

BRUNO BERNARDI YAMAMOTO

**Análise do perfil de expressão, produção e secreção
das toxinas termolábil (LT) e termoestável (ST)
em isolados de *Escherichia coli* enterotoxigênica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2016

BRUNO BERNARDI YAMAMOTO

Análise do perfil de expressão, produção e secreção das toxinas termolábil (LT) e termoestável (ST) em isolados de *Escherichia coli* enterotoxigênica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientadora: Profa. Dra. Roxane Maria
Fontes Piazza

Versão Original

São Paulo
2016

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Bernardi Yamamoto, Bruno
Análise do perfil de expressão, produção e
secreção das toxinas termolábil (LT) e termoestável
(ST) em isolados de Escherichia coli
enterotoxigênica / Bruno Bernardi Yamamoto;
orientadora Roxane Maria Fontes Piazza. -- São
Paulo, 2016.
62 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. ETEC. 2. Expressão. 3. LT. 4. ST. 5. Produção.
I. Fontes Piazza, Roxane Maria, orientador. II.
Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Bruno Bernardi Yamamoto

Título da Dissertação: Análise do perfil de expressão, produção e secreção das toxinas termolábil (LT) e termoestável (ST) em isolados de *Escherichia coli* enterotoxigênica

Orientador(a): Roxane Maria Fontes Piazza

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

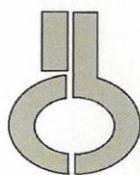
Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° **636/14** referente ao projeto intitulado: "*Análise do perfil de expressão das toxinas termolábil (LT) e termoestável(ST) em isolados clínicos de Escherichia coli enterotoxigênica*" sob a responsabilidade de **Bruno Bernardi Yamamoto**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP n°466 de 2012.

São Paulo, 26 de fevereiro de 2014.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais Lourdes e Jorge, pelo apoio em todas as minhas decisões, pelo amor e carinho. Sem vocês eu não teria conseguido chegar até aqui. Aproveito aqui para agradecer o apoio de toda minha família, vocês são essenciais em tudo o que eu faço, Brenda, vô Macuco, vó Laura e vó Lidia, madrinha Sueli, tios Beto e Toninho e todos meus primos, amo vocês.

Ao meu amor e com certeza minha melhor amiga, Jéssica. Acho que ela queria mais que eu que esse mestrado saísse. Agradeço o suporte, o carinho e a compreensão. Obrigado por tudo meu amor.

Á minha Professora Roxane, que além da oportunidade de trabalhar, sempre me apoiou. Agradeço não somente os papos científicos e ensinamentos, mas também os papos descontraídos e todas as dicas que ela me deu. Levo o que aprendi com ela para toda minha vida. Muito Obrigado mesmo.

Ao meu querido amigo Fernando, que não somente me ajudou em muitas discussões em relação ao meu trabalho mas também foi essencial na companhia, amizade. Almoçar e comentar o “movimento” foram difíceis com você nos EUA, sinto muito sua falta.

As minhas queridas “bests”, Dani Luz e Dani Munhoz. Vocês me incentivam sempre e aturam minhas chatices. Às vezes temos discussões, mas o importante é ter vocês me apoiando e ajudando sempre que possível.

A todos meus amigos de “bancada”, tenho certeza que eles não são só colegas de laboratório, irei leva-los com grande amizade para toda minha vida. Thata, Bruna, Camilinha, Shiga e Letícia. E aqueles que já passaram pelo Lab, Caio e Raquel.

Agradeço a todo pessoal do laboratório, em especial meus amigos do Piratas, Lud, Camila Souza, Fernanda, Lídia, Paulão, Afonso, Larissa, Glaide boy, Matilde, Claudia, RafaEu, Ju Higa e Samuel.

Agradeço ao Dr. Roberto, Rô! Que me ajudou em todas discussões e ensinamentos e pela sua amizade. Agradeço também ao Dr. José Ricardo Jensen, todas conversas, discussões e ensinamentos foram fundamentais, nossas divagações sempre foram muito produtivas.

A todos pesquisadores e funcionários do Laboratório de Bacteriologia. Em especial a Dr. Denise, Jozi, Denize, D. Geni, Dirce, Susana, Seu Edson e Juliana, muito obrigado pelas conversas, risadas e ajuda.

Tenho que agradecer a todos meus amigos, que não envolvidos diretamente no laboratório, sempre me ajudaram e me apoiaram. AMO VOCÊS!!

Agradeço também à Gisele e a Caciara, e todos os funcionários do ICB e da biblioteca.

Ao apoio da Capes, sem ela seria muito difícil realizar esse mestrado. A FAPESP também, que apesar de não querer me dar a bolsa, financia os projetos do Lab.

Agradeço a todos que se eu esqueci de falar, saibam que foi somente esquecimento, vocês que convivem comigo são muito importantes para mim, senão não estariam convivendo, hehe.

***“Depois que cumprimos nossa função,
somos descartados.***

Mas os genes são para sempre.”

Richard Dawkins

RESUMO

YAMAMOTO, B. B. **Análise do perfil de expressão, produção e secreção das toxinas termolábil (LT) e termoestável (ST) em isolados de *Escherichia coli* enterotoxigênica.** 2016. 62 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Escherichia coli enterotoxigênica (ETEC) é frequentemente associada à diarreia dos viajantes, e é uma das principais causas de mortalidade infantil em países em desenvolvimento. Para melhor colonizarem os diferentes nichos em que se encontram, essas bactérias precisam se adaptar às diferentes condições impostas pelo ambiente regulando assim, a expressão dos seus genes. No intestino, ETEC adere-se aos enterócitos por meio de fatores de colonização (CFA) e provoca diarreia aquosa pela secreção das toxinas termolábil (LT) e termoestável (ST). Não há um padrão exclusivo de secreção das toxinas LT e ST pelos isolados de ETEC. Sendo assim, investigou-se como seria o perfil de expressão dos genes que regulam a produção e secreção dessas toxinas. O objetivo do presente trabalho foi comparar o perfil de secreção e produção das proteínas LT e ST, bem como analisar a transcrição dos genes envolvidos na produção dessas toxinas em isolados de ETEC. Os resultados obtidos nesse estudo permitem concluir que os genes *eltA*, *sta1* e *sta2* presentes nas cepas H10407 e 5 são transcritos diferencialmente nas bactérias cultivadas em caldo *E. coli*. Apesar da semelhança, não há correlação entre a expressão gênica e secreção e produção das toxinas, sugerindo que há outros mecanismos envolvidos no controle da produção dessas toxinas.

Palavras-chave: ETEC. Expressão. Transcrição. LT. ST. Secreção. Produção. Regulação.

ABSTRACT

YAMAMOTO, B. B. **Analysis of the expression production and secretion profile of heat labile (LT) and heat stable (ST) toxins by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates.** 2016. 62 f. Master thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) is often associated with travelers' diarrhea, and is a major cause of infant mortality in developing countries. To better colonize different niches, these bacteria need to adapt to different conditions imposed by the environment thus regulating the expression of their genes. ETEC adhere to the enterocytes in the gut by colonization factors (CFs) and causes watery diarrhea by secretion of heat-labile (LT) and heat-stable toxins (ST). There is no exclusive pattern of LT and ST secretion by ETEC isolates. Therefore, the aim of this study was to compare the secretion and production profile of LT and ST proteins, as well as to analyze the genes expression of these toxins in ETEC isolates. The results of this study showed that the *eltA*, *sta1* and *sta2* genes present in H10407 and 5 strains are differentially expressed when bacteria cell was cultivated in *E. coli* broth. Despite the parallel, there was no correlation between gene expression and secretion and production of the toxins, suggesting that there are other mechanisms involved in controlling the production of these toxins.

Keywords: ETEC. Expression. Transcription. LT. ST. Secretion. Production. Regulation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mecanismos de patogênese das seis categorias de <i>E. coli</i> diarreio gênicas (DEC)	20
Figura 2 - Estrutura cristalina da toxina LT de ETEC	24
Figura 3 - Estrutura cristalina e sequência de aminoácidos da toxina STa ou STI de ETEC	26
Figura 4 - Diferentes ambientes encontrados por ETEC que regulam a expressão gênica	27
Figura 5 - Perfil eletroforético em gel de agarose 2% de PCR para confirmação do gene <i>eltA</i>	36
Figura 6 - Perfil eletroforético em gel de agarose 2% de PCR para confirmação do gene <i>sta1</i> (A) e <i>sta2</i> (B)	37
Figura 7 - Unidades Formadoras de Colônia do pré-inóculo de H10407	38
Figura 8 - Perfil de secreção de LT pela cepa H10407 em diferentes meios de cultivo	39
Figura 9 - Perfil de secreção de ST pela cepa H10407 em diferentes meios de cultivo	39
Figura 10 - Perfil de Secreção e Produção da toxina LT e Secreção da toxina ST pela cepa H10407	40
Figura 11 - Perfil de Secreção e Produção da toxina LT e Produção da toxina ST pela cepa 5	42
Figura 12 - Perfil de transcrição normalizada dos genes <i>eltA</i> e <i>sta1</i> em relação ao <i>rpoA</i> na cepa H10407 em diferentes tempos	44
Figura 13 - Perfil de transcrição normalizada dos genes <i>eltA</i> e <i>sta2</i> em relação ao <i>rpoA</i> na cepa 5 em diferentes tempos	45
Figura 14 - Curva de crescimento bacteriano das cepas H10407 e 5	46
Figura 15 - Perfil de Secreção e Produção de LT e Transcrição do gene <i>eltA</i> na cepa H10407	47
Figura 16 - Perfil de Secreção e Produção de LT e Transcrição do gene <i>eltA</i> na cepa 5	48
Figura 17 - Perfil de Secreção de ST e Transcrição do gene <i>sta1</i> na cepa H10407	49

Figura 18 - Perfil de Produção de ST e Transcrição do gene <i>sta2</i> na cepa 5	50
Tabela 1 - Iniciadores utilizados para o ensaio de PCR (*) e qRT-PCR	30

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Absorbância
AB ₅	1 Subunidade A e 5 subunidades B
A/E	Lesão <i>attaching and effacing</i>
AFF	<i>Aggregative adherence fimbriae</i>
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
BFP	<i>Bundle-forming pilus</i>
BHI	<i>Brain heart infusion</i>
Caldo EC	Caldo <i>Escherichia coli</i>
CD44	Receptor de membrana de linfócitos
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
cDNA	DNA complementar
CF	Fator fibrilar
CFA	Fator de colonização antigênico
CFTR	Regulador transmembrana de fibrose cística
CH	Colite hemorrágica
Cl ⁻	Íon Cloro
CT	Toxina colérica
C _t	Threshold cycle
DAEC	<i>E. coli</i> difusamente aderente
DEC	<i>E. coli</i> diarreioagênica
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DO	Densidade ótica
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
EAF	EPEC adherence factor
EDAC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasora
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogênica
ER	Retículo endoplasmático
EspS	<i>E. coli secreted proteins</i>
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigênica
EVANS	Meio Evans
Gb3	Globotriaosilceramida

GC-C	Guanilato ciclase
GD1d	Disialogangleosideo
GM1	Monosialotetraesosilgangliosideo
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
h	Hora
IS	Sequência de inserção
kDa	Kilo Daltons
LB	Luria Bertani
LEE	<i>Locus of enterocyte effacement</i>
LT	Toxina <i>heat-labile</i> ou termolábil
MAb	Anticorpo monoclonal
mim	Minuto
nm	Nanômetro
OPD	orto-fenilenodiamina
PAb	Anticorpo policlonal
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> ou tampão fosfato salino
PBST	<i>Phosphate-buffered saline</i> ou tampão fosfato salino com Tween
PCR	Reação em cadeia de polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
R\$	Real
RT-PCR	Transcriptase Reversa da Reação em Cadeia da Polimerase
Sat	<i>Secreted autotransporter toxin</i>
SHU	Síndrome hemolítica urêmica
SPATE	Serino protease autotransportadora de Enterobacteriaceae
SST3	Sistema de secreção tipo III
ST	Toxina <i>heat-stable</i> ou termoestável
STEC	<i>E. coli</i> produtora da toxina de Shiga
Stx1	Toxina de Shiga 1
Stx2	Toxina de Shiga 2
SUS	Sistema único de saúde
UFC	Unidades formadoras de colônia
tEPEC	<i>E. coli</i> enteropatogênica típica
Tir	<i>Translocated intimin receptor</i>
TSB	Caldo Triptona de soja
VT	Verotoxina
°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1	<i>Diarreia</i>	18
2.2	<i>Escherichia coli</i>	19
2.3	<i>Escherichia coli</i> diarreiogênicas	20
2.4	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica (ETEC)	24
2.5	Toxinas de ETEC	25
2.6	Regulação gênica	27
3	OBJETIVOS	29
3.1	Objetivo geral	29
3.2	Objetivos específicos	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1	Cepas bacterianas e meios de cultura	30
4.2	Identificação da presença dos genes <i>eltA</i> , <i>sta1</i> e <i>sta2</i>	30
4.3	Ensaio de avaliação da produção/secreção das toxinas LT e ST	32
4.3.1	<u>ELISA de captura para LT</u>	32
4.3.2	<u>ELISA indireto para ST</u>	33
4.4	Cultivo bacteriano; coleta de material para ELISA, extração de RNA bacteriano e síntese de cDNA	33
4.4.1	<u>Contagem de células bacterianas</u>	33
4.4.2	<u>Inóculo bacteriano e coleta de material para a extração de RNA e o ELISA</u>	34
4.4.3	<u>Extração de RNA bacteriano e síntese de cDNA</u>	34
4.5	Análise da transcrição dos genes	35
5	RESULTADOS	37
5.1	Presença dos genes <i>eltA</i> , <i>sta1</i> e <i>sta2</i>	37
5.2	Secreção das toxinas LT e ST	38
5.3	Secreção/Produção de toxinas LT e ST	41
5.4	Extração de RNA e síntese de cDNA	43
5.5	Análise da transcrição dos genes <i>eltA</i> , <i>sta1</i> e <i>sta2</i>	44
5.6	Secreção/Produção das toxinas x Transcrição dos genes	46

6	DISCUSSÃO	52
7	CONCLUSÕES	58
	REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

Inúmeros microrganismos colonizam e crescem sobre, ou no interior do corpo dos animais. Esses seres vivos são denominados de microbiota (ou microbioma) e na espécie humana, o trato gastrointestinal é um local de extrema importância onde essa comunidade microbiana é encontrada. Uma de suas funções é impedir que patógenos exógenos se instalem nesse local causando doenças (GOPHNA, 2011). Como esses microrganismos co-evoluíram com a espécie humana, sua presença contribui para a homeostase corporal, sendo parte importante da fisiologia humana. Um exemplo desse benefício são cepas de *Escherichia coli*, uma espécie comensal que interage positivamente com outros membros da microbiota e ajudam o animal hospedeiro produzindo substâncias como vitaminas necessárias para o bem estar do indivíduo. As populações de microrganismos são influenciadas principalmente pela dieta do indivíduo (LIEVIN-LE MOAL; SERVIN, 2006).

Escherichia coli é uma das espécies de microrganismo mais bem estudada atualmente, pois além de fazer parte da microbiota humana e de alguns animais, também pode causar um amplo espectro de doenças que variam de diarreia a infecções urinárias, além de meningite e sepse (CLEMENTS et al., 2012). Esses microrganismos colonizam vários nichos dentro de animais e seres humanos, onde competem com comensais intestinais e são atacados pelo sistema imune do hospedeiro. Para sobreviverem nestes ambientes hostis que possuem complexas redes de regulação, os microrganismos têm que coordenar o controle de fatores de virulência, funções metabólicas adaptadas ao hospedeiro e resistência ao estresse (HEROVEN; NUSS; DERSCH, 2016).

Escherichia coli enterotoxigênica (ETEC) é frequentemente associada com diarreia dos viajantes, e é uma das principais causas de mortalidade infantil em países em desenvolvimento. A doença é dependente da expressão orquestrada de enterotoxinas, pili e outros fatores de virulência. Tanto a toxina termolábil (LT) e termoestável (ST), produzidas por esse patotipo são reguladas ao nível da transcrição, respondendo às alterações do ambiente em que a bactéria vive (MUNSON, 2013).

