

JÚLIA MITICO NARA

ADESINAS FIMBRIAIS EM *Escherichia coli*

ENTEROPATOGÊNICA ATÍPICA:

PREVALÊNCIA E PROTEÔMICA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2012

JÚLIA MITICO NARA

**ADESINAS FIMBRIAIS EM *Escherichia coli*
ENTEROPATOGÊNICA ATÍPICA:
PREVALÊNCIA E PROTEÔMICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Prof. Dra. Roxane Maria
Fontes Piazza

Co-orientador: Prof. Dr. Daniel
Carvalho Pimenta

Versão original

São Paulo
2012

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

reprodução não autorizada pelo autor

Nara, Júlia Mítico.

Adesinas fimbriais em *Escherichia coli* enteropatogênica atípica: prevalência e proteômica / Júlia Mítico Nara. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profª Dra. Roxane Maria Fontes Piazza.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Proteômica bacteriana

Versão do título para o inglês: Fimbrial adhesins in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*: prevalence and proteomics.

Descritores: 1. *Escherichia coli* 2. Genes 3. Proteínas 4. Reação em cadeia por polimerase (PCR) 5. Espectrometria de massas (MS) prevalência e proteômica I. Piazza, Profª Dra. Roxane Maria Fontes II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB020/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Júlia Mitico Nara.

Título da Tese: Adesinas fimbriais em *Escherichia coli* enteropatogênica atípica: prevalência e proteômica.

Orientador(a): Profª Dra. Roxane Maria Fontes Piazza.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a) () Reprovado(a)

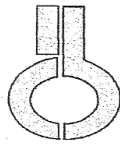
Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



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) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob n° 047 nas fls. 45 do livro 2 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de **Roxane Maria Fontes Piazza** Coordenador(a) da Linha de pesquisa "**Análise proteômica de adesinas fimbriais de Escherichia coli enteropatogênica atípica**" do qual participou(aram) o(s) alunos **Júlia Mítico Nara**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **17.05.2007**.

São Paulo, 18 de maio de 2007.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária -Suplente
CEEA - ICB/USP

Agradecimentos

À minha orientadora Dra. Roxane Maria Fontes Piazza, pela oportunidade de retornar ao Laboratório de Bacteriologia e desenvolver este trabalho, que muito contribuiu com um passo a mais no meu desenvolvimento profissional. Muito obrigada por tudo!

Ao meu co-orientador Dr. Daniel Carvalho Pimenta, o *expert* em espectrometria de massas, que soube explicar e orientar a cada passo deste estudo, no qual sem a sua inestimável colaboração não se realizaria. Meu muito obrigado!

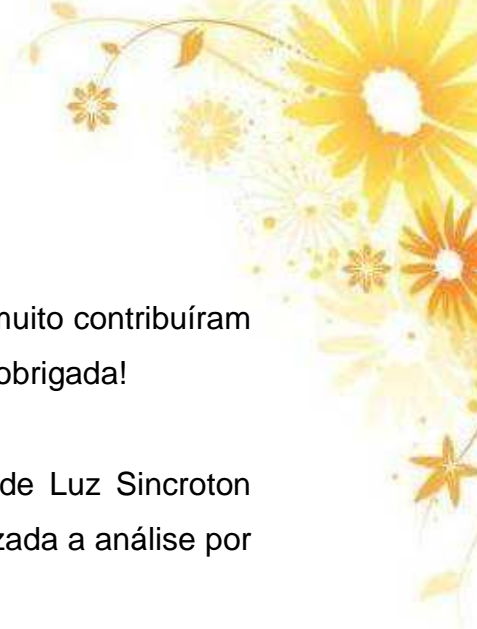
À Dra. Patrícia Abreu de Aniz, agradeço pelas sugestões e disponibilidade por me ensinar a trabalhar com proteoma, base fundamental para a realização deste estudo.

À Dra. Solange Massa do Laboratório de Imunogenética, agradeço por sua disponibilidade e boa vontade ao me explicar como utilizar o *software ImageMaster™ 2D Platinum 6.0*, importantíssimo para análise dos géis 2D.

À Dra. Cecília Abe do Laboratório de Biologia Celular, agradeço pela sua inestimável colaboração na obtenção das imagens por microscopia. Obrigada!

Aos Drs. Waldir Pereira Elias Jr. e Sérgio Paulo Dejato da Rocha, agradeço as sugestões que muito contribuíram na padronização dos ensaios de PCR.

À Dra. Claudia Trigo Pedroso de Moraes e a Natalia Cristina de Freitas pela grande contribuição técnica, na produção dos diferentes ensaios de bancada, realizada ao longo deste estudo. Muito obrigada!



À Dra. Denise Horton, agradeço pelas sugestões que muito contribuíram na elaboração escrita desta tese e de outros trabalhos. Muito obrigada!

À Dra. Adriana Paes Leme do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), responsável pelo Laboratório de Massa onde foi realizada a análise por ESI-Q-Tof das proteínas identificadas neste estudo.

Às Dras. Tânia Gomes do Amaral e Beatriz Guth do departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), que gentilmente forneceram várias das cepas de *E. coli*, utilizadas como controles nos ensaios de PCR.

Aos amigos de bancada: Cris Souza, Dani, Letícia, Márcio, Sarita, Fran, Tati, Keyde, Carol Menezes, Hebert e Cris Culler, Marina, Silvio, Gabi, Chris Ozaki e Cíntia pelo convívio diário compartilhando idéias, sugestões e brincadeiras.

Aos funcionários do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan: Demétria, Edson, Eliane, Juliana, Juscelino, Maria, Regina, Sebastiana e Thaís que gentilmente e com disposição, muito contribuem no cotidiano para facilitar o trabalho de pesquisadores e estudantes, através do apoio de serviço técnico realizado por vocês. Obrigada!

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa Científica do Estado de SP) pelo apoio financeiro, que foi de fundamental importância, durante o desenvolvimento deste estudo.

Meus sinceros agradecimentos a todos vocês.



Resumo

NARA, J. M. **Adesinas fimbriais em *Escherichia coli* enteropatogênica atípica: prevalência e proteômica.** 2012. 148 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Escherichia coli enteropatogênica atípica (EPECa) emergiu mundialmente como uma significativa causa de diarreia pediátrica. Em células epiteliais *in vitro*, devido à ausência da fímbria *Bundle-Forming Pilus* (BFP), esse patotipo não apresenta o padrão de adesão localizado em 3 h observado nas EPEC típicas. Por outro lado, os isolados de EPECa podem não aderir ou apresentar os padrões de aderência localizado-*like*, agregativo, difuso ou indeterminado. Como esses fenótipos de aderência são também observados em outros patotipos de *E. coli*, o objetivo deste estudo foi pesquisar nas EPECa a presença de genes de adesinas encontrados em outras *E. coli* patogênicas e analisar comparativamente por proteoma os extratos protéicos dos isolados de EPECa BA320 (localizado-*like*), Ec292/84 (agregativo), 9100-83 (difuso) e BA4013 (não aderente). Por microscopia eletrônica de transmissão observou-se a presença de diferentes estruturas filamentosas ancoradas a superfície nos quatro isolados de EPECa. Também verificou-se a presença dos genes *fimA*, *fimH*, *papA*, *ecpA*, *IdaH*, *pilS*, *daaC*, *sfpA*, *lpfA*₀₁₁₃ e os variantes polimórficos (*lpfA1* e *lpfA2*) por PCR. Enquanto, por proteômica, utilizando gel 2D e LC-MS/MS, foram identificadas nos extratos protéicos das EPECa, extraídos com *Omnimixer* e precipitados com sulfato de amônio, diversas proteínas envolvidas em diferentes processos funcionais das bactérias, incluindo proteínas indiretamente envolvidas no mecanismo de adesão bacteriana. Entre as estruturas encontradas estão: uma proteína envolvida no processo de regulação transcricional (*Histone-like Nucleoid Structuring*, H-NS), uma proteína de membrana (*Outer membrane protein*, OmpX), as proteínas metabólicas *Universal stress protein* (Usp), a glicoproteína *L-Fucose mutarotase* (FucU) e a proteína transportadora *galactose-binding transport* (MglB) associadas ao processo de funcionamento das adesinas fimbriais de *E. coli*. Nos extratos protéicos também foram identificadas algumas proteínas hipotéticas, dentre as quais se destaca uma possível proteína filamentososa encontrada nas EPECa com os fenótipos de adesão localizado-*like*, agregativo e difuso. Os resultados obtidos nos permitem concluir que os genes que codificam a fímbria tipo 1 e a fímbria ECP são altamente prevalentes nos isolados de EPECa e que as proteínas identificadas no proteoma dos quatro isolados de EPECa, que estão relacionadas as diferentes funções bacterianas, podem funcionar como complexos protéicos, direta ou indiretamente, envolvidos no processo de adesão.

Palavras-chaves: EPECa. Genes. Fímbrias. Proteoma. PCR. Gel de eletroforese 2D. LC-MS/MS.

Abstract

NARA, J. M. **Fimbrial adhesins in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*: prevalence and proteomics**. 2012. 148 p. PhD thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) have emerged as a significant cause of pediatric diarrhea worldwide. Due to the absence of BFP fimbriae (bundle-forming pili), aEPEC are unable to develop the 3 h-localized adherence pattern observed in typical EPEC. Since some aEPEC show the adherence phenotype observed for other pathotypes of *E. coli*, the aim of this study was to investigate, in aEPEC, the presence of adhesin genes found in other pathogenic *E. coli* and to analyze, by comparative proteomic analyses, the protein extracts isolated from aEPEC BA320 (localized-like), Ec292/84 (aggregative) and 9100-83 (diffuse) and BA4013 (non-adherent). Initially, transmission electron microscopy demonstrated the presence of different filamentous structures anchored to the surface in the four EPEC isolates. PCR analyses of aEPEC revealed the presence of the genes *fimA*, *fimH*, *papA*, *ecpA*, *ldaH*, *pilS*, *daaC*, *sfpA*, *lpfA*₀₁₁₃ and polymorphic variants (*lpfA1* and *lpfA2*), which are also present in other pathotypes of *E. coli*. On the other hand, proteomic analyses of aEPEC extracts obtained with an Omnimixer and precipitated with ammonium sulfate, using 2D gel electrophoresis and LC-MS/MS, identified several proteins involved in different functional processes of bacteria, including proteins involved in the mechanism of bacterial adhesion, namely: a histone-like nucleoid structuring protein (H-NS), an outer membrane protein (OmpX), universal stress proteins (Usp), L-fucose mutarotase (FucU) and galactose-binding transport protein (MglB) associated with the action of adhesins of *E. coli* fimbriae. The protein extract also revealed “hypothetical” proteins, particularly a putative filamentous protein found in aEPEC with the phenotypes of localized-like, diffuse and aggregative adherence. Therefore, we conclude that the genes encoding type 1 fimbriae and ECP fimbriae are highly prevalent in aEPEC isolates, and that the proteins identified in the proteome of four aEPEC strains, which are related to different bacterial functions, can operate as protein complexes, directly or indirectly involved in adhesion processes.

Keywords: aEPEC. Genes. Fimbriae. Proteome. PCR. 2D gel electrophoresis. LC MS/MS.

LISTA DE ABREVIATURAS

ESI-Q-Tof: *Electrospray - Quadrupole - Time of flight*

ORF (*open reading frame*): região de leitura aberta

Fim: Fímbria tipo 1

ECP / *ecp* (*E. coli common pilus*): pilus comum de *E. coli*

Esp / *esp* (*EPEC secreted proteins*): proteínas secretadas de EPEC

H-NS: *Histone-like Nucleoid Structuring protein*

Usp (*Universal stress protein*): proteína universal de stress

Omp (*Outer membrane protein*): proteína de membrana externa

MglB: *galactose-binding transport protein*

FucU: *L-fucose mutarotase*

ALL: **A**desão **L**ocalizada-**L**ike

AA: **A**desão **A**gregativa

AD: **A**desão **D**ifusa

NA: **N**ão **A**derente

LEE: *Locus of Enterocyte Effacement*

TTSS (*Type III Secretion System*): sistema de secreção do tipo III

eae : *EPEC attaching and effacing*

EAF (*EPEC adherence factor*): fator de aderência de EPEC

BFP / *bfp*: *bundle-forming pilus*

LPF / *lpf* (*Long Polar Fimbriae*): fímbria polar longo

Lng: **L**ongus

sfp (*sorbitol-fermenting pilus*): pili fermentadora de sorbitol

CFs (*Colonization Factors*): fatores de colonização

CS (*Coli Surface antigen*): antígenos da superfície de *coli*

AAFs (*Aggregative Adherence Fimbriae*): fímbrias de adesão agregativa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática <i>chaperone - usher</i> da fímbria P (Pap).....	25
Figura 2 - Representação esquemática <i>chaperone - usher</i> da fímbria tipo 1 (Fim).....	27
Figura 3 - Representação esquemática da localização hipotética das proteínas R64 Pil.	37
Figura 4 - Representação esquemática da formação do filamento de actina na montagem do pedestal.....	41
Figura 5 - Representação esquemática da ilha de patogenicidade LEE em EPEC	42
Figura 6 - Representação esquemática do aparato que forma o sistema de secreção tipo III, presente em EPEC e EHEC.....	43
Figura 7 - Processo de injeção do Electrospray.....	52
Figura 8 - Representação esquemática do analisador quadrupolo	54
Figura 9 - Representação esquemática dos detectores de Tof.....	55
Figura 10 - Perfil eletroforético em gel de agarose dos fragmentos amplificados nas reações com o gene <i>fimA</i>	77
Figura 11 - Perfil eletroforético em gel de agarose dos fragmentos amplificados nas reações com o gene <i>fimH</i>	77
Figura 12 - Perfil eletroforético em gel de agarose dos fragmentos amplificados nas reações com o gene <i>ecpA</i>	78
Figura 13 - Perfil eletroforético em gel de agarose dos fragmentos amplificados nas reações com o gene <i>lpfA</i> _{O113}	78

