detectado por *imunoblotting*, e AL em ensaios de 3 horas, foi classificada como tEPEC, enquanto as demais foram classificadas como aEPEC.

Como as amostras de O51:H40 de nossa coleção foram isoladas de pacientes com e sem diarréia e este sorotipo foi o mais freqüente entre amostras de aEPEC isoladas em nosso meio, neste estudo, examinamos todas as amostras de O51:H40 de nossa coleção quanto à presença de novas propriedades e genes de virulência em *E. coli*, seu potencial enteropatogênico *in vivo*, na tentativa de se obter uma visão mais ampla do potencial de virulência do sorotipo O51:H40.

## **Objetivo geral**

Avaliar o potencial enteropatogênico de amostras de *E. coli* do sorotipo O51:H40 *in vitro* e *in vivo*.

## **Objetivos específicos**

1. Pesquisar a ocorrência de marcadores de virulência descritos recentemente em *E. coli*.
2. Pesquisar a necessidade de fosforilar a proteína Tir e a ocorrência do gene *tccP* para promover a lesão A/E.
3. Pesquisar as interações das amostras do sorotipo com o epitélio intestinal *in vivo*, por meio de ensaios de alça intestinal ligada de coelhos.
4. Avaliar uma amostra selecionada aEPEC 1711-4/89 quanto ao potencial de translocação bacteriana *in vivo*, assim como os efeitos produzidos na perfusão tecidual em diferentes órgãos destes animais, comparando seu comportamento com o da amostras protótipo de tEPEC E2348/69.

## Material e Métodos

### 1. Amostras bacterianas

Foram analisadas 11 amostras de *E. coli* pertencentes ao sorotipo O51:H40, sendo 9 de pacientes com diarreia e duas de pacientes não diarreicos. A origem das amostras e os dados clínicos e microbiológicos dos pacientes portadores de *E. coli* O51:H40 estão apresentados na Tabela 1. Seis amostras foram obtidas em dois estudos epidemiológicos conduzidos no laboratório da Disciplina de Microbiologia da UNIFESP, em São Paulo (1985 a 1990), em colaboração com o *Centers for Disease Control and Prevention*, Atlanta, Ga., USA (GOMES *et al.*, 1998). Três amostras foram isoladas no Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira, hospital público ligado à Universidade Federal do Rio de Janeiro (GOMES *et al.*, 2004). As duas amostras restantes foram isoladas e identificadas pelo Instituto Adolfo Lutz e gentilmente cedidas pela Dra. Kinue Irino, uma delas tendo sido isolada de um adulto adético. Nesses estudos, todas as amostras foram identificadas como portadoras do gene *eae* (*eae+*) e desprovidas de seqüências genéticas homólogas às seqüências associadas à virulência de outras categorias diarreogênicas: ETEC (sondas STh, STp, LTI), EIEC (sonda *Inv*), STEC (sondas *stx1* e *stx2*), e, com exceção de uma amostra (0151-2/85), EPEC (sonda EAF). Além disto, a presença de outro enteropatógeno reconhecido foi detectada em 5 das 9 amostras provenientes de fezes diarreicas (GOMES *et al.*, 2004; VIEIRA, *et al.*, 2001). Em estudo posterior (MOREIRA, 2004), verificou-se que todas as amostras são desprovidas de 23 potenciais genes de



virulência, já descritos nos patótipos de *E. coli*, sendo que 4 amostras eram portadoras da seqüência críptica *shf*.

Nos diversos experimentos, foram utilizadas, como controles, as seguintes amostras: *E. coli* E2348/69 (tEPEC protótipo, produtora de AL) (LEVINE *et al.*, 1985), *E. coli* EDL 933 (EHEC/STEC protótipo), *E. coli* K12 711 (KELLER *et al.*, 1998), *E. coli* 39 R861 (Central Public Health Laboratory, Londres, Reino Unido). A amostra *E. coli* R6 (KOH; SILVA, 1996), isolada de um rato submetido a um experimento de translocação *in vivo*, foi utilizada como controle positivo de translocação bacteriana. Nesse estudo o animal foi tratado durante nove dias com Tetraciclina a 0,5 mg/ml e Metronidazol a 2 mg/ml, por via oral. Até o 3º dia, a coprocultura foi negativa. A partir do 4º dia da administração dos antibióticos, verificou-se que o animal passou a ser colonizado por uma amostra de *E. coli* resistente à Tetraciclina (Tet<sup>R</sup>). Nove dias depois, o animal foi sacrificado e analisado quanto à presença de bactérias Gram negativas Tet<sup>R</sup> nos seguintes materiais: sangue da veia porta, sangue da veia cava inferior, placas de Peyer, linfonodos do mesentério, fígado, baço e fezes. Observou-se a presença de bactérias Gram negativas Tet<sup>R</sup> nas fezes, em linfonodos e nas placas de Peyer. As bactérias isoladas se apresentaram morfolologicamente idênticas e foram identificadas como *E. coli* e sorotipadas posteriormente no Instituto Adolfo Lutz como *E. coli* ONT:H2, recebendo a denominação de *Escherichia coli* R6. As amostras não patogênicas, de *E. coli* HB101 (BOYER; ROULLAND-DUSSOIX, 1969) e uma amostra não patogênica, *E. coli* HS (sorotipo O9:H4) (LEVINE *et al.*, 1983), foram empregadas como controles negativos. Todas as amostras foram conservadas a -70°C em meio LB, acrescido de glicerol a 15%.

Os cultivos bacterianos foram realizados em meio Luria-Bertani (LB, Difco Laboratories Detroit, MI), ágar MacConkey (Difco Laboratories), Meio Essencial de Eagle modificado por Dulbecco -DMEM- (Sigma Chemical Co., ST Louis, MO, USA) conforme as necessidades experimentais. Os meios de cultura e os sais utilizados, exceto quando especificados, foram de procedência Difco (Difco laboratories), Merck (Merck S.A., Rio de Janeiro, RJ) ou Synth (Labsynth S.A., Diadema, SP), Sigma (Sigma Chemical Co.), Gibco (Life Technologies., Inc, Gaithersburg MD, USA) e Eppendorf (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). Os meios sob a forma desidratada foram preparados conforme as especificações dos fabricantes.

Os seguintes antibióticos foram utilizados, quando indicados: ampicilina (Amp), 100 µg/ml; ácido nalidíxico (Nal) a 50 µg/ml e canamicina (Km) a 50 µg/ml. Os reagentes 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-d-galactosídeo (X-Gal) e isopropil-tio-β-galactosídeo (IPTG), foram utilizados nas concentrações 80 µg/ml e 1 mM, respectivamente.

## **2. Métodos genéticos:**

Exceto quando indicado, as técnicas de manipulação e de análise de DNA utilizadas estão descritas em SAMBROOK e RUSSEL (2001) e AUSUBEL *et al.* (1995).

### **2.1. Extração de DNA genômico**

A extração de DNA genômico foi realizada utilizando-se o *Easy-DNA<sup>TM</sup> Kit (For genomic DNA isolation-Protocol # 3 - Invitrogen, U.S.A.)*, conforme recomendações do fabricante.

## **2.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

A técnica de PCR utilizou DNA molde, obtido a partir de uma colônia bacteriana cultivada em meio sólido (16-18 h a 37°C), ressuspensa em 300 µl de água bidestilada esterilizada e submetida à fervura durante 10 minutos. As reações foram realizadas em banho de gelo, em tubos tipo Eppendorf de 0,2 ml, onde foram colocados os reagentes descritos a seguir: 25 µl de PCR Master Mix (Promega, Madison, WI, USA), primers específicos (100 pmoles), 1 µl de DNA molde (lisado bacteriano) e água para completar 50 µl de volume de reação. A seguir, os amplicons foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, corados com brometo de etídio (anexo item 2.1.3) e visualizados em transiluminador (Mini-Transluminador, Bio-Rad, USA).

## **2.3. Extração de DNA plasmidial em pequena escala**

A extração de DNA plasmidial em pequena escala foi realizada utilizando-se o *kit Wizard<sup>®</sup> Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega, Madison, WI, USA), conforme recomendações do fabricante.

## **2.4. Reação de precipitação do DNA**

O DNA foi precipitado pela adição, a uma solução de 100 µl de DNA em tampão TE (anexo item 2.1.1), de 10 µL de acetato de sódio (anexo item 2.1.2) e 300 µl de etanol (p.a.), homogeneização e incubação a -70°C durante 1 hora. Após este período, a solução foi centrifugada a 4°C durante 15 minutos a 16.000 g (centrífuga Eppendorf, mod. 5402, Germany), o sobrenadante foi descartado e 800 µl de etanol a 80% foram acrescentados para lavagem do sedimento. A solução foi novamente centrifugada a 16.000 g por 5 minutos. Após essa centrifugação, o etanol foi removido e o sedimento foi seco à temperatura ambiente e, então, ressuspenso em água ou no tampão TE (anexo item 2.1.1).

## **2.5. Reações de digestão de DNA**

As reações de digestão com as enzimas de restrição foram realizadas em um volume final de 20 µl. As reações foram realizadas empregando-se os tampões e as temperaturas apropriadas, de acordo com as recomendações do fabricante para cada enzima de restrição empregada neste estudo.

## **2.6. 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 µl e mantidas a -70°C. Para a transformação, as células competentes foram descongeladas em gelo e 1 µl 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  $\mu$ F e controle de pulso de 200  $\Omega$ . Imediatamente após a eletroporação, foi adicionado 1 ml de meio SOC (item 2.1.4 ) (SAMBROOK ; RUSSEL, 2001) à reação, e a mesma foi incubada a 37°C Durante 1 h, sob agitação. Em seguida, diferentes volumes dos cultivos foram plaqueados em agar LB contendo antibióticos apropriados e as placas incubadas a 37°C por 18 h.

## 2.7. Obtenção da amostra mutada 1711-4::*escN*

Com a colaboração da Dra Suely Carlos Sampaio, foi realizada uma mutagênese não-polar no gene *escN* da amostra 1711-4/89 com a finalidade de verificar o envolvimento do SST3 no processo da TB. Para esse objetivo, foi escolhido o sistema que utiliza o vetor suicida pJP5603, pois contém a origem de replicação R6K ori (derivada de pUTKm), um fragmento de 1861 pb (derivado de Tn5 e conferindo resistência à canamicina), e um fragmento de 760 pb de pSUP202 (carregando o sítio RP4 Mob para mobilização do plasmídeo) (PENFOLD; PEMBERTON 1992). Este vetor é dependente da complementação *in trans* dos genes que codificam a proteína Pir para que ocorra a sua replicação estável na amostra hospedeira.

Inicialmente, um fragmento de 481 pb do gene *escN* foi amplificado com primers específicos (Tabela 2), a partir da amostra selvagem 1711-4/89, e clonado no vetor *pGEM – T Easy* (Promega, Madison, WI, USA). Após a reação de ligação, células competentes de *E. coli* JM109 (YANISCH-PERRON *et al.*, 1985) foram transformadas por eletroporação e plaqueadas em ágar LB contendo ampicilina (100 µg/ml), IPTG 1 mM e X-Gal (80 µg/ml). As colônias brancas, resistentes a ampicilina, foram selecionadas para confirmação da presença do inserto por PCR e de reações de digestão com *EcoR* I. Após essa etapa de clonagem, o fragmento do gene *escN* clonado em *pGEM – T Easy* foi extraído do vetor com *EcoR* I, eluído do gel com o *kit Wisard® SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega, Madison, WI, USA), e ligado ao vetor pJP5603 (Km<sup>R</sup>) no sítio de *EcoR*I. Após reação de ligação, as células competentes de *E. coli* DH5α<sub>pir</sub> (ELLIOT; KAPER, 1997) foram transformadas também por

eletroporação e plaqueadas em ágar LB contendo canamicina (50 µg/ml) e X-Gal (80 µg/ml). As colônias brancas resistentes a canamicina foram selecionadas e testadas para a presença do inserto por PCR. As colônias que apresentaram o inserto foram armazenadas a -70°C em LB-glicerol contendo canamicina. Em seguida, o DNA recombinante foi extraído e transferido para *E. coli* S17-λ pir (SIMON *et al.*, 1983) por eletroporação (esquema representativo no anexo 4).

Para os experimentos de conjugação, foi utilizada, como receptora, uma amostra mutante espontânea derivada de aEPEC 1711-4/89, que apresenta resistência ao ácido nalidíxico (selecionada neste estudo, por sub-cultivos em placa contendo a droga). As amostras de *E. coli* S17-1λ pir (Km<sup>R</sup>) (doadora) e 1711-4/89 (Nal<sup>R</sup>) (receptora) foram cultivadas por 16 a 18 h em 3 ml de caldo LB contendo os respectivos antibióticos. Em seguida, 1 ml da doadora e 100 µl da receptora foram centrifugados a 720 g por 15 minutos, e ressuspensos em 100 µl de LB. Essas suspensões foram misturadas sobre a superfície de membranas de filtração de poros de 0,45 µm (Millipore), dispostas sobre placas de Petri contendo ágar LB. Duas membranas foram colocadas em cada placa. Após incubação por 16 a 18 h, o crescimento de cada membrana foi suspenso em 10 ml de PBS. A seguir, 50, 100 e 150 µl da suspensão (mistura de conjugação) foram plaqueados em ágar LB contendo canamicina e ácido nalidíxico. O transconjugante (mutante) selecionado foi denominado 1711-4:escN.

### **2.7.1. Curva de Crescimento**

Para a realização da curva de crescimento, a amostra 1711-4/89 e a amostra mutada 1711-4::*escN* foram cultivadas durante 18 horas à 37°C. Decorrido este período, cada cultura foi diluída na razão 1:50, utilizando-se *erlenmeyer* de 250 ml contendo 20 ml de caldo LB. As suspensões foram incubadas, sob agitação, a 37°C durante 30 minutos e posteriormente foram retiradas alíquotas de 1 ml para a realização das leituras (DO 600) em intervalos de 1 hora até que o teste tivesse completado 7 horas.

### **2.8. Técnica de *Southern-blot***

Para a realização deste ensaio, primeiramente selecionamos 4 enzimas de restrição que não possuíam sítios de clivagem no gene *escN* das amostras pesquisadas. Após a corrida eletroforética, os géis de agarose a 1%, contendo o DNA genômico das amostras 1711-4/89 e 1711-4::*escN* digeridos com as enzimas *EcoRV*, *PstI*, *HindIII* e *MluI*, foram corados e observados sob luz ultravioleta, sendo que o padrão de bandeamento do marcador de peso molecular  $\lambda$  *HindIII* (Invitrogen, USA) foi marcado sobre uma transparência e fotografado. Após diversas tentativas, apenas o gel contendo as amostras digeridas com a enzima *EcoRV* foi utilizado nas etapas posteriores, já que o tratamento com as demais enzimas não forneceu perfis de digestão adequados. Em seguida, o gel foi colocado em um recipiente contendo uma solução desnaturante, (anexo item 2.2.2) durante 40 minutos à temperatura ambiente. O gel foi lavado com água bidestilada para a retirada do excesso da solução desnaturante e transferido para outro recipiente contendo uma solução



neutralizante (anexo item 2.2.3). Este tratamento também foi realizado à temperatura ambiente, por 40 minutos. A seguir, o gel foi colocado sobre uma folha de papel de filtro previamente umedecida com água bidestilada. A membrana utilizada para transferência (Hybond-N- Amersham Biosciences) foi previamente umedecida com solução de SSC 2X (anexo item 2.2.1). A transferência dos fragmentos de DNA do gel para a membrana foi realizada por capilaridade, utilizando-se o aparato de transferência *Vaccugene XL – Vacuum Blotting System* (Pharmacia, EUA), durante 2 h sob vácuo a baixa pressão (50 mbar), segundo recomendação do fabricante. Uma solução de SSC 10 X (anexo item 2.2.1) foi utilizada para transferência. Após a transferência, a membrana foi tratada com a solução de SSC 2X (anexo item 2.2.1) e, em seguida, foi colocada sobre papel de filtro para secar. Ao final desta etapa, o *cross linking* foi realizado. As sequências gênicas de nosso interesse foram detectadas utilizando o *Kit EDL (Nucleic Acid Labelling and Detection System- Amersham, UK Limited)*. A revelação do filme exposto ao gel foi realizada no Setor de Radiologia do Hospital São Paulo, UNIFESP.

## **2.9. Pesquisa de genes de virulência**

A pesquisa de seqüências genéticas associadas a novos fatores de virulência descritos em EPEC e EHEC foi realizada por PCR, utilizando as seqüências nucleotídicas dos *primers* descritos na Tabela 3.

## 2.10. Técnica de *Southern-blot* para localização do gene *toxB*

Os géis de agarose a 0,8%, um contendo o DNA plasmidial e outro, o DNA genômico das amostra *E. coli* 39 R861 (marcador de massa molecular), amostra de EPEC típica protótipo E2348/69 (controle negativo), amostra EHEC protótipo EDL 933 (controle positivo), EPEC atípica 0151-1/85 e EPEC atípica 1711-4/89 (controle negativo) foram colocados em um recipiente contendo uma solução desnaturante (anexo item 2.2.2), durante 40 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, os géis foram lavados com água bidestilada para a retirada do excesso da solução desnaturante e transferidos para outro recipiente contendo uma solução neutralizante (anexo item 2.2.3). Este tratamento também foi realizado à temperatura ambiente, por 40 minutos. A seguir, os géis foram colocados sobre uma folha de papel de filtro previamente umedecida com água bidestilada, e outro papel de filtro umedecido foi depositado sobre os géis, fazendo-se um "sanduíche". Estes conjuntos foram submetidos à secagem em um equipamento *Gel Dryer*, Bio-Rad modelo 543, durante 20 minutos a 80° C. Após a secagem, foram submetidos à hibridação, conforme descrito por GRUSTEIN e HOGNESS (1975), com os respectivos fragmentos de sondas. Fragmento da sonda *toxB* foi obtido pela técnica de PCR utilizando o lisado bacteriano da amostra EDL933 como DNA molde e os iniciadores descritos por BADEA *et al.* (2003). A revelação do filme exposto aos géis foi realizada no Setor de Radiologia do Hospital São Paulo, UNIFESP.

### **3. Método de análise de proteínas**

#### **3.1. Detecção da expressão da proteína EspA**

Com o intuito de verificar se as amostras 3062-1, 3102-1 e 21242 do sorotipo O51:H40, que são negativas para o teste de FAS (MOREIRA, 2004), são capazes de expressar a proteína secretada EspA, foi realizado o ensaio de *immunoblotting* utilizando o anti-soro anti-EspA.

##### **3.1.1- Preparo das amostras para obtenção de extrato total de proteínas**

As amostras foram cultivadas em 25 ml de caldo LB e incubadas a 37°C durante 18 h. Após a incubação, 10 ml de cultura bacteriana foram transferidos para um tubo cônico contendo 10 ml de DMEM acrescido de 2% de SFB. A seguir, esta preparação foi submetida a uma incubação por um período de 6 h à temperatura de 37°C, sob agitação. Decorrido este período, a preparação foi centrifugada a 14.000 g (centrífuga Eppendorf, mod. 5804R/rotor F34-6-38, Hamburg, Germany) durante 10 minutos e, em seguida, o sobrenadante foi desprezado e os sedimentos obtidos foram suspensos em 100 µl de tampão de amostra (anexo item 3.4). Após a fervura por 10 minutos, os extratos foram submetidos à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) (anexo item 3.7).

##### **3.1.2- Imunoblot**

A separação eletroforética das proteínas extraídas, juntamente com o padrão de peso molecular *LMW-SDS Marker* (Amersham Pharmacia Biotech

Inc), foi realizada em SDS-PAGE, de acordo com as condições de desnaturação descritas por LAEMMLI (1970).

Após a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (poro 0,45  $\mu\text{m}$  - BioRad-Hercules, CA, USA) por eletroforese de acordo com o protocolo descrito por TOWBIN *et al.* (1979).

Os géis e as membranas foram montados em uma cuba (*Mini trans-blot*<sup>®</sup> Cell, BioRad, USA) contendo tampão de transferência (anexo item 3.8), de acordo com as instruções do fabricante, onde foram submetidos a uma corrente elétrica de 10-20 mA durante 16-18 h. A seguir, as membranas foram corados em Ponceau S (anexo item 3.9) por 5 minutos, sob agitação lenta. Decorrido este período, o corante foi desprezado e a membrana foi lavada com água bidestilada, até que as bandas pudessem ser visualizadas. Após a verificação das bandas de interesse, a membrana foi novamente lavada com água bidestilada até a completa eliminação do corante.

Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo à nitrocelulose foram bloqueados com 20 ml de Tris-Tween (anexo item 3.11) acrescidos de 1,5 g de soroalbumina bovina (BSA) por 2 h à temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram tratadas por 1 h com o anti-soro para EspA diluído 1:1.000, gentilmente cedidos pelo Dr. Gad Frankel. Após 6 lavagens de 10 minutos cada com Tris-Tween, as membranas foram tratadas por 2 h com o anticorpo secundário, anti-imunoglobulina de coelho marcada com fosfatase alcalina (Bio Rad, USA) e diluída a 1:2.000. Após este período, as membranas foram submetidas a mais 6 lavagens (10 minutos cada) com PBS-Tween e as bandas protéicas de interesse foram identificadas com a solução reveladora (anexo item 3.12).

As amostras tEPECE2348/69 e aEPEC 1711-4 foram utilizadas como controles positivos, enquanto a amostra de *E. coli* HB101 foi utilizada como controle negativo do ensaio.

## **4. Ensaio fenotípicos de virulência**

### **4.1. Ensaio de interação com células cultivadas *in vitro***

#### **4.1.1 - Linhagens celulares utilizadas**

Nos testes de aderência e nos testes de FAS foram empregadas as linhagens celulares humanas HeLa, originária de adenocarcinoma de colo uterino (JONES *et.al*,1971), células HEp-2 (linhagem de células tumorais derivadas de carcinoma laríngeo humano). Nos testes de fosforilação da tirosina foram utilizadas as linhagens HeLa e T84 (originária de carcinoma de colo-retal).

#### **4.1.2 - Preparo das microplacas e condições de cultivo**

As células HeLa e HEp-2 foram mantidas por meio de sucessivos cultivos em garrafas plásticas apropriadas, contendo DMEM acrescido de 2 g/l de bicarbonato de sódio, 15 mM de HEPES (Sigma, Chemical Co. St. Louis, USA), 1% de penicilina/estreptomlcina (Gibco, Life Technogies) e 10% de soro fetal bovino (SFB), sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> à temperatura de 37°C , por cerca de 2 dias, sendo o meio de cultura trocado a cada 48 h.

A linhagem celular T84 foi cultivada em uma mistura de meio DMEM-F12 (Gibco, Life Technogies), suplementado com 2 g/l de bicarbonato de sódio, 15 mM de HEPES acrescido de 10% de SFB e 1% de penicilina-estreptomicina

sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> à temperatura de 37°C. O cultivo das células T84 seguiu o mesmo protocolo descrito para as células HeLa e HEp-2.

No preparo das microplacas, após a formação das monocamadas celulares na superfície dos frascos, as culturas foram lavadas com 2 ml de solução de ATV (anexo item 1.3) e a seguir, 1 ml da mesma solução foi adicionado, seguida de agitação manual dos frascos durante 3-5 minutos para promover o destacamento das monocamadas. As suspensões celulares foram diluídas 1:20 nos respectivos meios de cultivo, de modo a obter-se suspensões com aproximadamente 10<sup>5</sup> células/ml e de 2 ml dessas preparações foram distribuídas em microplacas de 24 orifícios (Corning) contendo lamínulas de vidro (13 mm de diâmetro).