Portanto, para melhor colonizarem os ambientes em que se encontram, as bactérias precisam se adaptar às diferentes condições impostas pelo ambiente regulando assim, a expressão dos seus genes.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Diarreia

Dados recentes da Organização Mundial da Saúde mostram que a diarreia ainda é a segunda causa de morte mais comum entre crianças menores de cinco anos no mundo. Entre os patógenos causadores da diarreia, temos àqueles de origem viral e os de origem bacteriana, sendo o Rotavírus e a *Escherichia coli* diarreio gênica (DEC) os dois agentes etiológicos mais comuns nos países em desenvolvimento (WHO, 2013). A cada ano, aproximadamente 760.000 crianças morrem em decorrência de complicações causadas pela diarreia. Estima-se que, em todo o mundo, ocorra cerca de 3 bilhões de episódios de diarreia a cada ano (MCCORMICK; FINLAY, 2012; WHO, 2013). Esse fato é agravado pela desnutrição infantil e também pela falta de acesso à água tratada e ao saneamento básico, aumentando ainda mais o número da doença e conseqüentemente as mortes em decorrência dela (MCCORMICK; FINLAY, 2012).

Tanto nos países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento, como o Brasil, a importância da diarreia está relacionada ao impacto na população, traduzido pelos seus danos à saúde. Estes danos afetam o desenvolvimento infantil, bem como à sociedade, pelos custos diretos e indiretos gerados por: demanda aos serviços médicos, atendimento ambulatorial, pronto atendimento, hospitalizações (custos diretos) e as perdas de dias de trabalhos, de escola, gastos com medicamentos, transportes, etc. (custos indiretos). Adicionalmente, o conhecimento da interação de diarreia persistente e má nutrição como causa de mortalidade tem reforçado a necessidade de desenvolvimento de programas de intervenção além do tratamento baseado em terapia de reidratação oral (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO PAULISTA, 2004).

Dados de hospitalização mostram que a diarreia é responsável por 15% das internações de crianças com menos de 5 anos. Em 2011, os gastos do SUS com internações por diarreia no país foi de R\$ 140 milhões. Em 2013, segundo o Ministério da Saúde, foram notificadas mais de 340 mil internações por infecções gastrointestinais no país. O custo de uma internação por infecção gastrointestinal no Sistema Único de Saúde (SUS) foi de cerca de R\$ 355,71 por paciente na média

nacional. Além disso, 217 mil trabalhadores precisam se afastar de suas atividades devido a problemas gastrointestinais por ano. A cada afastamento perdem-se 17 horas de trabalho. Considerando o valor médio da hora de trabalho no país, de R\$ 5,70, e apenas os afastamentos provocados pela falta de saneamento básico, os custos chegam a R\$ 238 milhões por ano em horas-pagas e não trabalhadas (TRATABRASIL, 2016).

2.2 *Escherichia coli*

E. coli é um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, presente abundantemente na microbiota do trato gastrointestinal de aves e mamíferos (GARMENDIA, et al., 2005). Essa bactéria coloniza o trato gastrointestinal infantil, horas após o nascimento e ali se estabelece por longos períodos, em uma relação de mútuo benefício, não patogênica (NATARO; KAPER, 1998). Geralmente em humanos, ela representa 10^7 - 10^9 organismos por grama de fezes (LIEVIN-LE MOAL; SERVIN, 2006).

Enquanto que a maioria das cepas convive de forma harmônica com o hospedeiro, algumas são capazes de promover a doença diarreica causando o desequilíbrio na microbiota, tornando-se patogênicas (CROSSMAN et al., 2010) devido à aquisição de propriedades específicas de virulência que concede às bactérias habilidade para colonizar novos ambientes. Na verdade, os microrganismos comensais e os patógenos são estreitamente relacionados, a diferença entre eles depende da presença de material genético adquirido que codifica um ou mais fatores de virulência (DUBREUIL, 2012). As aquisições genéticas são: ilhas de patogenicidade, plasmídeos, clusters genéticos que conferem virulência e transposons (CROXEN; FINLAY, 2010; GARMENDIA, et al., 2005).

Fenotipicamente, alguns fatores são requeridos para que as bactérias patogênicas sejam capazes de causar infecção, como: capacidade em colonizar a mucosa intestinal, suprimindo a microbiota, evasão do sistema imune do organismo hospedeiro, multiplicação celular (aumento da população bacteriana) e dano ao hospedeiro (NATARO; KAPER, 1998; NATARO, 2015). O vasto repertório de fatores de virulência adquiridos por *Escherichia coli*, pode dar origem a uma gama

variada de manifestações clínicas, que vão de infecções extra intestinais, tais como infecções urinárias, meningite e sepse, como também infecções intestinais causadas por *E. coli* diarreio gênica (NATARO; KAPER, 1998).

As *E. coli* diarreio gênicas dividem-se tradicionalmente em seis patotipos, de acordo com mecanismos de virulência específicos, as síndromes clínicas que causam, os aspectos epidemiológicos e os tipos de interação com linhagens celulares *in vitro*: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* produtora de toxina de Shiga (STEC) e a subcategoria *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC) (**Figura 1**) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Alguns autores sugerem a inclusão de mais dois patotipos: *E. coli* invasivamente aderente (AIEC), que aparentemente está associada a doença de Crohn, mas não causa diarreia e *E. coli* enteroagregativa produtora da toxina de Shiga (STEAEC) (CLEMENTS et al., 2012), responsável pelo surto de *E. coli* em 2011 na Alemanha (FRANK et al., 2011). Ainda não há um consenso sobre esse tema e estudos ainda são necessários para confirmar se esses clones emergentes constituem realmente novos patotipos.

2.3 *Escherichia coli* diarreio gênicas (DEC)

EPEC foi o primeiro patotipo de *E. coli* associado a diarreia em humanos, e está frequentemente associada a diarreia em crianças nos países em desenvolvimento (GARMENDIA et al., 2005). EPEC produz uma lesão histopatológica denominada lesão A/E (*attaching and effacing*), caracterizada pelo apagamento das microvilosidades do enterócito, íntima aderência as células do epitélio intestinal, alterações no citoesqueleto, acúmulo de actina e formação de uma estrutura similar a um pedestal, por onde as proteínas efetoras são translocadas. Essas proteínas efetoras são denominadas Esps (*E. coli secreted proteins*) e são secretadas, em sua maioria, pelo sistema de secreção do tipo III (SST3) (ELLIOTT et al., 2000; NATARO; KAPER, 1998). Todos os patógenos causadores da lesão A/E possuem uma ilha de patogenicidade denominada *Locus of enterocyte effacement* (LEE), que alberga genes reguladores de adesão (intimina), sistema de secreção

(SST3), produção de chaperonas e várias proteínas efetoras, bem como a translocação do receptor de intimina, denominado Tir (McDANIEL et al., 1995; NATARO; KAPER, 1998; NAVARRO-GARCIA, et al., 2013). Isolados EPEC podem ser classificados como típicas e atípicas, que diferem em relação à presença (típica) ou ausência (atípica) do plasmídeo EAF (EPEC adherence factor) que ancora o gene responsável pela produção da fímbria BFP (*Bundle-forming pilus*) (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002; ABE et al., 2009; NARA et al., 2010).

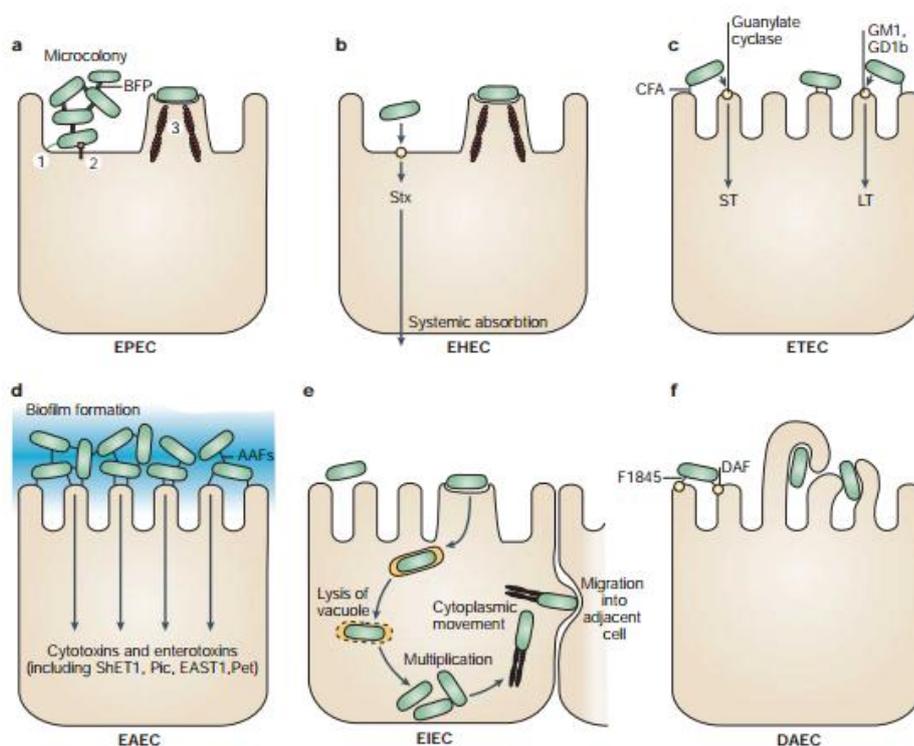


Figura 1 - Mecanismos de patogenicidade das seis categorias de *E. coli* diarréicas (DEC). Em **a**: EPEC adere-se intimamente ao epitélio intestinal, levando ao apagamento das microvilosidades e rearranjo do citoesqueleto, onde: 1. Aderência inicial, 2. Translocação de proteínas efetoras e 3. Formação do pedestal. **b**: EHEC (subgrupo de STEC), como em EPEC induz lesão A/E, e produz toxina de Shiga (Stx) acarretando em complicações clínicas severas como a síndrome hemolítica urêmica (SHU). **c**: ETEC adere-se aos enterócitos por meio de fatores de colonização (CFA) e provoca diarreia aquosa pela secreção das toxinas termolábil (LT) e termoestável (ST). **d**: EAEC aderem-se ao epitélio intestinal e agregam-se umas às outras por meio de AAFs (*aggregative adherence fimbriae*) formando um biofilme. **e**: EIEC possui capacidade de invadir as células do epitélio intestinal, bem como induzir a lise de fagossomos e se movimentar intracelularmente. Pode ainda, invadir as células lateralmente, por difusão direta. **f**: DAEC realiza a interação de adesinas bacterianas ao epitélio podendo levar a um rearranjo do citoesqueleto, que se manifesta como projeções semelhantes a dedos que envolvem as bactérias. Fonte: Kaper, Nataro e Mobley, 2004

EAEC possui um padrão de adesão do tipo autoagregativo, em que as bactérias se aderem umas às outras como “tijolos empilhados” e está associada a diarreia persistente distribuída mundialmente. A diarreia causada por EAEC é frequentemente aquosa, mas pode ser acompanhada também por muco ou sangue (CROXEN; FINLAY, 2010). EAEC adere-se a mucosa intestinal utilizando estruturas fimbriais denominadas AAFs (*aggregative adherence fimbriae*). As bactérias colonizam a mucosa intestinal e secretam enterotoxinas citotóxicas, tais como a toxina PIC uma protease autotransportadora que apresenta ação mucolítica, ShET1 uma enterotoxina encontrada em cepas de *Shigella flexneri*, o modo de ação desta última não está totalmente esclarecido, mas acredita-se que seja responsável por causar a diarreia secretória. Ambas toxinas são codificadas pelo mesmo locus cromossômico. Há também a produção de uma toxina homóloga a termoestável (ST) de ETEC, a ESTA1, responsável pelo fenótipo de diarreia aquosa. Algumas cepas podem ainda secretar outra enterotoxina de origem plasmidial, denominada Pet, responsável por alterações do citoesqueleto da célula epitelial do hospedeiro (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

EIEC apresenta semelhança fenotípica e genotípica com *Shigella spp.*, porém as manifestações clínicas causadas por esta categoria de *E. coli* costumam ser menos severas. Estudos filogenéticos sugerem que EIEC seja precursora de *Shigella spp.* (NAVARRO-GARCIA, et al., 2013). A patogênese dessas cepas compreende a capacidade de colonizar o epitélio intestinal, invadir as células epiteliais, multiplicar-se intracelularmente e expandir-se para células adjacentes, além da produção de uma ou mais enterotoxinas. O contato inicial entre a bactéria e a célula hospedeira ocorre através dos receptores CD44 e $\alpha 5\beta 1$ integrina presentes na membrana das células hospedeiras. A ligação com o receptor induz rearranjo inicial do citoesqueleto de actina, e as proteínas efetoras são translocadas pelo maquinário de secreção do tipo 3 (SST3). As proteínas efetoras IpaB, IpaC e IpaD promovem o rearranjo de actina necessário para fixação e invasão da bactéria na célula hospedeira, portanto são responsáveis pelo fenótipo invasivo. IpaB também foi associada a lise de vacúolo fagocítico e indução de apoptose em macrófagos, e juntamente com outras proteínas da família Ipa, foi caracterizada em ser responsável pela evasão do fagossomo (CROXEN; FINLAY, 2010; NATARO; KAPER, 1998; NAVARRO-GARCIA, et al., 2013).

Os fatores que levam a patogenicidade de STEC estão associados a produção da citotoxina de Shiga 1 e/ou 2 (Stx 1 e Stx 2), também conhecida como verotoxina (VT). Essa toxina possui 5 subunidades idênticas responsáveis pela ligação das holotoxinas ao globotriaosilceramida (Gb3) na célula alvo e uma subunidade responsável por clivar o RNA ribossomal. A toxina é produzida no cólon e distribuída pela corrente sanguínea até os rins, onde causa dano em células endoteliais renais por meio de ação direta da toxina ou por indução do sistema imunológico. Stx também pode mediar uma ação local, no intestino, induzindo apoptose de enterócitos, CH, necrose e perfuração intestinal (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; PATON; PATON, 1998). EHEC, além de produzir as toxinas Stx, possui ainda a capacidade em causar lesão A/E, como descrito em EPEC. Isolados STEC, não causam essa lesão pois são LEE-negativos. Os genes que codificam a toxina Stx são encontrados no cromossomo dessas bactérias que ali foram incorporados por transdução de fagos lisogênicos (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). EHEC foi primeiramente isolada em 1982 em um surto diarreico ocasionado pela ingestão de hambúrgueres malpassados vendidos em uma rede de comidas industrializadas americana. Os indivíduos infectados apresentaram colite hemorrágica (CH), ou seja, fortes dores abdominais e diarreia aquosa seguida por presença de sangue nas fezes (diarreia sanguinolenta). Também foi observado que alguns pacientes apresentaram síndrome hemolítica urêmica (SHU), que é uma doença caracterizada pela falência renal aguda, trombocitopenia e anemia hemolítica microangiopática (CLEMENTS et al., 2012; NATARO; KAPER, 1998).

O termo “aderência difusa” foi inicialmente utilizado para qualquer *E. coli* diarreiogênica que não apresentava perfil de adesão e formação de microcolônias como EPEC em células HEp-2, posteriormente admitiu-se DAEC como uma categoria de DEC (NATARO; KAPER, 1998). Os mecanismos pelos quais esta categoria leva a infecções intestinais e extra intestinais (infecções urinárias) ainda não são completamente entendidos. Estudos sugerem que a interação de um complexo de adesinas fimbriais e não fimbriais Afa/Dr com células do epitélio intestinal leva a lesão das microvilosidades que resulta em um rearranjo das proteínas apicais do citoesqueleto e a produção da toxina Sat (*Secreted autotransporter toxin*) aumentando a permeabilidade celular através da lesão das junções intercelulares. DAEC pode ainda ser internalizada através da interação

Afa/Dr com células não polarizadas do epitélio intestinal por meio dos microtúbulos e lipídeos de membrana (CLEMENTS et al., 2012)

2.4 *Escherichia coli enterotoxigênica (ETEC)*

Dentre os patótipos de DEC destaca-se a ETEC que é conhecida por causar diarreia aquosa, podendo variar desde leve e auto limitante até episódios diarreicos tipo cólera desidratante e fatal (SACK et al., 1975). Sendo a causa mais comum de diarreia em crianças no mundo em desenvolvimento, o equivalente a 200 milhões de casos de diarreia e aproximadamente 380000 mortes a cada ano (ISIDEAN et al., 2011). ETEC é também o principal agente associado à chamada “diarreia dos viajantes” nas áreas endêmicas (QADRI et al., 2005; WHO, 2013). Sendo particularmente prevalente no Brasil, onde estudos apontaram incidência da ordem de 2,7% das amostras coletadas de estudo realizado no Espírito Santo Lozer et al. (2013), 3,7% em Salvador Bueris et al. (2007), 4,4% em Porto Velho Orlandi et al. (2006), 9,2% em Teresina Nunes et al. (2012), e 10% em João Pessoa (Moreno et al. (2010).