Figura 14 - Perfil eletroforético em gel de agarose dos fragmentos amplificados nas reações com o gene <i>lpfA1-2</i>	79
Figura 15 - Perfil eletroforético em gel de agarose dos fragmentos amplificados nas reações com o gene <i>lpfA1-3</i>	79
Figura 16 - Perfil eletroforético em gel de agarose dos fragmentos amplificados nas reações com o gene <i>lpfA2-1</i>	80
Figura 17 - Prevalência dos genes de adesinas de <i>E. coli</i> patogênicas em EPECa	83
Figura 18 - Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) das estruturas filamentosas de EPECa.....	85
Figura 19 - MET do processo de extração de fímbrias.	86
Figura 20 - Eletroforese bidimensional (2D) do extrato proteico do isolado 9100-83 focalizado em fita de pH 3-10.....	88
Figura 21 - 2D dos extratos protéicos dos isolados BA320, Ec292/84, 9100-83 e BA4013 focalizado em fita de pH 4-7.	89
Figura 22 - Imagens tridimensionais (3D)	90
Figura 23 - Funções das proteínas identificadas nos isolados de EPECa	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - CFs produzidos por cepas humanas de ETEC	30
Tabela 2 - Isolados bacterianos controles.....	57
Tabela 3 - Isolados de EPECa pesquisados por PCR	58
Tabela 4 - Condições de amplificação dos genes para PCR	60
Tabela 5 - Massa molecular e ponto isoelétrico das fímbrias dos patótipos de <i>E. coli</i>	73
Tabela 6 - Prevalência dos genes de adesinas de <i>E. coli</i> patogênicas nos quatro isolados de EPECa	76
Tabela 7 - Genes de adesinas e padrões de aderência dos 59 isolados de EPEC atípica.....	81
Tabela 8 - Valores de área, volume e intensidade dos <i>spots</i>	90
Tabela 9 - Proteínas identificadas em EPECa BA320.....	92
Tabela 10 - Proteínas identificadas em EPECa Ec292/84	93
Tabela 11 - Proteínas identificadas em EPECa 9100-83	94
Tabela 12 - Proteínas identificadas em EPECa BA4013	95
Tabela 13 - Proteínas identificadas em EPECa funcionalmente relacionadas as adesinas fimbriais de <i>E. coli</i>	97

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	21
3	REVISÃO DA LITERATURA	22
3.1	<u>Escherichia coli</u> PATOGÊNICAS: FATORES DE VIRUÊNCIA E MECANISMOS DE ADESÃO	23
3.1.1	<u>Escherichia coli</u> uropatogênica (UPEC)	23
3.1.2	<u>Escherichia coli</u> enterotoxigênica (ETEC)	29
3.1.3	<u>Escherichia coli</u> difusamente aderente (DAEC)	32
3.1.4	<u>Escherichia coli</u> enteroagregativa (EAEC)	33
3.1.5	<u>Escherichia coli</u> produtora da toxina <i>Shiga</i> (STEC)	38
3.1.6	<u>Escherichia coli</u> enteropatogênica (EPEC)	41
3.1.6.1	Escherichia coli enteropatogênica típica (EPECt)	44
3.1.6.2	Escherichia coli enteropatogênica atípica (EPECa)	46
3.1.6.2.1	<u>Importância de EPECa na epidemiologia das doenças diarreicas</u>	48
3.2	<u>PROTEOMA E ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MS)</u>	50
3.2.1	<u>Electrospray (ESI)</u>	51
3.2.1.1	Quadrupolo	52
3.2.1.2	Time of flight (Tof)	54
4	MATERIAL E MÉTODOS	56
4.1	<u>ISOLADOS BACTERIANOS</u>	56
4.2	<u>REAÇÕES DE POLIMERASE EM CADEIA (PCR)</u>	59
4.2.1	<u>Extração do DNA genômico de lisado bacteriano</u>	63
4.2.1.1	Choque térmico	63
4.2.1.2	Digestão enzimática	63

4.3	<u>EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DOS ISOLADOS DE EPECa</u>	65
4.4	<u>MICROSCOPIA ELETRONICA DE TRANSMISSÃO</u>	67
4.5	<u>GEL BIDIMENSIONAL (2D)</u>	67
4.5.1	<u>Primeira Dimensão: separação das proteínas por gradiente de pH</u>	67
4.5.1.1	Reidratação em <i>DeStrek</i>	67
4.5.1.2	Focalização da fita	68
4.5.1.3	Equilíbrio da fita	68
4.5.2	<u>Segunda Dimensão: separação das proteínas por migração eletroforética</u>	68
4.6	<u>COLORAÇÃO DAS PROTEÍNAS COM NITRATO DE PRATA</u>	69
4.7	<u>ESPECTROMETRIA DE MASSAS</u>	70
4.7.1	<u>Digestão enzimática <i>in gel</i></u>	70
4.7.1.1	Remoção de SDS, redução, alquilação e digestão	70
4.7.1.2	Extração dos peptídeos trípticos	71
4.8	<u>PEPTIDE MASS FINGERPRINT (PMF)</u>	71
4.8.1	<u>Análise dos peptídeos trípticos em <i>Electrospray Quadrupole – Time of Flight Mass Spectrometry (ESI-Q-Tof)</i></u>	71
4.8.2	<u>Parâmetros MASCOT utilizados para a identificação das proteínas em banco de dados</u>	74
5	RESULTADOS	75
5.1	<u>PESQUISA DOS GENES DE ADESINAS NOS ISOLADOS DE EPECa BA320, EC292/84, 9100-83 E BA4013</u>	75
5.2	<u>PESQUISA DOS GENES DE ADESINAS EM 59 ISOLADOS DE EPECa</u>	80

5.3	<u>PREVALÊNCIA DOS GENES DE ADESINAS DE <i>E. coli</i> PATOGÊNICAS NAS EPECa</u>	82
5.4	<u>QUANTIFICAÇÃO DOS EXTRATOS PROTÉICOS EXTRAÍDOS COM OMNIMIXER G20</u>	84
5.5	<u>MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO</u>	84
5.6	<u>GEL BIDIMENSIONAL (2D)</u>	87
5.7	<u>PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR MASCOT</u>	91
6	DISCUSSÃO	98
7	CONCLUSÃO	111
	REFERÊNCIAS	112
	ANEXOS	148
	Artigos de periódicos	148
	I. Publicados	148
	II. Submetido	148

1 INTRODUÇÃO

Escherichia coli enteropatogênica (EPEC) é uma das seis categorias de *E. coli* diarreiogênicas (DEC). Este patotipo é composto por dois subgrupos denominados como EPEC típica (EPECt) e EPEC atípica (EPECa) (KAPER, 1996). Ambos subgrupos, além da *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), possuem a capacidade de promover a lesão *attaching/effacing* (A/E) mediada por genes localizados em uma ilha de patogenicidade denominada *locus of enterocyte effacement* (LEE) (MCDANIEL et al., 1997).

Uma das características utilizadas para a classificação dos patotipos que compõem as DEC é o padrão de adesão às células epiteliais *in vitro*. Diferentemente das EPECt, que apresentam padrão de adesão localizada (SCALETSKY; SILVA; TRABULSI, 1984), as EPECa apresentam diferentes fenótipos de aderência à células HEp-2 (ABE et al., 2009; MORA et al., 2009). Dentre os fenótipos observados, encontram-se os padrões agregativo-AA e difuso-DA que inicialmente foram características descritas em *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC), respectivamente (SCALETSKY, SILVA, TRABULSI, 1984; NATARO et al., 1987).

A adesão é um processo essencial tanto para a manutenção da microbiota intestinal, quanto para a patogênese bacteriana, sendo pré-requisito para que as cepas de *E. coli* colonizem com sucesso a mucosa do hospedeiro. As adesinas são estruturas protéicas bacterianas, que reconhecem e se ligam a receptores específicos presentes na superfície da célula hospedeira, estas podem ser classificadas em não fimbriais, que são proteínas de membrana externa, ou fimbriais (BRINTON, 1965).

As estruturas filamentosas, que são apêndices bacterianos não flagelares, ancoradas à membrana externa da bactéria são denominadas de pili/fímbria e filamentos/agulha. As estruturas do tipo “pili” ou “fímbrias” são

empregadas na fixação e/ou invasão bacteriana, formação de biofilme, autoagregação, *twitching motility* e transporte de material genético através das membranas (CRAIG et al., 2004; FRONZES; REMAUT; WAKSMAN, 2008). Por outro lado, os termos “filamentos” e “agulhas” são utilizados para designar os apêndices que compõem o sistema de secreção do tipo III (TTSS), um complexo injetor de proteínas efetoras através da qual ocorre o transporte de macromoléculas expressas pela bactéria à célula hospedeira (CORNELIS, 2006).

Nos principais patótipos de *E. coli* patogênica, as fímbrias propostas envolvidas na adesão são: as fímbrias do tipo 1, P, S e F1C de *E. coli* uropatogênica (UPEC), *Bundle-forming pilus* (BFP) de EPEC típica, a fímbria polar longo (LPF) de EHEC, a pili fermentadora de sorbitol (Sfp) de *E. coli* produtora da toxina *Shiga* (STEC), os fatores de colonização (CFs) de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), as fímbrias de adesão agregativa (AAFs) de *E. coli* enteroagregativa típica (EAECt), a fímbria Pil de EAEC atípica (EAECa) e a fímbria F1845 de *E. coli* difusamente aderente (DAEC). Além das fímbrias, estudos realizados por Ebel et al. (1998) e Cleary et al. (2004) também sugerem que os filamentos de EspA do TTSS produzidas por EHEC e EPEC podem estar envolvidas no processo de fixação bacteriana.

As cepas de UPEC expressam as fímbrias do tipo 1 (CONNEL et al., 1996), a fímbria P (BAGA et al., 1987), a fímbria S (KORHONEN; VIRKOLA; HOLTTHOFER, 1986) e a F1C (HACKER et al., 1993). Essas são responsáveis por infecções extra-intestinais, associadas à bacteremia, cistite, pielonefrite e meningite (JOHNSON, 1991; CONNELL et al., 1996; RUSSO; JOHNSON, 2000). Além disso, estão envolvidas no processo de adesão e ocasionalmente na invasão do tecido hospedeiro (MULVEY, 2002; WRIGHT; HULTGREN, 2006).

Dentre as adesinas fimbriais de EHEC, a fímbria polar longo (LPF) similar a fímbria de *Salmonella enterica serovar Typhimurium* (PERNA et al., 2001) foi detectada em isolados dos sorogrupos O157 e O145 (SZALO et al.,

2002) e também em isolados de STEC LEE negativo de sorotipo O113:H21 (OSEK; WEINER; HARTLAND, 2003). Coelhos e cordeiros foram utilizados como modelo animal de infecção, para demonstrar que a fímbria LPF está envolvida na adesão inicial à célula hospedeira e a persistência bacteriana intestinal (NEWTON et al., 2004; TORRES et al., 2007). Por sua vez, Sfp é uma fímbria manose resistente codificada por um conjunto de genes localizados no plasmídeo pSFO157, presente em STEC O157:NM (BRUNDER et al., 2001).

A colonização do intestino delgado humano por ETEC depende principalmente da expressão de diversas proteínas de superfície, conhecidas como fatores de colonização (CFs). Os CFs são classificados de acordo com sua especificidade antigênica e são chamados de fator antigênico de colonização (CFAs), antígenos da superfície de *coli* (CS) no qual se inclui a fímbria longus (CS21) e os possíveis fatores de colonização (PCFs) (QADRI et al., 2005). Além da classificação antigênica, os CFs podem ser subdivididos com base em sua estrutura como sendo: fimbriais, fibrilares, helicoidais, em forma de feixe (longus) e adesinas não fimbriais.

As cepas de EAEC típica expressam pelo menos quatro adesinas fimbriais, associados ao fenótipo agregativo de adesão ao enterócito, denominadas AAF I, II, III e IV (NATARO et al., 1992; CZECHULIN et al., 1997; BERNIER; GOUNON; LE BOUGUENEC, 2002; BOISEN et al., 2008). AAF estão relacionadas às adesinas da família Dr (SAVARINO et al., 1994) pois possuem as mesmas regiões conservadas nos genes que codificam a proteína de membrana externa (*usher*) e a proteína periplasmática (chaperonina) (SERVIN, 2005). Por outro lado, diferentemente das fímbrias AAF, a fímbria Pil é produzida por uma EAEC atípica, assim denominada devido a ausência do ativador transcricional *aggR* (DUDLEY et al., 2006).

Por sua vez, a adesina fimbrial F1845, caracterizada na cepa C1845 de DAEC, medeia a adesão difusa às células epiteliais (BILGE et al., 1989). A adesão de cepas de DAEC que expressam F1845 induz diferentes respostas

celulares, incluindo alongamento da célula infectada, nucleação das microvilosidades, formação de projeções na membrana e o rearranjo de F-actina (BERNET-CAMARD et al., 1996).

Duas estruturas foram descritas em isolados de EPEC atípicas envolvidas no processo da adesão difuso em células epiteliais. Uma das adesinas identificadas é uma estrutura fibrilar, denominada *Diffuse Adherence Fibrillar Adhesin* (Afa) que possui homologia com AfaE-1, descrita como adesina não-fimbrial, encontrada em *E. coli* uropatogênica (KELLER et al., 2002). A outra adesina encontrada foi denominada como locus para aderência difusa (*Ida*), identificada inicialmente no isolado de EPECa O26:H11 (SCALETSKY et al., 2005).

Aparentemente as bactérias possuem formas sofisticadas para selecionar, conectar e infectar as células-alvo e durante esses eventos os principais protagonistas são os apêndices filamentosos secretores, as adesinas fimbriais e não-fimbrias (KROGFELT, 1991; EBEL et al., 1998; CLEARY et al., 2004, FRONZES; REMAUT; WAKSMAN, 2008). Entretanto, as enterobactérias ainda necessitam de uma complexa combinação de sinais físico-químicos (temperatura, pH, osmolaridade e nutrientes disponíveis) (EDWARDS; PUENTE, 1998), enzimas, metabólitos, proteínas estruturais e reguladores transcricionais (OTTO et al., 2004; NACHIN et al., 2005; HAN et al., 2007; TORRES et al., 2008; LEE et al., 2009). A combinação entre esses fatores podem prover as enterobactérias a capacidade de identificar o nicho apropriado e estimular a expressão dos genes fimbriais e não-fimbriais, resultando na ligação específica à célula hospedeira.

Por outro lado, ainda não foi descrito em isolados de EPEC atípica nenhum fator de virulência especificamente associado aos fenótipos de adesão demonstrados por essas cepas, ao passo que fenótipos agregativo e difuso são observados, nos patotipos EAEC e DAEC, respectivamente. Nesses dois patotipos, os padrões de aderência bacteriana estão associados à expressão

de fímbrias de diferentes tipos, já caracterizadas, que foram abordadas nesta introdução e que serviram como subsídio aos objetivos deste trabalho.

2 OBJETIVOS

- 1.** Pesquisar, em isolados de EPEC atípica, a presença de genes que codificam adesinas de *E. coli* patogênicas.

- 2.** Analisar, comparativamente, por proteoma os extratos protéicos dos isolados de EPECa BA320 (localizado-*like*), Ec292/84 (agregativo) e 9100-83 (difuso) e BA4013 (não aderente).