A incubação foi realizada a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 48 h para as microplacas de células HeLa e HEp-2, até atingirem 80% de confluência, e até aproximadamente 10 dias, no caso das células T84, após atingirem o estágio de células pós confluentes e diferenciadas.

#### **4.2. Teste de adesão as células HeLa e HEp-2 (ensaios de 6 horas)**

As bactérias foram cultivadas em 3 ml de meio LB por 18 h a 37°C, e submetidas a ensaios de aderência (CRAVIOTO *et al.*,1979). Para essa finalidade, monocamadas incompletas de células HeLa e HEp-2 (80% de confluência), dispostas nas microplacas de 24 orifícios, foram submetidas a duas lavagens com PBS (anexo item 1.1) e acrescidas de 1 ml de DMEM sem antibióticos, suplementados com 2% de SFB e D-manose a 2% (anexo item 2.4) . A cada orifício, foram adicionados 20 µl de cultura bacteriana. Após 3 h

de incubação a 37°C, as preparações foram lavadas com PBS (anexo item 1.1) e o meio de cultura renovado. Depois de 3 h adicionais de incubação, nas condições descritas, as preparações foram lavadas novamente, fixadas com 1 ml de metanol durante 30 minutos e coradas com solução de May Grünwald (anexo item 1.6) por 5 minutos e com solução de Giemsa (anexo item 1.7) por 20 minutos. As lamínulas foram, então, lavadas em água corrente, secas e observadas por microscopia óptica de imersão.

#### **4.3. Teste de FAS (*Fluorescent actin-staining*)**

A capacidade de causar acúmulo de actina em células HeLa e foi avaliada através do teste de FAS (KNUTTON *et al.*, 1989). Para essa finalidade, foi utilizado o procedimento descrito no item 4.2, exceto pelo meio de cultura que, neste ensaio, foi utilizado DMEM acrescido de SFB a 10%, ao invés de 2%. Ao final do teste, as células foram fixadas com solução de formaldeído a 3% (anexo item 1.9), lavadas e permeabilizadas com Triton X-100 a 1% (anexo item 1.10), durante 5 minutos. Após novas lavagens, as preparações foram tratadas com FITC-faloidina (solução de isotiocianato de faloidina marcada com fluoresceína) a 5 µg/ml (anexo item 1.8), sob abrigo de luz, durante 20 minutos. Após este período, foram realizadas 3 lavagens a cada 10 minutos e em seguida, as lamínulas foram montadas em lâminas de vidro com 10 µl de glicerol a 90% em PBS e analisadas por microscopia de fluorescência.



#### **4.4. Detecção da Fosforilação de Tirosina**

A detecção da ocorrência de proteínas tirosina-fosforiladas foi realizada por imunofluorescência, como descrito por ROSENSHINE *et al.* (1992), utilizando células HeLa. Após a execução do teste convencional de aderência (item 4.2), os cultivos celulares foram fixados com formaldeído a 2% em PBS (item anexo 1.1), durante 30 minutos. Os tapetes foram, então, lavados 3 vezes com PBS (item anexo 1.1) e, a seguir, permeabilizados com Triton X-100 a 0,1% (anexo item 1.10) em PBS por 4 minutos, à temperatura ambiente. Após a lavagem com PBS, as células foram incubadas com anticorpo primário (anticorpo monoclonal antifosfotirosina diluído 1:500 em PBS), cedidos pelo Dr. Gad Frankel, durante 18 h, sob refrigeração, à temperatura de 4°C (ambiente úmido). Os tapetes foram lavados novamente com PBS e, em seguida, incubados com 100 µl do anticorpo secundário (anti-mouse IgG-FITC diluído 1:100 em PBS) durante 1 h, à temperatura ambiente. Após 3 novas lavagens com PBS, as lamínulas foram montadas em PBS-Glicerol (1:9) e observadas em microscopias de fase e fluorescência. As áreas fluorescentes indicativas do acúmulo de proteínas com resíduos de tirosina fosforilados devem coincidir com a presença de microcolônias bacterianas, visualizadas em microscópio de fase.

#### **4.5. Ensaio de alça ileal ligada de coelhos *in vivo***

Os experimentos de alça ligada foram realizados no Departamento de Ornitopatologia da Faculdade de Zootecnia e Medicina Veterinária da

Universidade de São Paulo, pelo Prof. Dr. Antônio José P. Ferreira, seguindo-se técnica descrita por TRABULSI *et al* (1964). Foram utilizados coelhos New Zeland, com idades entre 2 e 4 meses e pesos entre 1300 e 1800 g, cujas fezes não apresentavam amostras de *E. coli* portadoras do gene *eae*, conforme verificado por PCR. Os coelhos foram alimentados somente com solução de glicose a 10%, nas 48 h que antecederam o teste.

O projeto de investigação foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UNIFESP-EPM (anexo).

#### **4.5.1. Amostras testadas:**

**Grupo teste:** Inoculação das alças intestinais com 1 mL de cultura bacteriana ( $10^8$  UFC/ ml) (cultivadas por 18 h a 37°C) das seguintes amostras do sorotipo O51:H40, 21075, 21323, 21242, 2022/01, 1757/01, 3062-1/89 e 3102-1/89.

**Grupo controle negativo:** Amostra não patogênica *E. coli* HB101.

**Grupo controle positivo:** Amostra protótipo de tEPEC (E2348/69).

#### **4.5.2. Procedimento**

Os coelhos foram anestesiados por meio de injeção intramuscular de Telazol (Fort Dodge Animal Health, Iowa, USA), utilizando-se a dose de 0,2 ml/kg, e logo a seguir, foram administrados 0,3 ml/kg do analgésico Nilperidol (Cristália do Brasil). Na região abdominal (linha mediana abdominal), com prévia tricotomia e antisepsia com solução iodatada foi realizada uma incisão

cirúrgica na linha mediana abdominal, o intestino delgado foi exposto e a extremidade proximal do íleo, amarrada com fio de sutura. Esse segmento foi lavado com solução salina esterilizada a 0,9%, aplicada com uma seringa. A seguir, foram feitas alças intestinais de aproximadamente 5 cm e interalças de 3 cm, com fio de sutura. Nessas alças, foi inoculado 1 ml de culturas bacterianas. Em cada coelho, foram feitas, no máximo, 8 alças e o experimento foi realizado em duplicata. Ao final do experimento, as alças foram recolocadas no interior da cavidade abdominal e o peritônio e a pele do animal foram suturados.

Os animais foram mantidos em jejum e, após 18 h, foram sacrificados com 1 ml de Hypnol (pentobarbital, Cristalia, Brasil) a 3% e 0,8 ml de Inoval (Virbac do Brasil). Os intestinos dos coelhos foram retirados para observação e fragmentos da região intestinal foram extraídos e processados para microscopia de luz e eletrônica de transmissão (MET) pela Prof. Dra. Ana Cláudia de Paula Rosa (Universidade do Estado do Rio de Janeiro), no Centro de Microscopia Eletrônica (CEME) desta Instituição, sob orientação da Profa. Dra. Edna Haapalainen, e conforme técnicas padronizadas em nosso laboratório (ABE, 2001).

#### **4.6. Ensaio de Translocação Bacteriana *in vivo***

Todos os experimentos de translocação bacteriana (TB) foram realizados no Laboratório Clínico-Experimental de Gastroenterologia Pediátrica da Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina (UNIFESP-EPM), sob a responsabilidade do Prof. Dr. Ivan Koh.

O projeto de investigação foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UNIFESP-EPM (anexo 6).

#### **4.6.1. Animais:**

Foram utilizados ratos Wistar-EPM, fêmeas, com peso de aproximadamente 200-250 g, idade aproximada de 3 meses, oriundas do Biotério Central de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia - CEDEME, UNIFESP. Os animais permaneceram no período pré-operatório no biotério associado ao laboratório experimental da Disciplina da Gastroenterologia Pediátrica da UNIFESP-EPM, durante um período de adaptação de uma semana, em gaiolas plásticas medindo 40x34x17 centímetros, com cinco animais em cada uma, em ambiente controlado. Os animais receberam ração e água *ad libitum*. Todos os animais foram mantidos em jejum por 24 h antes da realização do experimento, com água *ad libitum*. Durante o período de adaptação, realizamos a pesquisa do gene *eae*, por meio de PCR, nas fezes dos animais adquiridos e somente aqueles livres deste marcador foram submetidos aos ensaios de TB.

##### **4.6.1.1. Grupos de animais:**

**Grupo TB:** Intestino delgado inoculado com 5 ml de suspensão contendo  $10^{10}$  UFC/ml/100 g de peso corporal. Amostras testadas: tEPEC (E2348/69), aEPEC 1711-4/89 (sorotipo O51:H40) e a amostra de 1711-4/89 mutada no gene *escN* (1711-4:*escN*). Foi empregado um total de 11 animais para cada amostra.

**Grupo controle negativo:** Intestino delgado inoculado com soro fisiológico a 0,9% na proporção de 1 ml/100 g de peso (grupo Sham), ou *E. coli* HB101, não patogênica, na mesma concentração. Foi empregado um total de 11 animais para cada amostra.

**Grupo controle positivo:** Amostra *E. coli* R6 (KOH; SILVA, 1996).

As concentrações utilizadas foram as mesmas do grupo TB (n=11, para cada amostra).

#### **4.6.2. Preparo do inóculo 10<sup>10</sup> UFC/ml**

As amostras bacterianas foram cultivadas em meio LB por 18-24 h a 37°C. Uma alíquota de cada cultivo foi semeada em novo meio LB, na relação de 250 µl de suspensão bacteriana para 100 ml de meio LB. Após a incubação por 18 a 24 h a 37°C, sob agitação constante, as culturas foram centrifugadas a 1500 g por 20 minutos. Os sobrenadantes foram desprezados e os sedimentos suspensos com solução fisiológica a 0,9% esterilizada para a obtenção de uma concentração bacteriana de 10<sup>10</sup> UFC/ml. Uma alíquota de 100 µl de cada cultura foi semeada em ágar MacConkey, incubada a 37°C por 18 a 24 h, para a verificação da concentração final dos inóculos.

#### **4.6.3. Procedimentos**

##### **4.6.3.1. Anestesia**

A indução e manutenção anestésica foram realizadas utilizando uma associação de Cloridrato de Xilazina (Fort Dodge, Iowa, USA) e Cloridrato de Quetamina (Fort Dodge, Iowa, USA) em proporção de 1:4, sendo utilizada uma dose de 0,1 ml/100 g de peso corporal por via intramuscular.

#### **4.6.3.2. Inoculação no animal**

Os ensaios de TB *in vivo*, em alça intestinal de ratos, foram realizados segundo a metodologia descrita por KOH e SILVA (1996). Após a anestesia foi realizada a anti-sepsia do abdome com álcool a 70% e colocação de campos cirúrgicos, seguida de laparotomia mediana, ligadura do íleo terminal e reparo da segunda porção do duodeno, sondagem oroduodenal, inoculação das suspensões bacterianas ( $10^{10}$  UFC/ml/100 g de peso corporal); ligadura subsequente obstrutiva do duodeno e remoção da sonda. Em seguida, foi feito o fechamento da parede abdominal em dois planos. A inoculação de  $10^{10}$  UFC/ml e confinamento no intestino delgado é o procedimento utilizado para a indução de translocação bacteriana experimental descrito por PESSUTO *et al.*, (1996). Essa inoculação causou uma dilatação transitória do intestino delgado, que desapareceu dentro de um curto período de tempo.

Após um período de duas horas, os animais foram novamente submetidos à re-laparotomia sob anestesia e as amostras foram coletadas para análise. Foi realizada a coleta com seringa de 1 ml de sangue da veia cava inferior, seguida de excisão dos linfonodos do mesentério (LMN), baço e fígado. A amostra de sangue foi semeada diretamente em meio de MacConkey e, após a pesagem, baço, LNM, e fígado foram submetidos à trituração, re-suspensos em volume conhecido de salina e filtrados em gaze, em condições estéreis, para a determinação da presença de bactérias. Decorrido o período de incubação, foi realizada a contagem de UFC/ml e determinada a relação do número de bactérias por grama do órgão. O procedimento da TB pode ser visualizado na representação esquemática no anexo.

#### **4.7. Ensaios de Perfusão Tecidual em ratos**

Em seis animais de cada subgrupo de estudo (item 4. 6.1.1), foi avaliada a perfusão tecidual da parede do intestino delgado (porção média do jejuno e do íleo), da superfície do parênquima hepático (lobo esquerdo) e da porção média da face anterior de ambos os rins, utilizando equipamento Laser-Doppler Flow Meter (BLF-21).

O princípio do funcionamento do equipamento de medidor de fluxo ultrassom Doppler é baseado no princípio de Doppler, pelo qual a frequência transmitida é alterada de forma linear, sendo refletida de partículas e bolhas no líquido. O resultado é um deslocamento de frequência Doppler entre transmissor e receptor de frequências que podem ser diretamente relacionadas com a velocidade do fluxo, sendo assim o medidor Doppler pode calcular a vazão volumétrica.

A anestesia e as técnicas assépticas foram empregadas de acordo com o item 4.6.3.1. Foram realizadas três mensurações em cada órgão, antes dos procedimentos (medição basal) e ao final dos procedimentos (medição final). A média das três medições de cada órgão foi expressa em unidades de perfusão tecidual (UPT). A correlação entre a medição basal e a final foi expressa em delta percentil ( $\Delta\%$ ), utilizando a equação matemática:

$$\Delta\% = (\text{medição final} - \text{medição basal}) \times 100 / \text{medição basal}.$$

O índice de perfusão tecidual foi referido como  $\Delta\%$ .

.

#### **4.8. Análise Estatística**

Levando em consideração a natureza da variável quantidade de bactérias recuperadas, foram utilizados testes não paramétricos. Os valores de

UFC obtidos nos estudos microbiológicos foram convertidos a  $\text{Log}_{10}$  para a análise estatística. Escolhemos os seguintes testes: Análise da variância (Anova), Teste de Friedman, Teste de variância por postos de Kruskal-Wallis, Teste G de COCHRAN, Prova exata de Fisher e para a rejeição da hipótese nula,  $p < 0,05$ .

## **5. Análise da resistência ao soro das amostras bacterianas.**

A capacidade de resistência à atividade do complemento presente no soro de ratos foi analisada para todas as amostras bacterianas empregadas no ensaio da TB. As amostras foram cultivadas em meio LB a  $37^{\circ}\text{C}$  por 18 h. As culturas bacterianas foram diluídas 1:100 e recultivadas em meio LB a  $37^{\circ}\text{C}$ , sob agitação constante, até a fase exponencial ( $\text{OD} = 0,5$  a  $0,8$ ).

O teste foi realizado com uma mistura de soros de ratos aparentemente sadios (mantida congelada até o momento do uso), utilizando-se o método de viabilidade em microplacas com 96 orifícios de fundo chato. Volumes de  $75\ \mu\text{l}$  das suspensões bacterianas foram distribuídos em triplicata, nos orifícios da microplaca, e o soro foi adicionado para concentrações finais de 36% e 50%, em um volume final de  $150\ \mu\text{l}$ . Após incubação da microplaca a  $37^{\circ}\text{C}$ , alíquotas dessas misturas foram plaqueadas em ágar MacConkey, nos tempos zero e 24 h, para a determinação de células bacterianas viáveis. Os ensaios foram realizados com soro normal e soro inativado a  $56^{\circ}\text{C}$  por 30 min. Foi utilizada, como controle negativo, a amostra *E. coli* K12 711, sensível à ação lítica do soro e, como controle do crescimento bacteriano, o soro inativado pelo calor. As amostras são consideradas resistentes à ação lítica do soro quando ocorre



multiplicação bacteriana na presença de soro normal tanto a 36% quanto a 50% (KELLER *et al.*, 1998).

## **6. Microscopia intravital**

Para avaliação do estado da microcirculação, os animais anestesiados (n=4) foram posicionados sobre uma placa de vidro com a região jejunal e ileal exteriorizada, umidificada com solução fisiológica a 0,9% estéril e mantida em temperatura ao redor de 37°C com placa de aquecimento regulada em igual temperatura. Uma primeira observação foi realizada antes da administração dos respectivos inóculos bacterianos (observação inicial) e ao final do período de 2 h dos experimentos (observação final). Com o animal posicionado, iniciou-se o estudo da microcirculação mesenterial com auxílio do microscópio intravital Zeiss Axioscope-2 Plus (Carl Zeiss, Germany) utilizando objetivas de 5x, 10x e 20x, acoplado a um sistema composto de duas câmeras, uma analógica e outra digital, o que permitiu o armazenamento das imagens analógicas em vídeo cassete (VHS) e as imagens digitais no computador, usando o programa Axio Vision 3.1 da Zeiss. A conversão das imagens analógicas em formato digital foi realizada utilizando o programa Pinnacle Studio (Pinnacle) versão 8. A análise da microcirculação mesenterial foi direcionada à avaliação do estado funcional das arteríolas, vênulas assim como dos capilares, observando-se a ocorrência de rolamento e adesão leucocitária, lentificação e ou parada do fluxo sanguíneo, focos de hemorragias perivasculares e trombose. Além disso, também foram analisados os vasos linfáticos aferentes do mesentério quanto à sua celularidade, aparente velocidade do fluxo circulante e atividade contrátil da parede linfática.

**Tabela 1.** Origem das amostras e dados clínicos e microbiológicos dos pacientes portadores de *E. coli* O51:H40

Amostra	Ano	Origem <sup>a</sup>	Idade do paciente	Presença de diarreia	Dados clínicos	Presença de outros patógenos
O151-1/85	1985	UNIFESP	2 meses	sim	Vômito e muco nas fezes	-
1711-4/89	1989	UNIFESP	4 anos e 5 meses	sim	Vômito e febre	DAEC
1931-2/89	1989	UNIFESP	2 anos e 4 meses	sim	Vômito, febre e dor abdominal	Rotavírus
4361-2/89	1989	UNIFESP	1 ano e 10 meses	sim	Vômito	-
3062-1/89	1989	UNIFESP	2 anos e 5 meses	não	Bronquite	-
3102-1/89	1989	UNIFESP	1 ano e 7 meses	não	Catapora	-
SHU 1757/01	2001	IAL	27 anos	sim	(AIDS)	<i>Campylobacter</i>
SHU 2022/01	2001	IAL	1 ano	sim	-	-
21242	2001	UFRJ	1 ano e 7 meses	sim	Sangue nas fezes	Rotavírus
21075	2001	UFRJ	8 meses	sim	-	Rotavírus
21323	2001	UFRJ	1ano e 6 meses	sim	-	-

<sup>a</sup> UNIFESP, Universidade Federal de São Paulo; IAL, Instituto Adolfo Lutz; UFRJ, Universidade Federal do Rio de Janeiro

**Tabela 2.** Pares de *primers* e condições de amplificação dos genes utilizados neste estudo.

Gene	Seqüência de nucleotídeos	Ciclos de amplificação				Fragmento (pb)	Referências
<b>eae</b> (AE11/AE12)	CCC GGC ACA AGC ATA AGC TAA ATG ACT CAT GCC AGC CGC TCA	94°C 1min	68°C 1min	72°C. 1min	924 pb	Gannon <i>et al.</i> , 1993	
<b>escN</b> ( <i>escN</i> - F/ <i>EscN</i> -R)	CGA CGA CTA TTG CAG AGT GCC TTA TCT GCT TCA GGA	94°C 1min	53°C 1min	72°C. 1min	480 pb	Gauthier <i>et al.</i> , 2003	
<b>escN</b> ( <i>EscN</i> -S-20 / <i>EscN</i> -B-19)	ACG CGT CGA CTC A GG C AA C CA CTT TGA ATA GGC CGC GGA TCC TCT AAG GGA ATA ATA TCG AAC TTA AAG	98°C 30 sec	62°C 30 sec	72°C 72°C 2min 10 min	1341 pb	Gauthier <i>et al.</i> , 2003	
<b>escN</b> ( <i>EscN</i> -S-20 / M13)	ACG CGT CGA CTC AGG CAA CCA CTT TGA ATA GGC	94°C 1min	63°C 1min	72°C. 1min	600 pb	Este estudo	

**Tabela 3.** Seqüências nucleotídicas dos *primers* utilizado para a pesquisa de fatores de virulência associados às categorias patogênicas de *E. coli*.

Fator	Propriedade	Seqüência dos nucleotídeos	Referências
<i>tccP</i>	Proteína efetora de EHEC	CATGCCATGGTTAACAATGTTTCTTCACTT CCGGAATTTCGGCGAGCGCCTTAGAGTATTAAT	Garmendia <i>et al.</i> , 2004
<i>lpfO113</i>	Fímbria polar longa	ATG AAGCGTAATATTATAG TTA TTT CTT ATA TTC GAC	Doughty <i>et al.</i> , 2002
<i>IdaG</i>	Adesina afimbrial	AAA GAT CTG TGA TGA GGT TCA GGT TCA GGT GAA G AAA TCT AGA TGC AGA CGC AAC TAC AGC CA	Scaletsky <i>et al.</i> , 2005
<i>cifA</i>	Efator que bloqueia a transição G2/M do ciclo celular	5'AGT CAA TGC TTT ATG CGT CAT 5'AAC AGA TGG CAA CAG ACT GG	Marches <i>et al.</i> , 2003
<i>toxB</i>	Adesina de EHEC	5'TAA AGC AGA AAA ATG CGA CAG AAG AT 5'TAG TAA GTA GAG TAG AAC TGG GGG ATG	Badea <i>et al.</i> , 2003
<i>espJ</i>	Proteína efetora secretada pelo SST3 de EPEC	ATG CCA ATC ATA AAG AAC TGC TTT TTT GAG TGG GTG GAT AT	Garmendia <i>et al.</i> , 2004
<i>espM</i>	Proteína efetora secretada pelo SST3 de EPEC e EHEC que ativa as Rho GTPases	CCA AAA GAA GCA TTC CCC ATT AT TCT TTC AGC TCT TTT GGT AT	Arbeloa <i>et al.</i> , 2009
<i>espT</i>	Proteína efetora secretada pelo SST3 de EPEC e EHEC que ativa as Rho GTPases	TCA TGT GAT GAG TGG ATG AAT CTC ATT CTC TTA TC	Arbeloa <i>et al.</i> , 2009

## RESULTADOS

### 1. O sorotipo O51:H40 de *E. coli* compreende amostras de tEPEC e aEPEC potencialmente patogênicas.

Esta primeira parte dos resultados trata sobre as propriedades fenotípicas e genotípicas das amostras O51:H40, identificadas em estudo anterior (MOREIRA, 2004) e complementadas neste estudo, os quais foram reunidos e publicados na revista *Journal of Clinical Microbiology* (artigo em anexo). Com relação à pesquisa da ocorrência dos genes *espM* e *espT*, os resultados estão incluídos em publicação do *Journal of Medical Microbiology* (artigo em anexo).