Para aderirem às células epiteliais, e assim iniciar a infecção, as ETEC utilizam polímeros de proteína encontrados em sua parede, denominados fatores de colonização (CFs) que apresentam mais de 25 tipos diferentes descritos, sendo os primeiros fatores de virulência identificados nessa categoria (FLECKENSTEIN et al., 2010). Apesar da grande variedade de fatores de colonização encontrados em isolados ETEC, os mais comumente identificados são: CFA/I, CS1, CS2, CS3, CS4, CS5, CS6, CS7, CS14, CS17 e CS 21. Porém, CFs não são encontrados em todas as cepas ETEC, portanto não permitindo a detecção deste patótipo pela presença desses fatores em aproximadamente 30 a 50% dos isolados. Isso se deve pela ausência de CF, ou pela perda desses fatores em subculturas, ou ainda, pela falta de ferramentas necessárias para a detecção desses antígenos de superfície (QADRI et al., 2005). Juntamente com CFs, outros fatores de virulência de ETEC contribuem para a sua patogenicidade, destacando-se a presença de uma ou duas enterotoxinas, a toxina termolábil (LT) e a toxina termoestável (ST) secretadas após a colonização bacteriana (GILL et al., 1981).

2.5 Toxinas de ETEC

LT é uma proteína de 86 kDa com estrutura do tipo AB₅, uma subunidade A enzimaticamente ativa ligada a um pentâmero de subunidades B, responsável pela ligação ao receptor celular; é encontrada em duas formas, LT-I e LT-II, apresentando de 55 a 57% de homologia entre si (KAPER; NATARO, 1998; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). LT-I é associada à diarreia em humanos (LTh) e porcos (LTp) enquanto que, LT-II é subdividida em LT-IIa, LT-IIb e LT-IIc isoladas em humanos, bovinos e búfalos (NAWAR et al., 2010). Os diferentes tipos de LT diferem quanto ao receptor específico de ligação no epitélio intestinal (**Figura 2**) (KAPER; NATARO, 1998; DUBREUIL, 2013). Lasaro e colaboradores (2008) encontraram ainda outras variantes de LT, mostrando a diversidade de toxinas que essas bactérias possuem para causar a diarreia. O mecanismo de ação de LT inicia-se pela ligação da subunidade B a gangliosídeos GM1 (LT-I) ou GD1 (LT-II) presentes na superfície do epitélio seguida de sua internalização por endocitose e transporte através do complexo de Golgi e do retículo endoplasmático para o citosol onde a subunidade A sofre processamento pós-traducional para gerar os peptídeos A1 e A2. A1 tem como alvo principal a proteína G α , uma GTPase que ativa o sistema adenilato-ciclase, levando a elevação intracelular de AMP cíclico (AMPc), estimulando a secreção de íons Cl⁻ e água, que levam à diarreia (SPANGLER, 1992). Juntamente com seu papel na secreção de fluídos, a toxina LT pode induzir uma série de efeitos que favorecem a bactéria. LT regula negativamente a resposta imune inata do hospedeiro Chakraborty et al. (2008), aumentando a aderência de ETEC às células epiteliais, colonizando assim o intestino (JOHNSON et al., 2009). Essa toxina também é conhecida como um potente adjuvante de mucosa, pois aumenta os títulos de anticorpos, o que resulta em aumento da resposta imunológica, sendo assim pode ser incorporada em preparações vacinais e utilizada por via nasal, oral ou intra-dérmica (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

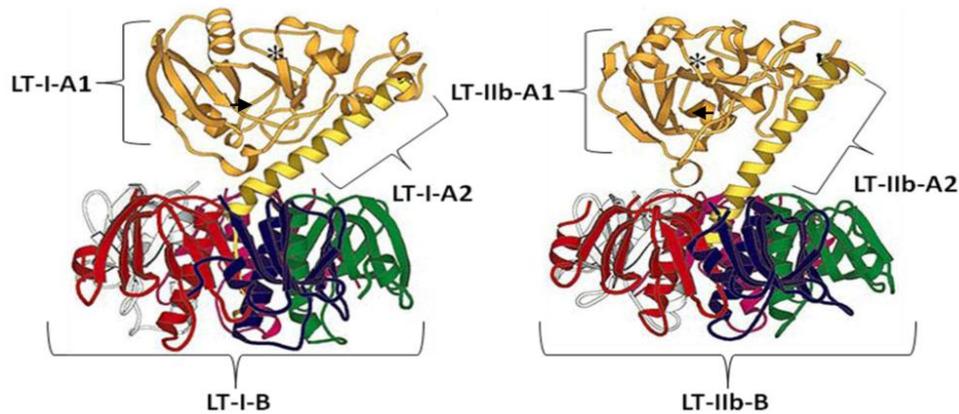


Figura 2 - Estrutura cristalina da toxina LT de ETEC. Do lado esquerdo LT-I e LT-II ao lado direito. Em amarelo subunidade A. As cinco subunidades B são demonstradas em vermelho, branco, rosa, verde e azul. Fonte: ODUMOSU et al., 2010.

A toxina ST é um peptídeo de aproximadamente 2 kDa classificada em dois subgrupos: em ST-I (ou STa) isolada principalmente de fezes humanas e ST-II (ou STb) isolada principalmente de fezes animais e está mais associada à diarreia em animais, causando grandes prejuízos para a pecuária. Existem variantes dessa toxina, denominadas ST-Ib ou STh que foi associada a casos de diarreia em humanos e ST-Ia ou STp em animais e humanos, estas duas variantes são praticamente idênticas, pois possuem 15 aminoácidos iguais na sequência correspondente a toxina biologicamente ativa. ST-Ib é codificada pelo gene *sta2* e possui 19 aminoácidos, enquanto que ST-Ia pelo gene *sta1* com 18 aminoácidos, (Figura 3) (CROSSMAN et al., 2010; DUBREUIL, 2013; NATARO; KAPER, 1998).

Todas as toxinas ST são sintetizadas como uma proteína precursora de 72 aminoácidos e então convertidas para a forma ativa que se liga ao domínio extracelular de guanilil ciclase C (GC-C), presente no epitélio intestinal. Essa interação ativa o domínio catalítico intracelular da GC-C que leva ao acúmulo de guanosina monofosfato cíclico (GMPc) intracelular que por sua vez, ativa a proteína quinase II, dependente de GMPc, provocando a fosforilação do regulador transmembrana da fibrose cística (CFTR), o que dirige a secreção de íons Cl^- e bloqueia a adsorção de sódio, resultando no acúmulo de água no lúmen com consequente diarreia (SCHULZ et al., 1990). Para STb, o mecanismo de ação e sua internalização difere de STa (DUBREUIL, 2012).

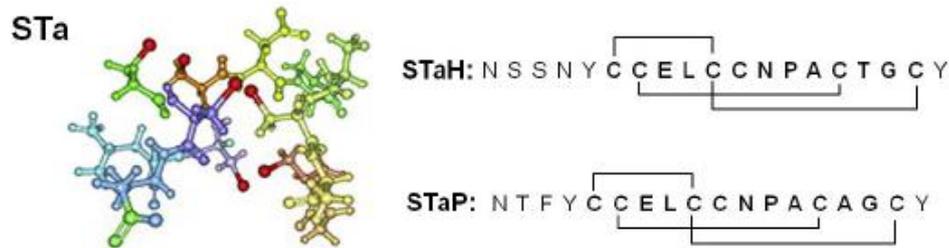


Figura 3 - Estrutura cristalina e sequência de aminoácidos da toxina STa ou STI de ETEC. A toxina ST monomérica de 2 kDa, STaH refere-se a STIb ou STh (humanos), enquanto que STaP a STIa ou STp (porcinos). Fonte: Dubreuil, 2013.

Os três genes das toxinas são normalmente codificados em plasmídeos e são frequentemente ladeado por sequências de inserção (IS), implicando na evolução destes patógenos por elementos genéticos móveis geneticamente diversos. De fato, tem sido sugerido que a diversidade de ETEC é impulsionado em grande parte pela difusão generalizada de plasmídeos que codificam os genes da toxina entre um conjunto diversificado de cepas hospedeiras de *E. coli* (CROSSMAN, et al., 2010).

2.6 Regulação gênica

A diarreia causada por *E. coli* enterotoxigênica é geralmente iniciada através da ingestão de alimentos ou bebidas contaminados por essas bactérias. Antes de chegar ao hospedeiro, essas bactérias habitam diversas localidades como rios e reservas de abastecimento de água (BEGUM et al., 2005; LOTHIGIUS et al., 2010), e aderem firmemente a vegetais (SHAW et al., 2011). Por outro lado, quando chegam ao trato gastrointestinal humano, as bactérias encontram um ambiente hostil. Para colonizar esse ambiente, esse patógeno necessita se adaptar ao ambiente e expressar adequadamente todo seu arsenal de virulência (GONZALES-SILES; SJÖLING, 2016). Os ambientes que essas bactérias vão encontrar e que vão influenciar em sua expressão gênica são: alta osmolaridade, variações no pH, diferentes fontes de carbono, sistema imune do hospedeiro, sais biliares, microbiota e metabólitos. Esses fatores são percebidos pela bactéria, que regulam a expressão gênica, morfologia e fisiologia das bactérias (FERREYRA et al., 2014). Mesmo,

nesse ambiente hostil, essas bactérias são capazes de colonizar o trato gastrointestinal e produzir e secretar as toxinas, levando assim a diarreia aquosa.

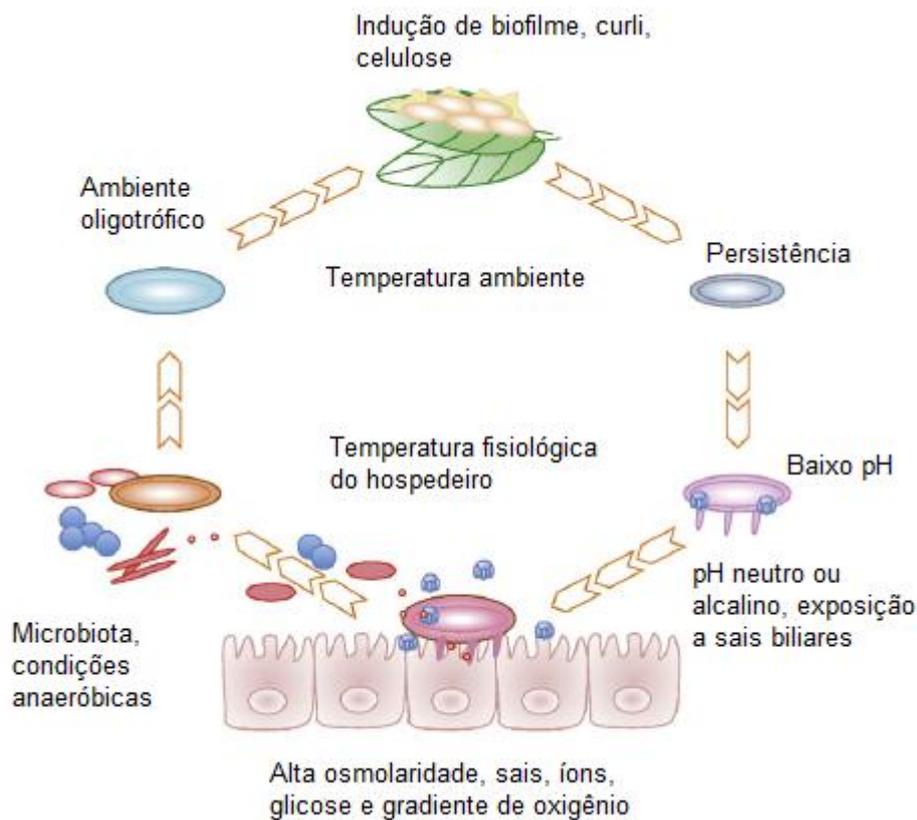


Figura 4 - Diferentes ambientes encontrados por ETEC que regulam a expressão gênica. Fonte: modificado de Gonzales-Giles; Sjöling, 2016.

Em trabalho anterior, realizado em nosso laboratório observamos que não havia um padrão único de secreção das toxinas LT e ST pelos isolados de ETEC (ROCHA et al., 2013). Sendo assim, decidimos investigar como seria o perfil de expressão dos genes que regulam a produção e secreção dessas toxinas, surgindo assim os objetivos do presente trabalho.

3 OBJETIVOS

3.1 *Objetivo geral*

O objetivo do presente trabalho é comparar o perfil de secreção e produção das proteínas LT e ST, bem como analisar a transcrição dos genes envolvidos na produção dessas toxinas em isolados de ETEC.

3.2 *Objetivos específicos*

Avaliar qual o melhor meio de cultura para a secreção das toxinas LT e ST.

Analisar o perfil de secreção e produção de LT e ST nesse meio de dois isolados de ETEC.

Analisar o perfil de transcrição dos genes *eltA*, *sta1* e *sta2* envolvidos na produção dessas toxinas.

Avaliar se há uma correlação entre o perfil de transcrição dos genes com o perfil de secreção e produção das toxinas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cepas bacterianas e meios de cultura

As bactérias utilizadas neste estudo foram 2 cepas de ETEC incluindo o protótipo H10407 (O78: H11) ST⁺/LT⁺ (EVANS; EVANS, 1973) e o isolado 5 [descrito em ROCHA et. al (2013) como ST⁺/LT⁺]. Como controle das reações de PCR, foi utilizada a cepa de *E. coli* K12 DH5 α (DURFEE, 2008). Essas cepas são mantidas a -80 °C no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan.

Para a verificação da produção das toxinas LT e ST, diversos meios de cultura foram utilizados: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium – Cultilab, Campinas, Brasil), Caldo EC (*E. coli*, Merck, Rio de Janeiro, Brasil), EVANS (EVANS; EVANS PIERCE, 1973), Syncase, TSB (Tryptic Soy Broth - Merck, Rio de Janeiro, Brasil), LB (Luria-Bertani - Difco, EUA) e BHI (Brain Heart Infusion, Merck, Rio de Janeiro, Brasil).

4.2 Identificação da presença dos genes *eltA*, *sta1* e *sta2*

O DNA bacteriano foi obtido pelo método da fervura. Resumidamente, os isolados foram cultivados em meio LB, por 16-18 h a 37 °C. Um mL desta cultura foi centrifugado a 5.500 x g durante 2 min, e depois o sedimento foi lavado no mesmo volume com água ultrapura esterilizada e centrifugado novamente. O sedimento foi ressuspensão em 100 μ L de água ultrapura esterilizada, fervido a 100 °C durante 10 min e centrifugado a 2.200 x g durante 5 min. Os sobrenadantes foram utilizados como moldes em PCR para a detecção dos genes.

A identificação da presença dos genes *eltA*, *sta1* e *sta2* foi realizada por amplificação pela técnica de reação em cadeia da Polimerase (PCR), com os iniciadores indicados na Tabela 1. Como marcadores de peso molecular foram utilizados 50 bp DNA Ladder ou 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, EUA). As reações foram preparadas em banho de gelo, em microtubos de polipropileno (Axygen, EUA), adicionando-se os seguintes componentes: 20 pmol de cada um dos iniciadores (*forward* / *reverse*), 1 U de *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen, EUA), 1,0

mM de cloreto de magnésio, 200 μ M da mistura de dNTPs (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 2.5 μ L de tampão de reação de PCR (Invitrogen) e água ultrapura estéril para um volume final de 25 μ L. A cada reação foi adicionado 1 μ L do lisado bacteriano.