3 REVISÃO DA LITERATURA

As doenças diarreicas continuam sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade infantil no mundo, principalmente relacionadas à contaminação de alimentos e fontes de água (WHO, 2009), uma vez que aproximadamente 1 bilhão de pessoas carecem de acesso à água tratada e 2,5 bilhões não têm acesso a saneamento básico (WHO, 2009). Desde 1980, a Organização Mundial de Saúde reconhece que a diarreia persistente é uma área prioritária de pesquisa (WHO, 1988), uma vez que estudos identificaram fatores de risco, tais como: problemas nutricionais e o uso indiscriminado de antibióticos, infecções no trato urinário e respiratório inferior, que podem contribuir para o agravamento da diarreia persistente podendo inclusive levar a morte (UMAMAHESWARI et al., 2010). Estima-se que mundialmente ocorram, a cada ano, cerca de 4 bilhões de casos diarreicos (revisado por UNICEF et al., 2010). Doenças diarreicas foram responsáveis por 6,9% dos óbitos ocorridos no mundo, sendo a segunda principal causa de morte por infecção, ficando atrás somente das doenças respiratórias como a pneumonia (WHO, 2009). Dentre os óbitos, estima-se a morte de 1,5 milhões de crianças com idade inferior a 5 anos por doenças diarreicas (revisado por UNICEF et al., 2010). Entre os casos de diarreia aguda apresentada por crianças, estima-se que entre 3% e 19% destas podem tornar-se persistentes (LIMA, GUERRANT, 1992). Outros especialistas estimam que até 50% da mortalidade infantil causada pela diarreia deve-se à sua persistência (MATHERS et al., 2004). Como o número de mortes por diarreia aguda é reduzida após o uso generalizado da terapia de reidratação oral, a contribuição da diarreia persistente na mortalidade global é elevada (ABBA et al., 2009).

Os agentes etiológicos da diarreia incluem uma ampla variedade de vírus, bactérias e parasitas. Entre os patógenos bacterianos, *Escherichia coli* diarreiogênica (DEC) é um dos mais importantes agentes de diarreia endêmica e epidêmica no mundo (NATARO; KAPER, 1998). As cepas de DEC podem ser classificadas em seis principais patotipos [*E. coli* enteropatogênica (EPEC),

E. coli enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC)], com base em suas propriedades específicas de virulência associadas a alguns sorotipos, e nas diferentes características clínicas e epidemiológicas (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

3.1 *Escherichia coli* PATOGÊNICAS: FATORES DE VIRULÊNCIA E MECANISMOS DE ADESÃO

3.1.1 *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC)

O trato intestinal é considerado o reservatório primário para a infecção do trato urinário, onde UPEC, a partir da região anal, passa a ter acesso a região periuretral, atravessando a uretra e estabelecendo a infecção de forma ascendente, migrando da bexiga para os rins (HEPTINSTALL, 1964; CORRIERE et al., 1970; FOWLER; STAMEY, 1977). Portanto, o trato gastrointestinal e o trato urinário representam dois diferentes nichos nutricionais para UPEC (SAVAGE, 1977, NATARO, 2005).

UPEC, pertencente à categoria das *E. coli* patogênicas, são responsáveis por infecções extra-intestinais (ExPEC) (RUSSO; JOHNSON, 2000), sendo um agente causador de infecções no trato urinário associada à bacteremia em crianças e adultos, além de sepse e meningites em neonatos (KUNIN; HALMAGYI, 1962; RUSSO; JOHNSON, 2000). As cepas de UPEC presentes transitoriamente na microbiota fecal possuem grupos específicos de genes que codificam os fatores de virulência (DONNENBERG; WELCH, 1996).

Os fatores de virulência de UPEC estão associados ao antígeno somático (O1, O2, O4, O6, O7, O15, O18, O25, O75 e O83) e ao antígeno capsular (K1 e K2), à presença da proteína de membrana externa (OmpT - protease), à produção de toxinas (α -hemolisina - HlyA, *cytotoxic necrotizing*

factor1 – CNF1 e *protease autotransporter toxin* – Sat), sideróforos (aerobactina), adesinas afimbriais (Afa/Dr) e fímbrias (tipo 1, P, S e F1C) (DONNENBERG; WELCH, 1996; BLANCO et al., 1997; GUYER et al., 2000; MARRS et al., 2005).

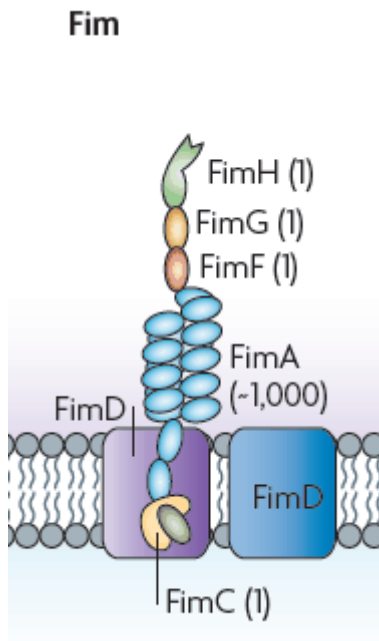
Por ser uma classe de proteínas extracelulares, as adesinas de UPEC promovem a adesão e, em alguns casos, a invasão do tecido hospedeiro (WRIGHT; HULTGREN, 2006).

A fímbria tipo 1 e a fímbria P são expressas pelas cepas de UPEC e pertencem à categoria das fímbrias, conhecidas como *chaperone-usher* (WAKSMAN; HULTGREN, 2009). Essas fímbrias se estruturam na membrana externa bacteriana através de duas proteínas, uma periplasmática (*chaperone*) e outra formadora de poros (*usher*) (SAUER et al., 2004). A *chaperone* facilita o dobramento das subunidades da pilina (BARNHART et al., 2000) impedindo a sua polimerização no periplasma até a sua translocação no *usher* (DODSON et al., 1993; THANASSI et al., 1998). O *usher* desempenha diferentes funções envolvidas na montagem da estrutura fimbrial, tais como: plataforma de montagem, recrutamento das *chaperones* complexadas a subunidades da pilina através do periplasma, coordenação da montagem da pilina e a sua secreção através dos poros (WAKSMAN; HULTGREN, 2009).

As fímbrias do tipo 1 são continuamente expressas por cepas de UPEC que colonizam a bexiga e são causadoras de cistite (CONNELL et al., 1996). A transcrição da fímbria tipo 1 depende do mecanismo de fases *on/off*, para que ocorra a expressão da maior subunidade estrutural da pilina (FimA). Na fase *on*, ocorre o aumento da transcrição do gene *fimA* mediado pela atividade de duas recombinases, denominadas FimE e FimB (GALLY; LEATHART; BLOMFIELD, 1996).

As fímbrias do tipo 1 (**Figura 1**) são formadas por filamentos helicoidais de 7 nm de espessura, constituídas por subunidades de FimA. A essa estrutura encontra-se acoplada a adesina FimH e dois adaptadores FimF e FimG (RUSSELL; ORNDORFF, 1992; JONES et al., 1995).

Figura 1 - Representação esquemática *chaperone* (FimC) - *usher* (FimD) da fímbria tipo 1 (Fim). O número indica a quantidade de cópias em cada subunidade estrutural que compõem as fímbrias.



FONTE: WAKSMAN; HULTGREN, 2009.

A adesina FimH é responsável pela ligação bacteriana a moléculas de superfície conhecidas como receptores *uropalakin*¹ e $\alpha 3\beta 1$ integrina², que estão presentes em células de bexiga e outras células hospedeiras (KROGFELT; BERGMANS; KLEMM, 1990; ZHOU et al., 2001; ETO et al., 2007). Além disso, a presença de FimH na estrutura das fímbrias tipo 1 também medeia a invasão de UPEC em células de bexiga (MARTINEZ et al, 2000;. WRIGHT; SEED; HULTGREN, 2007) via integrinas (SCIBELLI et al., 2007).

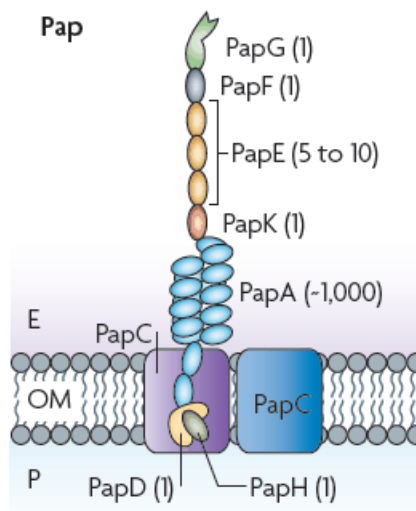
1. *Uropalakin* são subunidades protéicas de 16 nm que formam cristais bidimensionais (0,2 – 1,0 μ m de diâmetro), conhecida como placa urotelial que recobre mais de 90% da superfície apical da célula (KACHAR et al.,1999).

2. Integrinas são proteínas transmembrânicas presentes em células eucarióticas, que medeiam à interação célula-célula ou a ligação entre as proteínas de matriz extracelular e a actina do citoesqueleto, proporcionando uma via de sinalização entre os meios intra e extracelular (SCIBELLI et al., 2007).

Por outro lado, as cepas causadoras de pielonefrite têm a expressão da fímbria tipo 1 reprimida, uma vez que FimE e FimB se encontram na fase *off* de transcrição (GALLY; LEATHART; BLOMFIELD, 1996; GUNTHER et al., 2001). Alguns autores ainda apontam que, a ausência da fímbria tipo 1 propicia a não adesão bacteriana aos receptores *uropalakin* das células epiteliais da bexiga, ocorrendo assim a migração bacteriana pelo ureter até os rins, onde ocorre a fixação da UPEC através da fímbria P (SVANBORG-EDEN; HANSSON, 1978; KORHONEN; VIRKOLA; HOLTHOFER, 1986).

As fímbrias P (**Figura 2**) são formadas por um filamento de 6,8 nm de espessura e constituídas por subunidades de PapA, que gera uma estrutura cilíndrica helicoidal. A subunidade PapH ancora a estrutura helicoidal formada por PapA à membrana externa bacteriana (BAGA et al., 1987). Na extremidade da estrutura fimbrial localiza-se a adesina PapG, associada às subunidades PapE, PapF e PapK, que ligam a adesina PapG ao corpo da fímbria (KUEHN et al., 1992; JACOB-DUBUISSON et al., 1993). A adesina PapG se liga ao receptor de galabiose (Gal α 1–4Gal) presente na superfície do epitélio renal, possibilitando a colonização bacteriana (SVANBORG-EDEN; HANSSON, 1978; KORHONEN; VIRKOLA; HOLTHOFER, 1986). Neste estágio, a hemolisina pode danificar o epitélio renal através da permeabilização da membrana plasmática pela formação de poros (TRIFILLIS et al., 1994). Além disso, a hemolisina, juntamente com o lipopolissacarídeo (LPS), pode levar a uma resposta inflamatória aguda pelo recrutamento de polimorfos nucleares (PMNs) no local da infecção. Em alguns casos, a secreção da autotransportadora Sat responsável pela dissolução da membrana glomerular e a vacuolização de células do túbulo proximal (GUYER et al., 2002), pode causar a destruição das barreiras constituídas pelos túbulos e as bactérias podem invadir o endotélio celular, caindo na corrente sanguínea, causando uma bacteremia (NATARO; KAPER; MOBLEY, 2004).

Figura 2 - Representação esquemática *chaperone* (PapD) - *usher* (PapC) da fímbria P (**Pap**). O número indica a quantidade de cópias em cada subunidade estrutural que compõem as fímbrias.



FONTE: WAKSMAN; HULTGREN, 2009.

As fímbrias S são compostas pela subunidade maior SfaA, além de três subunidades menores SfaG, SfaH e SfaS. A subunidade SfaS localiza-se na extremidade da fímbria e pode mediar a interação bacteriana com resíduos de ácido siálico dos receptores expressos pelo epitélio renal e pelas células endoteliais vasculares (KORHONEN; VIRKOLA; HOLTTHOFER, 1986;. MOCH et al., 1987; MORSCHHAUSER et al., 1990; HANISCH; HACKER; SCHROTEN, 1993). A principal subunidade SfaA também possui características adesivas mediando a adesão bacteriana aos glicolipídeos das células endoteliais (PARKKINEN; HACKER; KORHONEN, 1991; PRASADARAO et al., 1993). As subunidades menores, incluindo a SfaS, também estão envolvidas na modulação das propriedades de ligação da fímbria S (SCHMOLL et al., 1989; MORSCHHAUSER et al., 1993). A fímbria S pode facilitar a disseminação bacteriana no interior do tecido hospedeiro sendo frequentemente associada às cepas de *E. coli* causadoras de sepse, meningite e infecções do trato urinário, incluindo a pielonefrite (KORHONEN et al., 1985; MARRE et al., 1986; PARKKINEN et al., 1988; HACKER et al., 1993). A fímbria F1C (gene *foc*) possui estrutura homóloga a fímbria S, porém difere

desta na afinidade pelo tipo de receptor específico (HACKER et al., 1993). F1C possui uma elevada afinidade pelo dissacarídeo GalNAc β 1-4Gal β , que é encontrado em glicolípidos expressos pelas células epiteliais dos túbulos distais e ductos coletores renais e também por células endoteliais dos rins e da bexiga (KHAN et al., 2000). Sua importância foi demonstrada na formação de biofilme, na aderência em superfícies bióticas e abióticas e na colonização do trato intestinal em filhotes de camundongos murinos (LASARO et al., 2009).

Outros fatores tais como: CNF-1 (DAVIS; RASMUSSEN; O'BRIEN, 2005), os antígenos capsulares (HORWITZ; SILVERSTEIN, 1980) e os sideróforos (RUSSO et al., 2002) também contribuem para a sobrevivência e manutenção das UPEC. A citotoxina CNF-1 atua na ativação de Rho GTPase³ e na modulação da função dos PMNs através da inibição fagocitária (DAVIS; RASMUSSEN; O'BRIEN, 2005). Por outro lado, o antígeno capsular, além de inibir a ativação do sistema complemento, também inibe a fagocitose pelos PMNs, protegendo as UPEC do sistema imune inato (HORWITZ; SILVERSTEIN, 1980). Os sideróforos são usados como um sistema de absorção de ferro pelas UPEC, auxiliando na sobrevivência do microorganismo em ambientes com limitações nutricionais, tal como a bexiga (RUSSO et al., 2002).

3. Rho GTPase pertence à família de enzimas que hidrolisa a guanosina trifosfato (GTP), exercendo o controle sobre processos celulares, tais como: remodelação do citoesqueleto de actina, quimiotaxia e prolongamentos da membrana (LERM; SCHMIDT; AKTORIES, 2000; GARDINER et al., 2002).

3.1.2 Escherichia coli enterotoxigênica (ETEC)

As cepas de ETEC colonizam a mucosa do intestino delgado, onde produzem enterotoxinas responsáveis pela diarreia aguda e aquosa em crianças, além de ser a principal causa da diarreia do viajante, que acomete adultos que visitam áreas endêmicas (NATARO; KAPER, 1998).