#### 1.1. Presença de seqüências genéticas associadas a fatores de virulência em EPEC e/ou EHEC.

As amostras deste estudo haviam sido previamente caracterizadas como sendo portadoras do gene *eae* e desprovidas dos genes *stx* e, com exceção de uma amostra (0151-1/85), da seqüência EAF (MOREIRA, 2004). Estudos conduzidos anteriormente também mostraram que todas as 11 amostras estudadas eram portadoras das seqüências homólogas às das sondas *LEE A* (extremidade direita de LEE), *LEE B* (parte de *escV* e *escN*), *LEE C* (parte de *eae*) e *LEE D* (parte de *espA* e *espB*) e da seqüência *ler*. Apenas a amostra 0151-1/85 apresentou as seqüências relacionadas ao plasmídio EAF, isto é, *perA* e *bfpA*, e 4 amostras apresentaram a seqüência *shf* (proteína críptica de *Shigella* e de várias amostras de EAEC). Além disso, nenhuma das amostras foi portadora das demais seqüências pesquisadas, isto é, EAEC, *aggR*, *aggA*,

*aggC, aafA, aafC, astA, pic, aap, pet, irp-2, efa1, saa, paa,  $\alpha$ -hly, cdt, cnf, daaC, afa e pap*, conforme verificado em Moreira (2004).

Com relação aos genes de virulência descritos recentemente, foi verificado que todas as 11 amostras foram negativas para as seqüências *IdaG*, *lpf*<sub>O113</sub>, *tccP*, *espM* e *espT*, e com exceção de 1 amostra (0151-1/85), para a seqüência *toxB*. Por outro lado, foi verificado que todas as 11 amostras são positivas para *espJ* de EPEC e apenas 1 amostra (3102-1/89) é desprovida de *cifA*. A tabela 4 apresenta os genes de virulência identificados nas amostras do sorotipo O51:H40.

**Tabela 4.** Propriedades genótípicas das amostras de *E. coli* do sorotipo O51:H40.

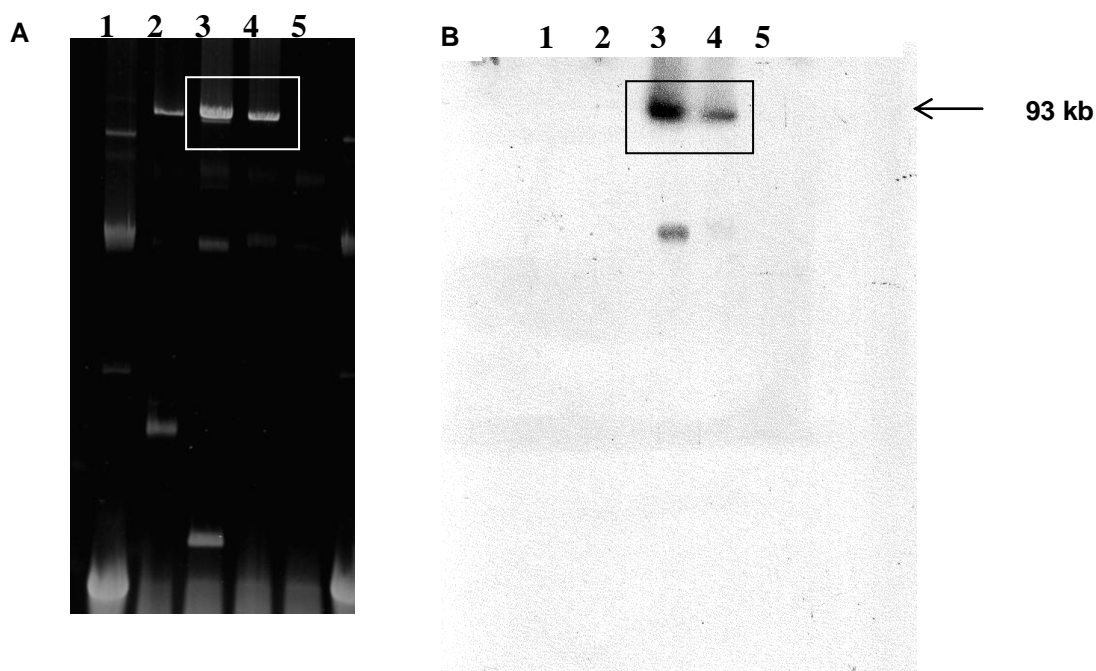
Amostra	Regiões genéticas relacionadas com virulência <sup>a</sup>
0151-1/85	LEE A, B, C, D, <i>ler</i> , EAF, <i>perA</i> , <i>bfpA</i> , <i>toxB</i> , <i>espJ</i> , <i>cifA</i>
1711-4/89	LEE A, B, C, D, <i>ler</i> , <i>shf</i> , <i>espJ</i> , <i>cifA</i>
1931-2/89	LEE A, B, C, D, <i>ler</i> , <i>espJ</i> , <i>cifA</i>
4361-2/89	LEE A, B,C,D <i>ler</i> , <i>espJ</i> , <i>cifA</i>
3062-1/89	LEE A, B, C, D, <i>ler</i> , <i>espJ</i> , <i>cifA</i>
3102-1/89	LEE A, B, C, D, <i>ler</i> , <i>espJ</i>
1757/01	LEE A, B, C, D, <i>ler</i> , <i>shf</i> , <i>espJ</i> , <i>cifA</i>
2022/01	LEE A, B, C, D, <i>ler</i> , <i>espJ</i> , <i>cifA</i>
21242	LEE A, B, C, D, <i>ler</i> , <i>espJ</i> , <i>cifA</i>
21075	LEE A, B, C, D, <i>ler</i> , <i>shf</i> , <i>espJ</i> , <i>cifA</i>
21323	LEE A, B, C, D, <i>ler</i> , <i>shf</i> , <i>espJ</i> , <i>cifA</i>

<sup>a</sup> Todas as amostras foram negativas para EAEC, *aggR*, *aggA*, *aggC*, *aafA*, *aafC*, *astA*, *pic*, *aap*, *pet*, *irp-2*, *EH-hly*, *efa/lifA*, *saa*, *paa*,  $\alpha$ -*hly*, *cdt*, *cnf*, *daaC*, *afa*, *pap*, *ldaG*, *lpf*<sub>O113</sub>, *tccP*, *espM* e *espT*  
LEE, *locus of enterocyte effacement*  
*espj*, *espJ* de EPEC

## 1.2. Localização da seqüência do gene *toxB* na amostra 0151-1/85

O gene *toxB* foi descrito no plasmídio da amostra de EHEC O157:H7 EDL 933 (TATSUNO, *et al.*, 2001) e seu produto tem um importante papel na aderência de amostras do patotipo. Por meio da pesquisa de seqüência genéticas, detectamos a presença de *toxB* apenas na amostra 0151-1/85. Conforme verificado pelo experimento de *Southern-Blotting*, a seqüência *toxB* está localizada na banda de ~ 93 kb do DNA plasmidial da amostra 0151-1/85, cuja massa é compatível com a do plasmídio da amostra protótipo EDL933, utilizada neste ensaio como controle positivo (Figura 4).





**Figura 4.** *Southern – blotting* de DNA plasmidial das amostras de *E. coli* O51:H40 0151-1/85 e 1711-4 com a seqüência da sonda *toxB*. **A**, gel de agarose a 0,8% contendo extrato de DNA plasmidial. **B**, filme de raios X, após a exposição de membrana submetida à hibridação. Canaletas: **1 e 6**, *E. coli* 39 R861 (marcador de massa molecular); **2**, amostra de tEPEC protótipo E2348/69 (controle negativo); **3**, amostra EHEC protótipo EDL933 (controle positivo); **4**, tEPEC 0151-1/85; **5**, aEPEC 1711-4/89 (controle negativo). A seqüência *toxB* está presente apenas na amostra 0151-1/85 e localiza-se em uma banda plasmidial de ~93 kb, sendo essa massa compatível com a do plasmídio de virulência da amostra protótipo de EHEC EDL933.

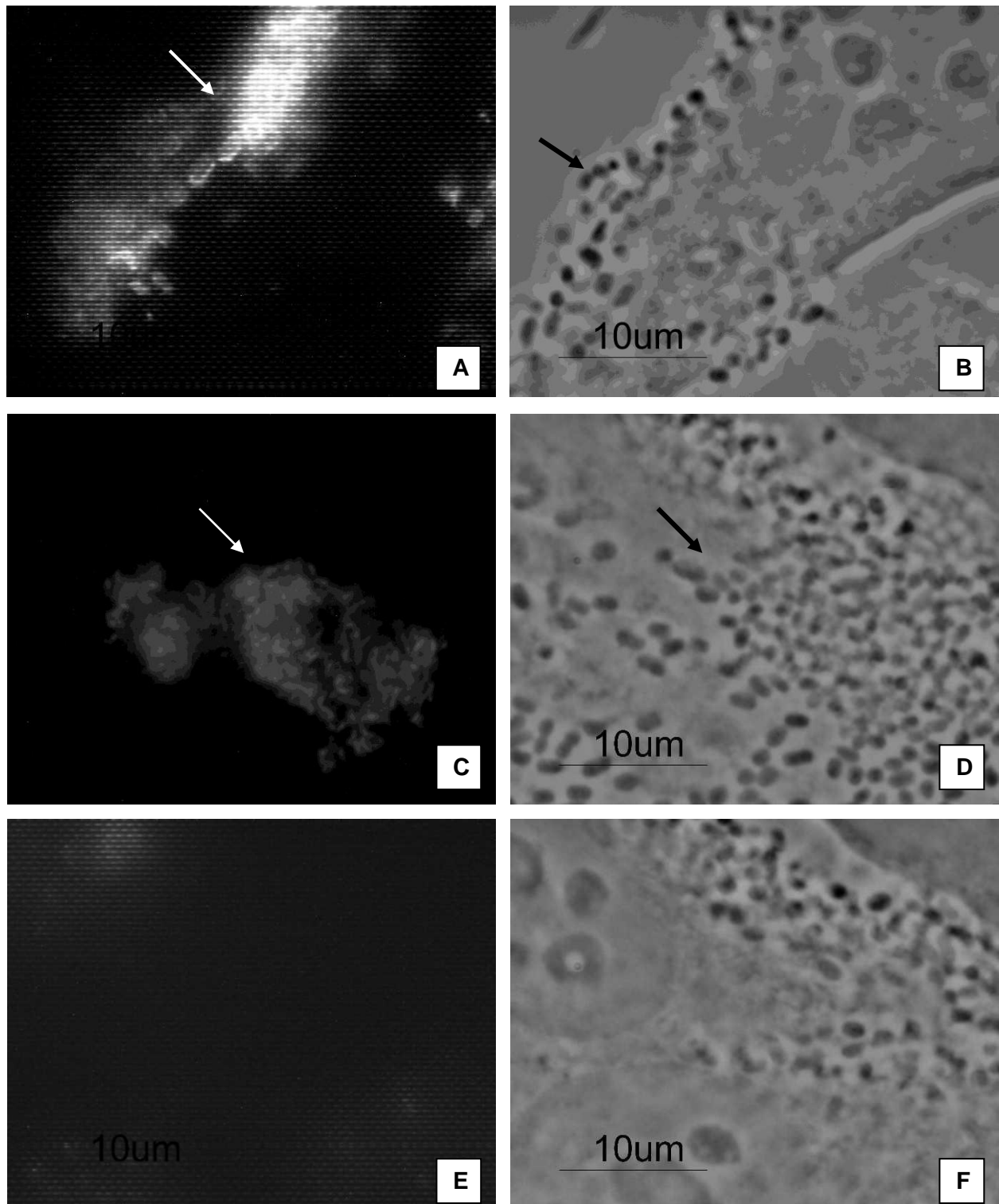
### **1.3. Detecção da fosforilação de resíduo de tirosina em Tir**

O acúmulo de proteínas com resíduos de tirosina-fosforiladas foi detectado em 9 (81,2%) e 6 (54,5%) das 11 amostras estudadas, em células T84 e HeLa, respectivamente. A concordância de resultados nas duas linhagens empregadas foi observada em 8 amostras, sendo 6 positivas e 2 negativas (Tabela 5; Figura 5).

**Tabela 5.** Capacidade de fosforilar resíduos de tirosina em Tir em amostras de *E. coli* do sorotipo O51:H40, evidenciada pelo teste de fosforilação em células HeLa e T84.

Amostra	FOS <sup>a</sup>	
	HeLa	T84
0151-1/85	+	+
1711-4/89	+	+
1931-2/89	+	+
4361-2/89	+	+
3062-1/89	-	-
3102-1/89	-	-
1757/01	+	+
2022/01	-	+
21242	-	+
21075	+	+
21323	-	+

<sup>a</sup>, Teste de Fosforilação da Tirosina, em 6 horas, revela a capacidade de fosforilar a proteína Tir.



**Figura 5.** Ensaio de fosforilação de tirosina com amostra representativa de *E. coli* do sorotipo O51:H40 em células HeLa. A e B, amostra 1711-4/89; C e D, amostra protótipo de tEPEC (E2348/69), controle positivo, e E e F, amostra protótipo de EHEC (EDL 933), controle negativo.

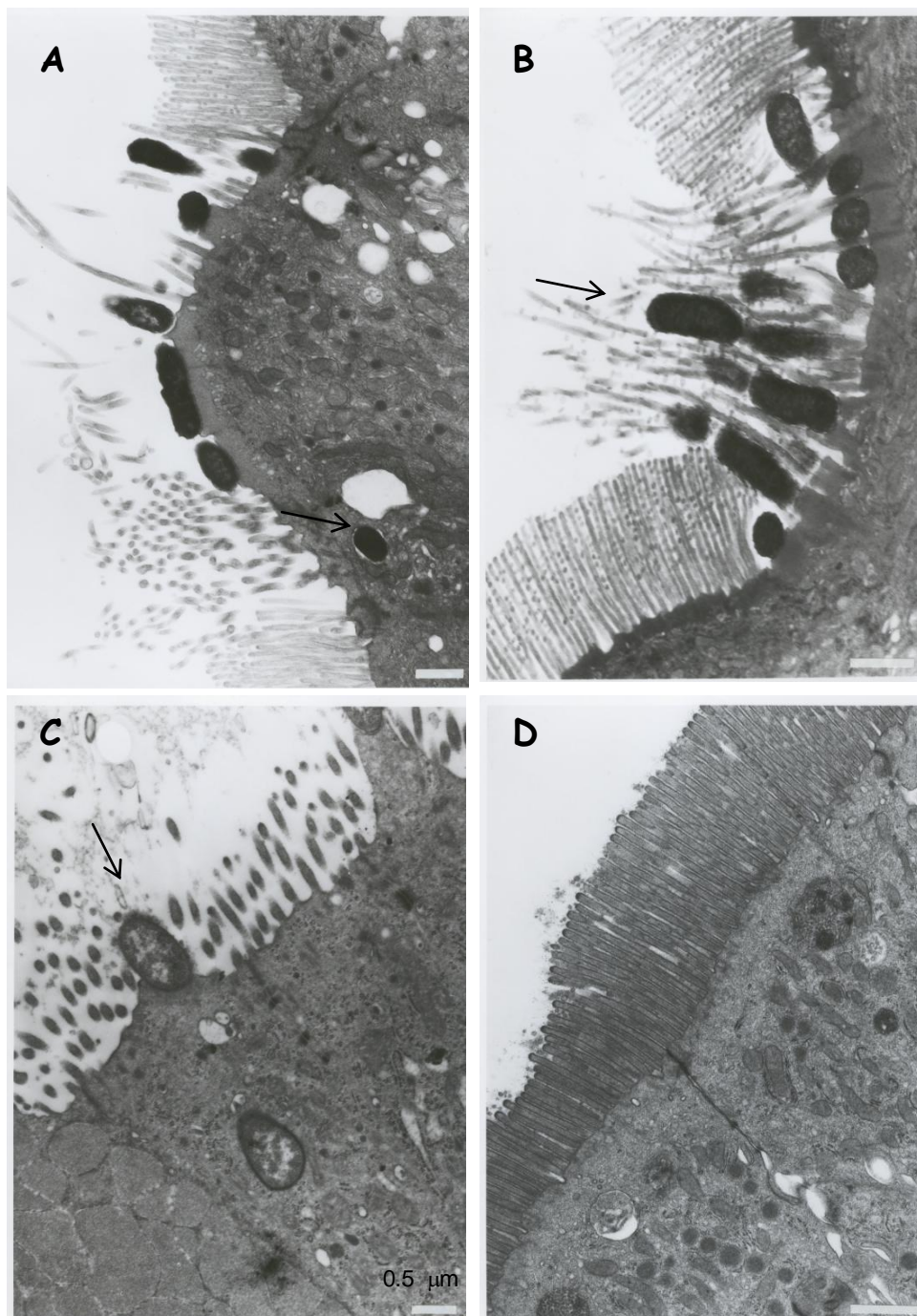
#### **1.4. Amostras de *E. coli* do sorotipo O51:H40 colonizam e provocam lesão A/E em alça ileal ligada de coelhos *in vivo***

As amostras foram analisadas em relação aos aspectos das interações com alça ileal ligada de coelho para a pesquisa de colonização e indução de lesão A/E. Os testes mostraram que 5 das 7 amostras testadas produziram lesões A/E, sendo que 3 destas 5 amostras foram detectadas no interior de enterócitos (internalização). Além disso, uma delas aumentou a produção de muco, e ainda, todas as amostras provocaram “achatamento” do epitélio intestinal. A amostra protótipo de tEPEC (E2348/69) produziu lesão A/E e também foi evidenciada internalização bacteriana (Tabela 6; Fig. 6).

**Tabela 6.** Alterações macroscópicas e ultra-estruturais da alça ileal de coelho inoculada *in vivo* com amostras do sorotipo O51:H40.

<b>Alterações Macroscópicas</b>		<b>Alterações morfológicas ultra-estruturais</b>	
<b>Amostras</b>	<b>Aumento na ocorrência de muco/aspecto do epitélio</b>	<b>Produção da lesão A/E</b>	<b>Internalização bacteriana</b>
3062-1/89	não/ delgado	não	não
3102-1/89	sim/ fino	não	não
1757/01	não/ fino	sim	sim
2022/01	não/ fino	sim	IN
21075	não/fino	sim	sim
21242	não/ fino	sim	sim
21323	não/ fino	sim	IN

IN, Inconclusivo



**Figura 6.** Microscopia eletrônica de transmissão de alça ileal ligada de coelho inoculada com culturas de amostras do sorotipo O51:H40. A e B: *E. coli* 21075, amostra representativa do sorotipo, produzindo lesão A/E, em A, bactéria internalizada; C, amostra protótipo de tEPEC (E2348/69), produzindo lesão A/E e internalização; D, *E. coli* HB101, controle negativo.

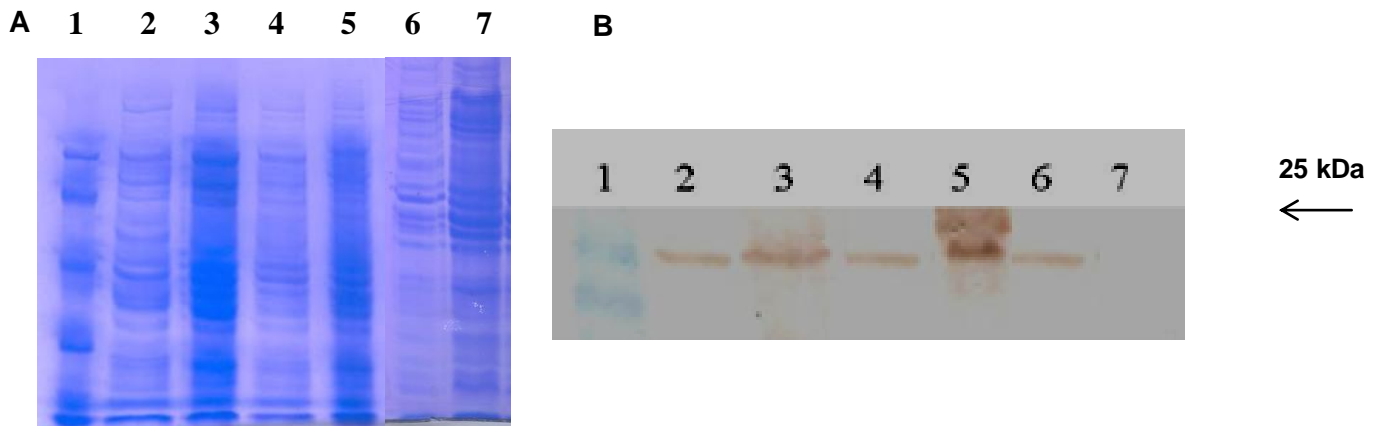
A- 15.600 X; B- 26.000 X; C- 31.200X, e D- 27.000X.

### **1.5. Análise da expressão da proteína EspA em amostras de O51:H40**

Com o intuito de verificar se as amostras do sorotipo O51:H40, que são negativas para o teste de FAS (MOREIRA, 2004) e não causam lesão A/E em epitélio intestinal de coelhos (3062-1/89, 3102-1/89), são capazes de expressar a proteína secretada EspA, foi realizado o ensaio de *immunoblotting* utilizando soro anti-EspA.

Na figura 7, observa-se uma banda de ~ 25 kDa, correspondente à proteína EspA nas amostras 3062-1/89 e 3102-1/89, bem como nas amostras E2348/69, 0151-1/85 e 1711-4/89 (controles positivos). Entretanto, a mesma não foi detectada na amostra HB101 (controle negativo). Deste modo, podemos afirmar que a proteína EspA está sendo expressa nessas amostras do sorotipo O51:H40.





**Figura 7.** Reatividade do soro anti-EspA com extrato protéico de amostras de *E. coli* do sorotipo O51:H40. **(A)**, Gel de SDS-PAGE a 15% contendo extratos protéicos purificados. Canaletas: **1**, padrão de peso molecular; **2**, tEPEC E2348/69; **3**, aEPEC 3102-1/89; **4**, aEPEC 3062-1/89; **5**, aEPEC 1711-4/89; **6**, tEPEC 0151-1/85 (controle positivo); **7**, *E. coli* HB101. **(B)** Membrana de nitrocelulose contendo as bandas protéicas purificadas em gel tratadas com soro anti- EspA.

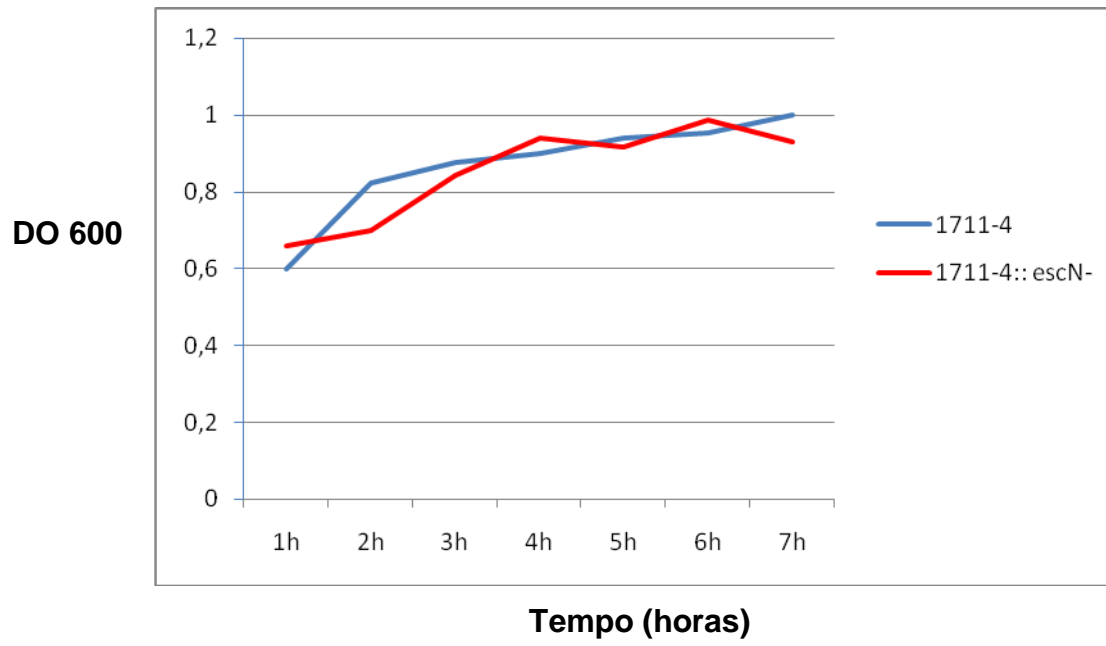
## **2. Análise do potencial de translocação bacteriana *in vivo* e dos efeitos da perfusão tecidual em diferentes órgãos, exibido pelas amostras de tEPEC (E2348/69) e aEPEC (1711-4) no modelo de alça intestinal de ratos**

### **2.1. Confirmação e análise do mutante em EscN (amostra 1711-4::*escN*)**

Para a confirmação da construção do mutante no gene *escN* na amostra 1711-4/89 por meio de recombinação homóloga, foram realizados ensaios genotípicos (*Southern-blot*) e fenotípicos (teste de aderência e FAS).