A seguir, as preparações foram colocadas em termociclador Veriti® 96-Well Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems, EUA), e submetidas às seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, com as amostras sujeitas a 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento por 1 minuto (60 °C para ambos os genes, com exceção do *rpoA* em que foi usada a temperatura de 56 °C), extensão a 72 °C por 1 min, e extensão final a 72 °C por 7 min. Após amplificação com intuito de confirmar o perfil do produto sintetizado, 5 μ L de cada reação foi analisada por eletroforese em gel de agarose 2% com GelRed (Biotium, EUA).

Confirmado a presença dos genes, a cepa de ETEC H10407 foi cultivada em 3 mL de caldo Luria Bertani (LB) a 37 °C, por 16 - 18 h, com agitação de 200 rpm (pré-inóculo). Esse pré-inóculo foi então colocado nos meios citados no item anterior, em uma razão de 1:100 (1 μ L do pré-inóculo em 100 μ L de meio de cultura) e a cada intervalo de hora (até 8 h de cultivo), 1 mL de cultura de cada meio foi retirada para centrifugação, onde o sobrenadante foi obtido para futuramente se analisar por ELISA a quantidade de toxina produzida por essa cepa, com a finalidade de se obter o melhor meio de cultura onde essas toxinas são produzidas.

Tabela 1 - Iniciadores utilizados para o ensaio de PCR (*) e qRT-PCR.

Gene	Sequências (5' - 3')	Referência
<i>sta1</i> (STIa)	(F) TTTCCCCTCTTTTAGTCAGTCAA (R) GCAGGATTACAACACAATTCACAGCAG	Guion et al., 2008
<i>sta2</i> (STIb)	(F) TGCTAAACCAGTAGAGTCTTCAAAA (R) GCAGGATTACAACACAATTCACAGCAG	Guion et al., 2008
<i>eltA</i>	(F) GGCGACAAATTATACCGTGC (R) GCCGGTTTGTGTTCCCTCTC	Ozaki et al., 2015
<i>rpoA</i>	(F) GCGTCATCTTCTTCCGAAT (R) CGCGGTCGTGGTTATGTG	Walters, Sperandio, 2006
<i>rpoA</i> (* PCR convencional)	(F) AGTCAATTCAGATCGTCAA (R) GTATTCTGCTCTCATCGATG	Freitas, 2012

4.3 *Ensaio de avaliação da produção/secreção das toxinas LT e ST*

Após a confirmação da presença dos genes que codificam as toxinas ST e LT, será analisado o perfil de produção das toxinas com a utilização de anticorpos específicos obtidos em estudos anteriores em nosso laboratório. Na imunodeteção por ELISA, foi empregada a metodologia descrita em Rocha e colaboradores (2013). O estudo foi dividido em duas etapas, primeiramente foi escolhido o meio de cultura utilizando-se essa metodologia. Nessa etapa foi utilizado somente a cepa H10407. Após essa escolha, novos ensaios de ELISA foram realizados para verificar o perfil de secreção/produção das toxinas, utilizando-se as duas cepas (H10407 e 5).

4.3.1 ELISA de captura para LT

A produção e secreção de LT foi determinada por um ELISA de captura como descrito abaixo. Microplacas (MaxiSorp microplacas, Nunc, Rochester, NY, EUA) foram sensibilizadas a 4 °C durante 18 h com a fração de IgG enriquecida anti-LT policlonais de coelho a 30 µg/mL em tampão de carbonato-bicarbonato de sódio 0,05 M, pH 9,6. Em cada passo, as placas foram lavadas quatro vezes com PBS-Tween 0,05% (PBS-T). Elas foram bloqueadas com PBS mais 5% de leite desnatado (solução de bloqueio) a 37 °C durante 30 min. A seguir, os sobrenadantes bacterianos foram adicionados e incubados a 37 °C durante 2 h. Anticorpo anti-LT monoclonal a 10 µg/mL diluído em solução de bloqueio foi então adicionado e as placas foram incubadas a 37 °C durante 60 min. Depois foi adicionado anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), diluído 1: 10000 em solução de bloqueio seguido por uma incubação adicional a 37 °C durante 45 min, seguido por 0,5 mg/mL de o-fenilenodiamina (OPD, Sigma Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA) mais 0,5 µL/mL de peróxido de hidrogénio em tampão 0,05 M de citrato-fosfato, pH 5,0, no escuro, à temperatura ambiente. As reações foram interrompidas depois de 15 min por adição de 50 mL de HCl 1M. A absorbância foi medida a 492 nm em um leitor Multiskan EX ELISA (Labsystems, Milford, MA, EUA).

Em cada passo, o volume adicionado foi de 100 µL/poço, exceto na lavagem e bloqueio, quando o volume era 200 µL/poço. Todas as amostras foram testadas em duplicata.

4.3.2 ELISA indireto para ST

Para a avaliação da produção de ST nos meios de cultura, microplacas (MaxiSorp microplacas, Nunc, Rochester, NY, EUA) foram sensibilizadas a 4 °C durante 18 h com sobrenadante de crescimento das bactérias. A cada passo, as placas foram lavadas 4x com PBS-T. As placas foram depois bloqueadas com PBS 5% de leite desnatado a 37 °C durante 30 min. Em seguida, foram adicionados em cada poço 15 µg/mL de anticorpo monoclonal anti-ST diluídos em solução de bloqueio, por 1h a 37 °C. Para a revelação, as reações foram desenvolvidas tal como descrito acima. Os valores de absorbância representam a média de duplicatas.

4.4 Cultivo bacteriano; coleta de material para ELISA, extração de RNA bacteriano e síntese de cDNA.

4.4.1 Contagem de células bacterianas

Escolhido o meio de cultura, as cepas de ETEC H10407 e 5 foram cultivadas em 3 mL de caldo LB a 37 ° C, por 16 - 18 h, com agitação de 200 rpm (pré-inóculo). 100 µL desse pré-inóculo foi então diluído em 900 µL de PBS estéril, e diluições seriadas desse material foram plaqueadas em ágar LB, utilizando-se pérolas de vidro, para a contagem das células bacterianas pelo método de UFC. A contagem das bactérias foi necessária para se obter uma maior uniformidade do inóculo bacteriano nos tempos investigados. Após plaqueadas, as placas foram mantidas em temperatura controlada a 37 °C por 16 h.

4.4.2 Inóculo bacteriano e coleta de material para a extração de RNA e o ELISA

Após a contagem, 1 mL do pré-inóculo contendo 10^9 - 10^{10} bactérias foi colocado em 100 mL de meio Caldo EC, que foi mantido sob agitação (200 rpm) a 37 °C por 16 h e em diferentes tempos do cultivo bacteriano (1, 4, 7, 8, 10, 12 e 16 h), 4 mL dessa cultura foram retirados, (1) 1 mL para a medição da absorbância (Ultrospec 2100 pro, Amersham / Biosciences, EUA), (2) 1 mL foi misturado com o dobro de volume de RNA Protect (Qiagen, EUA) seguindo as recomendações do fabricante, para em seguida, serem centrifugados a 10.000 x g por 10 min para recuperar o sedimento. Esses sedimentos foram então congelados a -20 °C para a extração do RNA. (3) 1 mL desse cultivo foi centrifugado a 10.000 x g por 2 min para a coleta de sobrenadante; e (4) 1 mL dessa cultura foi congelado a -20 °C e em seguida tratado com 0,2 mg/mL de polimixina B, sob agitação por 30 min a 37 °C (de acordo com Rocha e colaboradores, 2013) para rompimento das células bacterianas. Após essa etapa, esse material foi novamente centrifugado a 10.000 x g por 2 min.

Os materiais obtidos em (3) e (4) foram então analisados por ELISA, como descrito anteriormente.

4.4.3 Extração de RNA bacteriano e síntese de cDNA

Após o congelamento do sedimento (1), o RNA total do cultivo foi extraído com o auxílio de RNeasy Mini kit (Qiagen, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante, e eluído com 30 µL de água ultrapura. O RNA obtido para cada amostra foi quantificado por espectrometria, por leitura de absorbâncias em comprimentos de onda de 260 e 280 nm utilizando-se um Nanodrop Lite (Thermo Scientific, EUA). Para verificar que não havia contaminações de DNA no eluído de RNA, foi realizado, para todas as amostras, uma amplificação por PCR, utilizando-se o iniciador do gene constitutivo *rpoA* (marcado na Tabela 1 com um *). As amostras que não apresentavam amplificação eram utilizadas nas próximas etapas. Já as que ainda apresentavam contaminação eram tratadas novamente com DNase.

Após a extração, os RNAs bacterianos foram submetidos à reação de digestão com DNase, utilizando o kit Deoxyribonuclease I Amplification Grade

(Invitrogen). As reações foram preparadas em banho de gelo, em microtubos estéreis (Axygen), adicionando-se 5 µL de RNA total extraído (contendo aproximadamente 1 µg de RNA), 1 µL de tampão de reação DNaseI e 1 µL de enzima DNaseI. As preparações foram incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos, e em seguida adicionado a cada tubo 2,5 mM de EDTA, incubando-se a 65 °C por 20 min.

Ao término da digestão, os cDNAs foram sintetizados à partir dos RNAs, utilizando-se o kit SuperScript™III First-Strand Synthesis Systems for RT-PCR (Invitrogen). Primeiramente, em cada reação foram adicionados: 1000 ng de RNA digerido, 1 µL de *random hexamer primers*, 1 mM da mistura de dNTPs (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) e água ultrapura estéril para um volume final de 10 µL. As reações foram incubadas a 65 °C por 5 min e imediatamente incubadas em banho de gelo por 1 min. Em seguida, foram adicionados a cada tubo 2 µL de tampão de reação RT, 5 mM de cloreto de magnésio, 10 mM de DTT, 2 U de RNaseOUT™, 2,5 U de SuperScript™III RT e água ultrapura estéril para um volume final de 20 µL. A seguir, as preparações foram colocadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, EUA) e submetidas às temperaturas de 50 °C por 50 minutos, seguido de 85 °C por 5 min. Após retirar as reações do termociclador, foram adicionados a cada tubo um volume adicional de 20 µL de água ultrapura, totalizando um volume final de solução de RNA de 40 µL.

Também foram realizadas reações de controle das amostras. Foi designado à amostra o nome de –RT, onde todos os reagentes utilizados na conversão do RNA para cDNA foram misturados ao RNA, sem a enzima SuperScript™III RT. Isso garantirá que as amplificações que estão sendo analisadas não são devido a DNA que sobrou na amostra.

4.5 Análise da transcrição dos genes

Para confirmação da síntese de RNA em cDNA, 1 µL desse produto foi amplificado por PCR, utilizando-se o iniciador do gene constitutivo *rpoA* (marcado na Tabela 1 com um *). Após confirmação em gel de agarose 1% do produto de amplificação contendo 656 pb, temos o cDNA que será utilizado no qRT-PCR.

A identificação da presença de cDNA contendo o produto codificado pelos genes *eltA* e *sta1* e *sta2* foi realizada pela amplificação por tempo real, com os iniciadores indicados na Tabela 1.

A reação de qRT-PCR foi realizada utilizando Power SYBR Green PCR Master Mix (2x) (Applied Biosystems, EUA) com um volume final de reação de 20 μ L, contendo 0,2 μ M de cada primer, de 2 μ L de cDNA e completando o volume com água estéril ultrapura. As reações foram realizadas em duplicata no aparelho StepOne™ plus v2.3 (Applied Biosystems, EUA), com um protocolo de reação de duas fases consistindo em 40 ciclos de 94° C durante 30 seg e 60° C durante 1 min, seguido por uma fase de dissociação para controle de qualidade.

As diferenças nos valores de expressão relativos foram calculadas utilizando os valores Ct no programa StepOne Software v2.3, e determinada pela equação $2^{-\Delta Ct}$. O gene constitutivo *rpoA* que codifica a subunidade α da RNA polimerase foi utilizado como controle das reações, servindo para a normalização das equações.

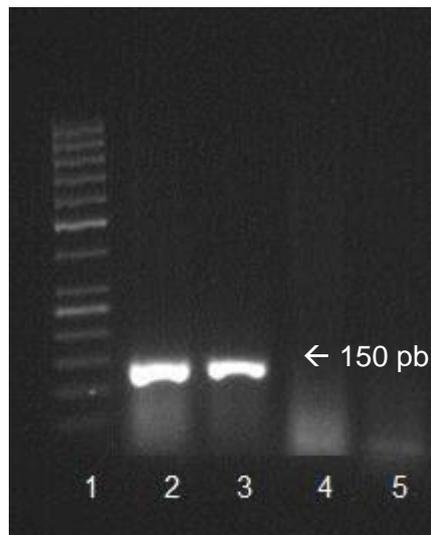
Os dados de expressão foram então analisados no programa DataAssist v3.01. Foram realizados experimentos com RNA obtido de forma independente em dois ensaios separados. O programa Prisma 5™ foi utilizado para a confecção dos gráficos de produção, secreção e expressão.

5 RESULTADOS

5.1 Presença dos genes *eltA*, *sta1* e *sta2*

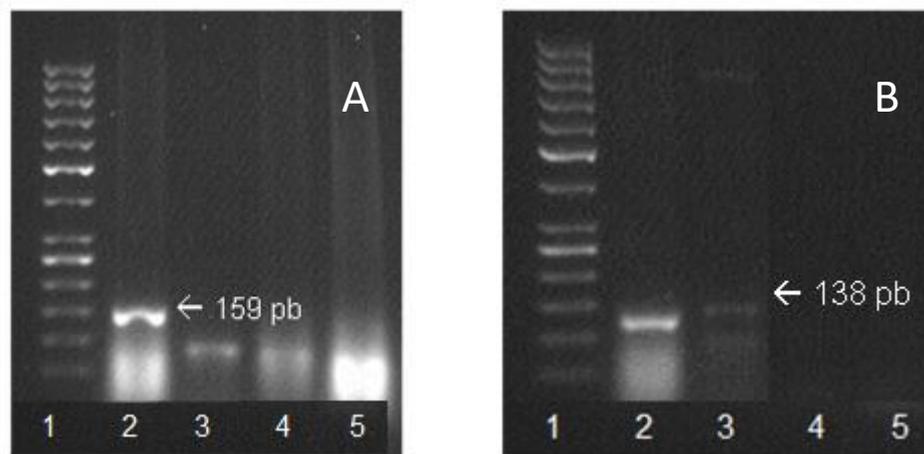
Inicialmente foi feita a confirmação da presença de genes codificadores das toxinas nos isolados de ETEC utilizados no estudo, por PCR. O gene *eltA* está presente em ambas as cepas H10407 e 5, como um fragmento amplificado de 150 pb (**Figura 5**). O gene *sta1* está presente somente na cepa H10407 com um fragmento amplificado de 159 pb (**Figura 6A**). E, o gene *sta2* está presente nas cepas H10407 e 5, com um fragmento amplificado de 138 pb (**Figura 6B**). Esses resultados permitiram a sequência do estudo.

Figura 5 - Perfil eletroforético em gel de agarose 2% de PCR para confirmação do gene *eltA*.



Canaletas: 1. Marcador de peso molecular 50 pb, 2. H10407, 3. 5, 4. DH5 α , 5. controle da reação (reagentes com H₂O).

Figura 6 - Perfil eletroforético em gel de agarose 2% de PCR para confirmação do gene *sta1* (A) e *sta2* (B).



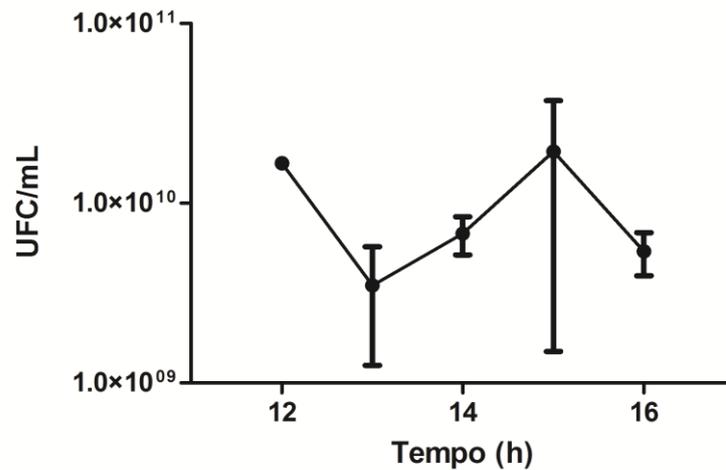
Canaletas: 1. Marcador de peso molecular 50 pb, 2. H10407, 3. 5, 4. DH5 α , 5. controle da reação (reagentes com H₂O).