Esse grupo de *E. coli* alberga um plasmídeo que contém os genes que codificam o grupo das enterotoxinas (DE GRAAF; GAASTRA, 1994) termo-lábil (LT) e termo-estável (ST) (LEVINE, 1987), que podem ser secretadas em conjunto ou separadamente (NATARO; KAPER, 1998).

A adesão e a colonização do intestino delgado é um fator essencial para a virulência das cepas de ETEC. Diferentes estruturas foram identificadas como prováveis adesinas ou fatores de colonização e são codificadas por genes cromossomais ou plasmideais (FLECKENSTEIN et al., 2010).

Um grupo heterogêneo de proteínas estruturais de superfície, denominadas como fatores de colonização (CFs) foram os primeiros fatores de virulência identificados nas cepas de ETEC (EVANS et al., 1975). Pelo menos 25 diferentes CFs já foram descritos, sendo a maioria deles codificados por genes plasmideais (GAASTRA; SVENNERHOLM, 1996; QADRI et al., 2005).

Os CFs podem ser subdivididos em três grandes grupos (**Tabela 1**), de acordo com suas características estruturais, que podem ser descritos como: fímbria de filamentos rígidos, fímbrias de filamentos flexíveis (*bundle-forming*) e fímbrias de filamentos finos e flexíveis (fibrilas) (NATARO; KAPER, 1998). Dentre as CFs encontramos os fatores antigênicos de colonização (CFA), os antígenos da superfície de *coli* (CS) e os prováveis fatores de colonização (PCF) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Tabela 1 - CFs produzidos por cepas humanas de ETEC.

Fímbrias		
Filamentos rígidos	Diâmetro (nm)	Referências
CFA/I	7	Jordi et al., 1992
CS1	7	Perez-Casal; Swartley; Scott, 1990
CS2	7	Froehlich et al., 1995
CS4	6	Wolf et al., 1989
<i>Bundle-forming</i>		
CFA/III	7	Taniguchi et al., 1995
longus (CS21)	7	Girón et al., 1994
Fibrilas		
CS3	2 a 3	Levine et al., 1984
CS5	5	Clarck; Hauzenroeder; Manning, 1992

A fímbria CFA/I é uma estrutura filamentosa rígida composta por uma única proteína de configuração helicoidal (JANN; HOSCHUTSKY, 1991). A fímbria CFA/II é uma estrutura em forma de fibrila flexível denominada CS3, que pode também estar associada a outros filamentos denominados CS1 e CS2 (LEVINE et al., 1984; SJOBERG et al., 1988). CFA/III é uma fímbria de filamento flexível (*bundle-forming*) com homologia a família das fímbrias do tipo 4 (TANIGUCHI et al., 1995). Enquanto, a fímbria CFA/IV é formada por uma adesina afimbrial CS6 (JANSSON et al., 2009) em conjunto com as fímbrias CS4 ou CS5 (KNUTTON et al., 1989).

Dentre as fímbrias de ETEC, também foi descrito um filamento denominado longus / CS21, que é codificado por um *cluster* formado por 16 ORFs (*open read frame* – região de leitura aberta) de 14 kb contidos no plasmídeo p9034A de 90 Kbp (GIRÓN; LEVINE; KAPER, 1994; GÓMEZ-DUARTE, 1999; GÓMEZ-DUARTE et al., 2007). ORFs contidos em p9034A são denominados: *IngR*, *IngS*, *IngT*, *IngA*, *IngB*, *IngC*, *IngD*, *IngE*, *IngF*, *IngG*, *IngH*, *IngI*, *IngJ*, *IngP*, *IngX1* e *IngX2* (GÓMEZ-DUARTE et al., 2007).

A maior subunidade estrutural repetitiva da fímbria longus (LngA) é codificada por *IngA* e possui uma massa molecular de 22 kDa (GIRÓN et al., 1994). A região N-terminal de LngA apresenta uma sequência de aminoácidos similar a fímbria TcpA de *Vibrio cholerae* e à fímbria BfpA de EPECt (TAYLOR et al., 1987; GIRÓN et al., 1991, 1994).

As demais ORFs de longus codificam proteínas envolvidas na regulação da fímbria [*Ing (R e S)*] e no *twitching motility* [*Ing (H e J)*], enquanto outras codificam a síntese de transglicosilase (*IngT*), pilina-like (*IngB*), lipoproteína de membrana externa (*IngD*), proteína de membrana interna [*Ing (E, F e I)*], proteína periplasmática (*IngG*) e prepilina peptidase (*IngP*). Por outro lado, ainda se desconhece as funções das ORFs de *Ing (C, X1 e X2)* (GÓMEZ-DUARTE et al., 2007).

A comparação molecular e imunológica entre as fímbrias do tipo IV longus e CFA/III mostrou que ambas são homólogas, embora existam certas diferenças no nível de ORFs entre elas (TANIGUCHI et al., 1995; GIRÓN et al., 1997; GÓMEZ-DUARTE, 1999; GÓMEZ-DUARTE, 2007). Dentre as diferenças encontradas destacam-se as ORFs *Ing (X1 e X2)*, que não possuem qualquer homologia com os genes da fímbria CFA/III (GÓMEZ-DUARTE, 2007). Isto poderia explicar as diferenças encontradas na sua forma de apresentação, uma vez que longus são fímbrias polares, enquanto CFA/III apresentam-se de forma peritríquia sobre a superfície bacteriana (GIRÓN et al., 1997).

Além disso, a fímbria longus também foi encontrada em isolados humanos de ETEC em associação aos CFs, principalmente CFA/II, seguido por CFA/I e CFA/IV e produtoras das toxinas ST e LT, sendo mais prevalente em cepas que produzem somente ST (NISHIMURA et al., 2002).

Mazariego-Espinosa et al. (2010), sugeriram a participação da fímbria longus na colonização de células de cólon humano. Esses autores observaram

que a cepa mutada no gene *IngA* mostrou uma significativa diminuição na aderência *in vitro* em células de linhagens de carcinoma de cólon quando comparadas a cepa selvagem. Além disso, os mesmos autores demonstraram que à cepa mutada foi incapaz de dispersar-se sobre a superfície tecidual e colonizar outras áreas, através de *twitching motility*, diferentemente da cepa selvagem E9034A e da cepa mutada complementada com o plasmídeo (pLNgA) - contendo o gene para a montagem da fímbria longus.

3.1.3 *Escherichia coli* difusamente aderente (DAEC)

As cepas de DAEC são definidas por apresentar um padrão difuso de aderência em monocamadas de células HEP-2 (SCALETSKY; SILVA; TRABULSI, 1984). Esse patotipo causa diarreias, particularmente em crianças com a idade variando entre 1 e 5 anos (SCALETSKY et al., 2002).

Aproximadamente 75% das cepas de DAEC expressam uma adesina fimbrial denominada F1845, que foi inicialmente caracterizada na cepa protótipo C1845. O *operon* da fímbria F1845 pode ser encontrado no plasmídeo pF18 de ~60 kb (JOHNSON; NOLAN, 2009). F1845 é formada por um *cluster* de cinco genes (*daaA*, *daaB*, *daaC*, *daaD* e *daaE*) (BILGE et al., 1989). O gene promotor *daaA* apresenta a função de regular a quantidade do produto codificado pelo gene *daaE*, enquanto o gene *daaE* é responsável por codificar uma proteína de 14,3 kDa que constitui a maior subunidade estrutural da fímbria. Além disso, compartilha nucleotídeos homólogos com o gene *daaC* de massa molecular de 95 kDa. Por outro lado, aparentemente o produto dos genes *daaB* e *daaD* não são essenciais para a expressão da fímbria (BILGE et al., 1989, 1993).

A fímbria F1845 pertence à família das adesinas Afa/Dr (Afa-I, Afa-III, Dr, Dr-II) por sua homologia com outros membros desta família (NOWICKI et al., 1990). F1845 reconhece o receptor celular de superfície, denominado CD55

(PEIFFER et al., 1998) ou *decay-accelerating factor* (DAF) (HASAN et al., 2002). Essa característica permite que as cepas bacterianas (diarreio gênicas e uropatogênicas), que expressam as adesinas da família Afa/Dr, promovam aglutinação de hemácias humanas mesmo na presença de manose (propriedade conhecida como hemaglutinação manose-resistente – MRHA) (LE BOUGUÉNEC et al., 2005).

Em função da adesão bacteriana à célula hospedeira, DAEC induz um efeito citopático, caracterizado pela alteração morfológica e o desenvolvimento de prolongamentos celulares que envolvem a bactéria aderida (BERNET-CAMARD et al., 1996). A alteração celular resulta na ativação da cascata de sinalização celular, que envolve as proteínas quinases e o aumento da concentração de íons cálcio (PEIFFER et al., 1998) promovendo o rearranjo da borda em escova e a alteração das atividades funcionais (PEIFFER et al., 2001). Tanto as DAEC quanto as UPEC produzem a toxina autotransportadora Sat que causa o acúmulo de fluídos intestinais (TADDEI et al., 2005). Outra adesina, denominada AIDA-I, é uma proteína de membrana externa, descrita por Benz e Schmidt (1989), que também parece estar associada ao fenótipo difuso de aderência das cepas de DAEC.

3.1.4 *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC)

As cepas de EAEC são mais proeminentemente associadas à diarreia persistente (≥ 14 dias) diagnosticada em crianças, tanto de países em desenvolvimento quanto nos países industrializados (NATARO; KAPER, 1998). EAEC também é responsável por surtos diarreicos causados por alimentos contaminados, sendo assim outra causa da diarreia em viajantes (NATARO; STEINER; GERRANT, 1998). Essas cepas são conhecidas por aderirem a células HEp-2 ou HeLa e também em lamínulas de vidro, em um padrão fenotípico conhecido como agregativo, no qual as EAEC se aderem umas às outras formando uma “parede de tijolos empilhados” (NATARO et al, 1987).

A estratégia básica para a infecção por EAEC, predominantemente na região do cólon intestinal, é a colonização da mucosa que ocorre pela adesão bacteriana em virtude da ação das estruturas denominadas fímbrias de adesão agregativa AAFs expressas pelas EAEC típica (NATARO et al., 1992; CZECZULIN et al., 1997; BERNIER; GOUNON; LE BOUGUÉNEC, 2002; BOISEN et al., 2008) e a fímbria Pil expressa pela EAEC atípica (DUDLEY et al., 2006).

O termo EAEC típica é reservado às cepas que carregam o gene do regulador transcricional *aggR*, membro da família AraC de ativadores (NATARO et al., 1994), enquanto o termo EAEC atípica é reservado às cepas que não albergam o gene deste regulador (DUDLEY et al., 2006).

Em isolados de EAEC típicas foi verificada a expressão das fímbrias denominadas *aggregative adherence fimbriae I* (AAF/I) (NATARO et al., 1992), *aggregative adherence fimbriae II* (AAF/II) (CZECZULIN et al., 1997), *aggregative adherence fimbriae III* (AAF/III) (BERNIER; GOUNON; LE BOUGUÉNEC, 2002), *aggregative adherence fimbriae IV* (AAF/IV) (BOISEN et al., 2008).

A fímbria denominada AAF/I expressa pelo protótipo EAEC 17-2, caracterizada por Nataro et al. (1992), foi descrita como sendo uma estrutura de feixes frouxos (*bundle-forming*) que apresenta fímbrias de 2 a 3 nm de diâmetro e que não possui homologia com os membros da família de fímbrias do tipo IV (TENNANT; MATTICK, 1994).

Os genes responsáveis pela biogênese da AAF/I estão organizados em um *operon* denominado *agg* do plasmídeo pAA1 (~60 MDa). (VIAL et al., 1988). Este *operon* é constituído pelos genes *aggA*, que codifica a pilina (maior subunidade estrutural); *aggB*, que codifica uma proteína crítica; *aggC*, que codifica o *usher*; *aggD*, que codifica a chaperonina e; *aggR*, que é o ativador transcricional dos genes da biogênese da fímbria (SAVARINO et al., 1994).

Em 1997, Czczulin e colaboradores demonstraram que o fenótipo de adesão AA, promovido pela cepa de EAEC 042 é codificado pelo plasmídeo pAA2 (65 MDa). Este alberga o gene *aafA* que codifica a maior subunidade estrutural da fimbria denominada AAF/II, que possui características genóticas e fenóticas distintas da fimbria AAF/I expressa pela cepa 17-2.

Os determinantes genéticos de AAF/II estão localizados em duas regiões não contíguas do plasmídeo pAA2, denominadas *cluster aaf*, composto por cinco genes (*aafA*, *aafB*, *aafC*, *aafD* e *aafR*) responsáveis pela biogênese AAF/II. O gene *aafA* codifica a pilina, *aafB* codifica uma proteína crítica, *aafC* codifica o *usher*, *aafD* codifica a chaperonina e o *aggR* é o ativador transcricional dos genes da biogênese da fimbria. (ELIAS et al., 1999).

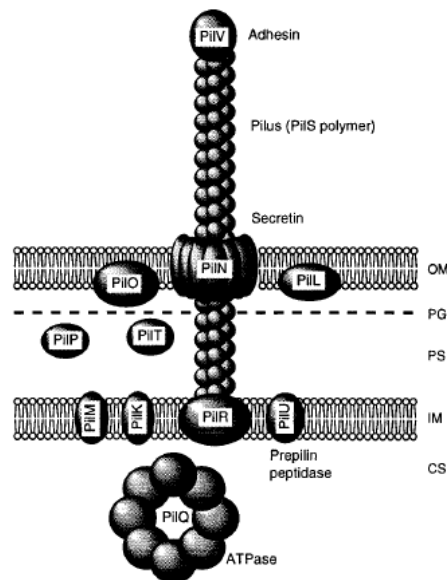
Ao contrário das fímbricas AAF/I e AAF/II, que formam feixes, a fimbria designada AAF/III é constituída por filamentos individuais. A região que compreende os genes responsáveis pela biogênese de AAF/III é denominada de *operon agg3*, sendo constituída pelos genes *agg3A*, *agg3B* e *agg3C*. Essas fímbricas são responsáveis pela aderência à mucosa sendo, conseqüentemente, fatores de colonização intestinal (BERNIER; GOUNON; LE BOUGUENEC, 2002).

Em 2008, BOISEN e colaboradores descreveram outra variante da fimbria AAF, denominada tipo IV ou Hda, expressa pela cepa C1010-00 isolada de caso diarreico (OLESEN et al., 2005). Este isolado demonstrou ser uma EAEC típica, uma vez que foi verificada a presença do ativador transcricional *aggR* e o fenótipo de adesão agregativa em células HEp-2; também apresentou a formação de biofilme em superfície abiótica e ausência dos genes fimbriais *aggA* (AAF/I), *aafA* (AAF/II), *agg3A* (AAF/III) (BOISEN et al., 2008). A análise filogenética realizada por BLAST demonstrou que a fimbria AAF/IV-Hda possui 61% dos aminoácidos idênticos a adesina afimbrial M-aglutinina expressa por *E. coli* uropatogênica (UPEC) (RHEN et al., 1986) e 57% dos aminoácidos idênticos a AfaE-VIII, pertencente à família Dr. AfaE-VIII é comumente produzida por cepas de *E. coli* isoladas de animais com diarreia e sepse e

também em isolados humanos associados a infecções extra-intestinais (LE BOUGUÉNEC; SERVIN, 2006). Além disso, o gene *hdaA* presente no plasmídeo pO86A1, também foi encontrada na UPEC O73:K5:H18 (BOISEN et al., 2008).