#### **2.1.1. Análise do mutante 1711-4::*escN***

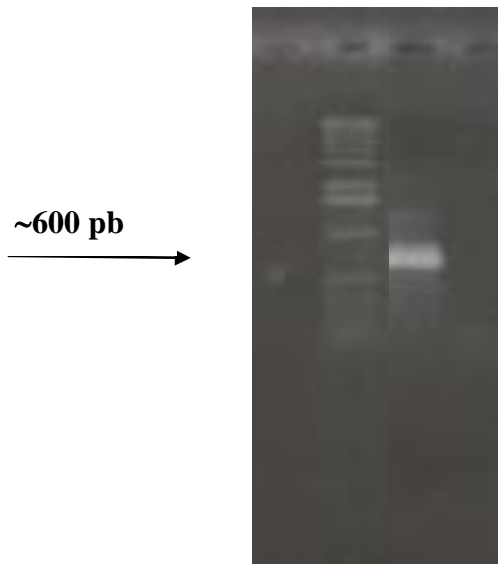
Após a seleção de colônias provenientes dos eventos de conjugação, as mesmas foram testadas individualmente e um clone foi selecionado para o prosseguimento deste estudo. Foi, então, realizada uma curva de crescimento (figura 8) do mutante, demonstrando que o mesmo foi capaz de se multiplicar de forma semelhante à amostra 1711-4/89 (selvagem). Esse mutante foi então repurificado em placas de MacConkey (contendo ácido nalidíxico e canamicina) e novamente submetido aos testes complementares de confirmação da mutagênese.



**Figura 8.** Curva de Crescimento. Amostras 1711-4/89 e 1711-4/89 mutada no gene *escN*.

### **2.1.1.1. Pesquisa da sequência genética associada à mutagênese da amostra 1711-4 no gene *escN*.**

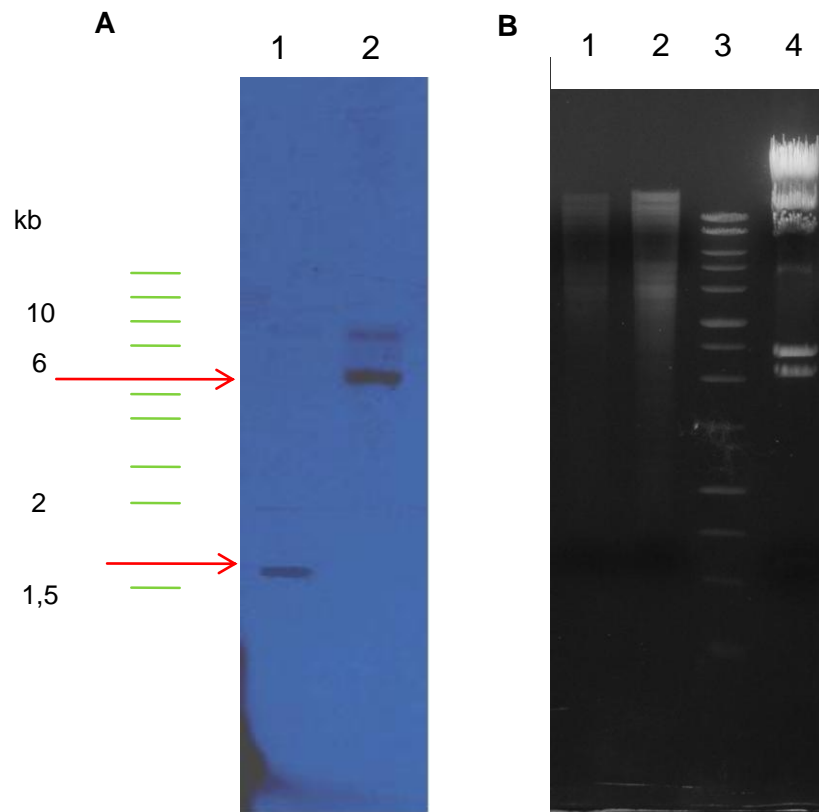
A inserção do plasmídeo recombinante no gene *escN* foi confirmada por meio da técnica PCR. A presença de um fragmento amplificado a partir da amostra mutada 1711-4:*escN*, foi pesquisada utilizando o conjunto de *primers* M13/pUC (*Forward*) (PENFOLD, R.J.; PEMBERTON, J.M, 1992) e (*Reverse*) EscN-S-20 (GAUTHIER, *et al.* 2003). A sequência do *primer* M13/pUC anela com a região 5' terminal do gene *lacZ* (sequência presente no vetor suicida pJP5603) e o *primer* EscN-S-20, por sua vez, amplifica uma sequência do gene *escN*. O amplicon resultante revelou uma banda de aproximadamente 600 pb na amostra mutada e ausência de banda na amostra selvagem, comprovando, dessa forma, que o gene *escN* foi realmente interrompido pela inserção do vetor pJP5603 (Figura 9).



**Figura 9.** PCR para a confirmação da mutação em *escN*, Amostras: **1.** padrão de peso molecular (marcador de peso molecular  $\lambda$  *HindIII* (Invitrogen)); **2.** 1711-4:: *escN*- e **3.** 1711-4/89 selvagem. Observa-se a presença de uma banda de aproximadamente 600 pb apenas na amostra mutada no gene *escN*, comprovando a ocorrência da inserção do vetor suicida pJP 5603 no gene *escN*, na amostra mutada 1711-4::*escN*.

### **2.1.1.2. Southern-blot**

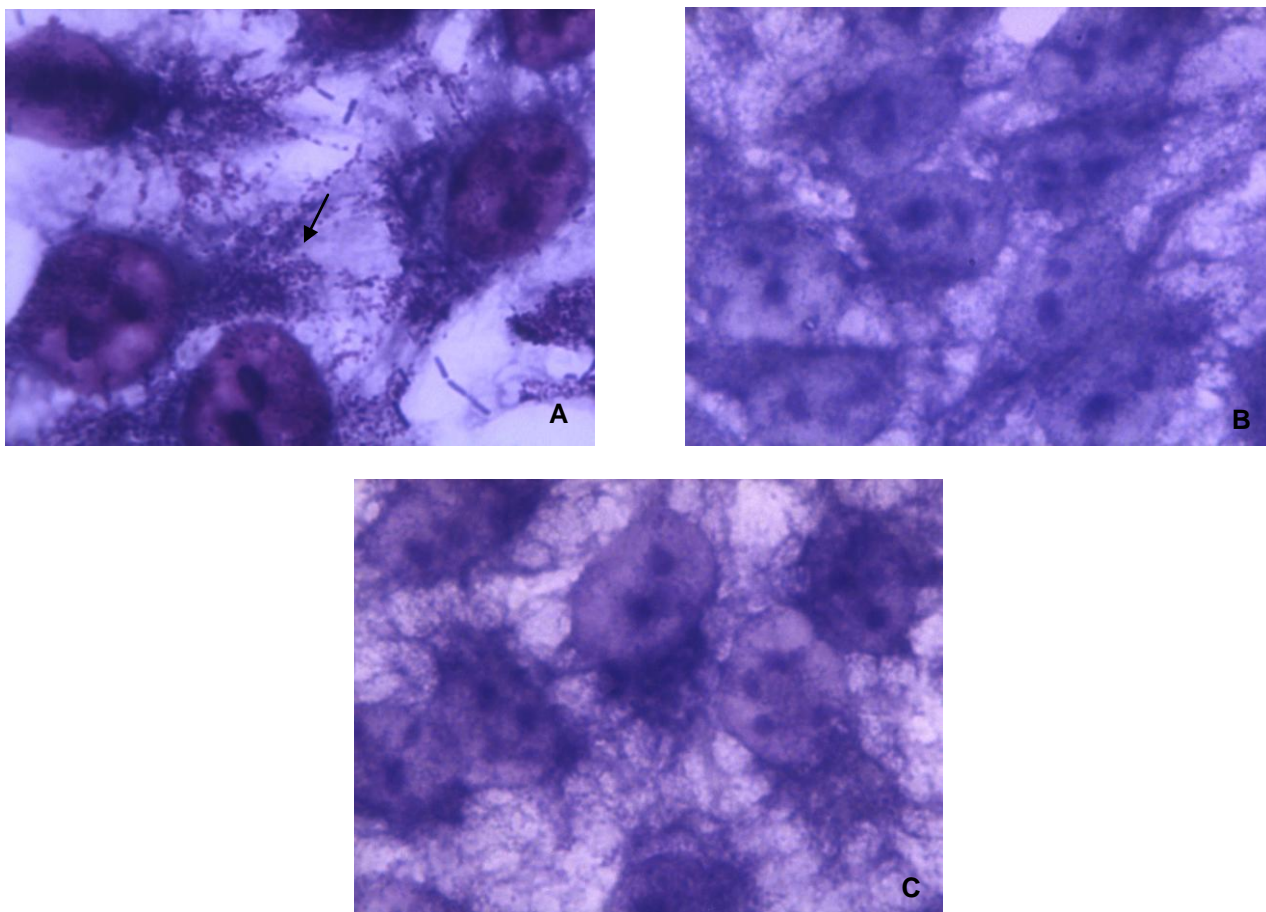
Este experimento foi realizado para demonstrar que o gene *escN*, que codifica a proteína EscN, responsável pelo fornecimento de energia para a montagem do SST3, havia realmente sido interrompido pela inserção do vetor suicida pJP5603. Na figura 9, podemos observar que a utilização da enzima de restrição *EcoRV*, escolhida para este experimento por não cortar o gene *escN*, gerou na aEPEC 1711-4/89 (selvagem) um fragmento de ~ 1,7 kb, enquanto na amostra mutada gerou uma banda de ~ 5,2 kb. Com base nesses dados, podemos afirmar que o gene *escN* da amostra 1711-4/89 foi interrompido pela inserção do vetor suicida pJP5603 (3,1 kb) por um processo de recombinação homóloga.



**Figura 10.** *Southern-blot* para comprovação da inserção do vetor suicida pJP5603 em *escN*. Em A, observa-se o *Southern-blot* do DNA cromossômico das amostras selvagem 1711-4/89 (canaleta 1), mutada 1711-4::*escN* (canaleta 2), hibridados com a sonda *escN*. Na amostra 1711-4/89, observa-se um fragmento de aproximadamente 1,7 kb, enquanto que, na amostra mutada, detectamos a presença de 1 fragmento de 5,2 kb. Em B, observa-se um gel de agarose a 1%; DNA digerido com *EcoRV* da amostra 1711-4/89 (canaleta 1), 1711-4::*escN* e do vetor pJP5603+ fragmento de ~ 481 pb de *escN* clonado (canaleta 2). Canaletas: 3, Marcador de peso molecular 1 kb (Invitrogen) e 4, marcador de peso molecular  $\lambda$  *HindIII* (Invitrogen).

### 2.1.1.3. Alteração no padrão de aderência

A figura 11, compara o padrão de adesão em células HEp-2 da amostra 1711-4/89 com o mutante 1711-4::*escN*. A amostra selvagem 1711-4 aderiu e formou grupos bacterianos frouxos (AL-like), entretanto, nenhuma aderência foi detectada com o mutante, bem como com o controle negativo (amostra HB101). Deste modo, podemos afirmar que a amostra 1711-4 mutante é defectiva na montagem do SST3, uma vez que perdeu a capacidade aderente.

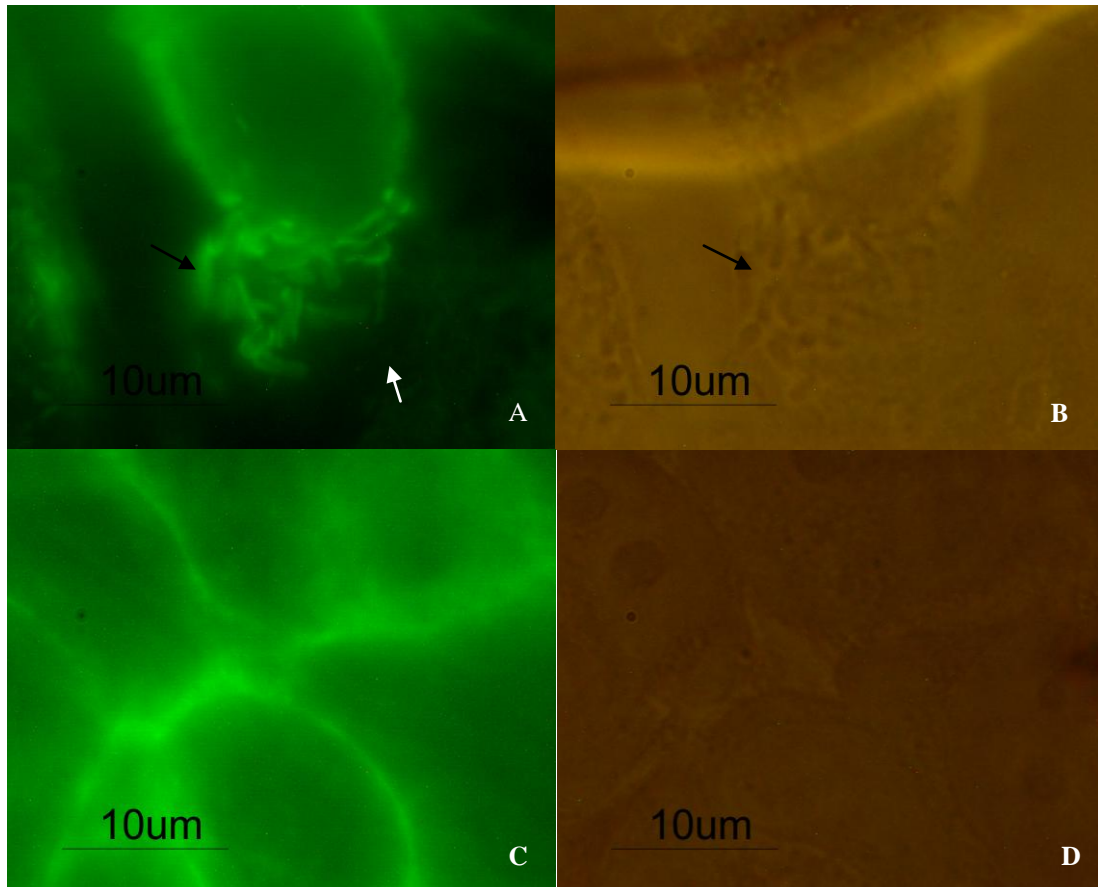


**Figura 11.** Teste de aderência em células HEp-2 das amostras 1711-4/89 e seu mutante em *EscN*; A, amostra 1711-4/89 selvagem apresentando grupos frouxos; B, amostra 1711-4::*escN* e C, amostra HB101, não aderentes. Aumento microscópico: 1000 x.



#### 2.1.1.4. Alteração da capacidade de promover lesão AE *in vitro*

O mutante 1711-4::*escN* foi avaliado pela demonstração da perda da capacidade de auxiliar na montagem do SST3 pelo teste de FAS em células HeLa (figura 12). Este resultado é coerente com a ausência de aderência, observada em ensaios de 6 horas em células HEP-2 (figura 11).



**Figura 12.** Ensaio de FAS realizado em células HeLa (teste de 6 horas) com as amostras: 1711-4/89 (A e B), controle positivo; mutante 1711-4::*escN* (C e D). Notam-se bactérias aderidas às células HeLa em A e B (→).

**Figura 12.** Ensaio de FAS realizado em células HeLa (teste de 6 horas) com as amostras: 1711-4/89 (A e B), controle positivo; mutante 1711-4::*escN* (B e C). Notam-se bactérias aderidas às células HeLa em A e B (→).

### **3. Ensaios de Translocação Bacteriana TB *in vivo*, no modelo de alça Intestinal de Ratos**

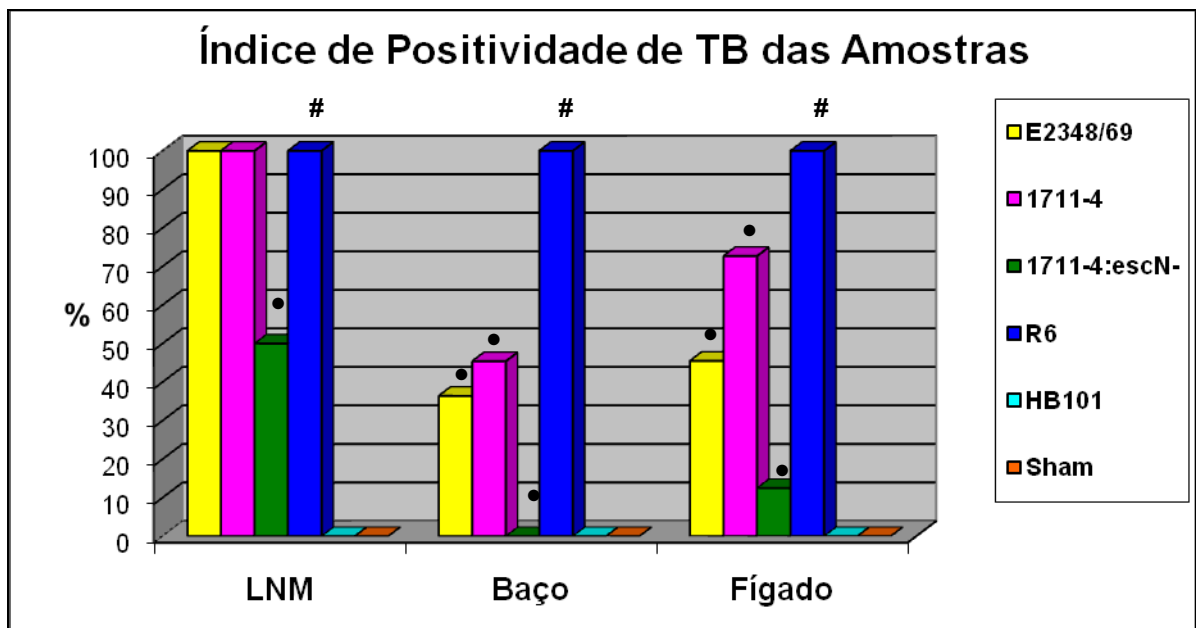
A capacidade de translocação bacteriana *in vivo* da aEPEC 1711-4/89 foi pesquisada em comparação com a da amostra E2348/69 (protótipo de tEPEC). Com estes ensaios, avaliamos o potencial dessas amostras de atravessar a barreira do trato intestinal e promover a colonização em órgãos extra-intestinais. Os índices da TB obtidos com as amostras E2348/69 e 1711-4/89 foram: LNM, ambas 100%; baço, 36,4% e 45,5%; e fígado, 45,5% e 72,7%, respectivamente. A *E. coli* R6 (controle positivo) apresentou 100% de positividade em todos os compartimentos. A amostra HB101 (não patogênica) foi 100% negativa para todos os compartimentos testados. Não foram encontradas bactérias no sangue de nenhum dos animais testados.

As análises estatísticas mostraram que as amostras de tEPEC (E2348/69) e aEPEC (1711-4/89) possuem capacidade significativa de promover TB quando comparadas aos controles negativos ( $p < 0,05$ ), embora apresentem índices de TB significativos, porém menores, em relação ao fígado e baço ( $p < 0,05$ ) quando comparadas à *E. coli* R6 (Figuras 13 e 14).

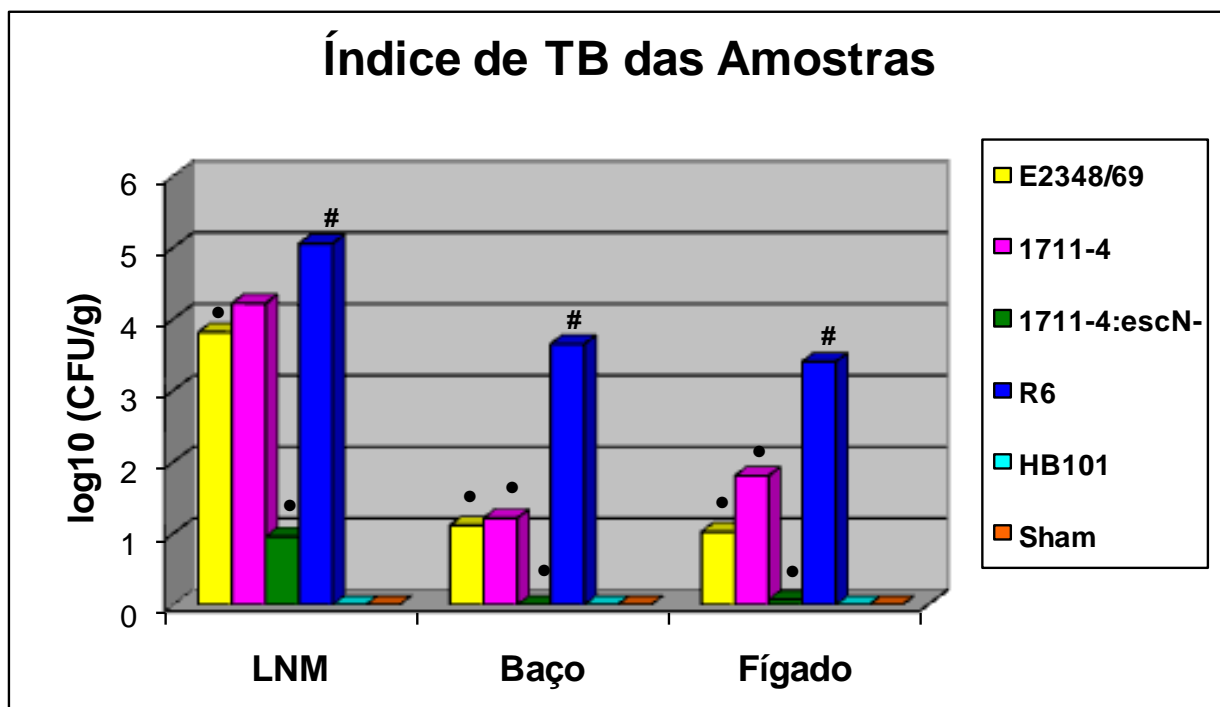
Os resultados apresentados demonstram que algumas amostras de tEPEC e aEPEC podem translocar a mucosa intestinal sob condições de sobrecrecimento e que a amostra de aEPEC (1711-4/89) possui aparentemente alto potencial patogênico para induzir alterações sistêmicas, quando comparada com a amostra de tEPEC (E2348/69).