5.2 Secreção das toxinas LT e ST

Confirmado a presença dos genes nas cepas, verificou-se por ELISA, a secreção das toxinas LT e ST. Para esse estudo, foi utilizada somente a cepa protótipo H10407 e foram testados diversos meios de cultura: DMEM, Caldo EC, EVANS, Syncase, TSB, LB e BHI, com o objetivo de avaliar em qual meio as toxinas são secretadas, bem como, diferentes tempos do cultivo bacteriano, para verificar em qual tempo ocorreria a maior produção das toxinas.

Para padronizar os experimentos realizou-se a contagem do pré-inóculo, sendo assim, o pré-inóculo da cepa H10407 foi cultivada a partir do cultivo congelado a -80 °C. O tempo de cultivo do pré-inóculo varia entre 12 e 16 h. A **Figura 7** nos mostra esse perfil. Nos diferentes tempos, a contagem de bactérias variou entre 10⁹ a 10¹⁰ UFC/mL. Como todos pré-inóculos foram obtidos a partir do mesmo estoque congelado, esse número de bactérias foi utilizado como definição em todos os experimentos.

Figura 7 - Unidades Formadoras de Colônia do pré-inóculo de H10407



Os tempos de crescimento bacteriano estão indicados no eixo X. As barras de erro indicam as duplicatas do experimento.

A secreção da toxina LT por H10407 (**Figura 8**) foi bastante diversa em todos os meios de cultivo testados. Destaca-se a maior secreção de LT em 8 h de cultura, nos meios DMEM, caldo EC e TSB, uma secreção mediana nos meios Syncase e EVANS, e uma baixa secreção em LB e BHI e observa-se que, em 4 h, ocorre uma elevação na secreção da toxina em todos os meios testados.

Verifica-se também uma grande diversidade na secreção de ST por H10407 nos diferentes meios testados (**Figura 9**). Destaca-se a maior secreção de ST em 8 h de cultura nos meios DMEM e caldo EC, e uma menor secreção nos meios restantes. Uma elevada secreção em 4 h também é observado para ST, ocorrendo nos meios Syncase, Caldo EC e LB.

Figura 8 - Perfil de secreção de LT pela cepa H10407 em diferentes meios de cultivo.

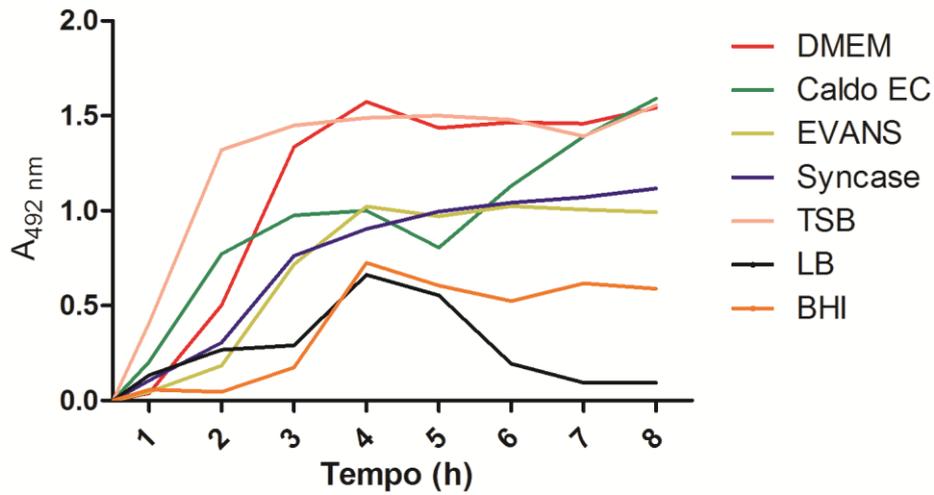
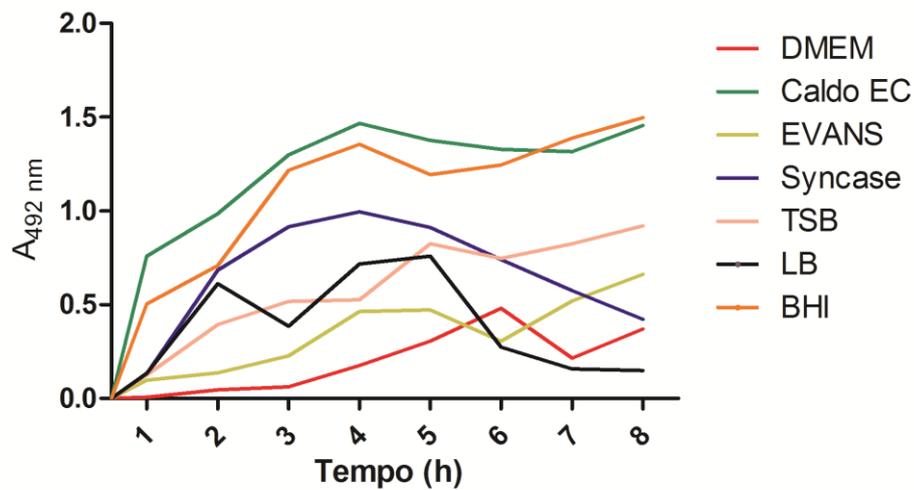


Figura 9 - Perfil de secreção de ST pela cepa H10407 em diferentes meios de cultivo.



De acordo com os resultados mostrados acima (**Figura 8 e 9**), os meios que propiciam a secreção de LT pela cepa H10407 são DMEM, caldo EC e TSB; e para a secreção de ST, são BHI e caldo EC. Como caldo EC, mostrou-se o melhor meio para a secreção de ambas as toxinas, este, foi escolhido para as próximas etapas do estudo.

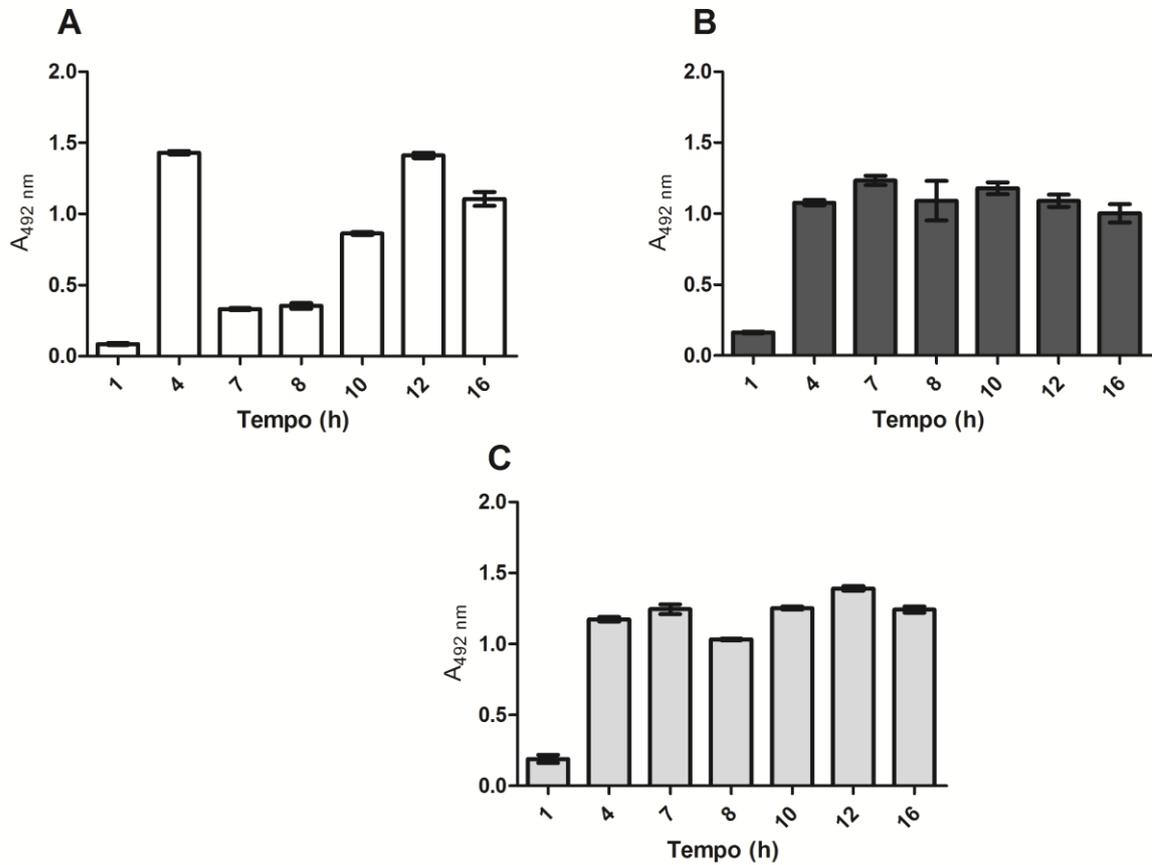
5.3 Secreção/Produção de toxinas LT e ST

Para toda toxina que foi coletada no sobrenadante bacteriano, denominou-se secreção; e, para toda toxina que estava na bactéria (que foi rompida pelo tratamento com polimixina), denominou-se produção. Foram usadas essas denominações, visto que a bactéria pode produzir a toxina mas não secretá-la para o meio extracelular. Nesta etapa do trabalho, foram utilizadas as cepas H10407 e a cepa 5.

A secreção de LT pela cepa H10407 é bem variada, observando-se maior secreção nos tempos de 4, 12 e 16 h de cultivo; e uma baixa secreção em 1, 7 e 8 h; e intermediária em 10 h (**Figura 10A**). Por outro lado, a produção de LT por essa cepa mantém-se constante a partir da hora 4 de cultivo, indicando uma estabilidade na produção dessa toxina (**Figura 10B**).

A cepa H10407 secreta toda toxina ST, observado na **Figura 10C**. Ela é uniforme após a hora 4 de cultivo. Quando se realiza o tratamento do cultivo com polimixina, não se verifica ST pelo método empregado (dados não mostrados).

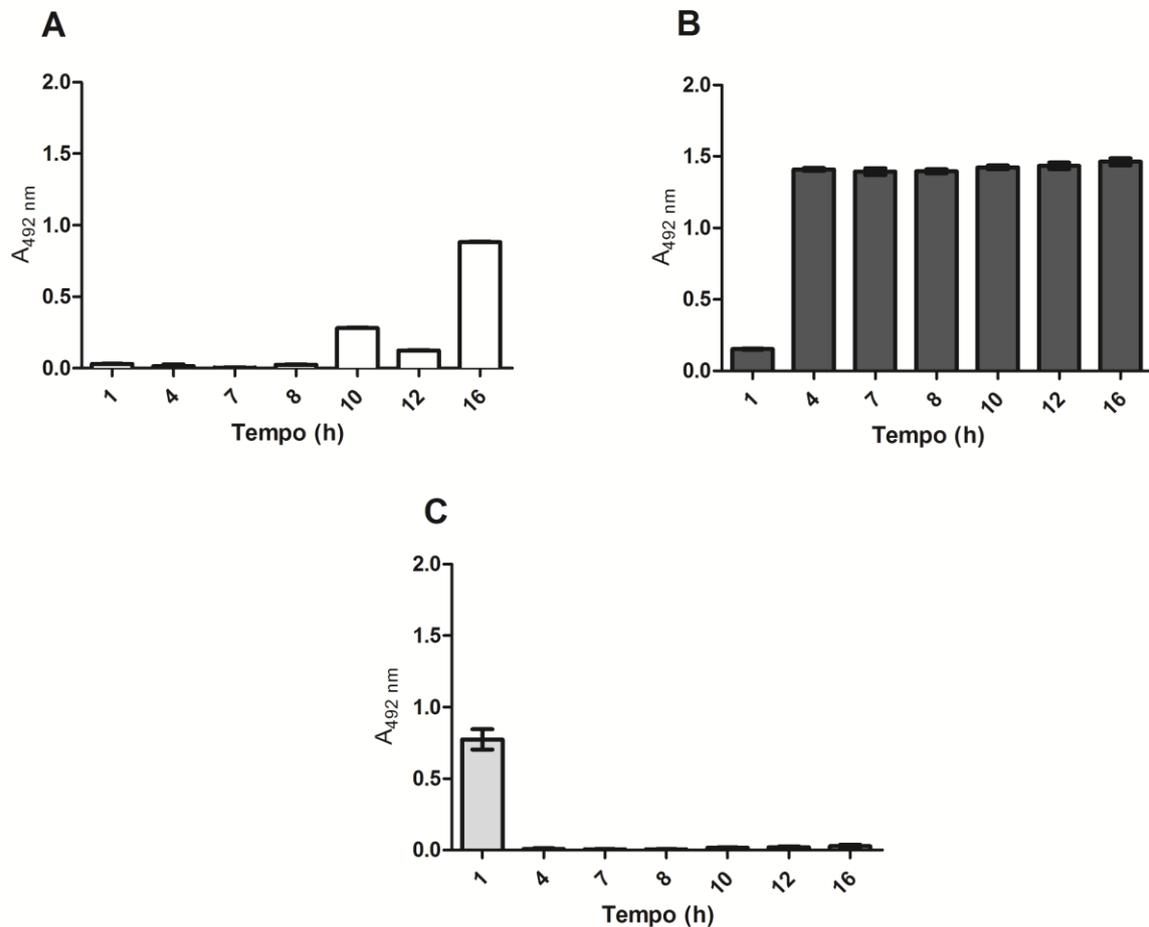
Figura 10 - Perfil de Secreção e Produção da toxina LT e Secreção da toxina ST pela cepa H10407.



A. Secreção de LT. B. Produção de LT. C. Secreção de ST. H10407 foi a cepa utilizada nesse experimento nos tempos de 1, 4, 7, 8, 10, 12 e 16 h de cultivo.

A cepa 5, tem uma baixa secreção de LT, mas tem um perfil de produção dessa toxina comparável a cepa H10407 (**Figura 10B x Figura 11B**). A toxina ST não é secretada por essa cepa (dados não mostrados) e é apenas produzida com 1 h de cultivo bacteriano (**Figura 11C**).

Figura 11 - Perfil de Secreção e Produção da toxina LT e Produção da toxina ST pela cepa 5.



A. Secreção de LT. B. Produção de LT. C. Secreção de ST. 5 foi a cepa utilizada nesse experimento nos tempos de 1, 4, 7, 8, 10, 12 e 16 h de cultivo.

5.4 Extração de RNA e síntese de cDNA.

Foram extraídos o RNA das cepas H10407 e 5. Os parâmetros analisados foram o cultivo em caldo EC, as diferentes fases do cultivo bacteriano e razão 260/280 que é utilizada para avaliar a pureza do RNA. Para a realização dos experimentos de conversão do RNA em cDNA, normalmente é aceito para o RNA uma razão com valor acima de 1,8, aproximada de 2,0. Como todas as razões observadas (dados não mostrados) em nossas preparações apresentaram esses valores, o RNA extraído foi utilizado nas próximas etapas do estudo.

Após a extração, foi realizada com todas as amostras, uma amplificação por PCR dos RNAs, com o objetivo de verificar se após o tratamento com a DNase

ainda existiam resquícios de DNA contaminante. Todas as amostras (dados não mostrados) não apresentaram banda de amplificação no gel, então os RNAs não estavam contaminados e, portanto foi possível continuar as análises.

Após a conversão para cDNA, todas as amostras foram testadas por amplificação por PCR (dados não mostrados). Todas as amostras possuem cDNA e portanto foram utilizadas na próxima etapa.