Por outro lado, Dudley et al. (2006) verificaram que a cepa C1096, caracterizada como EAEC atípica não possui o regulador transcricional *aggR*, porém alberga o gene *pilS* no plasmídeo pSERB1. Este expressa uma fímbria do tipo IV, que aparentemente contribui para conjugação plasmidial, aderência *in vitro* a célula epitelial HEp-2 e a interação bactéria-bactéria ao biofilme, o que possibilita a aderência bacteriana em uma superfície abiótica. Por sua vez, o plasmídeo R64 de *Salmonella enterica serovar Typhimurium* também possui uma região *pil* responsável por codificar uma fímbria do tipo IV (KIM; KOMANO, 1997). A região R64 *pil* contém 14 genes, nos quais 12 genes *pil* (*K*, *L*, *M*, *N*, *O*, *P*, *Q*, *R*, *S*, *T*, *U* e *V*) (**Figura 3**) são essenciais para a formação da fímbria (YOSHIDA; KIM; KOMANO, 1999). Entre estes genes, há os que codificam lipoproteínas (*pilL*), secretinas (*pilN*), ATPase (*pilQ*), proteína de membrana integral (*pilR*), prepilina (*pilS*), transglicosidase lítica (*pilT*), prepilina peptidase (*pilU*) e adesina (*pilV*) (SAKAI; KOMANO, 2002). O produto de *pilS* é sintetizado como uma prepilina de 22 kDa, que sob a ação da prepilina peptidase forma a pilina madura de 19 kDa (SHIMODA et al., 2008)

Figura 3 - Representação esquemática da localização hipotética das proteínas R64 Pil. Membrana interna (OM), peptidoglicano (PG), espaço periplasmático (PS), membrana interna (IM) e espaço citoplasmático (CS).



FONTE: SAKAI; KOMANO, 2002.

Após a colonização, as EAEC secretam enterotoxinas e citotoxinas, tais como: a peptidase autotransportadora com atividade mucinolítica e hemaglutinante, denominada *protein involved in intestinal colonization* (Pic) (HENDERSON et al., 1999); a enterotoxina oligomérica, codificada pelos genes *setA* e *setB*, conhecida como *Shigella enterotoxin 1* (ShET1) (NORIEGA et al., 1995; HENDERSON et al., 1999); a toxina *enteroagregative E. coli* ST (EAST1), assim denominada devido a sua homologia com a toxina STa produzida pelas cepas de ETEC (SAVARINO et al., 1993); a toxina autotransportadora *plasmid-encoded toxin* (Pet) responsável pela proteólise da α -fodrina, que promove o desarranjo dos filamentos de actina resultando no arredondamento e na esfoliação celular (CANIZALEZ-ROMAN; NAVARRO-GARCIA, 2003). As toxinas secretadas são responsáveis por danos celulares e estímulos à resposta inflamatória (STEINER et al., 1998; DUDLEY, et al., 2006).

3.1.5 *Escherichia coli* produtora da toxina *Shiga* (STEC)

A denominação STEC é usada para definir qualquer cepa de *E. coli* produtora de toxina *Shiga* (Stx), capaz de causar uma diarreia leve, que pode evoluir para uma colite hemorrágica (CH) ou a doença potencialmente fatal como síndrome hemolítica urêmica (SHU) (NATARO; KAPER, 1998). O termo EHEC é utilizado para designar as cepas positivas para Stx, que também possuem a ilha de patogenicidade LEE (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

A adesão de EHEC O157:H7 ao enterócito do epitélio intestinal, induz a formação da lesão *attaching and effacing* (A/E) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). O fenótipo A/E está associado à ilha de patogenicidade LEE, que contém os genes que codificam os componentes estruturais do aparato de secreção do tipo III, proteínas efetoras secretadas, adesina intimina e o seu receptor *translocated intimin receptor* (Tir) (TORRES; KAPER, 2001).

Pelo menos 16 prováveis *operons* fimbriais foram identificados em cepas de EHEC O157:H7 (PENA et al., 2001), incluindo as bem caracterizadas adesinas fimbriais do tipo 1 e curli (LOW et al., 2006).

A fímbria polar longo (LPF) de EHEC está relacionada a fímbrias tipo 1 em nível de organização genética, tendo sido inicialmente identificada em *Salmonella enterica serovar Typhimurium* (BÄUMLER; HEFFRON, 1995), na qual foi observado que a presença de LPF facilita a adesão bacteriana às placas de Peyer, presentes na mucosa do íleo no intestino delgado. (BÄUMLER; TSOLIS; HEFRON, 1996).

Coelhos, como modelo animal, foram utilizados para demonstrar que a fímbria LPF participa da adesão inicial e sua expressão é importante no desenvolvimento da diarreia severa causada por EPEC isolada de coelho (REPEC) (NEWTON et al., 2004). Também foram utilizados outros modelos de infecção tais como, cordeiros para elucidar a função da fímbria LPF como um fator de colonização associada à persistência de EHEC no intestino (TORRES et al., 2007).

A cepa de EHEC O157:H7 contém dois diferentes *loci* homólogos de *lpf* (*lpf1* e *lpf2*) relacionados a fímbria LPF de *Salmonella enterica serovar Typhimurium* (TORRES et al., 2004). A indução do operon *lpf1* de EHEC O157:H7 em *E. coli* K12 resultou em um aumento da expressão da fímbria LPF e da adesão em células HeLa (TORRES et al., 2008). O operon *lpf2* também foi associado à adesão às células epiteliais (TORRES et al., 2004). Porém, as cepas de EHEC O157:H7 possuem mutações em um, ou em ambos, *loci* homólogos de *lpf*, causando a diminuição da colonização bacteriana em modelos animais (suínos e ovinos) (JORDAN et al., 2004). Torres et al. (2009) identificaram diferentes variantes (tipos) polimórficos do gene *lpfA*, denominados *lpfA1* e *lpfA2*. A variante *lpfA1* é composta por cinco diferentes tipos, que possuem várias sequências conservadas de DNA. Enquanto, a variante *lpfA2* é composta por 3 diferentes tipos polimórficos. Além disso, foi observado que, as variantes polimórficas dos genes *lpfA1* e *lpfA2*, podem contribuir como marcadores de virulência em associação a intimina, uma proteína de membrana externa (TORRES et al., 2009).

Doughty et al. (2002) identificaram, por sua vez, um cluster (*lpfA*_{O113}) relacionado à fímbria LPF em cepas de STEC LEE negativo de sorotipo O113:H21. O gene *lpfA*_{O113} está presente em várias outras cepas de STEC, isolados clínicos de EPEC e cepas de REPEC. A deleção do gene *lpfA*_{O113}, que codifica a maior subunidade estrutural da fímbria, resultou na diminuição da aderência de STEC O113:H21 ao epitélio intestinal, sugerindo que a fímbria LPF_{O113} pode atuar como uma adesina em isolados de STEC LEE negativo.

Por sua vez, EHEC O157:H7 não fermentadoras de sorbitol (nSfp) apresenta uma ilha de patogenicidade denominada *tellurite resistance and adherence-conferring island* (TAI), que contém os genes que codificam proteínas envolvidas na aderência do patógeno (TARR et al., 2000). Por outro lado, TAI encontra-se ausente em cepas de STEC O157:H⁻ fermentadoras de sorbitol (TARR et al., 2000). Também, diferentemente das cepas de EHEC (nSfp) O157:H7, as cepas não móveis de STEC (Sfp) O157:H⁻ albergam o

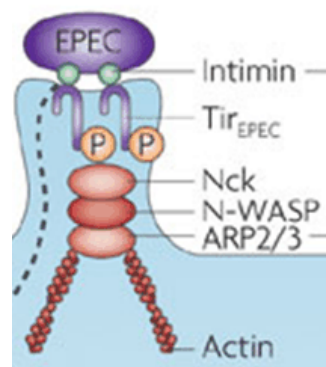
plasmídeo pSFO157 que contém o *cluster sorbitol-fermenting pilus (sfp)* formado por seis genes denominados *sfpA*, *sfpH*, *sfpC*, *sfpD*, *sfpJ* e *sfpG*, responsáveis pela expressão da fímbria Sfp manose resistente (BRUNDER et al., 2001) que contribui para a aderência da cepa *E. coli* (Sfp) O157:NM ao epitélio intestinal (MÜSKEN et al., 2008).

A fímbria Sfp possui um par de resíduos de cisteína nas posições 19 e 58 da proteína madura, que forma a ponte de dissulfeto encontrada nas fímbrias do tipo 1, P e S expressas pelas cepas de *E. coli* uropatogênica (BRUNDER et al., 2001). Os mesmos autores, também demonstraram uma elevada homologia entre os genes que compõem o *cluster* da fímbria Sfp de STEC O157:H⁻ com genes que codificam os componentes envolvidos na montagem da fímbria P expressa por UPEC. A partir desta comparação, estes autores identificaram as prováveis funções dos genes que compõem o *cluster sfp*, responsável pela montagem estrutural da fímbria Sfp, onde estão contidos o gene *sfpA*, que codifica a maior subunidade estrutural, o gene *sfpH* que codifica a menor subunidade envolvida na ancoragem da fímbria a membrana externa, o gene *sfpC* responsável pela síntese da proteína de membrana externa *usher*, que forma um canal que possibilita o transporte das subunidades protéicas da pilina através da membrana bacteriana, o gene *sfpD* que codifica uma chaperonina que atua no periplasma promovendo formação de um complexo estável com as subunidades da pilina, que são apresentados ao *usher*. Aparentemente, o gene *sfpG* codifica uma proteína responsável pela atividade aderente da fímbria ao enterócito. Por outro lado, o gene *sfpJ* provavelmente codifica uma proteína que compõe a extremidade final da fímbria, atuando em associação à proteína SfpG. Estes autores acreditam ainda que *sfpF* seja uma ORF não funcional.

3.1.6 *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)

O principal mecanismo de patogenicidade da EPEC é a produção da lesão histopatológica *attaching and effacing* (A/E) no trato gastrointestinal, que ocorre pela íntima fixação bacteriana e a destruição das microvilosidades da borda em escova do epitélio intestinal com a formação de um pedestal por agregação de actina e outros componentes protéicos do citoesqueleto, no local de contato entre a célula hospedeira e a cepa de EPEC (MOON et al., 1983). Os componentes do citoesqueleto do hospedeiro são utilizados na remodelagem e formação dos filamentos de actina (KENNY, 1999). Isto ocorre uma vez que a *host adaptator protein* (Nck) se liga a *neural–Wiskott–Aldrich syndrome protein* (N-WASP), que por sua vez, recruta e ativa o complexo *actin-related proteins 2 and 3* (Arp2/3), responsável pela formação dos filamentos de actina (**Figura 4**) (KALMAN et al., 1999; GRUENHEID et al., 2001).

Figura 4 - Representação esquemática da formação do filamento de actina na montagem do pedestal.

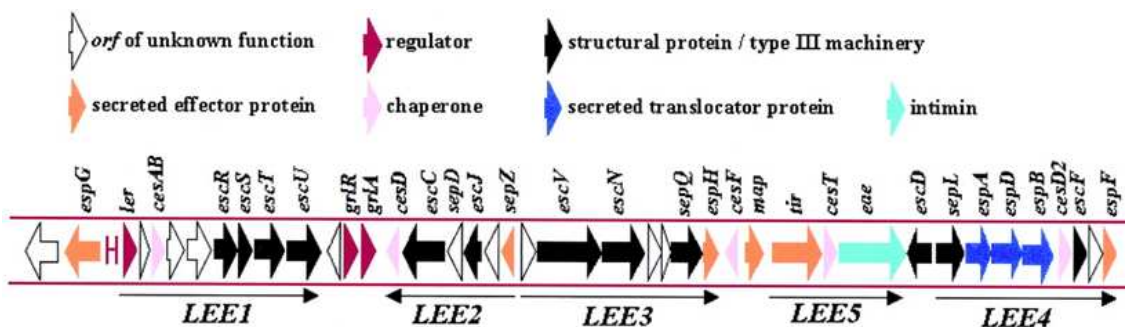


FONTE: CROXEN; FINLAY, 2010.

Os genes que codificam a lesão A/E estão localizados no *locus*, conhecido como ilha de patogenicidade LEE (MCDANIEL et al., 1997). Essa região possui aproximadamente 35,6 kb e pode ser dividida em cinco segmentos designados LEE1, LEE2, LEE3, LEE5 (TIR) e LEE4 (**Figura 5**), que contém os 41 genes necessários para a expressão do sistema de secreção do

tipo III (TTSS) transcrito a partir de LEE1, LEE2 e LEE3; as *EPEC secreted proteins* (Esp) que se localizam em LEE4 e os genes envolvidos na íntima ligação bactéria-célula denominados *translocated intimin receptor* (*tir*) e *EPEC attaching and effacing* (*eae*), estão presentes em LEE5 (ELLIOTT et al., 1998; MELLIES et al., 1999). O gene *eae* codifica a intimina, uma proteína de membrana externa de 94 kDa responsável pela íntima aderência da bactéria ao enterócito. (ADU-BOBIE et al., 1998). Por sua vez, o receptor Tir fosforilado atua no reconhecimento da intimina (KENNY et al., 1997; WARANA; KENNY, 2001).

Figura 5. Representação esquemática da ilha de patogenicidade LEE em EPEC.

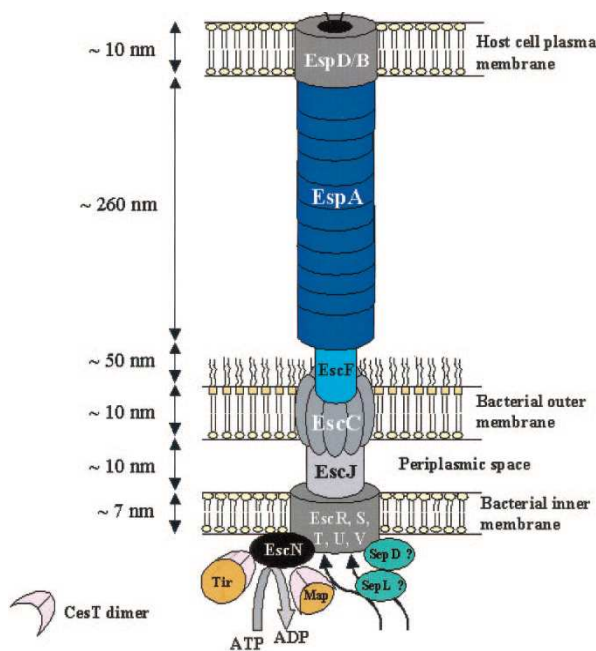


FONTE: GARMENDIA; FRANKEL; CREPIN, 2005.