A amostra de a-EPEC 1711-4/89 mutante em *escN* (1711-4::*escN*-) foi pesquisada em comparação com a amostra E2348/69 e a amostra selvagem

1711-4/89. Os índices da TB obtidos pela amostra defectiva no SST3 (1711-4::escN) foram: LNM, 50% e fígado 12,5%, enquanto não foram recuperadas bactérias no baço. Os animais desafiados com aEPEC (1711-4/89) e tEPEC (E2348/69) apresentaram diferença significativamente maiores de bactérias recuperadas no LMN quando comparadas ao mutante 1711-4::escN, assim como nos 3 compartimentos (LMN, fígado e baço) quando comparadas aos controles negativos ( $p < 0,05$ ) e foram significativamente menores, em relação ao fígado e baço ( $p < 0,05$ ) quando comparadas à *E. coli* R6 (Fig. 13 e 14).



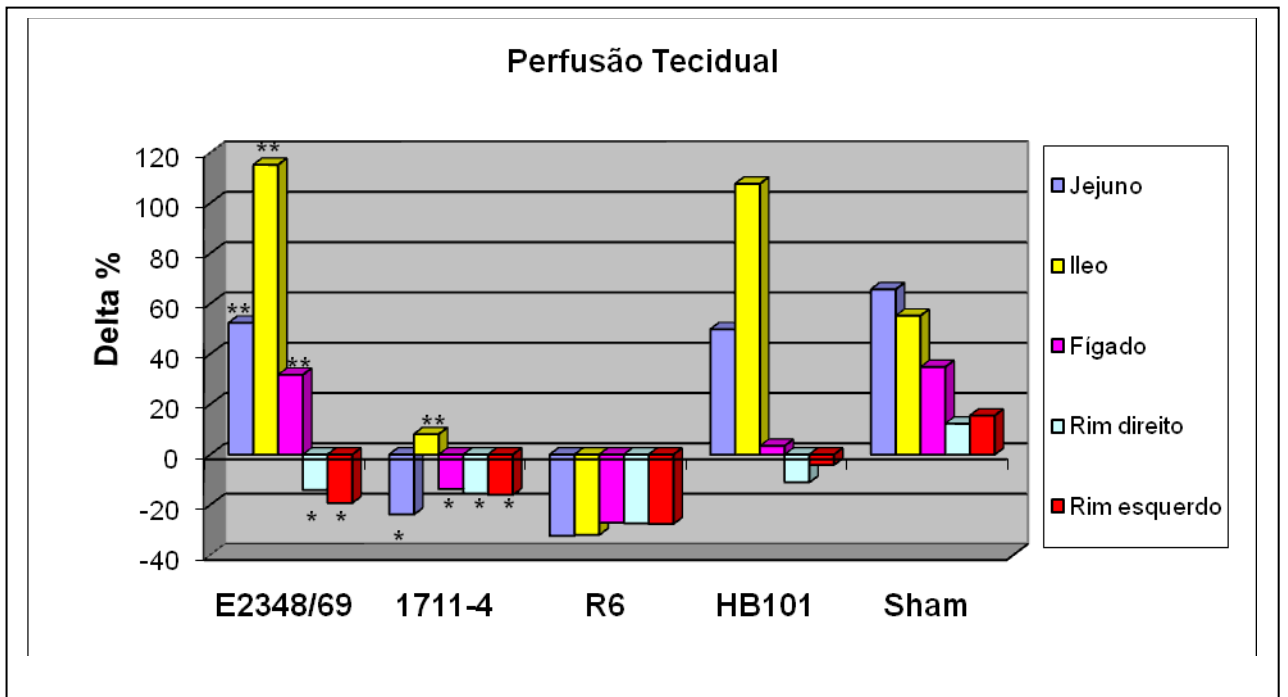
**Figura 13.** Porcentagem de animais positivos para translocação bacteriana (TB) para LNM, Baço e Fígado. Diferença estatística ( $p < 0,05$  # vs ●) foi observada entre *E. coli* R6 (controles positivo) e os grupos de EPEC no baço e fígado e nos 3 compartimentos para a amostra mutada 1711-4::escN.



**Figura 14.** Bactérias recuperadas em LNM, Baço e Fígado, após os ensaios de TB de 2 h. Diferença estatística ( $p < 0,05$  # vs ●) foi observada entre a *E. coli* R6 (#) e tEPEC e 1711-4::escN (●) no LNM, e entre *E. coli* R6 e todos os grupos (tEPEC, aEPEC e 1711-4::escN) no Baço e Fígado.

#### **4. Índice da perfusão tecidual**

Na figura 15, observa-se que somente a amostra de aEPEC (1711-4/89) induziu uma significativa redução da perfusão no intestino (jejuno) e no fígado, a qual foi muito similar ao perfil apresentado pela *E. coli* R6 nesses mesmos órgãos. Por outro lado, as análises estatísticas revelaram que, assim como na aEPEC (1711-4/89) e na amostra R6, a amostra de tEPEC (E2348/69) reduziu significativamente a perfusão nos rins. Esses achados revelam que as aEPEC translocadas provocam efeitos danosos à microcirculação comprometendo a perfusão tecidual, e atuam significativamente na ativação das respostas pró-inflamatórias do hospedeiro dentro do processo da TB.



**Figura 15.** Perfusão tecidual dos órgãos após 2 horas da indução da TB com todas as amostras tEPEC E2348/69 e aEPEC 1711-4, (\*)  $p < 0,05$  e (\*\*)  $p < 0,05$ , quando comparadas com os controles negativos e positivo, respectivamente.

## **5. Análise da resistência ao soro das amostras bacterianas.**

Com o objetivo de avaliar se as amostras ensaiadas na TB são capazes de escapar das defesas imunológicas do hospedeiro no sangue, foram realizados ensaios da resistência ao sistema complemento presente no soro de ratos.

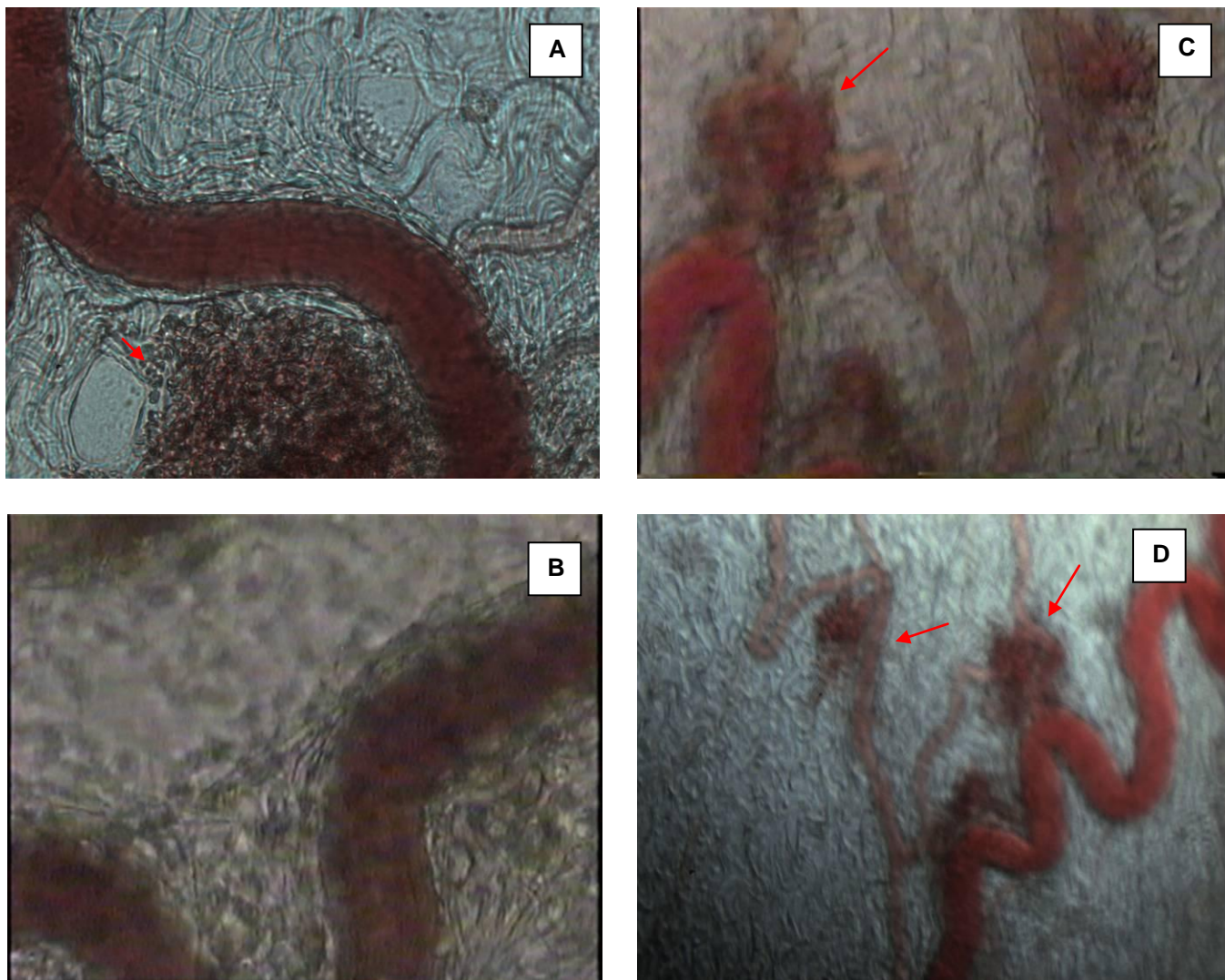
Os experimentos foram realizados em triplicata e mostraram que todas as amostras testadas para TB (E2348/69, 1711-4/89, 1711-4:*escN*, HB101 e R6) são resistentes ao soro do rato, isto é, conseguiram multiplicar-se na presença de soro normal e do soro inativado pelo calor (56° C por 30 min), tanto a 36% quanto a 50%, nos tempos zero e 24 horas. A amostra *E. coli* K12 711, sensível à ação lítica do soro (controle negativo), teve seu crescimento inibido pelo complemento presente no soro do rato, no entanto, seu crescimento não foi inibido pelo soro inativado pelo aquecimento mesmo após 24 horas de incubação. Conclui-se, portanto, que as amostras ensaiadas na TB são capazes de escapar das defesas imunológicas do hospedeiro no sangue, corroborando, desta forma, com os resultados da recuperação das bactérias pós-TB decorrentes das vias de translocação para alcançar os variados compartimentos.

## **6. Análise da microcirculação mesentérica**

Os efeitos provocados pelas amostras testadas nos ensaios de TB na microcirculação dos animais foram analisados por meio de análises da microcirculação do mesentério utilizando a microscopia intravital. Decorrido o



período de 2 horas de inoculação da amostra tEPEC E2348/69, foram observados danos significantes da microcirculação mesenterial, tais como: alterações na aderência leucocitária com aumento gradativo de *rolling* de leucócitos, o funcionamento de ductos linfáticos foram comprometidos, o fluxo sanguíneo das vênulas e arteríolas foi reduzido, detectou-se a presença de vários focos hemorrágicos (Figura 16) e, em algumas regiões, observou-se vênulas totalmente obstruídas, inclusive sugerindo um processo de trombose. Semelhante à protótipo de tEPEC, a amostra 1711-4/89 provocou muitas alterações à microcirculação, entretanto, seus efeitos foram mais intensos, pois, além do comprometimento do fluxo de vênulas e arteríolas e de *rolling* de leucócitos, observou-se um aumento expressivo do fluxo e da celularidade nos ductos linfáticos aferentes, obstruções de capilares e grandes extensões de hemorragias. Vale ressaltar que as injúrias causadas pela amostra 1711-4/89 foram maiores do que aquelas encontradas quando a amostra *E. coli* R6 foi testada. Por outro lado, a amostra de *E. coli* não patogênica HB101 não alterou o funcionamento da microcirculação e o aspecto geral observado é normal, pois não ocorreu alterações no fluxo sanguíneo e focos hemorrágicos não foram encontrados.



**Figura 16.** Aspectos da microcirculação mesentérica observados pela técnica Intra vital após 2 horas de indução da TB. A, amostra protótipo de tEPEC (E2348/69), promovendo aumento da aderência leucocitária e focos hemorrágicos (→); B, amostra não patogênica *E. coli* HB101 com microcirculação normal; C e D, amostra 1711-4/89, mostrando as obstruções do fluxo de capilares, e focos hemorrágicos (→).

## DISCUSSÃO

Estudos epidemiológicos realizados pelo nosso grupo nos últimos 20 anos permitiram o isolamento de amostras de *E. coli* portadoras do gene *eae* e desprovidas dos genes *stx*, que não pertenciam a sorogrupos de EPEC. Essas amostras apresentaram uma grande diversidade de sorotipos e de combinações de genes de virulência dos diferentes patotipos de *E. coli* diarreogênicas (GOMES *et al.*, 2004., VIEIRA *et al.*, 2001). Devido à relativa alta freqüência de isolamento dessas amostras pertencendo ao sorotipo O51:H40, em casos de diarreia em dois estados do Brasil (São Paulo e Rio de Janeiro), acreditávamos que pelo menos algumas delas possuiriam potencial enteropatogênico. Recentes investigações sobre as características fenotípicas e genotípicas das 11 amostras do sorotipo O51:H40 de nossa coleção, revelaram o potencial enteropatogênico *in vitro* da maioria dessas amostras (MOREIRA, 2004; GOMES *et al.*, 2004). Neste estudo, ampliamos o conhecimento sobre o potencial patogênico dessas amostras, avaliando novas propriedades de virulência e o potencial patogênico *in vivo* de amostras selecionadas

O conjunto de genes apresentados pelas amostras O51:H40 revela um comportamento bem homogêneo, sendo que todas são desprovidas de genes de virulência dos demais patotipos de *E. coli* diarreogênica (ETEC, EIEC, DAEC e EAEC). Além disto, todas as amostras O51:H40 têm o gene *ler* (regulador de transcrição de LEE) e uma região LEE completa, uma vez que são portadoras das seqüências de LEE A a LEE D, que correspondem às diferentes regiões de LEE (Mc DANIEL *et al.*, 1995). As exceções incluem as 4

amostras que contêm a seqüências *shf* e a amostra 0151-1/85 (EPEC típica), que contém o gene *toxB*. O gene *shf* possui homologia com duas ORFs de *Shigella flexneri* e uma de *E. coli* O157:H7 (EHEC), e foi detectado em amostras da categoria EAEC (CZECZULIN *et al.*, 1999; OKEKE *et al.*, 2000; ELIAS *et al.*, 2002). Essas ORFs codificam a proteína Shf com função desconhecida, mas que apresenta 25% de homologia com a proteína IcaB de *Staphylococcus epidermidis*, a qual está relacionada com aderência intercelular nessa espécie (HEILMANN *et al.*, 1996). O gene *toxB*, descrito no plasmídio da amostra de EHEC O157:H7 (TATSUNO, *et al.*, 2001) cujo produto tem um importante papel na aderência de amostras do patotipo, foi localizado do DNA plasmidial da amostra 0151-1/85, cuja massa é compatível com a do plasmídio da amostra protótipo de EHEC (EDL 933). É interessante salientar que o gene *toxB*, na amostra 0151-1/85, aparentemente está presente no mesmo plasmídio que abriga a seqüência EAF ou em um plasmídio que migra juntamente com o plasmídio EAF. TOZZOLI *et al.*, (2005) descreveram a distribuição do gene *toxB* em cepas de EPEC e EHEC, mas esta foi a primeira descrição em cepas pertencentes ao sorotipo O51:H40. Outro fator amplamente estudado, o gene *cif*, mostrou-se ausente somente na amostra 3102-1/89. CIF é uma proteína efetora, que embora não seja codificada pela região LEE, é translocada através do SST3 e atua no bloqueio da transição G<sub>2</sub>/M do ciclo celular. Além disso, causa efeito citopático irreversível nas células do hospedeiro (MARCHES *et al.*, 2003). Adicionalmente, todas as amostras albergam o gene *espJ*, que está presente no profago CP-933U. A proteína EspJ é translocada através do SST3 e tem a propriedade de influenciar a dinâmica do *clearence* no interior no trato intestinal do hospedeiro

pelo patógeno, sugerindo um papel na transmissão do mesmo (GARMENDIA *et al.*, 2004).

As interações dessas amostras com o epitélio intestinal, em ensaios de alça ligada de coelhos confirmam que o sorotipo O51:H40 contém amostras com potencial enteropatogênico, uma vez que a maioria das amostras foi capaz de produzir lesão A/E *in vivo*, a exemplo do que ocorre com a amostra protótipo de tEPEC.

Com exceção de duas amostras (3062-1/89 e 3102-1/89), todas as demais testadas foram capazes de colonizar o epitélio ileal de coelho, em maior ou menor grau, quando visualizadas em microscopia de luz. Nos exames ultraestruturais, embora as EPECs não se multipliquem intracelularmente, detectamos a amostra protótipo de tEPEC (E2348/ 69) dentro de enterócitos de coelho, assim como a amostra 1711-4/89, que, em um estudo anterior realizado por VIEIRA (2000), produziu lesão A/E, invasão, desorganização do epitélio intestinal e apresentou sugestiva presença de bactérias no interior de células fagocitárias. Uma localização dentro de enterócitos proporcionaria proteção contra a resposta do sistema imune (IgA), prolongando a doença e propiciando a ocorrência de infecção crônica.

É interessante salientar que as duas amostras (3062-1/89 e 3102-1/89) que não produziram lesão A/E foram isoladas de crianças sem diarreia. O motivo dessa deficiência não é conhecido ainda, e como já comentamos, a região LEE está aparentemente completa em todas as amostras deste estudo (VIEIRA *et al.*, 2001). Entretanto, a ocorrência de uma ou mais mutações nos genes da região LEE poderia ser um evento alternativo que poderia prejudicar a mobilização de actina para formação de pedestais, o que evitaria a interação

intimina-Tir e, conseqüentemente, a produção de lesão A/E e diarreia. Ainda neste estudo, demonstramos, por ensaios de *immunoblotting*, que a proteína EspA é expressa nas duas amostras FAS negativas, o que sugere que o fato das amostras (3062-1/89 e 3102-1/89) não produzirem lesão A/E *in vivo* deve estar relacionado com outras alterações que interferem no processo de montagem do SST3 e/ou defeitos na expressão de outras proteínas envolvidas na formação da lesão A/E, já que este evento também é controlado vários elementos reguladores.

Diferenças na sensibilidade de detecção da fosforilação de tirosina foram encontradas entre as linhagens T84 e HeLa em três cepas (21323, 21242, 2022/01). Embora não conheçamos os motivos desses eventos, no estudo anterior (MOREIRA, 2004), foram observadas diferenças nas respostas entre células T84 e HeLa quando estudados os padrões de aderência, tendo-se concluído, naquela ocasião, que células intestinais polarizadas e diferenciadas constituiriam um modelo de avaliação da expressão de lesão A/E *in vitro* mais eficiente do que as células HeLa. Assim como ressaltamos anteriormente, a expressão da lesão A/E pode ser influenciada por fatores ambientais, como a exposição a diferentes tipos celulares, produzindo alterações importantes ao nível fenotípico

O fato de que todas as amostras O51:H40 produtoras de lesão A/E *in vivo* terem fosforilado resíduos de tirosina em Tir bem como de serem desprovidas de *tccP* sugere que existe uma maior similaridade das referidas amostras com o patotipo tEPEC, do que com as do patotipo EHEC (amostra protótipo EDL 933), que são incapazes de fosforilar resíduos de tirosina em Tir, e carregam *tccP*. Pois diferentemente das EPEC, as EHEC injetam TccP, que

se liga a N-WASP e promove a acumulo de actina via ativação do complexo Arp 2/3 (CAMPELLONE *et al.*, 2004; GARMENDIA *et al.*, 2004). Até o momento, duas variantes do gene *tccP* têm sido descritas: *tccP* (carreado no profago CP-933U/Sp14) e *tccP2* (carreado no profago Sp4/CP-933M). Estudos sobre a caracterização de amostras de aEPEC revelaram a presença tanto de *tccP* como de *tccP2* e têm demonstrado que cepas de aEPEC podem desencadear a polimerização de actina via Tir-Nck e/ou Tir-Tccp (GARMENDIA *et al.*, 2005b; OOKA *et al.*, 2007).

Os modelos experimentais podem propiciar boas condições de estudo de doenças, tais como a sepse, mediante a homogeneidade dos animais e melhor controle das variáveis, sendo de grande importância para o conhecimento dos fatores envolvidos nas diferentes etapas de doenças. Apesar dos achados em modelos animais terem restrições quanto à transposição para os humanos, foi através de estudos experimentais que ocorreram contribuições importantes na elucidação de fenômenos relativos à fisiopatologia. (BERG; GARLINGTON, 1979; TRACEY *et al.*, 1987; WRIGHT *et al.*, 1990; LAM *et al.*, 1994; MEDZHITOV *et al.*, 1997; COOPERSMITH *et al.*, 2002; RIEWALD *et al.*, 2002; DEICH *et al.*, 2006).

Neste estudo, observamos que as amostras de tEPEC e aEPEC testadas têm a capacidade de translocar o epitélio do intestino delgado sob condições de sobrecrescimento, não somente para o linfonodo mesentérico como também para outros órgãos sistêmicos (baço e fígado). Além da sua habilidade de ultrapassar a barreira intestinal, as amostras de aEPEC foram capazes de provocar injúrias na microcirculação mesentérica e provocar alteração como a hipoperfusão em fígado, intestino delgado e rins. Tais

resultados foram inesperados com base no consenso de que o agente infeccioso EPEC é restrito à mucosa intestinal.

Na avaliação da capacidade de sobrevivência na circulação sanguínea do hospedeiro, por meio de ensaios da resistência ao soro de rato, as amostras bacterianas empregadas nos ensaios da TB mostraram que são capazes de escapar das defesas imunológicas do hospedeiro no sangue. Esses achados corroboram com os resultados da recuperação das bactérias translocadas para variados compartimentos extra- intestinais.

Portanto, nossos achados sugerem que as amostras de EPEC podem oferecer um risco hipotético de inflamação sistêmica sob condições de sobrecrescimento no intestino delgado. Embora estejamos conscientes de que um processo de TB não significa necessariamente a instalação da infecção, tais como a pneumonia ou sepse, pesquisas realizadas por nossos colaboradores têm demonstrado que o processo de TB desempenha um papel importante no agravamento da inflamação sistêmica (MENCHACA-DIAZ *et al.*, 2003). Surpreendentemente, a amostra de aEPEC (1711-4) revelou um potencial de TB tão alto quanto a amostra controle positivo *E. coli* R6, cuja capacidade de translocação foi consistentemente demonstrada em experimentos de TB *in vivo* (KOH; SILVA, 1996; KOH *et al.*, 2002; KOH *et al.*, 2003). Estes resultados demonstram que ao menos as amostras de tEPEC e aEPEC estudadas possuem habilidade para translocar para sítios extra-intestinais, embora a aEPEC apresente um maior potencial patogênico para induzir complicações sistêmicas quando comparada à tEPEC. Adicionalmente, a investigação do envolvimento do SST3 na TB, por meio da mutagênese do gene *escN* que codifica uma ATPase essencial para a montagem desse



sistema na amostra de aEPEC (1711-4:escN), revelaram que a montagem do SST3 é importante na translocação de bactérias, já que uma falha provocada na formação desse aparato promoveu uma redução no número de bactérias recuperadas nos órgãos. Recentemente, MARTINEZ-ARGUDO *et al.*(2007) descreveram que o SST3 é requerido para induzir a perda da função da barreira intestinal e permitir a translocação de cepas de *Salmonella enterica* através da células M. Alternativamente, o SST3 seria importante na medida em que permitiria a injeção, na célula hospedeira, de uma ou mais proteínas efetoras que poderiam contribuir para os eventos de translocação observados neste estudo. É necessária, portanto, uma melhor investigação para entendermos o papel das proteínas efetoras translocadas no processo da TB.