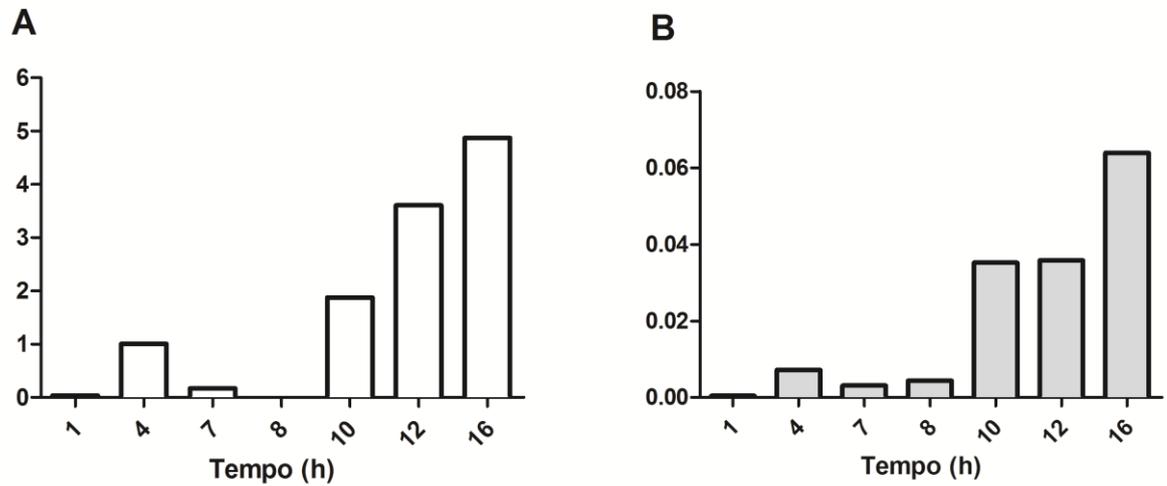
5.5 Análise da transcrição dos genes *eltA*, *sta1* e *sta2*

Os ensaios de RT-PCR foram então realizados e os níveis relativos de transcrição dos genes de virulência foram examinados, em experimentos com RNA obtido de forma independente em dois ensaios separados, os perfis de transcrição foram similares nos dois experimentos. Os níveis de transcrição de genes selecionados foram calculados em relação à transcrição do gene de constitutivo *rpoA* e foram realizados ajustes nos *Cts* dos experimentos, a fim de normalizar a abundância dos transcritos entre os experimentos.

Primeiramente utilizando a cepa protótipo H10407, para o gene *eltA* (que codifica a toxina LT) (**Figura 12A**) verificou-se que, ocorre uma maior transcrição do gene a partir da décima hora do cultivo, e ela continua a se elevar, atingindo o máximo de transcrição em 16 h. Em 4 h de cultivo, vemos uma elevação da transcrição, menor que nos outros tempos, porém maior, comparado com 1, 7 e 8 h de cultivo.

Nas condições analisadas do experimento, a bactéria H10407 não transcreve o gene *sta2* (STh) (dados não mostrados), somente transcreve o gene *sta1* (STp) (**Figura 12B**). A transcrição do gene *sta1* segue também a transcrição do gene *eltA*, ela é maior a partir da décima hora do cultivo, atingindo o máximo de transcrição as 16 h. Parece não haver diferença entre 4, 7 e 8 h de cultivo, somente na primeira hora, que parece não haver transcrição.

Figura 12 - Perfil de transcrição normalizada dos genes *eltA* e *sta1* em relação ao *rpoA* na cepa H10407 em diferentes tempos.

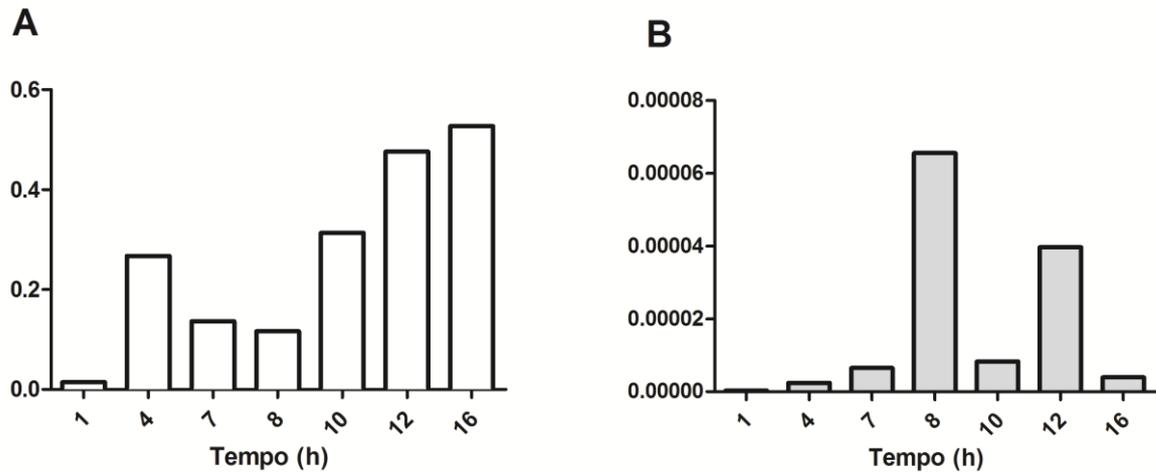


Não ocorre transcrição do gene *sta2* nas condições testadas. A. transcrição normalizada do gene *eltA* (LT). B. Transcrição normalizada do gene *sta1* (STIa ou STp)

Na cepa 5, a transcrição do gene *eltA* ocorre de forma parecida com o gene *eltA* da H10407 (**Figura 13A**). Uma baixa ou quase inexistente transcrição em 1 h, uma elevada transcrição em 4 h, com uma diminuição em 7 e 8 h. Após esse tempo a transcrição volta a se elevar em 10 h, atingindo um nível máximo em 16 h.

Essa cepa não possui o gene *sta1*, portanto não há figura de sua transcrição. A transcrição de *sta2* (**Figura 13B**) possui valores variados, com picos de expressão na hora 8 e hora 10, mas nos outros tempos a sua transcrição é pequena.

Figura 13 - Perfil de transcrição normalizada dos genes *eltA* e *sta2* em relação ao *rpoA* na cepa 5 em diferentes tempos.



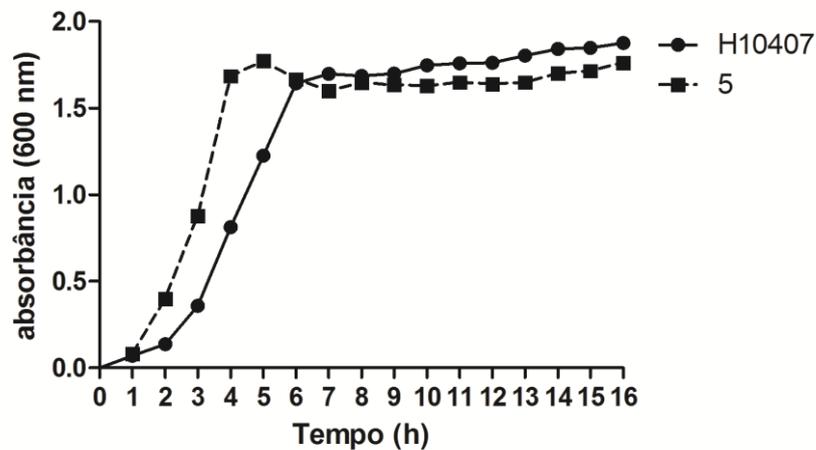
Não há nessa cepa o gene *sta1*. A. Transcrição normalizada do gene *eltA* (LT). B. Transcrição normalizada do gene *sta2* (STIb ou STh).

5.6 Secreção/Produção das toxinas x Transcrição dos genes.

Para investigar se há alguma similaridade entre a produção, secreção e a transcrição das toxinas LT e ST em diferentes pontos no tempo da curva de crescimento de bactérias, foram comparados os dados de produção e secreção das toxinas por ELISA, com os dados de a transcrição dos genes *eltA* e *sta1* e *sta2* por RT-PCR nas cepas H10407 e 5.

Após a medição da absorbância, foi possível analisar o perfil de crescimento das bactérias utilizadas nesse estudo (**Figura 14**). A cepa H10407 possui uma fase *Lag* de crescimento entre 1 e 2 h, enquanto que a cepa 5 está nessa fase durante somente a primeira hora de cultivo. A cepa 5 possui uma fase de crescimento exponencial (fase *Log*) entre 1 e 3 h de cultivo, já a cepa protótipo tem um crescimento exponencial (fase *Log*) entre 1 e 4 h. Após esse tempo, ambas as cepas mantêm seus crescimentos em fase estacionária. Portanto, os sobrenadantes, cultivo e extração de RNA nesses estudos aconteceram em fases diferentes do crescimento para cada bactéria. Para 1 h de cultivo, as duas cepas estão em fase *Lag*; para 4 h de cultivo, a cepa H10407 está fase *Log*, mas a cepa 5 está em fase estacionária. Nos demais tempos de cultivo, ambas as bactérias estão em fase estacionária.

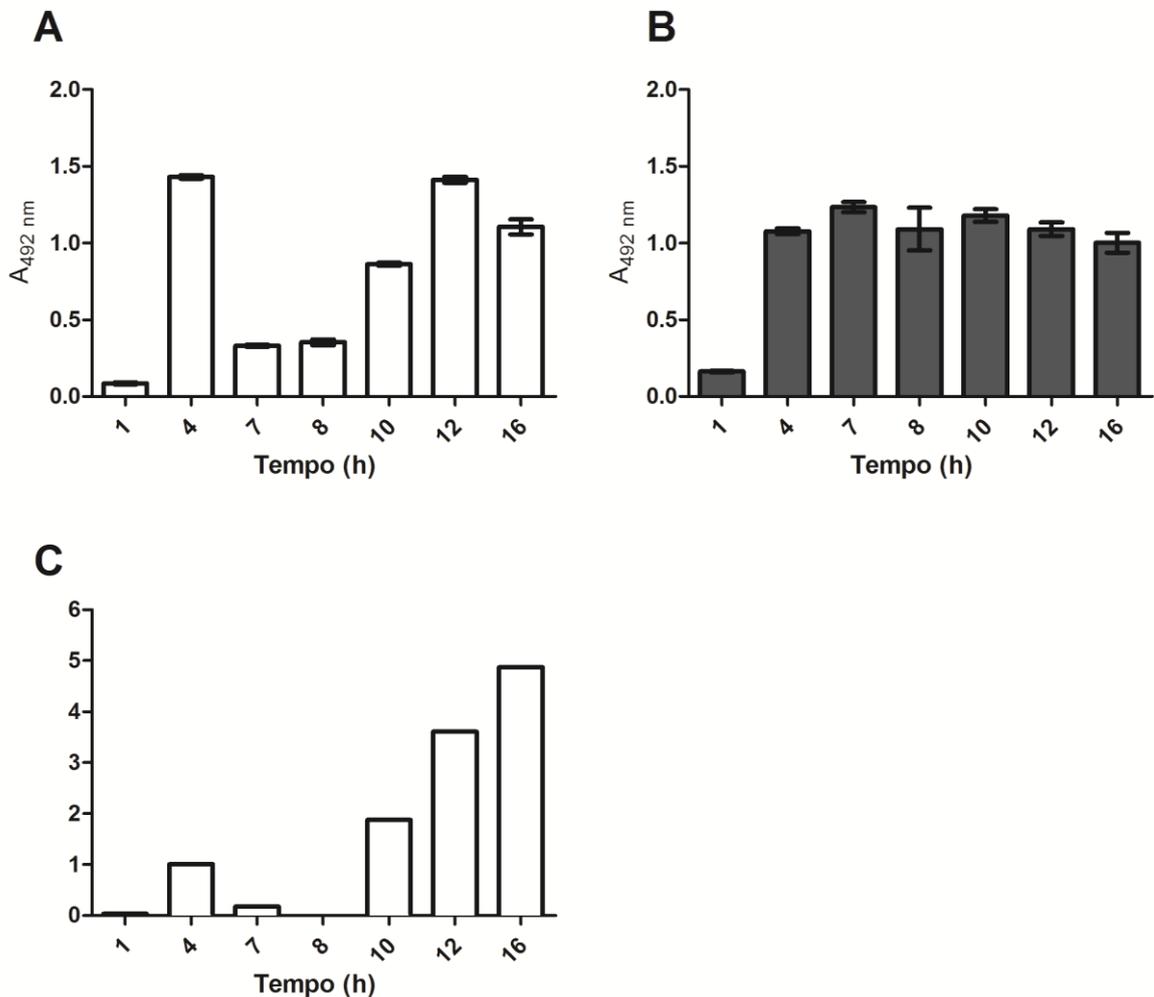
Figura 14 - Curva de crescimento bacteriano das cepas H10407 e 5.



No eixo X temos os diferentes tempos de cultivo e no Y, a absorbância (600 nm). H10407 (linha contínua) e 5 (linha tracejada).

A cepa H10407 secreta LT diferencialmente nos tempos de cultivo analisados (**Figura 15A**), já sua produção (**Figura 15B**) é uniforme. A secreção dessa toxina parece acompanhar a transcrição do gene *eltA* (**Figura 15C**). Na primeira hora do cultivo (fase *Lag*), há uma baixa transcrição do gene *eltA* e conseqüentemente uma baixa produção e secreção da toxina LT. Com exceção do tempo 4 h, esses resultados mostram que a secreção dessa toxina e a expressão desse gene são maiores a partir do tempo 10 h do cultivo, ou seja na fase estacionária da curva de crescimento. No tempo 4 h, essa bactéria encontra-se em fase exponencial do crescimento, verifica-se uma elevada secreção de LT nesse tempo, o que não é verificado com a transcrição.

Figura 15 - Perfil de Secreção e Produção de LT e Transcrição do gene *eltA* na cepa H10407.



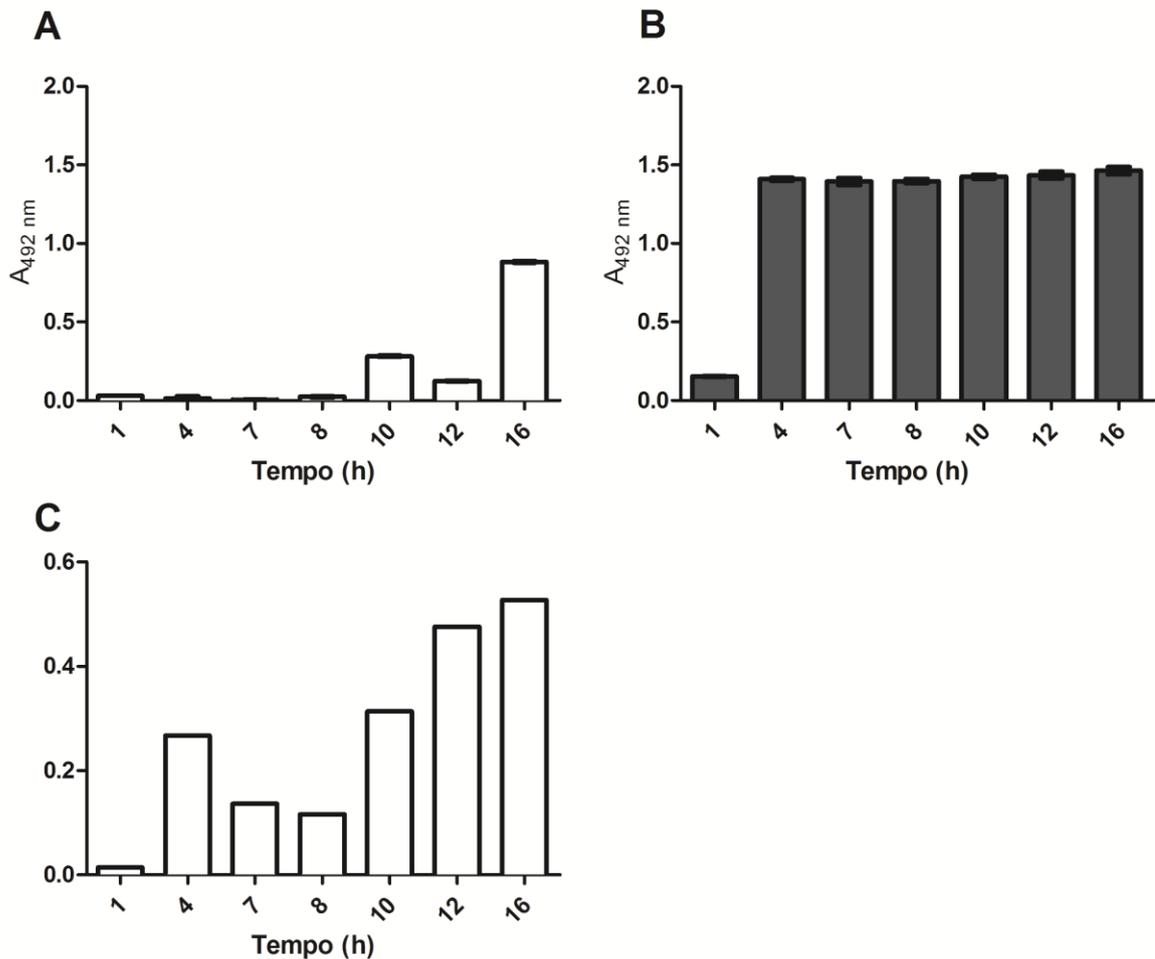
A. Secreção de LT. B. Produção de LT. C. Transcrição normalizada do gene *eltA* (LT). A cepa utilizada nesse estudo foi a H10407.