A estrutura basal do TTSS (**Figura 6**) é composta pela secretina EscC, proteínas de membrana interna (EscR, EscS, EscT, EscU e EscV) e pela lipoproteína EscJ. Essas proteínas formam estruturas aneladas que conectam as membranas interna e externa da bactéria (revisado por GARMENDIA; FRANKEL; CREPIN, 2005), enquanto EscF constitui uma estrutura em forma de agulha (WILSON et al., 2001), a partir da qual ocorre a polimerização das subunidades de EspA, formando assim uma estrutura filamentosa oca denominado como canal de translocação (DANIELL et al., 2001, 2003; CREPIN

et al., 2005). Na extremidade de EspA encontram-se outras duas proteínas translocadoras EspB e EspD, que atuam na membrana plasmática do hospedeiro, através da formação de um poro (KRESSE; ROHDE; GUZMAN, 1999; IDE et al., 2001; BUTTNER; BONAS, 2002). Este poro possui uma dupla função, pois possibilita a ancoragem do filamento EspA e permite a passagem do receptor Tir e das proteínas efetoras para a célula hospedeira (KNUTTON et al., 1998; FIVAZ; VAN DER GOOT, 1999). Com a ancoragem, o filamento maduro de EspA passa a atuar como fator de adesão, uma vez que estabelece uma ligação transitória entre a bactéria seu hospedeiro (EBEL et al., 1998; CLEARY et al., 2004) promovendo a translocação das proteínas. Após a translocação, o filamento EspA é eliminado da superfície da célula bacteriana, possibilitando assim a íntima ligação entre a bactéria e o hospedeiro através da interação íntima-Tir (KENNY et al., 1997; ADU-BOBIE et al., 1998; KNUTTON et al., 1998; WARANA; KENNY, 2001).

Figura 6 - Representação esquemática do aparato que forma o sistema de secreção tipo III, presente em EPEC e EHEC.



FONTE: GARMENDIA; FRANKEL; CREPIN, 2005.

3.1.6.1 *Escherichia coli* enteropatogênica típica (EPECt)

As cepas de EPECt já foram reconhecidas como sendo o agente etiológico mais associado a surtos e casos de diarreia infantil em países em desenvolvimento (NATARO; KAPER, 1998).

A colonização da célula hospedeira pela EPECt ocorre em decorrência de eventos multifatoriais, dentre os quais podem estar envolvidas as adesinas fimbriais e não-fimbriais, que podem agir simultaneamente ou em diferentes estágios durante o processo infeccioso.

EPECt possui um plasmídeo de alta massa molecular (60 MDa) pMAR2, identificado na cepa E2348/69, conhecido como EPEC *adherence factor* (EAF) (BALDINI et al., 1983; BIEBER et al., 1998). O plasmídeo EAF contém um operon *bfp* composto por 14 genes (*A, G, B, C, U, D, E, F, P, H, I, J, K* e *L*) (DONNENBERG; ZHANG; STONE, 1997), dentre os quais os genes *bfp* (*A, B, D, E* e *P*) se relacionam diretamente com a formação estrutural da fímbria do tipo IV (STONE et al., 1996; CRAIG, LI, 2008). O gene *bfpA* codifica uma bundlina (SOHEL et al., 1993; STONE et al., 1996) que constitui a maior e principal subunidade estrutural da fímbria, conhecida como *bundle-forming pilus* (BFP) de massa molecular de 19,5 kDa (GIRÓN; HO; SCHOOLNIK, 1991). As demais funções essenciais para a formação de BFP são atribuídas à secretina (*bfpB*) de membrana externa, responsável pela externalização da pilina; à ATPase (*bfpD*) pela produção de energia utilizada no processo de polimerização da pilina; à proteína de membrana integral (*bfpE*) e à prepilina peptidase (*bfpP*) de membrana interna (STONE et al., 1996; CRAIG, LI, 2008). Os genes restantes codificam proteínas adicionais, indiretamente envolvidas no processo de montagem da fímbria, com exceção dos genes *bfp* (*H* e *F*) que aparentemente não são requisitados para a formação de BFP (DONNENBERG; ZHANG; STONE, 1997).

A fímbria BFP é descrita como um filamento longo de aproximadamente 100 nm de diâmetro e com 15 a 20 µm de comprimento, que aparece lateralmente agregado enrolado em torno de si mesmo ou em torno de outros filamentos próximos de comprimentos variáveis, semelhante a estruturas em cordas (GIRÓN; HO; SCHOOLNIK, 1991).

BFP é responsável pela ligação bactéria-bactéria, resultando na formação de microcolônias compactas sobre uma monocamada de células epiteliais HEp-2, fenômeno este que ocorre após 3 h de contato entre a bactéria e a célula, gerando o fenótipo de aderência denominado adesão localizada (AL) (CRAVIOTO et al., 1979; SCALETSKY; SILVA; TRABULSI, 1984).

Alguns autores também acreditam que a ligação bactéria-célula inicial é mediada por BFP e o filamento de EspA, sendo esta associação o estímulo necessário para que ocorra a translocação de EspB, Tir e possivelmente outras proteínas efetoras para dentro da célula hospedeira (KNUTTON et al., 1998; CLEARY et al., 2004).

Outros fatores podem colaborar na adesão inicial, um dos quais foi demonstrado por Khursigara et al. (2001), no qual BFP medeia a adesão de EPEC típica via receptores que reconhecem especificamente a fosfoetanolamina (PE⁴ – fosfatidiletanolamina) presente na célula hospedeira. Por outro lado, Hyland et al. (2008) observaram que a bundlina-α de EPECt possui propriedade lectina-*like* sendo a responsável pela aderência inicial entre a EPECt e a célula eucariótica, pois tem afinidade pelo glicosídeo N-acetilactosamina (LacNAc) presente nos receptores da célula hospedeira.

4. PE faz parte da classe dos glicerofosfolípides, sendo encontrado em membrana de eucariotos e procariotos (nº acesso EMBL-EB1: CHEBI 16030)
<http://en.wikipedia.org/wiki/Phosphatidylethanolamine>

A análise da sequência genômica da EPECt E2348/69 (IGUCHI et al., 2009) e da *E. coli* K12 (BLATTNER et al., 1997) sugere que estes dois organismos compartilhem vários *operons pilus-like*.

Em 2009, Saldaña e colaboradores demonstraram que outra adesina, denominada Pilus Comum de *E. coli* (ECP) parece contribuir para a eficiência da interação de EPECt a células epiteliais durante o processo infeccioso *in vitro*. A fímbria ECP é uma fímbria peritríquia longa de 4 nm de espessura, semi-flexível composta por subunidades de pilina codificada pelo gene *ecpA* (RENDÓN et al., 2007), também conhecido como *yagZ* em *E. coli* K12 ou *matB* em *E. coli* associada a meningites (POUTTU et al., 2001; RENDÓN et al., 2007). Rendón et al. (2007) também demonstraram a presença do gene *ecpA* em diferentes patótipos de *E. coli* patogênicos, tais como: EHEC, STEC, ETEC, EAEC, EIEC, UPEC, REPEC e EPEC de ave (APEC).

3.1.6.2 ***Escherichia coli* enteropatogênica atípica (EPECa)**

A definição de EPECa foi criada por Kaper (1996) para denominar cepas de *E. coli* enteropatogênicas que não são portadoras do plasmídeo EAF, do *operon* de *bfp* e que não expressam a fímbria BFP, porém são capazes de produzir intimina/*eae* (PELAYO et al., 1999; VIEIRA et al., 2001; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002; DULGUER et al., 2003; BLANCO et al., 2006; ABE et al., 2009; NARA et al., 2010).

Na ausência da fímbria BFP, cepas atípicas de EPEC apresentam diferentes fenótipos de adesão observados em células HEp-2, tais padrões foram denominados: localizada-*like* (ALL), difusa (AD), agregativa (AA) (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002) ou indeterminado (IND) de aderência (MORA et al., 2009). Por outro lado, também foram relatadas cepas não aderentes em células *in vitro*, sendo denominadas EPEC atípicas não aderentes (NA) (ABE et al., 2009).

Em 2002, Keller e colaboradores verificaram a ocorrência de um padrão de aderência difusa em células HEp-2 e a hemaglutinação de glóbulos vermelhos humanos em presença de EPECa, denominada EPEC afa. Os mesmos autores demonstraram que EPEC afa alberga uma região cromossomal de 11,6 Kb, responsável pela expressão de uma fina estrutura fibrilar denominada *Diffuse Adherence Fibrillar Adhesin* (Afa) de ~16 kDa, que possui 98% de homologia a AfaE-1, descrita como adesina não-fimbrial, encontrada em UPEC. Por alinhamento de sequência de aminoácidos, outras quatro proteínas expressas por EPEC possui elevada identidade, que varia entre 98 % a 100 % com as proteínas codificadas pelo *operon* da adesina não-fimbrial *afa* (AfaA, AfaB, AfaC e AfaD) presente em UPEC (LABIGNE-ROUSSEL et al., 1984; KELLER et al., 2002).

O padrão difuso de aderência *in vitro* observado por Keller et al. (2002) em algumas cepas de EPEC atípicas, também foi observado por Scaletsky et al (2005). Estes autores relataram a presença de uma nova adesina afimbrial, designada *locus* para aderência difusa (*Ida*), de 15 kb, que confere o fenótipo difuso de aderência em células HEp-2, quando expressas em uma *E. coli* K12. Inicialmente *Lda* foi encontrada em cepas de EPECa O26:H11 isoladas de crianças com diarreia. Análises da sequência genética de *Ida* revelaram 15 ORFs (SCALETSKY et al., 2005), nos quais estão incluídos: a maior subunidade estrutural (*IdaG*); o *usher* de membrana externa (*IdaD*); a chaperonina periplasmática (*IdaE*) e a menor subunidade (*IdaH*). As ORFs descritas possuem homologia com *operons* que codificam a fímbria K88 (gene *fae*) e a fímbria CS31A (gene *clp*) (SCALETSKY et al., 2005). As fímbrias K88 patogênicas são expressas por ETEC de suínos (MOON et al., 1990), enquanto o antígeno associado à superfície CS31A está envolvido na patogenia de bovinos e cepas septicêmicas de *E. coli* (GIRARDEAU et al., 1988). Apesar da homologia entre a sequência de aminoácidos das fímbrias K88 e CS31A, a *Lda* mostrou-se também semelhante a outras adesinas afimbriais tais como: *Ral* de

REPEC (ADAMS et al., 1997), CS6 de ETEC (WOLF et al., 1989) e Afa, originalmente identificada em UPEC sorogrupo O2 (LABIGNE-ROUSSEL et al., 1984) e também com EPEC 132/12 sorotipo O55:H⁻ (KELLER et al., 2002).

3.1.6.2.1 Importância de EPECa na epidemiologia das doenças diarreicas

As cepas de EPECa podem ser encontradas em pessoas saudáveis e em alguns animais doentes (como cachorros, macacos, gatos e bovinos) que podem servir de reservatórios, representando uma fonte de infecção ou estabelecendo um ciclo de infecção mútua entre humanos e animais domésticos (GOFFAUX et al., 2000; CID et al., 2001; BEUTIN et al., 2003; AKTAN et al., 2004; MOURA et al., 2009).

No Brasil a partir da década 90, observa-se através de amostras coletadas nos diferentes Estados (Rondônia, Bahia, Rio de Janeiro e São Paulo) a diminuição da frequência dos casos de diarreia aguda causada por infecção de EPEC típica (DA SILVA DUQUE et al., 2002; RODRIGUES et al., 2002). Em contrapartida é observado o aumento na frequência de casos de diarreia persistente causada por EPEC atípica (GOMES et al., 2004; FRANZOLIN et al., 2005; ORLANDI et al., 2006; ARAUJO et al., 2007; BUERIS et al., 2007; MORENO et al., 2010). Os fatores responsáveis pelas mudanças na prevalência de EPECt por EPECa ainda não foram estabelecidos, porém acredita-se que medidas de saúde pública, como o controle mais eficiente das infecções hospitalares, possa ser um dos responsáveis pelo atual perfil apresentado pelas infecções por EPEC (FRANZOLIN et al., 2005).

Diferentes sorogrupos de EPECa estão associados à diarreia persistente e são observados em países industrializados e em desenvolvimento (JENKINS et al., 2006; OCHOA et al., 2008; TENNANT et al., 2009; TORRES et al., 2009). No Brasil foram identificados 43 diferentes sorogrupos, além de um grupo não-

-tipável de EPECa, nos quais estão inclusos: ONT, O1, O2, O3, O4, O5, O9, O20, O21, O23, O26, O29, O33, O34, O35, O39, O49, O51, O54, O55, O64, O76, O80, O86, O88, O103, O101, O104, O105, O108, O110, O111, O113, O114, O119, O124, O125, O128, O131, O134, O153, O157, O163, O167 (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002; ABE et al., 2009; TORRES et al., 2009; MORENO et al., 2010).

Os casos de diarreia persistente devido à infecção por EPECa, ou a sua participação no agravamento de doenças manifestadas por outros casos clínicos, podem ser observados através de dados obtidos em diferentes estudos realizados tanto em países industrializados quanto nos países em desenvolvimento, dentre os quais podemos citar: (i) Os dados obtidos em estudo realizado com amostras isoladas de crianças em Salvador (Bahia), no nordeste brasileiro, demonstrou a associação das cepas de EPECa à diferentes outros patógenos, tais como: protozoários (*Cryptosporidium parvum*, *Entamoeba coli* e *Endolimax nana*), helmintos (*Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura*) e vírus (*Astrovirus*, *Rotavirus* e *Reovirus*), levando ao agravamento do quadro clínico do paciente, pois além do estado diarreico persistente apresentado, estes também manifestaram outros sintomas tais como febre, tosse e vômito que são responsáveis pela necessidade de uma intervenção hospitalar (FRANZOLIN et al., 2005). (ii) EPECa também foi encontrada em amostras diarreicas coletadas de crianças com idade inferior a 5 anos, originárias de países industrializados (Noruega e Austrália) (AFSET et al., 2003; NGUYEN et al., 2006). (iii) Ou em desenvolvimento (Brasil) (ARAUJO et al., 2007) onde foi encontrado um alto percentual de EPECa [92% (23/25)] em relação a EPECt [8% (2/25)], de um total de 446 amostras isoladas de casos diarreicos em crianças. Em 2010, Moreno e colaboradores, através de um estudo realizado com 2344 *E. coli* isoladas de amostras diarreicas coletadas de crianças em João Pessoa (PB), encontraram uma distribuição de 9,3% de EPECa em relação a 1,7% de EPECt, o que reforça a necessidade de mais estudos sobre as características de virulência das cepas de EPEC atípica.