Deste modo, algumas amostras de EPEC podem atravessar a barreira mucosa gastrointestinal sob condições de sobrecrecimento e a viabilidade deste evento pode ocorrer em diversas situações clínicas, tais como imunossupressão, antibioticoterapia, obstrução biliar e outros processos que causam alterações na microbiota intestinal.

Baseado nos conhecimentos atuais da interação entre o sistema de defesa e os microorganismos, sabe-se que, a partir de um estímulo, o hospedeiro ativa o sistema de amplificação pró-inflamatório gerando variados mediadores indutores da resposta imune, tais como citocinas especializadas e quimiocinas. Em situações de doenças graves, tais como politrauma, queimadura, sepse e choque, o organismo desencadeia um estado de hipoperfusão esplâncnica na tentativa de preservar os órgãos considerados vitais à manutenção da vida. Este fenômeno promove a redução do fluxo sanguíneo no território intestinal com conseqüente morte celular e rompimento

da barreira, propiciando a invasão microbiana e a ativação da resposta imune local do intestino, podendo incrementar a resposta inflamatória sistêmica (BERG,1992; HINSHAW, 1996; FARIES *et al.*, 1998; BAKER *et al.*, 2002; FINK, 2003; FINK *et al.*, 2005; TRZECIAK; RIVERS, 2005; LEAPHART; TEPAS, 2007). Entretanto, quando esta resposta ultrapassa os limites da normalidade, o efeito fisiológico benéfico parece ser suplantado pelo efeito fisiológico deletério, contribuindo para o desencadeamento da morte celular, processo entendido como resposta inflamatória exacerbada (potencialmente relacionados à falência de múltiplos órgãos e óbito). Esta atividade imunológica do intestino, por meio de produção de citocinas, tem sido indiretamente ressaltada (MAIMOUS, *et al*, 1995; MICHALSKY, *et al*, 1997; RUIZ- SILVA *et al*, 2002) e atribuída ao processo da ativação do tecido linfóide associado ao intestino (*Gut Associated Lymphoid Tissue*, GALT).

O estado de hipofluxo intestinal pode ter propiciado a disfunção da barreira intestinal favorecendo a TB. A morte celular no epitélio das vilosidades tem sido relacionada com uma menor produção de muco e seus componentes, diminuindo a barreira física e química por ele imposta, facilitando a passagem de bactérias. As junções intercelulares (*tight junctions*), que conferem permeabilidade paracelular seletiva e mantêm a adesão intercelular da mucosa, são afetadas pela reação inflamatória (FINK, 2003; CLARK; COOPERSMITH, 2007; MAGALHÃES *et al.*, 2007). Portanto, a translocação bacteriana poderia ocorrer tanto pela via transcelular como pela via paracelular, devido a alterações das *tight junction*”, ou ainda pela combinação de ambos os processos.

Ensaio de medida do fluxo sanguíneo em diferentes órgãos do rato (índice de perfusão tecidual) mostraram que somente a amostra de aEPEC (1711-4/89) induziu uma redução significativa da perfusão no intestino (jejuno e íleo), fígado e rins, muito semelhante ao perfil de perfusão tecidual da amostra de *E. coli* R6 nestes órgãos. Esses achados revelam que pelo menos uma amostra de aEPEC translocada provoca efeitos danosos à microcirculação, comprometendo a perfusão tecidual, e atua significativamente na ativação das respostas pró-inflamatórias do hospedeiro dentro do processo da TB.

Além disso, o expressivo índice de TB, assim como os prejuízos provocados na perfusão tecidual pela aEPEC em comparação com a tEPEC, sugere a ocorrência de um aumento na capacidade deletéria da aEPEC, a qual pode ser atribuída às mudanças na sua composição genotípica ao longo do tempo. Baseando-se nos resultados obtidos, o conceito tão bem estabelecido de que as injúrias provocadas pelas EPEC são locais e estão limitadas somente ao intestino, deve ser reconsiderado. Adicionalmente, os efeitos sistêmicos e consequenciais promovidos pela TB devem ser melhor examinados sob diversas circunstâncias experimentais que mimetizam os ajustes clínicos patológicos multifatoriais.

Em resumo, os nossos resultados mostram, pela primeira vez em um estudo experimental, a capacidade de amostras de aEPEC e tEPEC de translocar e prejudicar microcirculação sistêmica. Contudo, outras amostras de EPEC devem ser investigadas para sabermos se os fenômenos observados são características de amostras do sorotipo O51:H40 e até mesmo de outras amostras de tEPEC e aEPEC. Uma identificação adequada de amostras bacterianas recuperadas a partir de pacientes sépticos poderá

contribuir para confirmar o potencial de amostras de EPEC em translocar a barreira intestinal e de gerar sepse.

## CONCLUSÕES

⇒ O sorotipo O51:H40 de *E. coli* compreende amostras potencialmente enteropatogênicas, uma vez que a maioria das amostras testadas produziram lesão A/E em alça ileal de coelhos *in vivo*, a amostra de aEPEC 1711-4, e a tEPEC E2348/69, apresentaram capacidade significativa de translocar a mucosa intestinal em ensaios de translocação bacteriana (TB) em ratos, sendo que a aEPEC 1711-4 provocou também danos à perfusão tecidual.

⇒ Entre as amostras do sorotipo O51:H40 estudadas, a maioria deve ser classificada como aEPEC.

⇒ O sobrecrescimento da amostra de aEPEC (1711-4) do sorotipo O51:H40, em intestino de rato, além de causar a translocação, produziu danos à microcirculação sistêmica, já que promoveu alterações no fluxo sanguíneo e produziu vários focos hemorrágicos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHESON, D.W.K.; LUCCIOLI, S. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, p.18, v. 387-404, 2004.

ADU-BOBIE, J.; FRANKEL, G.; BAIN, C.; GONÇALVES, A. G.; TRABULSI, L. R.; DOUCE, G.; KNUTTON, S.; DOUGAN, G. Detection of intimins  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  and  $\delta$ , four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 6, 1998.

AFSET, J.E., BERGH, K., BEVANGER, L. High prevalence of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Norwegian children with diarrhoea. **J Med Microbiol** ., v. 52, p. 1015-1019, 2003.

AFSET, J.E., BEVANGER, L., ROMUNDSTAD, P., BERGH, K. Association of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with prolonged diarrhoea. **J Med Microbiol** ., v. 53, p. 1137-1144, 2004.

AFSET, J.E.; ANDERSSSEN, E.; BRUANT, G.; HAREL, J.; WIELER, L.; BERGH, K. Phylogenetic backgrounds and virulence profiles of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains from a case-control study using multilocus sequence typing and DNA microarray analysis. **J Clin Microbiol** ., v. 46, p. 2280-2290, 2008.

ARBELOA, A.; BLANCO, M.; MOREIRA, F.C.; BULGIN, R.; LOPEZ, C.; DAHBI, G.; BLANCO, J.E.; MORA, A.; ALONSO, M.P.; MAMANI, R.C.; GOMES, T.A.; BLANCO, J.; FRANKEL, G., Distribution of espM and espT among enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. **J Med Microbiol.**, v. 58, p. 988-995, 2009.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Current Protocols in Molecular Biology**, New York, 1995.

BACKER, D.D.; CRETEUR, J.; PREISER, J.C.; DUBOIS, M.J.; VINCENT, J.L. Microvascular blood flow is altered in patients with sever sepsis. **Crit Care Med.**,v. 166, p. 98-104, 2002.

BADEA, L., DOUGHTY, S., NICHOLLS, L., SLOAN, J., ROBINS-BROWNE, R. M., HARTLAND, E. L. Contribution of Efa1/LifA to the adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells. **Microb Pathog**, v. 34, p. 205-15, 2003.

BERG R.D. Bacterial translocation from the gastrointestinal. **tract. J. Med.**; v. 23, p. 217-244, 1992.

BERG, R.D, GARLINGTON, A.W. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. **Infect Immun.**; v.23,p. 403-411, 1979.

BLAKE, P. A.; RAMOS, S.; MacDONALD, K. L.; RASSI, V.; GOMES, T. A. T.; IVEY, C.; BEAN, N. H.; TRABULSI, L. R. Pathogen-specific risk factors and protective factors for acute diarrheal disease in urban Brazilian infants. **J. Infect. Dis.**, v.167, p. 627-632, 1993.

BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; DAHBI, G.; MORA, A.; ALONSO, M.P.; VARELA, G., GADEA, M.P.; SCHELOTTO, F.; GONZALEZ, E.A.; 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 (muB and xiR/beta2B). **J Med Microbiol.**, v. 55, p. 1165-1174, 2006.

BLANCO, M.; PADOLA, N.L.; KRUGER, A.; SANZ, M.E.; BLANCO, J.E.; GONZALEZ, E.A.; DAHBI, G.; MORA, A.; BERNARDEZ, M.I.; ETCHEVERRIA, A.I.; ARROYO, G.H.; LUCCHESI, P.M.; PARMA, A.E.; BLANCO, J., , Virulence genes and intimin types of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina. **Int Microbiol.**, v. 7, p. 269-276, 2004.

BLANCO, M.; SCHUMACHER, S.; TASARA, T.; ZWEIFEL, C.; BLANCO, J. E.; 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-eta2). **BMC Microbiol.** , v. 5, p. 23, 2005.

BOYER, H.W., ROULLAND-DUSSOIX, D., , A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. **J Mol Biol.** , v. 41, p. 459-472, 1969.

BUERIS, V.; SIRCILI, M.P.; TADDEI, C.R.; DOS SANTOS, M.F.; FRANZOLIN, M.R.; MARTINEZ, M.B.; FERRER, S.R.; BARRETO, M.L. TRABULSI, L.R. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** , v. 102, p. 839-844, 2007.

CAMPELLONE, K.G.; ROBBINS, D.; LEONG, J.M.; EspFU is a translocated EHEC effector that interacts with Tir and N-WASP and promotes Nck-independent actin assembly. **Dev Cell** v. 7,p. 217-228, 2004.

CAMPOS, L.C.; FRANZOLIN, M.R.; TRABULSI, L.R., Diarrheagenic *Escherichia coli* categories among the traditional enteropathogenic *E. coli* O serogroups--a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v. 99,p. 545-552, 2004.

CAMPOS, L.C.; WHITTAM, T.S.; GOMES, T.A.T.; ANDRADE, J.R.C.; TRABULSI, L.R. *Escherichia coli* serogroup O111 includes several clones of diarrheagenic strains with different virulence properties. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 3282-3288, 1994.

CLARK, J.A.; COOPERSMITH, C.M. Intestinal crosstalk: a new paradigm for understanding the gut as the “motor” of critical illness. **Shock.**, v. 28(4), p. 384-393, 2007.

CLARK, S. C.; HAIGH, R. D.; FREESTONE, P. P. E.; WILLIAMS, P. H. Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 16, p.365-378, 2003.

CLEARY, J.; LAI, L.C.; SHAW, R.K.; STRAATMAN-IWANOWSKA, A.; DONNENBERG, M.S.; FRANKEL, G.; KNUTTON, S., Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. **Microbiology** ., v. 150,p, 527-538, 2004.

COHEN, M.B.; NATARO, J.P.; BERNSTEIN, D.I.; HAWKINS, J.; ROBERTS, N.; STAAT, M.A. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in acute childhood enteritis: a prospective controlled study. **J Pediatr** .,v. 146, p. 54-61, 2005.

COOPERSMITH, C. H.; STROMBERG, P. E.; DUNNE, W. M.; DAVIS, C. G.; AMID, D. M.; BUCHMAN, T. G.; KARL, I. E.; HOTCHKISS, R. S. Inhibition of intestinal epithelial apoptosis and survival in a murine model of pneumonia-induced sepsis. **JAMA**; 287:1716-1721, 2002.

CRANE, J. K.; McNAMARA, B. P.; DONNENBERG, M. S. Role of EspF in host cell death induced by enteropathogenic *Escherichia coli*. **Cell. Microbiol.**, v. 3, p. 197-211, 2001.

CRAVIOTO, A., GROSS, R. J.; SCOTLAND, S. M.; ROWE, B. An adhesive factor found in stains of *Escherichia coli* belonging to traditional infantile enteropathogenic serotypes. **Curr. Microbiol.**, v. 3, p. 95-99, 1979.

CZECZULIN, J. R.; WHITTAM, T. S.; HENDERSON, I. R.; NAVARRO-GARCIA, F.; NATARO, J. P. Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 2692-2699, 1999.

DAHAN, S.; WILES, S., LA RAGIONE, R.M., BEST, A., WOODWARD, M.J., STEVENS, M.P., SHAW, R.K., CHONG, Y., KNUTTON, S., PHILLIPS, A., FRANKEL, G., EspJ is a prophage-carried type III effector protein of attaching and effacing pathogens that modulates infection dynamics. **Infect Immun.**, v. 73,p. 679-686, 2005.

DALLA-COSTA, L.M.; IRINO, K.; RODRÍGUEZ, J.; RIVERA, I. N. G.; TRABULSI, L. R. Characterization of diarrhoeagenic *Escherichia coli* clones by ribotyping and ERIC-PCR. **J. Med. Microbiol.**, v. 47, p. 227-234, 1998.

DEAN, P.; KENNY, B. The effector repertoire of enteropathogenic *E. coli*: ganging up on the host cell. **Curr Opin Microbiol** 12: 101–109, 2009.

DEAN, P.; MARESCA, M.; KENNY, B. EPEC's weapons of mass subversion. **Curr. Opin. Microbiol.**, v.8, p. 28-34, 2005.



DEITCH, E. A.; XU, D.; KAISE, V. L. Role of the gut in the development of injury and shock-induced SIRS and MODS: the gut-lymph hypothesis, a review. **Front Biosci.**; 11: 520-528, 2006.

DEITCH, E.A. Simple intestinal obstruction causes bacterial translocation in man. **Arch Surg**; v.124,p. 699-702, 1989.

DENG, W.; PUENTE, J.L.; GRUENHEID, S.; LI, Y.; VALLANCE, B.A.; VAZQUEZ, A.; BARBA, J.; IBARRA, J.A.; O'DONNELL, P.; METALNIKOV, P.; ASHMAN, K.; LEE, S.; GOODE, D.; PAWSON, T.; FINLAY, B.B. Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 101, p. 3597-3602, 2004.

DEVINNEY, R.; NISAN, I.; RUSCHKOWSKI, S.; ROSENSHINE, I.; FINLAY, B.B. Tir tyrosine phosphorylation and pedestal formation are delayed in enteropathogenic *Escherichia coli* sepZ::TnpHoA mutant 30-5-1(3). **Infect Immun** ., v. 69, p. 559-563, 2001.

DONNENBERG, M. S.; WELCH, R. A. Virulence determinants of uropathogenic *Escherichia coli*, 135-174. In Mobley, H.L.T. and Warren W. (ed). Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management. **American society for Microbiology, Washington, DC** 2005.

DONNENBERG, M.S. Entry of enteropathogenic *Escherichia coli* into host cells. **Curr Top Microbiol Immunol.**, 209, 79-98, 1996.

DONNENBERG, M.S., YU, J.; KAPER, J. B. A second chromosomal gene necessary for intimate attachment of enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells. **J. Bacteriol.**, v. 175, p. 4670-4680, 1993.

DONNENBERG, M.S.; KAPER, J. B.; FINLAY, B. B. Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells. **Trends Microbiol.**, v. 5, p. 109-114, 1997.

DONNENBERG, M.S.; KAPER, J. B.; FINLAY, B. B. Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells. **Trends Microbiol.**, v. 5, p. 109-114, 1997.

DOUGHTY, S., LOAN, J., BENNETT-WOOD, V., ROBERTSON, M., ROBINS-BROWNE, R. M., HARTLAND, E. L. Identification of a novel fimbrial gene cluster related to long polar fimbriae in locus of enterocyte effacement-negative strains of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infect. Immun**, v. 70., p. 6761-6769, 2002.

DULGUER, M. V.; FABBRICOTTI, S. H.; BRANDO, S. Y.; MOREIRA-FILHO, C. A.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I. C. A. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains: Phenotypic and genetic profiling reveals a strong association between enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin and diarrhea. **J. Infect. Dis.**, v. 188 (11), p. 1685-94, 2003.

ELIAS, W. P.; UBER, A. P., TOMITA, S. K., TRABULSI, L. R., GOMES T. A. T. Combinations of putative virulence markers in typical and variant enteroaggregative

*Escherichia coli* strains from children with and without diarrhoea. **Epidemiol. Infect.**, v. 129, p. 49-55, 2002.

ELLIOTT, S. J.; KAPER, J. B. Role of type I fimbriae in EPEC infections. **Microbiol. Pathog.**, v. 23, p. 113-118, 1997.

FARIES, P.L.; SIMON, R.J.; MARTELLA, A.T.; LEE, M.J.; MACHIEDO, G.W. Intestinal permeability correlates with severity of injury in trauma patients. **J Traum** ., v. 44, p. 1031-1035; discussion 1035-1036, 1998.

FERREIRA, G.M.; SPIRA, B. The *pst* operon of enteropathogenic *Escherichia coli* enhances bacterial adherence to epithelial cells. **Microbiology**.,v.154, p. 2025-2036. 2008.

FINK, M.P. Intestinal epithelial hyperpermeability: update on the pathogenesis of gut mucosal barrier dysfunction in critical illness. **Curr Opin Crit Care**; v. 9, p.143-151, 2003.

FINK, M.P.; DELUDE, R.L. Epithelial barrier dysfunction: a unifying theme to explain the pathogenesis of multiple organ dysfunction at the cellular level. **Crit Care Clin.**, v. 21, p. 177-196, 2005.

FINLAY, B. B.; FALKOW, S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. **Microbiol Mol Biol Rev** 61, 136-169. 1997.

FOUBISTER, V., ROSENSHINE, I., DONNENBERG, M. S.; FINLAY, B. B. The *eaeB* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is necessary for signal transduction in epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 3038-3040, 1994.

FRANKEL, G.; CANDY, D. C. A.; EVEREST, P.; DOUGAN, G. Characterization of the C-terminal domains of intimin-like proteins of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Hafnia alvei*. **Infect Immun.**, v. 62, p. 1835-1842, 1994.

FRANKEL, G.; PHILLIPS, A. D.; ROSENSHINE, I.; DOUGAN, G.; KAPER, J. B.; KNUTTON, S. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* : more subversive elements. **Mol. Microbiol.**, v. 29, p. 911-921, 1998.

FRANZOLIN, M.R.; ALVES, R.C.; KELLER, R.; GOMES, T.A.; BEUTIN, L.; BARRETO, M.L.; MILROY, C.; STRINA, A.; RIBEIRO, H. TRABULSI, L.R. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v. 100, p. 359-363, 2005.

FRIEDBERG, D.; UMANSKI, T.; FANG, Y.; ROSENSHINE, I. Hierarchy in the expression of the locus of enterocyte effacement genes of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Mol Microbiol.**, v. 34, p. 941-952, 1999.

GANNON, V.P.; RASHED, M.; KING, R.K.; THOMAS, E.J. Detection and characterization of the *eae* gene of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* using polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol.**, v. 31, 1268-1274, 1993.

GARMENDIA, J., A. D. PHILLIPS, M. F. CARLIER, Y. CHONG, S. SCHULLER, O. MARCHES, S. DAHAN, E. OSWALD, R. K. SHAW, S. KNUTTON, G. FRANKEL.

TccP is an enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 type III effector protein that couples Tir to the actin-cytoskeleton. **Cell Microbiol.**, v. 6, p. 1167-1183. 2004.

GARMENDIA, J.; FRANKEL, G.; CREPIN, V.F. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. **Infect Immun.**, v. 73, p. 2573-2585, 2005a.

GARMENDIA, J.; PHILLIPS, A. D.; CARLIER, M. F.; CHONG, Y.; SCHÜLLER, S.; MARCHES, O.; DAHAN, S.; OSWALD, E.; SHAW, R. K.; KNUTTON, S.; FRANKEL, G. TccP is enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 type III effector protein that couples Tir to the actin-cytoskeleton. **Cell. Microbiol.**, v. 6., p. 1167-1183., 2004.

GARMENDIA, J.; REN, Z.; TENNANT, S.; VIERA, M.A.M.; CHONG, Y.; WHALE, A.; AZZOPARDI, K.; DAHAN, S.; SIRCILI, M.P.; FRANZOLIN, M.R.; TRABULSI, L.R.; PHILLIPS, A.; GOMES, T.A.; XU, J.; ROBINS-BROWNE, R.; FRANKEL, G. Distribution of tccP in clinical enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* isolates. **J Clin Microbiol.**, v. 43, p. 5715-5720, 2005b.

GARRIDO, P.; BLANCO, M.; MORENO-PAZ, M.; BRIONES, C.; DAHBI, G.; 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** v. 52, p. 192-201, 2006.

GAUTHIER, A; PUENTE J. L.; FINLAY, B. B Secretin of the Enteropathogenic *Escherichia coli* Type III Secretion System Requires Components of the Type III Apparatus for Assembly and Localization. **Infect Immun.**, v.71, p. 3310-3319, 2003.

GAUTHIER, A; PUENTE J. L.; FINLAY, B. B Secretin of the Enteropathogenic *Escherichia coli* Type III Secretion System Requires Components of the Type III Apparatus for Assembly and Localization. **Infect Immun.**, v.71, p. 3310-3319, 2003.

GERLACH, R.G.; HENSEL, M. *Salmonella* pathogenicity islands in host specificity, host pathogen-interactions and antibiotics resistance of *Salmonella enterica*. **Berl Munch Tierarztl Wochenschr** 120, 317-327, 2007.

GIRÓN, J. A.; HO, A.S.Y.; SCHOOLNIK, G.K. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Science.**, v. 254, p. 710-713, 1991.

GOMES, T. A. T.; IRINO, K.; GIRÃO, D. M.; GIRÃO, V. B. C.; GUTH, B. E. C.; VAZ, T. M. I.; MOREIRA, F. C.; CHINARELLI, S. H.; VIEIRA, M. A. M.. *Escherichia coli* strains outside the EPEC serogroups that carry *eae* and lack the EAF and the Shiga toxin DNA sequences: emerging pathogens? **Emerg. Infect. Dis.**, v 10, p. 1851-1855, 2004.

GOMES, T.A.; VIEIRA, M.A.; ABE, C.M.; RODRIGUES, D.; GRIFFIN, P.M.; RAMOS, S.R. Adherence patterns and adherence-related DNA sequences in *Escherichia coli* isolates from children with and without diarrhea in Sao Paulo city, Brazil. **J Clin Microbiol.**, v. 36, 3609-3613, 1998.

GOMES, T.A.T.; RASSI, V.; MACDONALD, K. L.; RAMOS, S.R.T.S.; TRABULSI, L.R.; VIEIRA, M.A.M.; GUTH, B.E.C.; CANDEIAS, J.A.N.; IVEY, C.; TOLEDO, M.R.F.;

BLAKE, P.A. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in São Paulo, Brazil. **J. Infect. Dis.**, v. 164, p. 331-337, 1991.

GOMEZ-DUARTE, O. G.; KAPER, J. B. A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal *eaeA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 1767-1776, 1995.