A cepa 5 também secreta LT diferencialmente nos tempos de cultivo analisados (**Figura 16A**), e apresenta sua produção (**Figura 16B**) uniforme como visto também na cepa H10407. Ocorre uma maior secreção de LT na hora 16, nas outras horas ocorre uma baixa ou quase nula secreção dessa toxina. A alta produção vista a partir da hora 4 do cultivo, indica que essa cepa produz essa toxina na fase estacionária do crescimento bacteriano.

A transcrição do gene *eltA*, na cepa 5 é bastante variável em relação ao tempo do cultivo (**Figura 16C**), mas possui semelhança se comparada com a expressão desse mesmo gene na cepa H10407 (**Figura 15C**). Ela é pequena na

primeira hora, possui uma elevação na quarta hora, decrescendo até a oitava hora. E uma nova elevação a partir da hora 10, mantendo-se elevada nas horas seguintes.

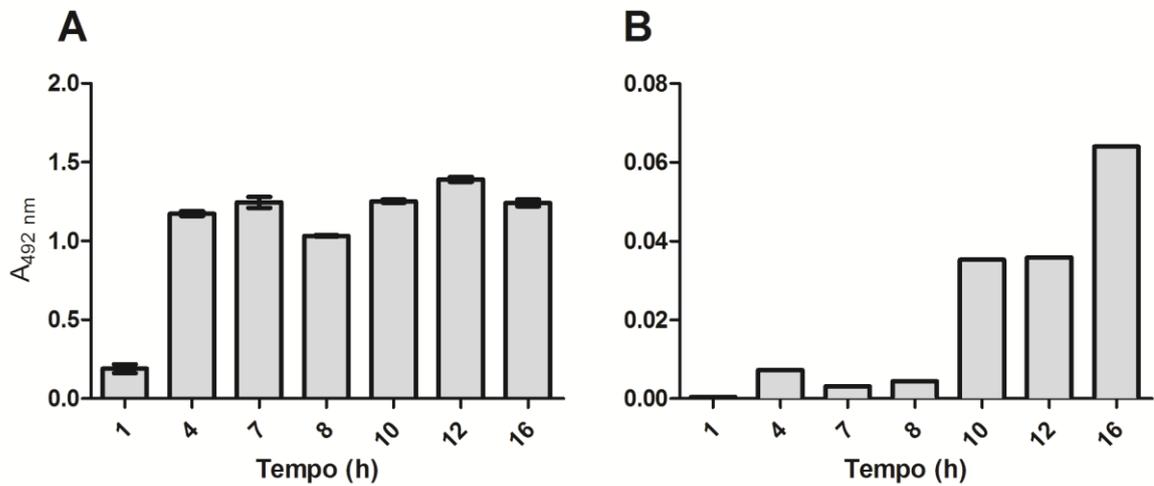
Figura 16 - Perfil de Secreção e Produção de LT e Transcrição do gene *eltA* na cepa 5.



A. Secreção de LT. B. Produção de LT. C. Transcrição normalizada do gene *eltA* (LT). A cepa utilizada nesse estudo foi a 5.

A cepa H10407 secreta toda toxina ST para o meio extracelular (**Figura 17A**), e como visto anteriormente possui uma secreção uniforme a partir da quarta hora do cultivo (fase exponencial), até a última hora observada (fase estacionária). A transcrição desse gene é variável (**Figura 17B**), quase inexistente na primeira hora de cultivo, menor até a hora 8 de cultivo, e maior a partir da hora 10, com uma máxima transcrição na hora 16.

Figura 17 - Perfil de Secreção de ST e Transcrição do gene *sta1* na cepa H10407.

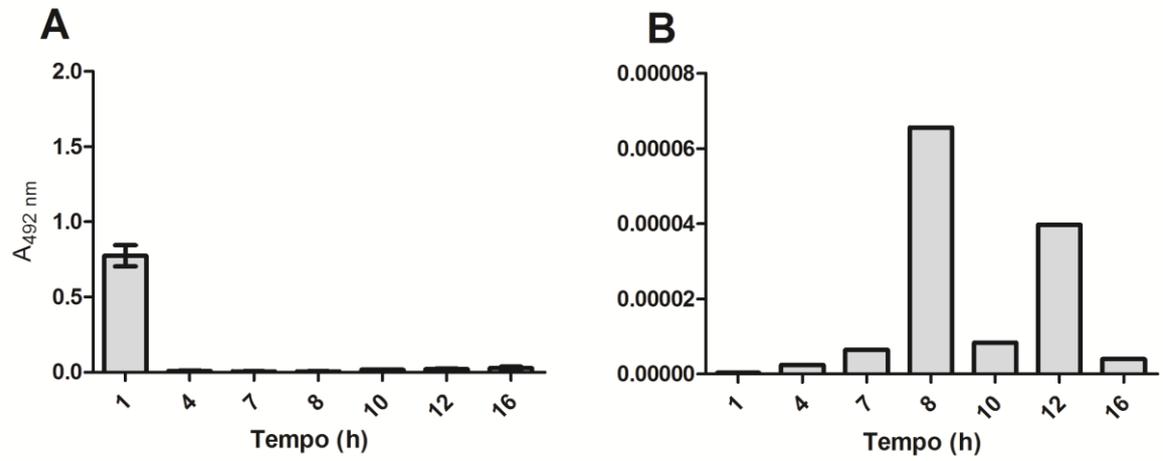


A. Secreção de ST. B. Transcrição normalizada do gene *sta1* (STp). A cepa utilizada nesse estudo foi a H10407.

Ao contrário da cepa H10407, a cepa 5 não é capaz de secretar a toxina ST para o meio extracelular, para verificarmos sua produção foi necessário romper a bactéria com o uso de polimixina. Diferentemente dos outros resultados, toda produção dessa toxina por essa cepa é verificada na primeira hora do cultivo (fase *Lag*) (**Figura 18A**), não sendo verificada nos outros tempos de cultivo.

Já sua transcrição é bastante variada: quase inexistente até a hora 7, com uma máxima transcrição em 8 h, uma diminuição na hora 10 e novamente uma elevação na hora 12.

Figura 18 - Perfil de Produção de ST e Transcrição do gene *sta2* na cepa 5.



A. Produção de ST. B. Transcrição normalizada do gene *sta2* (STh). A cepa utilizada nesse estudo foi a 5.

6 DISCUSSÃO

Escherichia coli é uma das espécies bacterianas mais bem estudadas, por sua enorme capacidade de se adaptar a diferentes ambientes, ela faz parte da microbiota, mas pode causar doenças em humanos e animais. Cepas de *E. coli* diarreiogênica apresentam características singulares quanto aos mecanismos de virulência e patogenicidade (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004), cada patotipo de DEC possui diferentes determinantes de virulência, os quais geralmente são adquiridos por elementos genéticos móveis. Esses fatores de virulência são regulados pelas bactérias com a finalidade de melhor se adaptar aos diferentes locais em que elas se encontram para que persistam ou colonizem novos ambientes.

Entre as *E. coli* que causam diarreia, ETEC se destaca pelas toxinas que produz, e pelo seu impacto em saúde pública. ETEC é responsável por cerca de 210 milhões de infecções anualmente, causando 380.000 mortes pelo mundo (GUPTA et al., 2008). Nas últimas décadas, vários estudos vêm sendo conduzidos com o intuito de contribuir para a elucidação dos fatores que influenciam na produção das toxinas por ETEC, e assim compreender melhor como esse patotipo causa a doença. Sabendo que *E. coli* é uma bactéria que transita desde a microbiota até patógenos mortais, o objetivo desse trabalho foi realizar a verificação da capacidade diferencial de expressão e produção de toxinas, LT e a ST, altamente relevantes nos papéis mais graves de infecção, que são produzidas por ETEC.

Neste estudo, observou-se que, apesar de pertencerem ao mesmo patotipo, as cepas H10407 e 5 comportam-se diferencialmente, frente ao mesmo estímulo, quanto a produção de toxinas e também transcrevem seus genes diferentemente.

Nesse contexto, foi realizada inicialmente a confirmação por PCR da presença de genes codificadores das toxinas LT e ST nos isolados de ETEC que foram utilizados no estudo. O gene *eltA* está presente nas cepas H10407 e 5, assim como o gene *sta2*. O gene *sta1* está presente somente na cepa H10407. Essa diferença na prevalência de cepas com o gene *sta2* maior do que em cepas com gene *sta1* é explicada, pois a toxina STh, codificada pelo gene *sta2* é mais comumente observada em isolados humanos de ETEC, e as cepas estudadas foram isoladas de casos clínicos de infecção diarreica em humanos .

Na literatura existem diversos trabalhos que utilizam a técnica de PCR para identificação dos genes *eltA*, *sta1* e *sta2*. Eles diferem principalmente pelo uso de diferentes iniciadores.

Após a confirmação da presença dos genes nas cepas, foi verificado por ELISA a produção das toxinas LT e ST utilizando-se a cepa protótipo H10407, com o objetivo de se verificar em qual meio de cultura essas toxinas eram melhores produzidas, as toxinas bacterianas têm expressões distintas de acordo com as condições do cultivo bacteriano (GONZALES-SILES; SJÖLING, 2016). Portanto, diferentes meios de cultura foram testados, entre eles; DMEM, caldo EC, meio Evans, Syncase, TSB, LB e BHI. O meio DMEM é comumente utilizado para o cultivo de células epiteliais, e os meios TSB e LB são também meios comuns utilizados na rotina laboratorial para o crescimento de bactérias.

Um dos fatores descritos como indutores da expressão de fatores de virulência em ETEC são os sais biliares (SJÖLING et al., 2007; NICKLASSON et al., 2012; SAHL; RASKO, 2012). Na composição do caldo EC esses sais estão incluídos. Nesse estudo, verificou-se que a cepa protótipo de ETEC H10407 produz diferencialmente ambas as toxinas em resposta aos diferentes meios de cultivos selecionados. Em caldo EC, verificou-se uma maior produção principalmente de ST quando comparado com a produção em outros meios de cultura. Rocha e colaboradores (2013), também verificaram uma produção diferencial dessas toxinas por diferentes cepas de ETEC, utilizando o mesmo meio de cultura, portanto o caldo EC foi escolhido para verificarmos a produção diferencial em diferentes tempos da curva de crescimento bacteriano e, se verificar também, se nessas horas do cultivo escolhidas, os genes *eltA*, *sta1* e *sta2* eram transcritos diferencialmente.

Primeiramente, foram testadas as oito primeiras horas do cultivo bacteriano, mas, após a escolha do melhor meio de cultura, diminuiu-se a quantidade de horas analisadas e estendeu-se a observação da curva de crescimento para maiores tempos do cultivo.

Como parte da LT produzida por ETEC, sob condições de crescimento laboratoriais, mantém-se no espaço periplasmático ou "associada com vesículas de membrana externa" (HORSTMAN; KUEHN, 2000), utilizamos o tratamento de bactérias com polimixina B para permitir a liberação da toxina intracelular (ROCHA et al. 2013).

Na literatura, existem poucos relatos da verificação da expressão diferencial de toxinas entre diferentes cepas. Um deles é o trabalho de Lasaro e colaboradores (2006), que verificou que a toxina LT é diferencialmente produzida *in vitro*, utilizando CAYE como meio de cultura, e *in vivo* utilizando o experimento de alça ligada de coelho. Outro trabalho que trata desse assunto, no entanto, observando a produção/secreção, é o realizado por Rocha e colaboradores (2013), que além de verificar a produção de LT também investigou a produção da toxina ST. Estudos sugerem que isolados produtores de LT/ST ou somente ST são responsáveis por causar quadros mais graves da doença, quando comparado com isolados produtores apenas da toxina LT (QADRI et al., 2005). Além disso, isolados que produzem somente STa ou em combinação com LT são responsáveis por 75% dos surtos diarreicos causados por ETEC (AREEF; SAEED, 2012). Portanto para uma melhor visão do papel que ETEC possui, há a necessidade de se estudar ambas as toxinas. Este estudo, além de investigar a produção diferenciada de toxinas em diferentes cepas, é o primeiro a identificar variação de produção temporal das toxinas termolábil e termoestável de ETEC.

Analisando o perfil de produção de LT pelas cepas H10407 e 5, verificou-se que, ambas possuem o mesmo padrão (**Figura 15B e 16B**), baixa produção na primeira hora de cultivo e uniformidade nas outras horas analisadas. Mas os valores de absorbância dos gráficos diferem um pouco, os de H10407 são um pouco menores que os valores da cepa 5. O perfil de secreção dessas cepas é bastante diferente (**Figura 15A e 16A**). H10407 tem picos de secreção em 4 h e 12 h de cultivo. O pico de secreção de LT pela cepa 5 acontece na 16 h de cultivo, mas se compararmos os valores de absorbância, veremos que mesmo esse pico de 16 h é menor que as secreções de H10407 nos tempos de 4, 12 e 16 h. Portanto podemos dizer que a cepa H10407, melhor secreta a toxina LT do que a cepa 5, mas em questão de produção, ambas são equivalentes. Com relação à toxina ST, há grandes diferenças entre as cepas (**Figura 15C e 16C**), H10407 é altamente secretora, atingindo a partir de 4h de cultivo um máximo de secreção. Já a cepa 5 não secreta ST e apenas produz essa toxina na primeira hora de cultivo. Há a possibilidade dela produzir essa toxina no intervalo de 2-3 h, mas como esses tempos não foram analisados, podemos somente afirmar que, na primeira hora ocorreu a produção dessa toxina. Dados da literatura mostram que toda toxina ST é

produzida/secretada para o meio extracelular TAXT et al. (2010) porém com esses resultados verificamos uma discordância da literatura.

A análise de apenas duas cepas não permite concluir, apenas sugerir, que esta variação na secreção/produção da toxina ST é cepa-dependente. Assim como a similaridade de produção de LT não permite concluir que esse mecanismo seja conservado. O estudo com mais cepas ST⁺/LT⁺ serão necessários para se fazer tais afirmações.

Com o perfil de secreção/produção das toxinas obtidos, partiu-se para analisar a transcrição dos genes dessas proteínas. Vários métodos podem ser utilizados para analisar o mRNA transcrito pelas células, dentre eles o ensaio de RT-PCR que é capaz de detectar quantidades diminutas de RNA, convertendo cadeia simples de RNA em cDNA (WANG; DOYLE; MARK, 1989). Um importante controle endógeno utilizado nas reações de RT-PCR é o gene *rpoA*, expresso constitutivamente por todas as células, os genes *housekeeping* (referência), assim denominados, são responsáveis pela manutenção do metabolismo celular (SAHL; RASKO, 2012; WALTERS; SPERANDIO, 2006).

O valor do real time utilizado nesse trabalho é $2^{-\Delta Ct}$ (é a expressão do gene alvo normalizada pela expressão do gene de referência). Considerando que a expressão do gene de referência não varia por causa das variáveis do experimento, o valor do *Ct* destes genes só variariam por causa de erros de pipetagem ou na eficiência na transcrição reversa/qualidade do RNA, fatores sobre os quais existe pouco ou nenhum controle. Os valores do $2^{-\Delta Ct}$ não tem um valor por si só (não são ng ou número de cópias), mas são valores que podem ser comparados por serem normalizados pelo mesmo gene de referência, ou seja, as barras mais altas nos gráficos indicam maior expressão e vice-versa. E quando você tem diversos genes-alvo normalizados para o mesmo gene de referência, o $2^{-\Delta Ct}$ te dá uma ideia da abundância da expressão de cada gene (se o gene A tem um $2^{-\Delta Ct}$ de 0,2 e o B de 0,001 após normalização para o mesmo gene de referência, você pode dizer que o gene A é mais abundante naquela amostra/grupo).