3.2 PROTEOMA E ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MS)

Proteômica baseada em MS tipicamente envolve a identificação em larga escala de proteínas celulares e/ou teciduais. Com o aumento e a disponibilidade cada vez maiores de informações sobre o genoma de várias espécies, a proteômica baseada em MS é uma importante ferramenta para a análise de sistemas biológicos e para a elucidação das funções protéicas e suas complexas interações (YANG et al., 2007). Além disso, abordagens proteômicas podem fornecer informações valiosas sobre as implicações funcionais de modificações pós-translacionais (AEBERSOLD, 2003).

Atualmente, a tecnologia utilizada para estudos proteômicos é baseada em uma variedade de técnicas de separação seguidas pela identificação das proteínas e/ou peptídeos proteolíticos utilizando MS e ou MS/MS (PENG; GYGI, 2001). A técnica de separação mais popularmente utilizada é o gel de eletroforese bidimensional (2D) capaz de separar até 2500 *spots* de proteínas em uma única análise (GIAVALISCO et al., 2005). Os *spots* protéicos são extraídos do gel 2D e as proteínas lá contidas são digeridas enzimaticamente, analisadas por MS e identificadas por pesquisa comparativa em banco de dados por algoritmos de busca como Mascot (<http://www.matrixscience.com/>), Aldente (<http://www.expasy.org>), Profound (<http://prowl.rockefeller.edu/>) e/ou MS-FIT (<http://prospector.ucsf.edu/>). Entre os métodos tradicionais de MS e MS/MS disponíveis para a identificação das proteínas separadas por gel 2D estão: MALDI-TOF-MS (THIEDE et al., 2005), MALDI--TOF/TOF MS (VANROBAEYS et al., 2005) e ESI-MS/MS (WILM et al., 1996).

3.2.1 Electrospray (ESI)

Em 2002, John Bennett Fenn recebeu o Prêmio Nobel em Química (MARKIDES; GRÄSLUND, 2002), pelo desenvolvimento do método de ionização por *Electrospray* capaz de medir a massa molecular de amostras biológicas de alta massa, sem promover a sua fragmentação (FENN et al., 1989).

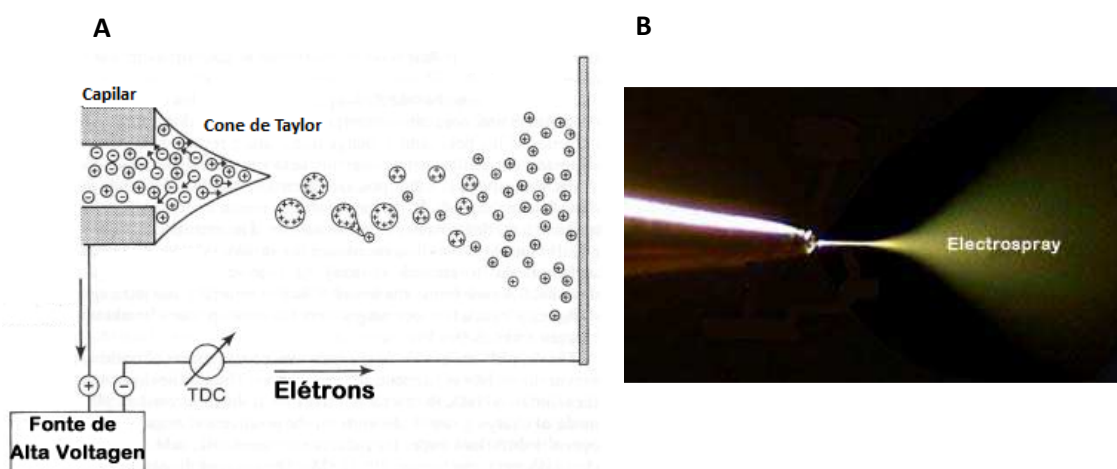
A fonte de íons tipo ESI pode ser considerada como sendo um método utilizado para gerar microaerossois através do acúmulo de carga eletrostática. Essa técnica de ionização possibilita a análise de macromoléculas complexas na fase gasosa mantendo intactas as suas interações não covalentes (ROBINSON, 1996, 2005). Por este método, os íons gerados à pressão atmosférica no fluxo de fase móvel (1 a ~1000 $\mu\text{L}/\text{min}$), atravessam um capilar de pequeno diâmetro mantido sob uma diferença de potencial (ddp) de poucos kV.

O campo elétrico é obtido pela aplicação de uma ddp de 2 a 5 kV que induz o acúmulo de cargas na superfície do líquido ao final do capilar, formando gotículas carregadas (**Figura 7A**). O *spray* inicia-se com a aplicação de uma voltagem dependente da tensão superficial de cada solvente. Por exemplo, para água temos uma ddp aplicada de 4 kV (tensão superficial de $0.073 \text{ N}/\text{m}^2$), para acetonitrila de 2.5 kV ($0.030 \text{ N}/\text{m}^2$) e para metanol de 2.2 kV ($0.023 \text{ N}/\text{m}^2$) (KEBARLE; TANG, 1993).

A gotícula carregada sofre a evaporação do solvente até tornar-se instável ao aproximar-se do limite de *Rayleigh*. Neste ponto, a gotícula deforma-se e emite jatos carregados em um processo conhecido como fissão de *Rayleigh* (**Figura 7B**). Durante a fissão, a gotícula perde uma pequena porcentagem da sua massa juntamente com uma porcentagem relativamente alta da sua carga (LI; TU; RAY, 2005). Os íons obtidos de macromoléculas podem carregar um grande número de cargas, dependendo do número de sítios ionizáveis.

Para a obtenção de um *spray* estável é necessário observar a condutividade do capilar, a tensão superficial da solução do analíto, o fluxo da solução, a composição do analíto e o potencial aplicado no capilar.

Figura 7 - Processo de injeção do Electro spray. A solução é injetada do capilar através do orifício de entrada, levando a formação do cone de Taylor, onde ocorre a separação entre os íons positivos e negativos.



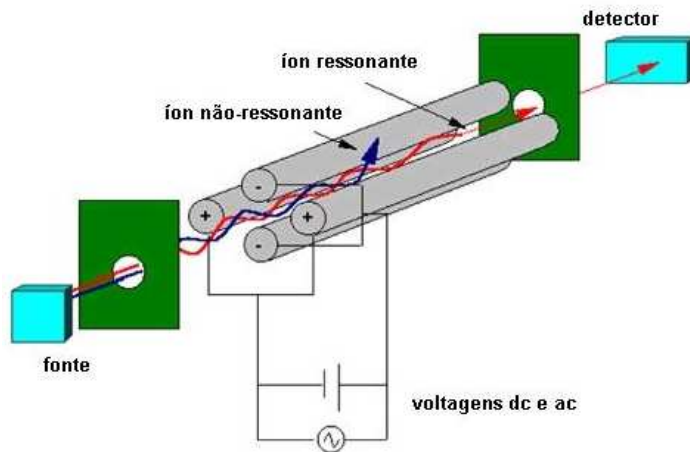
FONTE: <http://www.medicinescomplete.com/mc/clarke/current/images/Clkmass_spectrometryF009_default.png>. Acesso em: 17 jan. 2012.

3.2.1.1 *Quadrupolo*

Em um analisador de massas tipo quadrupolo, os íons são separados por campos elétricos criados por quatro barras paralelas, que possuem seção hiperbólica de formato cilíndrico. As barras opostas são eletricamente conectadas e duas voltagens são aplicadas, sendo esta a origem da corrente contínua (DC), da frequência de rádio (RF) e da corrente alternada (AC) (**Figura 8**). No interior do campo elétrico oscilante, os íons descrevem trajetórias complexas e somente os íons com trajetórias estáveis (íons ressonantes) migram ao longo do quadrupolo até chegar ao detector. Por outro

lado, os íons não detectados são defletidos pelo campo elétrico e são considerados não-ressonantes (GONZÁLES et al., 2007). À medida que as voltagens DC e RF são aumentadas, mantendo-se as tensões constantes, os íons com valores crescentes de razão m/z são selecionados (LEARY; SCHMIDT, 1996; STEEL; HENCHMAN, 1998). A voltagem no quadrupolo pode ser manipulada de três maneiras diferentes: (i) DC igual a zero com aplicação somente de RF o que faz com que a trajetória dos íons seja estável e todos passem através do quadrupolo. Neste caso, diz-se que o quadrupolo é definido no modo de RF. (ii) No modo de scaneamento, DC e RF são variados simultaneamente, permitindo aos íons com diferentes razões m/z passar sequencialmente. Neste caso, o ciclo de trabalho, ou seja, a porcentagem de tempo no qual uma partícula iônica chega ao quadrupolo atingindo o detector está geralmente abaixo de 0,1%. Portanto, a maioria dos íons é perdida e a sensibilidade é baixa. Os analisadores quadrupolos possuem a capacidade de melhorar o ciclo de trabalho através do aumento da sensibilidade em detrimento da resolução. (iii) O terceiro modo de usar um quadrupolo é através da voltagem fixa, com um elevado ciclo próximo de 100%, permitindo somente trajetórias estáveis para os íons com uma determinada razão m/z . A transmissão de íons nos quadrupolos diminui à medida que a razão m/z aumenta e o intervalo de massas é muito limitado, quando em comparação com *Time of flight* (Tof). A maioria dos quadrupolos em instrumentos analíticos tem uma razão m/z limite de 4000, embora a sensibilidade comece a diminuir muito abaixo deste nível. No entanto, devido à produção de múltiplas cargas iônica produzidas em fontes ESI, quadrupolos podem ser usados para determinar a massa molecular das macromoléculas, nos quais incluem as proteínas e os ácidos nucleicos (CHOWDHURY; KATTA; CHAIT, 1990).

Figura 8 - Representação esquemática do analisador quadrupolo. Corrente contínua (dc) e corrente alternada (ac).



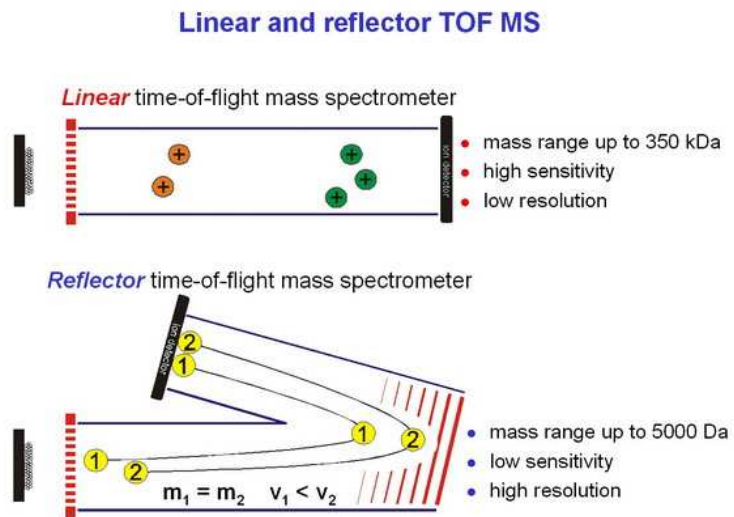
FONTE: GONZÁLES et al., 2007.

3.2.1.2 *Time of flight (Tof)*

Tof (**Figura 9**) é o mais simples analisador de massa e consiste essencialmente de um tubo de vôo sob vácuo. Moléculas iônicas, que são aceleradas com a mesma energia, voam ao longo do tubo com velocidades diferentes devido à relação inversamente proporcional da razão m/z (massa/carga) dos íons (WEICKHARDT; MORITZ; GROTEMEYER, 1996).

A energia cinética pode ser definida pela relação massa-velocidade de um corpo, de acordo com a equação $\epsilon = mV^2/2$, sendo V é a velocidade (do íon), pode-se calcular massa (molecular do composto) pois a energia do sistema é conhecida. Os compostos são separados no analisador de acordo com sua razão m/z , uma vez que íons mais leves alcançam mais rapidamente o detector, enquanto íons mais pesados demoram mais tempo para alcançá-lo. O detector de íons (linear ou refletor) localiza-se, normalmente na extremidade do tubo de vôo e, através do impacto de íons neste, produz-se um grupo de sinais que são convertidos em picos na apresentação final do espectro *Tof* (CANÃS et al., 2006).

Figura 9 - Representação esquemática dos detectores de ToF.



FONTE: <<http://www.anagnostec.eu/maldi-tof-ms/technology.html>>. Acesso em: 17 jan. 2011.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ISOLADOS BACTERIANOS

Neste trabalho foram estudados os isolados de EPECa BA320 (O55:H7) com padrão fenotípico de adesão localizado-*like* (ALL), Ec292/84 (O125:H6) com fenótipo de adesão agregativa (AA), 9100-83 (O55:H7) com fenótipo difusamente aderente (DA) e o isolado BA4013 (O88:HMN) não aderente (NA) à células HEp-2 no ensaio de adesão em 6 h (RODRIGUES et al., 1996; BARROS et al., 2008; ABE, et al., 2009).

Na **tabela 2**, encontram-se os isolados controles utilizados nas reações de PCR. Enquanto, na **tabela 3** estão descritos os 59 isolados de EPECa, pesquisados em relação a prevalência de genes de adesinas fimbriais e não fimbriais. Este isolados pertencem a uma coleção composta de 72 EPECa descritas por Abe et al. (2009), porém para este estudo somente foram selecionados os isolados com os padrões de aderência localizado-*like*, agregativa, difusa e isolados não aderente *in vitro*.