GONÇALVES, A. G.; CAMPOS, L. C.; GOMES, T. A. T.; RODRIGUES, J.; SPERANDIO, V.; WHITTAN, T. S.; TRABULSI, L. R. Virulence properties and clonal structures of strains of *Escherichia coli* O119 serotypes. **Infect. Immun.**, v 65 (6), p. 2034-2040, 1997.

GRUNSTEIN, M.; HOGNESS, D. S. Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 72, p. 3961-3963, 1975.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J.R. Gut flora in health and disease. **The Lancet.**, v. 361, p. 512-519, 2003.

GUILARDI, A. C.; GOMES, T.A.T.; ELIAS, W. P.; TRABULSI, L. R. Virulence factors of *Escherichia coli* strains belonging to serogroups O127 and O142. **Epidemiol. Infect.**, v. 131, p. 815-821, 2003.

HEILMANN, C.; SCHWEITZER, O.; GERKE, C.; VANITTANAKOM, N.; MACK, D.; GÖTZ, F. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. **Mol. Microbiol.**, v. 20, p. 1083-1091, 1996.

HERNANDES, R.T.; ELIAS, W.P.; VIEIRA, M.A.; GOMES, T.A., An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol Lett.** 2009.

HICKS, S.; CANDY, D.C. A.; PHILLIPS, A. D. Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa in vitro. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 4751-4760, 1996.

HICKS, S.; FRANKEL, G.; KAPER, J. B.; DOUGAN, G.; PHILLIPS, A. D. Role of intimin and bundle-forming pili in enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion to pediatric intestinal tissue in vitro. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 1570-1578, 1998.

HINSHAW, L.B. Sepsis/septic shock: participation of the microcirculation: an abbreviated review. **Crit Care Med.**; v. 24, p. 1072-1077, 1996.

HOTCHKISS, R.S.; KARL, I.E. The pathophysiology and treatment of sepsis. **The New Englan Journal of Medicine.** v. 15, p.138-150, 2003.

JENKINS, C.; SMITH, H. R.; LAWSON, A. J.; WILLSHAW, G. A.; CHEASTY, T.; WHEELER, J. G. TOMPKINS, D.S. Serotypes, intimin subtypes, and antimicrobial resistance patterns of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* isolated in England from 1993 to 1996. **Eur J Clin Microbiol.** , v. 25, p. 19-24, 2006.

JERSE, A. E., YU, J. U; TALL, B. D.; KAPER, J. B. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesion on tissue culture cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 87, p. 7839-7843, 1990.

JONES, H. W.; McKUSICK, V. A.; HAPER, P. S.; WUU, K. D. The HeLa cell and reappraisal of its origin. **Obstet. Gynecol**, v. 38, p. 945-949. 1971.

KALMAN, D.; WEINER OD, GOOSNEY DL, SEDAT JW, FINLAY BB, ABO A, BISHOP JM. Enteropathogenic *E. coli* acts through WASP and Arp 2/3 complex to form actin pedestals. **Nature Cell. Biol.**, v. 1 (6), p. 389-391, 1999.

KANACK, K.J.; CRAWFORD, J.A.; TATSUNO, I.; KARMALI, M.A.; KAPER, J.B. SepZ/EspZ is secreted and translocated into HeLa cells by the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system. **Infect Immun** v. 73, p. 4327-4337, 2005.

KAPER, J. P. Defining EPEC. In: Proceedings of the International Symposium on Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). **Rev. Microbiol.**, v. 27, p. 130-133, 1996.

KAPER, J.B., Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Curr Opin Microbiol.**, v.1,p. 103-108, 1998.

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

KELLER, R.; PEDROSO, M. Z.; RITCHMANN, R.; SILVA, R. M. Occurrence of virulence-associated properties in *Enterobacter cloacae*. **Infect Immun.**, v. 66, p. 645–649. 1998.

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** ., v. 31, p. 1229-1241, 1999.

KENNY, B., LAI, L., FINLAY, B. B.; DONNENBERG, M.S. EspA, a protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli* is required to induce signals in epithelial cells. **Mol. Microbiol.**, v. 20, p. 313-324, 1996.

KENNY, B.; DE VINNEY, R.; STEIN, M.; REINSCHEID, D. J.; FREY, E. A.; Finlay, B. B. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) transfer its receptor for intimate adherence into mammalian cells. **Cell.**, v. 91 (4), p. 511-520, 1997.

KENNY, B.; JEPSON, M. Targeting of an enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) effector protein to host mitochondria. **Cell. Microbiol.**, v. 2, p. 579-590, 2000.

KLAPPROTH, J. M.; SCALETSKY, I. C.; McNAMARA, B. P.; LAI, L. C.; MALSTROM, C.; JAMES, S.P.; DONNENBERG, M. S. A large toxin from pathogenic *Escherichia coli* strains that inhibits lymphocyte activation. **Infect. Immun.**, v.68, p. 2148-2155, 2000

KNUTTON, S.; BALDWIN, T., WILLIAMS, P. H.; MCNEISH, A. S. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**,v. 57, p.1290-1298, 1989.

KNUTTON, S.; BALDWIN, T., WILLIAMS, P. H.; MCNEISH, A. S. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**,v. 57, p.1290-1298, 1989.

KNUTTON, S.; LLOYD, D. R.; MCNEISH, A. S.; Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal enterocytes and cultured and human intestinal mucosa. **Infect. Immun.**, v.55, p. 69-77, 1987.

KOH, I.H., LIBERATORE, A.M., MENCHACA-DIAZ, J.L., RUIZ-SILVA, M., VILELA-OLIVEIRA, L., WATANABE, A.Y., SALOMAO, R., FAGUNDES-NETO, U., SILVA, R.M. Bacterial translocation, microcirculation injury and sepsis. **Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.**,v. 6, p. 143-150, 2006.

KOH, I.H.J.; MENCHACA-DÍAZ, J.L.; FARSKY, S.H.P.; SIQUEIRA, A.F.R.; RUIZ-SILVA M.; PUPPI, J.; FAGUNDES-NETO, U.; MORAIS, M.B.; SILVA, R.M. Injuries to the Mesenteric Microcirculation Due to Bacterial Translocation. **Transplant Proc.**, v.34, p. 1003-1004, 2002.

KOH, I.H.J.; SILVA, R.M. Novel in vitro small intestinal graft model for study of bacterial translocation in the rat. **Transplantation proceedings** v. 28, p. 2667-8, 1996.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAI, L. C., WAINWRIGHT, L. A., STONE, K. D.; DONNENBERG, M. S. A third secreted protein that is encoded by the enteropathogenic *Escherichia coli* pathogenicity island is required for transduction of signals and for attaching and effacing activities in host cells. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 2211-2217, 1997.

LAM, C.; TYMI, K.; MARTIN, C.; SIBBALD, W. Microvascular perfusion is impaired in a rat model of normotensive sepsis. **J Clin Invest.**; v. 94, p. 2077-2083, 1994.

LAPORTA, M.Z.; SILVA, M.L.; SCALETSKY, I.C.; TRABULSI, L.R., Plasmids coding for drug resistance and localized adherence to HeLa cells in enteropathogenic *Escherichia coli* O55:H- and O55:H6. **Infect Immun.**, v. 51,p. 715-717, 1986.

LEAPHART, C. L.; TEPAS, J. J. The gut is a motor of organ system dysfunction. **Surgery**; v. 141., p. 563-569, 2007.

LEVINE, M.M., KAPER, J.B., LOCKMAN, H., BLACK, R.E., CLEMENTS, M.L.;

FALKOW, S. Recombinant DNA risk assessment studies in humans: efficacy of poorly mobilizable plasmids in biologic containment. **J. Infect Dis**, v. 148, p. 699-709. 1983.

LEVINE, M M.; NATARO, J. P.; KARCH. H.; BALDINI, M. M.;KAPER, J. B.; BLACK, R. E., CLEMENTS, M. L.; O'BRIEN, A. 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.**, v. 1152, p. 550-559., 1985.

MACFIE, J.; O'BOYLE, C.; MITCHELL, C.J.; Gut origem of sepsis: a prospective study investigating associations between bacterial translocation, gastric microflora, and septic morbidity. **Gut** , v. 45,p. 223-228, 1999.

MAGALHAES, J.G.; TATTOLI, I.; GIRARDIN, S.E. The intestinal epithelial barrier: how to

MAINOUS, M.; TSO, P.; BERG, R.D.; DEITCH, E.A. Studies of the route, magnitude, and time course of bacterial translocation in a model of systemic inflammation. **Arch Surg**; v.126,p. 33- 37, 1991.

MAINOUS, M.R.; ERTEL, W.; CHAUDRY, I.H.; DEITCH, E.A., The gut: a cytokine-generating organ in systemic inflammation? **Shock** .,v. 4, p. 193-199, 1995.

MARCHES O, LEDGER TN, BOURY M, OHARA M, TU X, GOFFAUX F, MAINIL J, ROSENSHINE I, SUGAI M, DE RYCKE J, OSWALD E. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* deliver a novel effector called Cif, which blocks cell cycle G2/M transition. **Mol Microbiol.**; v. 50, p. 1553-1567, 2003.

MARCHES, O.; COVARELLI, V.; DAHAN, S.; COUGOULE, C.; BHATTA, P.; FRANKEL, G.; CARON, E. EspJ of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* inhibits opsono-phagocytosis. **Cell Microbiol** .,v. 10, 1104-1115, 2008.

MARSHALL, J.C.; CHRISTOU, N.V, HORN R.; MEAKINS, J.L.The microbiology of multiple organ failure. The proximal gastrointestinal tract as an occult reservoir of pathogens. **Arch Surg**, v. 123, p. 309-15, 1988.

MARTINEZ-ARGUDO, I.; SANDS, C.; JEPSON, M.A. Translocation of enteropathogenic *Escherichia coli* across an in vitro M cell model is regulated by its type III secretion system. **Cell Microbiol** ., v. 9, p. 1538-1546, 2007.

Mc DANIEL, T. K., JARVIS, K. G., DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 92, p. 1664-1668, 1995.

Mc DANIEL, T. K., JARVIS, K. G., DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens **Proc. Natl Acad. Sci. USA.**, v. 92, p. 1664-1668, 1995.

McNAMARA, B. P.; KOUTSOURIS, A.; O'CONNELL, C. B.; NOUGAYREDE, J. P.; DONNENBERG, M. S.; HECHT, G.Translocated EspF protein from enteropathogenic *Escherichia coli* disrupts host intestinal barrier function. **J. Clin. Invest.**, v. 107(5), p. 621-629, 2001.

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBERT, P.; JANEWAY, C. A. JR. A human homologue of the Drosophila toll protein signals activation of adaptative immunity. **Nature.**, v. 388, p. 393-397, 1997.

MELLIES, J. L.; ELLIOT, S. J.; SPERANDIO, V.; DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B. The per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a regulatory

cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler). **Mol. Microbiol.**, v. 33, p. 296-306, 1999.

MENCHACA-DÍAZ, J. L.; SILVA, R. M.; FIGUEIREDO, L.F.P.; BUGNI, G. M.; WATANABE A. Y.; SILVA, F. J. P.; KOH, I.H.J. Bacterial translocation consequential to intestinal bacterial overgrowth provokes aggravation of mortality by sepsis. **Critical Care** 7(3): P28. 2003.

MICHALSKY, M.P.; DEITCH, E.A.; DING, J.; LU, Q.; HUANG, Q. Interleukin-6 and tumor necrosis factor production in an enterocyte cell model (Caco-2) during exposure to *Escherichia coli*. **Shock** ., v. 7, p. 139-146, 1997.

MOON, H. W.; WHIPP, S. C.; ARGENZIO, R. A.; LEVINE, M. M.; GIANNNELA, R. A. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. **Infect Immun.**, v. 41, p. 1340-1351, 1983.

MOORE, F.A.; MOORE, E.E.; POGETTI, R.; MCANENA, O.J.; PETERSON, V.M.; ABERNATHY, C.M.; PARSONS, P.E. Gut bacterial translocation via the portal vein: A clinical perspective with major torso trauma. **J Trauma**, v. 31, p.629-638, 1991.  
MOREIRA, F. C. Análise do potencial de virulência e da diversidade genética de amostras de *Escherichia coli* do sorotipo O51:H40. São Paulo, 2004 (Tese de Mestrado - Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina).

MOREIRA, F. C.; VIEIRA, M. A.; FERREIRA, A. J.; GIRÃO, D. M.; VAZ, T. M.; ROSA, A. C.; KNOBL, T.; IRINO, K.; FREYMÜLLER, E.; GOMES, T.A. *Escherichia coli* strains of serotype O51:H40 comprise typical and atypical enteropathogenic E. coli strains and are potentially diarrheagenic. **J Clin Microbiol.** v. 461, p. 462-1465, 2008.

MUNDY, R.; PETROVSKA, L.; SMOLLETT, K.; SIMPSON, N.; WILSON, R.K.; YU, J.; TU, X.; ROSENSHINE, I.; CLARE, S.; DOUGAN, G.; FRANKEL, G. Identification of a novel *Citrobacter rodentium* type III secreted protein, EspI, and roles of this and other secreted proteins in infection. **Infect Immun** 72, 2288-2302, 2004.

NATARO, J. P.; SCALETSKY, I. C. A.; KAPER, J. B.; LEVINE, M. M.; TRABULSI, L. R. Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 48 (2), p. 378-383, 1985.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin Microbiol Rev.**, v. 11, p. 142-201, 1998.

NETER, E. *Escherichia coli* diarrhea: an outbreak among infants on a surgical ward. **AMA Am J Dis Child.**, v. 89, p. 564-566, 1955.

O'BOYLE, C.J.; MACFIE, J.; MITCHELL, C.J.; JOHNSTONE D, SAGAR, P.M.; SEDMAN P.C. Microbiology of bacterial translocation in humans. **Gut**, v. 42, p. 29-35, 1998.



OFEK, I.; HASTY, D.L.; SHARON, N. Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems. **FEMS Immunol Med Microbiol.**,v. 38, p. 181-191, 2003.

OKEKE, N.; LAMIKANRA, A.; CZECZULIN, J.; DUBOVSKY, F.; KAPER, J. B; NATARO, J. P. Heterogeneous virulence of enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolates from children in Southwest Nigeria. **J. Infect. Dis.**, v. 181, p. 252-260, 2000.

OOKA, T.; VIEIRA, M.A.; OGURA, Y.; BEUTIN, L.; LA RAGIONE, R.; VAN DIEMEN, P.M.; STEVENS, M.P.; AKTAN, I.; CAWTHRAW, S.; BEST, A.; HERNANDES, R.T.; KRAUSE, G.; GOMES, T.A.; HAYASHI, T.; FRANKEL, G., Characterization of tccP2 carried by atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol Lett** ., v. 271, p. 126-135, 2007.

ORLANDI, P.P.; MAGALHAES, G.F.; MATOS, N.B.; SILVA, T.; PENATTI, M.; NOGUEIRA, P.A.; SILVA, L.H. Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho (Rondonia, Western Amazon region, Brazil). **Braz J Med Biol Res** ., v. 39, p. 507-517. 2006.

OSWALD, E.; SCHMIDT, H.; MORABITO, S.; KARCH, H.; MARCHES, O.; CAPRIOLI, A. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* : Characterization of a new intimin variant. **Infect Immun.**, v. 68, p. 64-71, 2000.

PEIXOTO, J. C.; BANDO, S. Y.; ORDONEZ, J. A.; BOTELHO, B. A.; TRABULSI, L. R.; MOREIRA-FILHO, C. A. Genetic differences between *Escherichia coli* O26 strains isolated in Brazil and other countries. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 196, p. 239-244, 2001.

PENFOLD, R. J.; PEMBERTON, J. M. An improved suicide vector for construction of chromosomal insertion mutations in bacteria. **Gene** **118.**, 145-146. 1992.

RAMACHANDRAN, V.; BRETT, K.; HORNITZKY, M. A.; DOWTON, M.; BETTELHEIM, K. A.; WALKER, M. J.; DJORDJEVIC, S. P. Distribution of intimin subtypes among *Escherichia coli* isolates from ruminant and human sources. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 5022-5032, 2003.

REGUA-MANGIA A.H.; GOMES T.A. T.; VIEIRA M.A.; ANDRADE J.R.; IRINO K.; TEIXEIRA L. M. Frequency and characteristics of diarrhoeagenic *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhoea in Rio de Janeiro, Brazil. **J Infect.**, v. 48(2), p.161-167, 2004.

RIEWALD H, PETROVAN RJ, DONNER A, MUELLER BM, RUF W. Activation of endothelial cell protein activated receptor 1 by the protein C pathway. **Science.**, v. 296, p. 1880-1882, 2002.

ROBINS-BROWNE, R.M.; BORDUN, A.M.; TAUSCHEK, M.; BENNETT-WOOD, V.R.; RUSSELL, J.; OPPEDISANO, F.; LISTER, N.A.; BETTELHEIM, K.A.; FAIRLEY, C.K.; SINCLAIR, M.I.; HELLARD, M.E. *Escherichia coli* and community-acquired gastroenteritis, Melbourne, Australia. **Emerg Infect Dis** ., v. 10, p. 1797-1805, 2004.

RODRIGUES, J.; SCALETSKY, I.C.; CAMPOS, L.C.; GOMES, T.A.; WHITTAM, T.S.; TRABULSI, L.R., Clonal structure and virulence factors in strains of *Escherichia coli* of the classic serogroup O55. *Infect Immun* 64, 2680-2686, 1996.

ROSA, A.C.; MARIANO, A.T.; PEREIRA, A.M.; TIBANA, A.; GOMES, T.A.; ANDRADE, J.R. Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* isolated from infants with acute diarrhoea and healthy controls in Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Microbiol.*, v.47, p. 781-790,1998.

ROSENSHINE, I.; DONNEMBERG, M.S.; KAPER, J. B.; FINLAY, B.B. Signal transduction between enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and epithelial cells: EPEC induces tyrosine phosphorylation of host cell proteins to initiate cytoskeletal rearrangement and bacterial uptake. *EMBO J.*,v.11, p. 3551-3560,1992.

RUIZ-SILVA, M.; SILVA, R.M.; MENCHACA-DÍAZ, J.L.; SIQUEIRA, A.F.R.; BUZZUTTI, F.I.; SILIANO, P.R.; TAJIKI, M.H.; SALOMÃO, R.; FAGUNDES-NETO, U.; MORAIS, M.B.; KOH, I.H.J. Substantial changes in the intestine-derived lymph during bacterial translocation. *Transplant Proc.*, v. 34, p. 1001-1002, 2002.

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

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning**. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 3<sup>rd</sup> Ed, 2001.

SAMPAIO, S. **Localização intracelular e produção da citocina IL-8 em células Caco-2 infectadas com *Escherichia coli* não-pertencentes a sorogrupos de EPEC, portadoras do gene *eae* e desprovidas das seqüências genéticas EAF e *stx* (*E. coli* nãoEPEC *eae*<sup>+</sup>/EAF-/*stx*-)**. Mestrado em Bacteriologia Clínica, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2004.

SÁNCHEZ-GARCIA, M.; PRIETO, A.; TEJEDOR, A.; MARTIN-DUCE, A.; FERNANDEZ SANCHEZ, F.J.; GRANELL, J.; ALVAREZ-MON, M. Characteristics of thoracic duct lymph in multiple organ dysfunction syndrome. *Arch Surg*, v. 132, p. 13-18, 1997.

SANCHES-SANMARTIN, C.; BUSTAMANTE, V. H.; CALVA, E.; PUENTE, J. L. Transcriptional regulation of the *orf 19* gene and the *tir-ces-T-eae* operon of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* v. 183, p. 2823-2833, 2001.

SAVKOVIC, S.D.; KOUTSOURIS, A.; HECHT, G. Activation of NF- $\kappa$ B in intestinal epithelial cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Am J Physiol*; 273: C1160-C1167, 1997.

SCALETSKY, I. C. A.; PEDROSO, M. Z.; OLIVA, C.A. G.; CARVALHO, R. L. B.; MORAIS, M. B.; FAGUNDES-NETO, U. A localized adherence-like pattern as a second pattern of adherence of classic enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells that is associated with infantile diarrhea. *Infect. Immun.*, v. 67, p. 3410-3415, 1999.

SCALETSKY, I.C. A.; SILVA, M. L.M.; TRABULSI, L. R. Distintive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infect. Immun.**, v. 45, p. 534-536, 1984.

SCALETSKY, I.C.; FABBRICOTTI, S.H.; SILVA, S.O.; MORAIS, M.B., FAGUNDES-NETO, U. HEp-2-adherent *Escherichia coli* strains associated with acute infantile diarrhea, Sao Paulo, Brazil. **Emerg Infect Dis** ., v. 8, p. 855-858, 2002.

SCOTLAND, S.M.; SMITH, H.R.; CHEASTY, T.; SAID, B.; WILLSHAW, G.A.; STOKES, N.; ROWE, B. Use of gene probes and adhesion tests to characterise *Escherichia coli* belonging to enteropathogenic serogroups isolated in the United Kingdom. *J Med Microbiol* 44, 438-443, 1996.

SEKIYA, K.; OHISHI, M.; OGINO, T.; TAMANO, K.; SASAKAWA, C.; ABE, A. Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. **Proc. Natl. Sci. USA.**, v. 98, p.11638-11643, 2001.

SHAW, R.K.; SMOLLETT, K.; CLEARY, J.; GARMENDIA, J.; STRAATMAN-IWANOWSKA, A.; FRANKEL, G.; KNUTTON, S. Enteropathogenic *Escherichia coli* type III effectors EspG and EspG2 disrupt the microtubule network of intestinal epithelial cells. **Infect Immun.**, v. 73, p. 4385-4390, 2005.

SHERMAN, P.M.; LICHTMAN, S. N. Bacterial overgrowth. **Clinical Manifestations and Management.**, chapter 27 part 22, p. 816- 829, 1987.

SIMON, R.; PRIEFER, U.; PUHLER, A. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. **Bio/Tecnology**.,v. 1, p. 784-791, 1983.

STALEY, T. E.; JONES, E. W.; CORLEY, L. D. Attachment and penetration of *Escherichia coli* into intestinal epithelium of the ileum in newborn pigs. **Am. J. Pathol.**, v. 56, p. 371-392, 1969.

TARR, C. L.; WHITTAM, T. S. Molecular evolution of the intimin gene in O111 clones of the pathogenic *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 184, p. 479-487, 2002.

TATSUNO, I; HORIE, M; ABE, H; MIKI, T; MAKINO, K; SHINAGAWA, H; TAGUCHI, H; KAMIYA, S; HAYASHI, T; SASAKAWA, C. *tox*B gene on pO157 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for full epithelial cell adherence phenotype. **Infect Immun.**, v. 69, p. 6660-9, 2001.

TOBE, T.; HAYASHI, t.; HAN, C. G.; SCHOOLNIK, G. K.; OHTSUBO, E.; SASAKAWA, C. Complete DNA sequence and structural analysis of the enteropathogenic *Escherichia coli* adherence factor plasmid. **Infect Immun.**, v.67, p. 5455-5462, 1999.

TOLEDO, M.R.; ALVARIZA M. C. B.; MURAHOVSKI, J.; RAMOS, S.R.; TRABULSI, L.R. Enteropathogenic *Escherichia coli* serotypes and endemic diarrhea in infants. *Infect Immun* 39, 586-589, 1983.

TOLEDO, M.R.; ALVARIZA MDO, C.; MURAHOVSKI, J.; RAMOS, S.R.; TRABULSI, L.R. Enteropathogenic *Escherichia coli* serotypes and endemic diarrhea in infants. **Infect Immun** 39, 586-589, 1983.