Partindo desse princípio, podemos comparar as transcrições relativas dos genes nas diferentes cepas. Observou-se valores mais elevados na transcrição do gene *eltA* por H10407 (**Figura 12A**) que a transcrição desse mesmo gene pela cepa 5 (**Figura 13A**). Não se pode fazer comparações entre as duas cepas com relação

ao gene *sta*. Em H10407, somente o gene *sta1* foi transcrito (**Figura 12B**) mas esse gene não está presente na cepa 5 (**Figura 6B**).

Sahl e Rasko (2012) também verificaram por RT-PCR que com absorvância (600 nm) de 0,8, o gene *eltA* é diferentemente transcrito em duas cepas protótipos analisadas, a E24377A e a H10407. Com a adição de bile, no meio LB, o gene *eltA* de H10407 foi 2 vezes mais transcrito que o mesmo de E24377A. Esses autores também verificaram a variação de transcrição do gene *sta2*, para H10407 os sais biliares reprimiram a transcrição desse gene, ao contrário de E24377A, onde esse estímulo aumentou a transcrição de *sta2*. Nesse trabalho, foi analisado somente o gene *sta2*, pois os autores compararam somente os genes encontrados em ambas as cepas.

Existem outras variantes na literatura que afetam a transcrição dos genes aqui analisados. A interação com células epiteliais, observada por Kansal e colaboradores (2012) eleva a transcrição dos genes *eltA* e *sta2* em E24377A; pH alcalino, observado por Gonzales e colaboradores (2013) também elevou a transcrição do gene *eltA* pela cepa E2863; e, glicose, observado por Sahl e Rasko (2012) que também elevou a transcrição do gene *eltA* em H10407. Mas entre esses trabalhos apresentados, pouco se fala sobre a transcrição do gene *sta1*. Verificou-se no presente estudo, que nas condições estudadas, o gene *sta1* de H10407 apresenta uma variada transcrição ao longo da curva de crescimento (**Figura 12B**).

Outra importante observação do nosso estudo, é que os genes de virulência dessas bactérias são expressos com variações, ao longo de toda a curva de crescimento. Em H10407, nas horas 10, 12 e 16, observa-se ainda a expressão dos genes *eltA* e *sta1* (**Figura 12**). Isso também é observado na cepa 5 (**Figura 13**). Os trabalhos encontrados na literatura limitam-se a observar somente 2 ou 3 pontos da curva de crescimento dessas bactérias (GONZALES et al., 2013; KANSAL et al., 2012; SAHL; RASKO, 2012). Somente Gonzales e colaboradores mencionam que os níveis de transcrição e secreção/produção da ETEC E2863 são maiores nas primeiras horas de cultivo que no cultivo *overnight*. Os dados apresentados no presente estudo mostram que LT é produzida por ambas as cepas ao longo da curva de crescimento, porém como os estudos não utilizam as mesmas cepas podemos novamente levantar a questão de que essas variáveis são cepa-dependentes.

Para investigar se há alguma similaridade entre a produção, secreção e a transcrição das toxinas LT e ST em diferentes pontos no tempo da curva de

crescimento de bactérias, os dados de produção e secreção das toxinas por ELISA foram comparados com os dados de transcrição dos genes *eltA* e *sta1* e *sta2* por RT-PCR nas cepas H10407 e 5 (**Figuras 15-18**). Com exceção da secreção de LT por H10407 e a transcrição do gene *eltA* que parecem ser similares, não podemos afirmar que haja uma relação entre a secreção e produção dessas toxinas com a transcrição dos genes envolvidos. Portanto pode-se dizer que existem mecanismos pós-transcricionais que regulam a produção de ambas as toxinas.

Os processos de controle pós-transcricionais denominados “riboregulação” envolvem riboreguladores como RNAs *cis* e *trans* não codificantes (ncRNAs), termômetros de RNA e *riboswitches*, bem como proteínas de ligação a RNA reguladoras e RNA degradante ou enzimas modificadoras (HEROVEN; NUSS; DERSCH, 2016). Muitos desses exemplos respondem a variações nas condições ambientais encontradas durante o curso da infecção, e todos são encontrados em membros da família *Enterobacteriaceae* a qual ETEC pertence. Mais estudos são necessários para se verificar o papel desses riboreguladores na expressão das toxinas de ETEC, porém a diferença entre secreção/produção e transcrição dos genes é um indício que os riboreguladores estão atuando nas toxinas de ETEC.

Outra importante regulação que acontece nesses genes foi evidenciada por Boderó e Boderó e Munson (2009) que mostraram que o cAMP desempenha um importante papel na regulação da expressão de LT e STh. Mas isto é realizado ao nível da transcrição pelo receptor de cAMP, a proteína (CRP). Sturbelle e colaboradores (2015) também mostram que o *quorum sensing* é um fator importante na regulação de genes de virulência em ETEC. Portanto deve-se levar em consideração a importância desses múltiplos fatores quando trabalhamos com a expressão gênica.

O presente estudo mostra como é diversificado o mecanismo de produção das toxinas por ETEC. Além disso, ele fornece um melhor entendimento em como as ETEC transcrevem os genes *eltA*, *sta1* e *sta2* regulando suas toxinas. Isso irá proporcionar não somente uma melhor compreensão da patogênese dessas bactérias, mas também poderá ajudar em possíveis tratamentos do enorme número de casos diarreicos que essas bactérias causam.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que os genes *eltA*, *sta1* e *sta2* presentes nas cepas H10407 e 5 são transcritos diferencialmente nas bactérias cultivadas em caldo EC. Apesar da semelhança, não há correlação entre a transcrição gênica e secreção e produção das toxinas, sugerindo que há outros mecanismos envolvidos no controle da produção dessas toxinas.

REFERÊNCIAS*

- ABE, C. M. et al. Virulence features of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* identified by the eae+ EAF-negative stx-genetic profile. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 64, n. 4, p. 357-365, 2009.
- AREF, N. E. M.; SAEED, A. M. An enhanced protocol for expression and purification of heat-stable enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **J. Biochem. Molecular Toxicology**, v. 26, n. 4, p. 168-175, 2012.
- BEGUM, Y. A. et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from surface water in urban and rural areas of Bangladesh. **J Clin Microbiol.**, v. 43, p. 3582–3583, 2005.
- BODERO, M. D.; MUNSON, G. P. Cyclic AMP receptor protein-dependent repression of heat-labile enterotoxin. **Infect. Immun.**, v. 77, p. 791–798, 2009.
- BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO PAULISTA. **Surto de diarreia por rotavírus**, 2004. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa10_rota.htm>. Acesso em: 23 out. 2013.
- BUERIS, V. et al. 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.
- CHAKRABORTY, K. et al. Bacterial exotoxins downregulate cathelicidin (hCAP-18/LL-37) and human beta-defensin 1 (HBD-1) expression in the intestinal epithelial cells. **Cell Microbiol.**, v. 10, p. 2520-2537, 2008.
- CLEMENTS, A. et al. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Microbes**, v. 3, n. 2, p. 71-87, 2012.
- CROSSMAN et al. A Commensal Gone Bad: Complete Genome Sequence of the Prototypical Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strain H10407. **J. Bacteriol.**, v. 192, n. 21, p. 5822–5831, 2010.
- CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Rev. Microbiol.**, v. 8, p. 26-38, 2010.
- DUBREUIL, J. D. The whole shebang: the gastrointestinal tract, *Escherichia coli* enterotoxins and secretion. **Curr Issues Mol. Biol.**, v. 14, p. 71-82, 2012.
- DUBREUIL, J. D. Antibacterial and Antidiarrheal Activities of Plant Products against Enterotoxinogenic *Escherichia coli*. **Toxins**, v. 5, p. 2009-2041, 2013.
- DURFEE, T. et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: insights into the biology of a laboratory workhorse. **J. Bacteriol.**, v.190, n.7, p.2597-2606, 2008.
- ELLIOTT, S. J. et al. The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 11, p. 6115-6126, 2000.
- EVANS, D. G.; EVANS, D.J. Three characteristics associated with enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from man. **Infect. Immun.**, v. 8, p. 322-328, 1973.
- EVANS, D. G.; EVANS, D. J.; PIERCE, N. F. Differences in the response of rabbit small intestine to heat-labile and heat-stable enterotoxins of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v.7, p.873-880, 1973.

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- FERREYRA, J. A. et al. The enteric two-step: nutritional strategies of bacterial pathogens within the gut. **Cell Microbiol.**, v. 16, p. 993–1003, 2014.
- FLECKENSTEIN, James M. et al. Molecular mechanisms of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. **Microb. Infect.**, p.89-98, 2010.
- FRANK, C. et al. Epidemic profile of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. **N. Engl. J. Med.**, v. 365, n. 19, p. 1771-1780, 2011.
- FREITAS, N. C. Fímbrias Pil em *Escherichia coli* enteropatogênica atípica: caracterização e investigação do papel de PilS e PilV na adesão bacteriana. Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- GARMENDIA, J; FRANKEL, G; CREPIN, V. F. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. **Infect. Immun.**, v.73, n.5, p.2573–2585, 2005.
- GILL, D. M. et al. Subunit number and arrangement in *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **Infect. Immun.**, v. 33, p. 677-682, 1981.
- GONZALES, L. et al. Alkaline pH Is a signal for optimal production and secretion of the heat labile toxin, LT in enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). **PLoS ONE** v. 8, 2013.
- GONZALES-SILES, L.; SJÖLING, Å. The different ecological niches of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Environ. Microbiol.**, v.18, p. 741- 751, 2016.
- GOPHNA, U. The guts of dietary habits. **Science**, v. 334, p. 45-46, 2011.
- GUPTA, S. K., et al. Analysis of Data Gaps Pertaining to Enterotoxigenic *Escherichia coli* Infections in Low and Medium Human Development Index Countries, 1984–2005. **Epidem. Infect.**, v. 136, p. 721–738, 2008.
- HEROVEN, A. K.; NUSS, A. M.; DERSCH, P. RNA-based mechanisms of virulence control in *Enterobacteriaceae*. **RNA Bio.**, v. 0, p. 1–17, 2016.
- ISIDEAN, S. D. et al. A systematic review of ETEC epidemiology focusin on colonization factor and toxin expression. **J. Vaccine**, 2011.
- JOHNSON, A. M. et al. Heat-labile enterotoxin promotes *Escherichia coli* adherence to intestinal epithelial cells. **J. Bacteriol.**, v. 191, p. 178-186, 2009.
- KANSAL, R. et al. Transcriptional Modulation of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Virulence Genes in Response to Epithelial Cell Interactions. **Infect. Immun.**, v.81, p.259-270, 2013.
- KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Rev.**, v. 2, p. 123-140, 2004.
- LASARO, M. A. et al. Genetic Diverse of Heat-Labile Toxin Expressed by Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strains Isolated from Humans. **J. Bacteriol.**, v. 190, p. 2400-2410, 2008.
- LIEVIN-Le M.; SERVIN, A. L. The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides and microbiota. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 19, p. 315-337, 2006.
- LOTHIGIUS, A. et al. Survival and gene expression of enterotoxigenic *Escherichia coli* during long-term incubation in sea water and freshwater. **J Appl Microbiol.**, v. 108, p. 1441–1449, 2010.

- LOZER, D. M. et al. Genotypic and phenotypic analysis of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from Brazilian children living in low socioeconomic level communities. **BMC Infect. Dis.**, v. 13, p. 418-424, 2013.
- MCCORMICK, B; FINLAY, B. Special Edition of Gut Microbes. **Gut Microbes**, v. 3, n. 2, p. 1, 2012.
- McDANIEL, 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. U. S. A.**, v. 92, n. 5, p. 1664-1668, 1995.
- MORENO, A. C. et al. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 66, n. 1, p. 50-57, 2010.
- MUNSON, G. P. Virulence regulons of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Immunol. Res.**, v. 57, p. 229-236, 2013.
- NARA, J. M. et al. Differentiation of typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* using colony immunoblot for detection of bundle-forming pilus expression. **J. Appl. Microbiol.**, v. 109, p. 35-43, 2010.
- NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 1, p. 142-201, 1998.
- NATARO, J. P. Pathogenesis - Thoughts from the Front Line. **Microbiol. Spectr.**, vol. 3, p. 1-7, 2015..
- NAVARRO-GARCIA, F. et al. Actin cytoskeleton manipulation by effector proteins secreted by diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes. **Biomed Res Int.**, v. 2013, p. 1-22, 2013.
- NAWAR, H. F. et al. LT-IIc, a New Member of the Type II Heat-Labile Enterotoxin Family Encoded by an *Escherichia coli* Strain Obtained from a Nonmammalian Host. **Infect. Immun.**, v.78, p. 4705–4713, 2010.
- NICKLASSON, M. et al., Expression of colonization factor CS5 of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) is enhanced in vivo and by the bile component Na glycocholate hydrate. **PLoS ONE**, v. 7, ed. 4, 2012.
- NUNES, M. R. Attaching and effacing *Escherichia coli* and Shiga toxin-producing *E. coli* in children with acute diarrhoea and controls in Teresina/PI, Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 106, n. 1, p. 43-47, 2012.
- ODOMUSU, O. et al. AB toxins: A Paradigm Switch from Deadly to Desirable. **Toxins**, v. 2, p. 1612-1645, 2010.
- ORLANDI, P. P. et al. Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho (Rondônia, Western Amazon region, Brazil). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 39, n. 4, p. 507-517, 2006.
- QADRI, F. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 18, p. 465-483, 2005.
- PATON, J. C; PATON, A. W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.11, n.3, p.450-479, 1998.
- ROCHA, L. B. et al. Different assay conditions for detecting the production and release of heat-labile and heat-stable toxins in enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Toxins**, v. 5, p. 2384-2402, 2013.
- SACK, R. B. Human diarrheal disease caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 29, p. 333-353, 1975.
- SAHL, J.W.; RASKO, D.A. Analysis of global transcriptional profiles of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolate E24377A. **Infect. Immun.**, v. 80, p. 1232–1242. 2012.

- SCHULZ, S. et al. Guanylyl cyclase is a heat-stable enterotoxin receptor. **Cell**, v.63, p. 941-948, 1990.
- SHAW, R. K. et al. Flagella mediate attachment of enterotoxigenic *Escherichia coli* to fresh salad leaves. **Environ. Microbiol. Rep.**, v. 3, p. 112–117, 2011.
- SJÖLING, A. et al. Comparative analyses of phenotypic and genotypic methods for detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* (EPEC) toxins and colonisation factors. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, p. 3295–3301, 2007.
- SPANGLER, B. D. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **Microbiol. Rev.**, v. 56, p. 622-647, 1992.
- STURBELLE, R. T. et al. The role of quorum sensing in *Escherichia coli* (EPEC) virulence factors. **Vet. Micro.**, v. 180, p. 245-252, 2015.
- TAXT, A. et al. Heat-stable enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli* as a vaccine target. **Infect. Immun.**, v.78, p. 1824-1831, 2010.
- TRATABRASIL. **Saneamento é saúde**, 2016. Disponível em: <http://www.tratabrasil.org.br/saneamento-e-saude-3>. Acesso em: 02 set. 2016.
- TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; GOMES, T. A. T. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emer. Infect. Dis.**, v. 8, n. 5, p. 508-513, 2002.
- WALTERS, M.; SPERANDIO, V. Autoinducer 3 and Epinephrine Signaling in the Kinetics of Locus of Enterocyte Effacement Gene Expression in Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v.74, p. 5445-5455, 2006.
- WANG, A. M.; DOYLE, M. V.; MARK, D. F. Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. **Proc. Nat. Acad. Scien. USA**, v. 86, n. 24, p. 9717-9721, 1989.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Diarrhoea disease the world health**. 2013. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/index.html>. Acesso em: 20 set. 2013.