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheet: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

TOZZOLI, R.; CAPRIOLI, A.; MORABITO, S. Detection of toxB, a plasmid virulence gene of *Escherichia coli* O157, in enterohemorrhagic and enteropathogenic *E. coli*. **J Clin Microbiol** ., v.43, p. 4052-4056, 2005.

TRABULSI, L. R. Revelação de colibacilos associados às diarreias infantis pelo método da infecção experimental da alça ligada do intestino de coelho. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**,v. 6, p. 197-203, 1964

TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; GOMES, T.A.T. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, p. 508-513, 2002.

TRABULSI, L. R.; TOLEDO, M. R. F.; MURAHOVSKI, J.; FAGUNDES-NETO, U.; CANDEIAS, J. A. N. **Epidemiology of infantile bacterial diarrheal disease in Brazil.** KTK Scientific Publishers, Tokyo, 1985.

TRACEY, K.J.; FONG, Y.; HESSE, D.G.; MANOGUE, K.R.; LEE, A.T.; KUO, G.C.; LOWRY, S.F.; CERAMI, A. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. **Nature** ., v. 330, p. 662-664, 1987.

TRIANAFILOU, M.; TRIANAFILOU, K. Sepsis: molecular mechanisms underlying lipopolysaccharide recognition. **Expert Reviews in Molecular Medicine**.,v. 6, p. 1-18, 2004.

TRZECIAK, S.; RIVERS, E. P. Clinical manifestations of disordered microcirculatory perfusion in severe sepsis. **Crit Care**.,v. 9(4), p. S20- S26, 2005.

TU, X.; NISAN I.; YONA, C.; HANSKI, E.; ROSENSHINE, I. EspH, a new cytoskeleton-modulating effector of enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 47 (3), p. 595-606, 2003.

VALLANCE, B.A., FINLAY, B.B. Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 97, p. 8799-8806, 2000.

VIDAL, J.E.; NAVARRO-GARCIA, F., EspC translocation into epithelial cells by enteropathogenic *Escherichia coli* requires a concerted participation of type V and III secretion systems. **Cell Microbiol** .,v. 10, p. 1975-1986, 2008.

VIEIRA, M. A. M. **Análise do potencial de virulência de amostras de *Escherichia coli* não pertencentes a sorogrupos de EPEC, portadoras do gene *eae* e desprovidas das seqüências das sondas EAF e *stx*.** São Paulo, 2000 (Tese de Doutorado - Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina).

VIEIRA, M.A.; ANDRADE, J.R.; TRABULSI, L.R.; ROSA, A.C.; DIAS, A.M.; RAMOS, S.R.; FRANKEL, G.; GOMES, T.A., 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** .,183, 762-772, 2001.

WHALE, A.D.; GARMENDIA, J.; GOMES, T.A.; FRANKEL, G. A novel category of enteropathogenic *Escherichia coli* simultaneously utilizes the Nck and TccP pathways to induce actin remodelling. *Cell Microbiol.* v. 8, p. 999-1008, 2006.

WHALE, A.D.; HERNANDES, R.T.; OOKA, T.; BEUTIN, L.; SCHULLER, S.; GARMENDIA, J.; CROWTHER, L.; VIEIRA, M.A.M.; OGURA, Y.; KRAUSE, G.; PHILLIPS, A.D.; GOMES, T.A.; HAYASHI, T.; FRANKEL, G. TccP2-mediated subversion of actin dynamics by EPEC 2 - a distinct evolutionary lineage of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Microbiology**., v. 153, p. 1743-1755, 2007.

WIEST, R.; RATH, H.C. Gastrointestinal disorders of the critically ill. Bacterial translocation in the gut. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 17, p. 397-425, 2003.

WILSON, R. K.; SHAW, R. K.; DANIELL, S.; KNUTTON, S.; FRANKEL, G. Role of EscF, a putative needle complex protein, in the type III protein translocation system of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Cell. Microbiol.**, v. 3, p. 753-762, 2001.

WOLOCHOW, H.; HILDEBRAND, G.J.; LAMANNA, C. Translocation of microorganisms across the intestinal wall of the rat: effect of microbial size and concentration. **J Infect Dis**., v. 116, p. 523-8, 1966.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Manual for Laboratory Investigations for Acute Enteric Infections. **World Health Organization**, 1987.

WRIGHT, S. D.; RAMOS, R.A.; TOBIAS, P. S.; ULEVITCH, R. J.; MATHINSON, J. C. CD-14, a receptor for a complex of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. **Science**., v., p. 249:1431-1433, 1990.

YANISCH-PERRON, C., VIEIRA, J., MESSING, J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. **Gene** 33, 103-119, 1985.

YU, J.; KAPER, J.B. Cloning and characterization of the eae gene of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Mol Microbiol.**,v. 6(3), p. 411-417, 1992.

ZARIVACH, R.; VUCKOVIC, M.; DENG, W.; FINLAY, B. B.; STRYNADKA, N. C. J. Structural analysis of a prototypical ATPase from the type III secretion system **Nature**, v. 14, p. 131-137, 2007.

ZHANG, W. L.; KÖHLER, B.; OSWALD, E.; BEUTIN, L.; KARCH, H.; MORABITO, S.; CAPRIOLI, A.; SEURBAUM, S.; SCHMIDT, H. Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p.4486-4492, 2002.

## REAGENTES E SOLUÇÕES

### 1. Soluções utilizadas nos ensaios com cultura de células *in vitro*

#### 1. 1. Solução tampão salina-fosfato (PBS)

NaCl .....	136,9 mM
KCl .....	..2,7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	8,1 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1,5 mM

Os sais foram dissolvidos em água bidestilada e a solução foi autoclavada a 121°C por 15 minutos e conservada à temperatura ambiente.

#### 1.2. Solução de vermelho de fenol a 1%

Vermelho de fenol.....	0,5 g
NaOH a 1N .....	3,5 ml
Água deionizada q.s.p. ....	..50 ml

Após a dissolução total dos componentes, a solução foi esterilizada a 121°C durante 15 minutos.

### **1.3. Solução de Tripsina e Versene (ATV)**

Tripsina.....	2,0 g
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O.....	0,2 g
PBS (item 2.0).....	1000 ml

A solução de tripsina (Difco) foi dissolvida em 50 ml de PBS (item 1.1) a 4°C em banho de gelo, e a solução de Versene foi preparada dissolvendo-se 0,2 g de Titriplex (Merck) em 10 ml de PBS. As duas soluções foram misturadas e o volume foi completado para 1000 ml. Após a adição de 1,5 ml de uma solução de vermelho de fenol a 1% (item 1.2), o pH da solução final foi ajustado para 7,5- 7,6 com uma solução de NaOH a 1 N e esterilizada por filtração, em membranas com poros com 0,22 µm (Millipore).

A solução foi armazenada em frasco de vidro e mantida a -20°C.

### **1.4. Solução de D-manose a 20%**

D-manose (Sigma).....	20 g
Água bidestilada q.s.p. ....	100 ml

A D-manose foi dissolvida em água bidestilada e esterilizada por autoclavação, em vapor fluente, durante 1 hora e conservada a 4°C até o momento do uso.



### **1.5. Solução tampão de Sørensen (pH 7,3)**

Solução A:

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  ..... 0,6356 g

Água destilada q.s.p.....70 ml

Solução B:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  .....2,3674 g

Água destilada q.s.p. ....250 ml

O preparo do tampão foi realizada a partir da mistura de 69,6 ml da solução A com 230,4 ml da solução B, em um frasco estéril, e a solução resultante foi conservada a 4 °C.

### **1.6. Solução de eosina-azul de metileno, segundo May-Grünwald**

Foram dissolvidas 0,2 g do corante em 100 ml de metanol (p.a.), em banho-maria a 65°C. Em seguida, a solução foi filtrada em papel de filtro comum e armazenada à temperatura ambiente em um frasco escuro. O corante foi diluído na proporção 1:2 (v/v) em tampão Sørensen (item 1.5) no momento do uso.

### **1.7. Solução de azur-eosina de metileno segundo Giemsa**

A solução comercial (Merck) foi utilizada na diluição 1:3 em tampão Sørensen (item 1.5), preparado e filtrado no momento do uso.

### **1.8. Solução de isotiocianato de faloidina marcado com fluoresceína a 5 µg/ml**

A solução foi preparada dissolvendo-se 100 µg de isotiocianato de faloidina (Sigma) em 2 ml de PBS (item 1.1) esterilizado. O armazenamento foi em alíquotas, em tubos escuros, à temperatura de -20°C. No momento do uso, após o descongelamento, a alíquota foi diluída em PBS, obtendo-se uma concentração final de 5 µg/ml.

### **1.9. Solução de formaldeído a 3%**

O formaldeído (Merck) foi diluído em PBS (item 1.1) no momento do uso.

### **1.10. Solução de Triton X-100 a 1%**

Triton X-100 (Sigma) foi diluído em PBS (item 1.1) esterilizado, no momento do uso.

## **2. Meio de cultivo, reagentes e soluções utilizadas nos ensaios com DNA genômico e plasmidial**

### **2.1. Extração, purificação e eletroporação**

#### **2.1.1. Solução tampão T.E. (1x) pH 7,0**

Trisma base (Sigma).....10 mM

Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O.....1 mM

Os componentes foram dissolvidos em água bidestilada, a quente e, o pH foi ajustado para 7,0 com HCl (p.a.) (Merck). A solução foi autoclavada a 121°C e conservada à temperatura ambiente.

#### **2.1.2. Solução de acetato de sódio a 3 M, pH 4,8**

O preparo da solução foi feito dissolvendo-se acetato de sódio anidro (CH<sub>3</sub>COONa) em água bidestilada e o pH foi ajustado com ácido acético glacial. Em seguida, esta solução foi autoclavada (121°C durante 15 minutos) e mantida à temperatura ambiente até o momento do uso.

#### **2.1.3. Solução de brometo de etídio**

A solução foi preparada dissolvendo-se o pó comercial em água bidestilada na concentração de 5 mg/ml e a solução resultante, conservada em frasco escuro e mantida à temperatura ambiente.

#### **2.1.4. Meio SOC**

Triptona.....	2,0 g
Extrato de levedura.....	0,5 g
NaCl (1 M).....	1 ml
KCl (1 M).....	0,25 ml
Água destilada q.s.p.....	1000 ml

No momento do uso, foi adicionado 20 mM de Mg e 20 mM de glicose.

#### **2.2. Soluções utilizadas para *Southern-blot***

##### **2.2.1 Solução salina padrão com citrato (SSC) 20X pH 7,0**

NaCl.....	3,0 M
Citrato de sódio.....	0,3 M

Os sais foram dissolvidos em água bidestilada e, após o ajuste do pH com HCl (p.a.), a solução foi esterilizada por autoclavação (121°C durante 15 minutos). A solução foi armazenada à temperatura ambiente e, no momento do uso, foi diluída em água bidestilada esterilizada.

##### **2.2.2. Solução desnaturante para gel de agarose**

NaOH.....	1 N
NaCl.....	0,6 M

Foi feita mistura dos reagentes em água bidestilada, completando o volume total da solução.

### **2.2.3. Solução neutralizante para gel de agarose**

NaCl.....1,5 M

Tris pH 7,5.....0,5 M

Os componentes foram misturados e o volume foi completado com água bidestilada. As soluções desnaturante e neutralizante foram preparadas no momento do uso.

## **3. Reagentes e soluções utilizadas da detecção da expressão de proteínas**

### **3.1. Dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10 %**

SDS foi dissolvido completamente em água bidestilada e conservado em temperatura ambiente.

### **3.2. Tris- HCl a 0,5 M - pH 6,8**

Esta solução foi preparada dissolvendo-se 6,05 g de Trizma base em 80 ml de água bidestilada. A seguir, o pH foi ajustado para 6,8 com solução de HCl a 1 N e o volume foi completado com água bidestilada para 100 ml. A solução foi autoclavada a 121°C, durante 15 minutos.

### 3.3. Tris-HCl a 1,5 M - pH 8,8

O preparo desta solução foi realizado dissolvendo-se 18,7 g de Trizma base em 80 ml de água bidestilada. Após o ajuste do pH para 8,8, com solução de HCl a 1 N, o volume foi completado com água bidestilada para 100 ml e a solução final foi autoclavada a 121°C durante 15 minutos.

### 3.4. Tampão de amostra (6x)

Azul de bromofenol (Sigma).....	0,1%
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O (pH8,0).....	100 mM
Ficoll 400.000.....	15%
SDS .....	1,5%
Xileno cianol (Sigma) .....	0,07%

O Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O e o Ficoll 400.000 foram dissolvidos em água bidestilada, a quente, em 50% do volume total a ser preparado. Os demais componentes foram, em seguida, adicionados e o volume final, completado com água bidestilada esterilizada. A solução foi conservada a 4°C até o momento do uso.

### 3.5. Persulfato de amônio a 10%

Esta solução foi preparada no momento do uso, dissolvendo-se o pó comercial em água bidestilada.

### 3.6. Solução de acrilamida e bis-acrilamida

Acrilamida.....28,5%

Bis-acrilamida.....0,6%

Os componentes foram dissolvidos em água bidestilada, filtrados em membrana Millipore- poro 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore Co- Bedford, MA, USA) e a solução resultante foi conservada em frasco escuro a 4°C.

### 3.7. Gel de poliacrilamida

Soluções:	Gel de separação a 15%	Gel de empacotamento
Água bidestilada estéril	3,3 ml	3,8 ml
Acrilamida/Bis-acrilamida (item 3.6)	7,5 ml	0,87 ml
Tris-HCl pH 6,8 (item 3.2)	-----	0,66 ml
Tris-HCl pH 8,8 (item 3.3)	3,9 ml	-----
SDS a 10% (item 3.1)	150 ml	52 ml
Persulfato de amônio a 10% (item 3.5)	150 ml	52 ml
N,N,N,N, - tetrametil-etilenodiamino (TEMED)	6 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$

As soluções para o preparo do gel de poliacrilamida foram misturadas nesta ordem, no momento do uso.

### **3.8. Tampão de transferência**

Trizma base .....2,9 g  
Glicina.....14,4 g  
Metanol.....200 ml  
Água bidestilada q.s.p.....1.000 ml

Após o seu preparo, esta solução foi conservada a 4°C.

### **3.9. Ponceau S**

Ponceau S..... 0,5% (p/v)  
Ácido acético.....1% (v/v)

Os reagentes foram dissolvidos em água bidestilada e a solução, conservada à temperatura ambiente.

### **3.10. Solução Tris a 1 M pH 7,4**

O preparo desta solução foi realizado dissolvendo-se Trizma base em água bidestilada. A seguir, o pH foi ajustado para 7,4 com solução de HCL a 1 N, o volume foi completado com água bidestilada para 100 ml e a solução final foi autoclavada a 121°C, durante 15 minutos.



### 3.11. Tampão Tris-HCl (Tween)

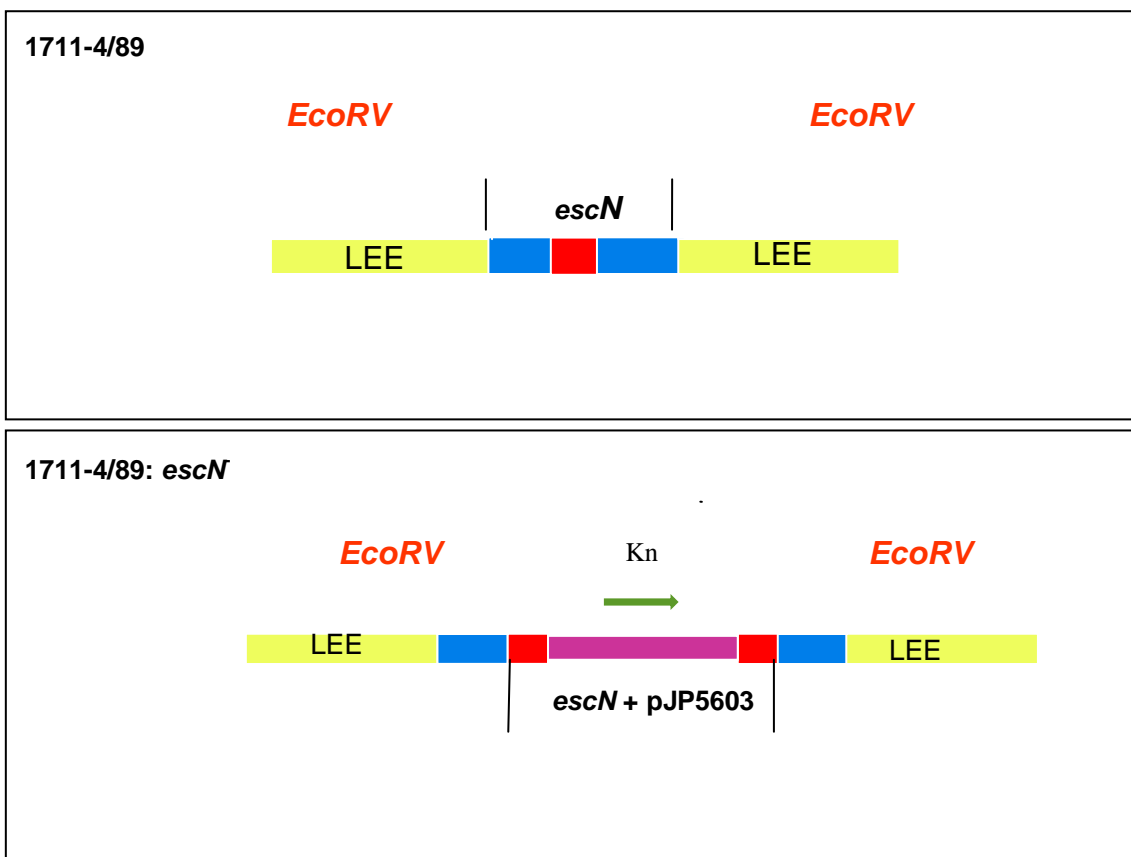
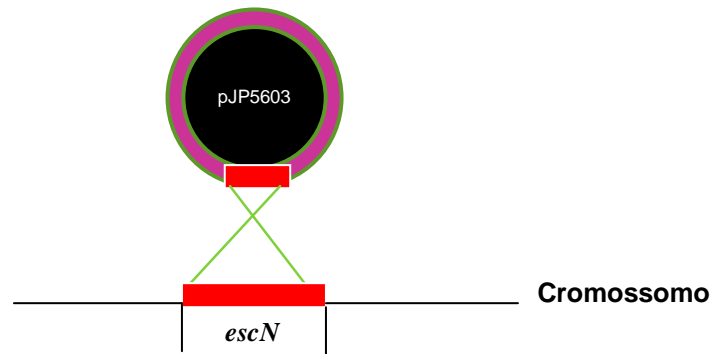
Tris-HCl 1M pH 7,4 (item 3.10).....	10 ml
Soro albumina bovina (BSA).....	1 g
Tween 20.....	0,5 ml
NaCl.....	9 g
Água bidestilada q.s.p.....	1.000 ml

Os componentes foram misturados e a solução final, conservada a 4°C.

### 3.12. Solução reveladora

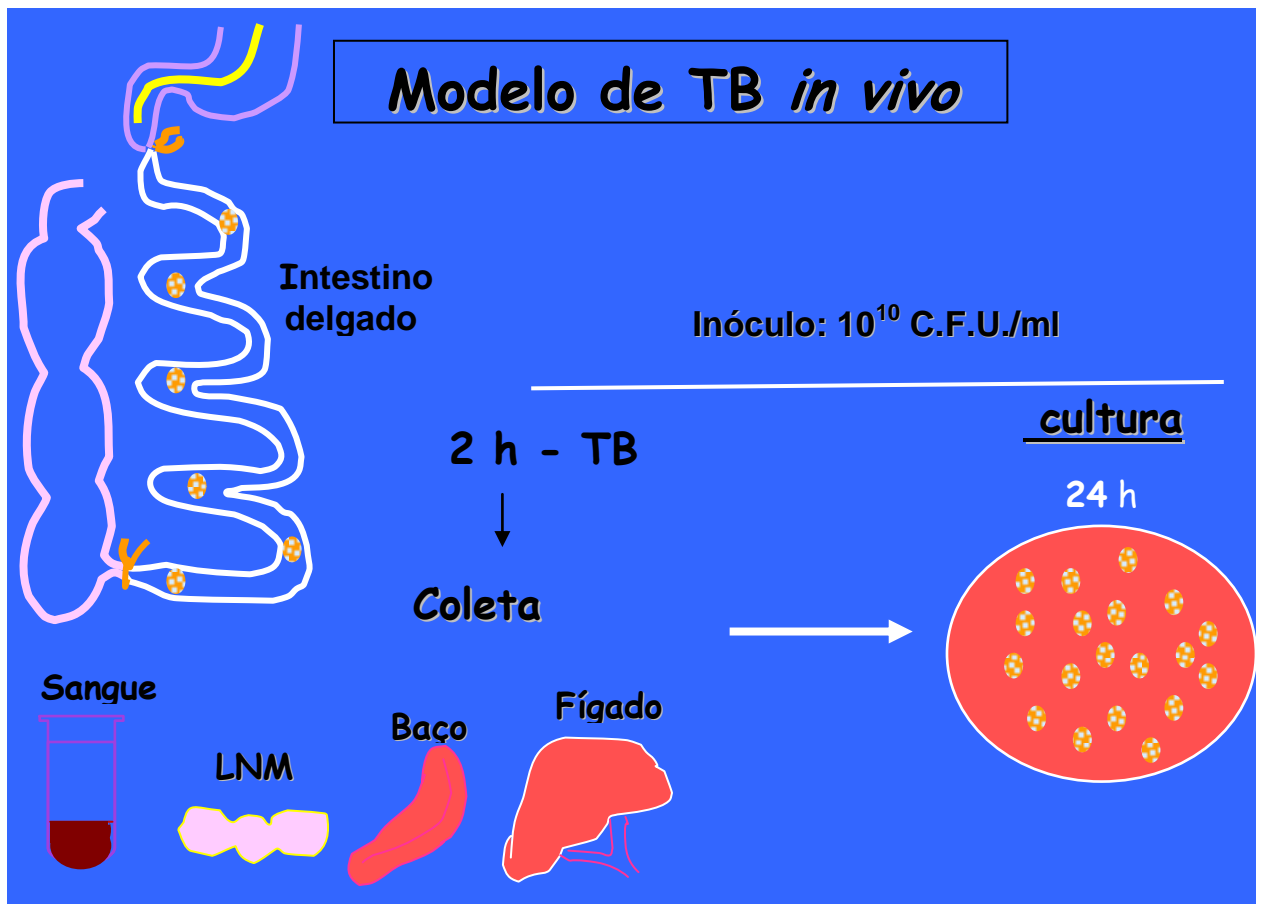
3,3-diaminobenzidina (DAB).....	5 mg
Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4.....	50 mg
Peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) a 30 %.....	10 µl

#### 4. Representação esquemática da inserção do vetor suicida pJP5603:



Representação esquemática da inserção do vetor suicida pJP5603 + o gene *escN* amplificado a partir da amostra selvagem (1711-4/89) no gene *escN* por um processo de recombinação homóloga. Observamos os fragmentos esperados no *Southern blot*. Esquema adaptado de Miller e Mekalanos, 1988.

5. Esquema representativo do modelo experimental de Translocação bacteriana



Esquema representativo do modelo experimental de Translocação bacteriana (TB) *in vivo* utilizando ratos fêmeas (Wistar-EPM) realizado no laboratório Clínico –Experimental de Gastroenterologia Pediátrica da Universidade Federal de São Paulo- UNIFESP, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Ivan Koh.



# 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](#)