Tabela 2 - Isolados bacterianos controles das reações de PCR

Isolado bacteriano	Descrição	Referência
DH5 α	<i>E. coli</i> K12	Sambrook et al., 1989
C600	<i>E. coli</i> K12	Sambrook et al., 1989
<i>S. aureus</i>	Gram (+), aeróbica, isolado clínico	ATCC25923
UEL13	<i>Proteus mirabilis</i> (WT ^(a))	Rocha et al., 2007
J96 (O4:K ⁻ :H5)	Protótipo de UPEC (Tipo I e P)	Hull et al., 1981
RS218 (O18:K1:H7)	UPEC (WT ^(a)), fímbria S	Johnson et al., 2001
E2348/69 (O127:H6)	Protótipo de EPECt (BFP, ECP e LPFA1-1 ^(e))	Levine et al., 1985
135/12 (O55:H ⁻)	EPECa, fibrilina de aderência difusa (Dafa)	Keller et al., 2002
<i>E. coli</i> 22 (O26:H11)	EPECa, menor subunidade (LdaH)*	Scaletsky et al., 2005
H10407 (O78:H11)	Protótipo de ETEC (CFA/I)	Evans et al., 1975
170A1 (O6:H16)	Isolado Clínico de ETEC (CS1)	Este Estudo
E4833 (O6:H16)	ETEC (CFA/II, CS2)	Guth et al., 1994
PB176 (O6:H16)	ETEC (CFA/II, CS3)	Evans; Evans, 1978
220A1 (O25:H ⁻)	ETEC (CFA/III)	Este estudo
E8775 (O25:H42)	ETEC (CFA/IV, CS4)	Thomas et al., 1982
4961-2 (O29:H21)	ETEC (CFA/IV, CS5)	Giraldi et al., 1993
E17018A (O167:H5)	ETEC (CFA/IV, CS6)	McConnell et al., 1988
E9034A (O8:H9)	ETEC (<i>Longus Pilus</i> , CS21)	Girón et al., 1994
17-2 (O3:H2)	Protótipo de EAECt (AAF/I)	Nataro et al., 1993
042 (O44:H18)	Protótipo de EAECt (AAF/II)	Vial et al., 1988
RN785-1 (O1:HNT ^(b))	Isolado clínico EAECt (AAF/III)	Zamboni et al., 2004
BA1116 (O59: HNT ^(b))	EAECt (AAF/IV)	Bueris et al., 2007
C 1096	EAECa (WT ^(a)), fímbria Pil	Cobeljic et al., 1996
C1845 (O75:NM ^(c))	DAEC (WT ^(a)), fímbria F1845	Bilge et al., 1989
O157:H ⁻	STEC (Sfp ^(d))	Blanco et al., 1995
STEC 50 (O87:H16)	STEC (animal) (LPFA _{O113})	Vaz et al., 2006
FV10094 (O26:H11)	STEC (LPFA1-2 ^(e))	Torres et al., 2009
EDL 933 (O157:H7)	EHEC (LPFA1-3 ^(e))	Perna et al., 2001
FV10106 (O145:H28)	EPECa (LPFA1-5 ^(e))	Torres et al., 2009
FV10132 (O119:H8)	EPEC (LPFA2-1 ^(e))	Torres et al., 2009

(a) **WT**: cepa selvagem; (b) **NT**: Não Tipável; (c) **NM**: Não Móvel; (d) **Sfp**: fímbria fermentadora de sorbitol produzida por *E. coli* produtora de toxina *Shiga*; (e) Variantes polimórficos da fímbria polar longo (LPF). **UPEC**: *E. coli* uropatogênica; **EPECt**: *E. coli* enteropatogênica típica; **EPECa**: *E. coli* enteropatogênica atípica; **ETEC**: *E. coli* enterotoxigênica, carreadora dos genes que codificam os fatores antigênicos de colonização (CFA) e os antígenos de superfície (CS); **EAECt**: *E. coli* enteroagregativa típica, carreadora do gene *aggR* (ativador transcripcional dos genes da biogênese das fímbrias agregativas [AAF/I, II, III e IV]); **EAECa**: *E. coli* enteroagregativa atípica, ausência do gene *aggR*; **DAEC**: *E. coli* difusamente aderente; **STEC**: *E. coli* produtora da toxina *Shiga*; **EHEC**: *E. coli* enterohemorrágica.

* *locus for diffuse adherence*

Tabela 3 - 59 Isolados de EPECa pesquisados por PCR.

EPECa	Sorotipo	Padrão de aderência^(a)	EPECa	Sorotipo	Padrão de aderência^(a)
BA1250	ONT:H6	ALL	BA2065	ONT:H5	NA
BA2034	ONT:H10	ALL	BA2117	ONT:H5	NA
BA2853	ONT:H10	ALL	BA151	ONT:H9	NA
BA3574	ONT:H38	ALL	BA365	ONT:H19	NA
BA3851	ONT:H38	ALL	BA2468	ONT:H19	NA
BA3977	ONT:H45	ALL	BA3800	ONT:H19	NA
BA4047	O1:H16	ALL	BA3836	ONT:H19	NA
BA4095	O4:H45	ALL	BA589	O5:H2	NA
BA2103	O26:H11	ALL	BA2294	O9:H33	NA
BA1324	O34:H45	ALL	BA4058	O20:H ⁻	NA
BA4132	O51:H48	ALL	BA179	O23:H16	NA
BA487	O55:H7	ALL	BA356	O33:H7	NA
BA1244	O55:H7	ALL	BA2991	O34:H ⁻	NA
BA4147	O55:H7	ALL	BA2923	O34:H6	NA
BA4077	O64:H23	ALL	BA442	O35:H19	NA
BA3378	O104:H2	ALL	BA3148	O35:H19	NA
BA714	O111:H ⁻	ALL	BA86	O76:H19	NA
BA1649	O111:H38	ALL	BA1738	O80:H26	NA
BA3157	O119:H2	ALL	BA655	O88:H25	NA
BA3733	O119:H19	ALL	BA2975	O88:H25	NA
BA1652	O131:H4	ALL	BA3443	O88:H25	NA
BA4157	ONT:H25	AA	BA852	O88:H25	NA
BA92	O2:H16	AA	BA2613	O101:H33	NA
BA2145	O105:H7	AA	BA4135	O108:H25	NA
BA3690	O111:H38	AA	BA3160	O110:H ⁻	NA
BA2482	O119:H11	AA	BA956	O111:H15	NA
BA585	O157:H16	AA	BA2775	O113:H19	NA
BA2073	ONT:H5	DA	BA580	O119:H2	NA
BA4009	O114:H25	DA	BA3392	O124:H11	NA
BA2297	O153:H11	DA			

^(a) Abe et al., 2009**ALL:** adesão localizada-*like***AA:** adesão agregativa**AD:** difusamente aderente**NA:** não aderente

4.2 REAÇÕES DE POLIMERASE EM CADEIA (PCR)

Genes fimbriais e não fimbriais caracterizados em diferentes patótipos de *E. coli* patogênicas foram pesquisados em 59 isolados de EPECa pertencente aos sorogrupos (ONT, O1, O2, O4, O5, O9, O20, O23, O26, O33, O34, O35, O51, O55, O64, O76, O80, O88, O101, O104, O105, O108, O111, O110, O113, O114, O119, O124, O131, O153 e O157) e também nos isolados BA320 (ALL), Ec292/84 (AA), 9100-83 (DA) e BA4013 (NA). Os respectivos controles positivos e negativos para cada um dos genes, os pares de iniciadores, as temperaturas de anelamento utilizadas, assim como os tamanhos dos fragmentos amplificados e as condições gerais de amplificação das reações encontram-se descritos na **Tabela 4**.

Para cada reação, foram utilizados 0,2 µM de cada um dos iniciadores (“forward” e “reverse”), 2,5 U de “*Taq DNA Polymerase*”, 2 mM de MgCl₂, Tampão de PCR 1X, 0,2 mM da mistura de dNTPs (Invitrogen®) e 1,0 µL do DNA molde obtidos por extração com fervura (**item 4.2.1.1**) ou 2,0 µL do DNA genômico extraído por digestão com lisozima e proteinase K. (**item 4.2.1.2**).

Após a amplificação em termociclador (GeneAmp® PCR System 9700), os produtos obtidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose *high EEO* (Fisher Scientific®) a 1,2%, utilizando o marcador de 1kb (*DNA Ladder* - Invitrogen®). A corrida eletroforética realizada sob voltagem constante a 80 V em solução tampão Tris-Acetato EDTA (TAE) pH 8.0. Os géis foram corados em solução de brometo de etídio a 0,01% (Invitrogen®) e a imagem capturada pelo programa AlphaImage™ 2200.

Tabela 4 - Condições de amplificação dos genes para ensaio de PCR.

Patotipo	Gene	Cepas Controles	Sequências (5' - 3')	Temperatura e tempo de anelamento	Tamanho do fragmento (pb)	Referências
UPEC	<i>fimA</i> ^(a) *	J96 (+) / UEL13 (-)	CTG TCG GCT CTG TCC CTC AGT GAT GCG GTA CGA ACC TGT CCT AA	65 °C – 1'	161	Nowrouzian et al., 2005
	<i>fimH</i> ^(a) * (adesina)	J96 (+) / UEL13 (-)	GAC GTC ACC TGC CCT CCG GTA TGC AGA ACG GAT AAG CCG TGG	63 °C – 1'	508	Hernandes, 2006
	<i>papA</i> ^(a) *	J96 (+) / UEL13 (-)	CAC ATT ATC ACC ATC TTT C TCT ATT GAT TTT GGA CAG C	50 °C – 1'	306	NC_007946
	<i>sfaD-E</i> ^(a) * (chaperonina)	RS218 (+) / DH5α (-)	(D) CTC CGG AGA ACT GGG TGC ATC TTA C (E) CGG AGG AGT AAT TAC AAA CCT GGC A	50 °C – 40"	410	Le Bouguenec et al., 1992
EPECt	<i>bfpA</i> ^(a) **	E2348/69 (+) / C600 (-)	GGT CTG TCT TTG ATT GAA TC TTT ACA TGC AGT TGC CGC TT	55 °C – 1'	485	NC_002142
	<i>ecpA</i> ^(a)	E2348/69 (+) / <i>S. aureus</i> ATCC (-)	(1F) GCC GCT GAT GAT GGA GAA AG (2R) GCA ACA GCC AAA AAA GAC ACC	56 °C – 1'	384	Saldanã et al., 2009 NC_011601
EPECa	<i>dafaE</i> ^(b) *	135/12 (+) / DH5α (-)	TACCAGCAGCGGCACCAAC GGTAGGTGCTGTTGGTCATTT	58 °C – 1'	369	AF325672
	<i>IdaH</i> ^(b) * (afimbrial)	O26:H11 (+) / C600 (-)	CCCCGGTTTTACGCCTTTTGT CGTAACCCTGCCGTCCGATAGA	64 °C – 1'	391	AY858803.1
EAECT	<i>aggA</i> ^(a) **	17-2 (+) / C600 (-)	GCG TTA GAA AGA CCT CCA ATA GCC GGA TCC TTA AAA ATT AAT TCC GGC	55 °C – 1'	462	Bernier et al., 2002
	<i>aafA</i> ^(a) **	O42 (+) / C600 (-)	ACA TGC ATG CAA AAA ATC AGA ATG TTT GTT CGG GAT CCA TTT GTC ACA AGC TCA GC	63 °C – 1'	550	Czeczulin et al, 1997
	<i>agg3A</i> ^(a) **	RN785-1 (+) / C600 (-)	GTA TCA TTG CGA GTC TGG TAT TCA G GGG CTG TTA TAG AGT AAC TTC CAG	60 °C – 1'	462	Bernier et al., 2002

Continua

Tabela 4 - Continuação

Patotipo	Gene	Cepas Controles	Sequências (5' - 3')	Temperatura e tempo de anelamento	Tamanho do fragmento (pb)	Referências
EAECT	<i>Agg4A / hdaA</i> ^{(a)**}	1116 (+) / DH5α (-)	TGAGTTGTGGGGCTAYCTGGA CACCATAAGCCGCCAAATAAGC	57 °C – 1'	169	Boisen et al., 2008
EAECa	<i>pilS</i> ^{(a)**}	C1096 (+) / C600 (-)	ATG AGC GTC ATA ACC TGT TC CTG TTG GTT TCC AGT TTG AT	50 °C – 1'	534	Dudley et al., 2006
	<i>pilV</i> ^{(a)**} (adesina)	C1096 (+) / C600 (-)	ATG CAA AAA GAC AAC GAT AA TTA ATT GAG CGT TAC ACA CG	50 °C – 1'	1194	NZ_AAJT02000012
ETEC	<i>CS21/IngA</i> ^{(a)**}	E9034A (+) / C600 (-)	AAA AAT CGC CAA ATA CCA T GTT TGT CCA TTG TTA CCT	55 °C – 45''	588	AF004308
	<i>CFA/I</i> ^{(a)**}	H10407 (+) / C600 (-)	GCT CTG ACC ACA ATG TTT G TTA CAC CGG ATG CAG AAT A	54 °C – 1'	364	S73191 Ghosal et al., 2007
	<i>CS1/cooA</i> ^{(a)**}	170A1 (+) / C600 (-)	TTG ACC TTC TGC AAT CTG A CAT CTG CAT GGA TTG TTG AAA G	54 °C – 1'	324	Ghosal et al., 2007
	<i>CS2/cofA</i> ^{(a)**}	E4833 (+) / DH5α (-)	(F1) GAG AAA AAT ATC ACT GTA ACTG (R1) TAT TAG TTT GCT GGG TGC TTC	57 °C – 1'	385	Z47800.1
	<i>CS3</i> ^{(a)**}	PB176 (+) / C600 (-)	GGT GGG TGT TTT GAC TCT T TGT TCG TTA CCT TCA GTG G	54 °C – 1'	264	Ghosal et al., 2007
ETEC	<i>CFA/III/cofA</i> ^{(a)**}	220A1 (+) / DH5α (-)	GCC TTC TGG AAG TCA TCA T TGC CAC ATA CTC CCA GTT A	52 °C – 40''	437	Ghosal et al., 2007
	<i>CS4/csfa</i> ^{(a)**}	E8775 (+) / C600 (-)	TTT TGC AAG CTG ATG GTA G TCT GCA GGT TCA AAA GTC A	54 °C – 1'	250	Ghosal et al., 2007
	<i>CS5</i> ^{(a)**}	4961-2 (+) / C600 (-)	CGG ATT GGA TAT ACC GTT T TCA ACA GCA AAT GTT ACC G	54 °C – 1'	453	Ghosal et al., 2007
	<i>CS6/cssA</i> ^{(a)**} (afimbrial)	E17018A (+) / C600 (-)	TTT TGC AAG CTG ATG GTA G TCT GCA GGT TCA AAA GTC A	54 °C – 1'	250	Ghosal et al., 2007
DAEC	<i>daaC</i> ^{(a)**} (Usher)	C1845 (+) / DH5α (-)	GTT CTG ACG CAC CTC TAT CCG CAT TGG ACC CTG GCG TGT TAG	64 °C – 1'	286	EU010379.1

Continua

Tabela 4 - Continuação

Patotipo	Gene	Cepas Controles	Sequências (5' - 3')	Temperatura e tempo de anelamento	Tamanho do fragmento (pb)	Referências
STEC	<i>sfpA</i> ^{(a) **}	O157:H ⁻ (+) / C600 (-)	AGC CAA GGC CAA GGG ATT ATT A TTA GCA ACA GCA GTG AAG TCT C	64 °C – 1'	440	Brunder et al., 2001
	<i>lpfA_{O113}</i> ^{(a) *}	STEC50 (+) / DH5α (-)	ATG AAG CGT AAT ATT ATA G TTA TTT CTT ATA TTC GAC	52 °C – 1'	573	Doughty et al., 2002
STEC/EHEC	<i>lpfA1-1</i> ^(c)	E2348/69 (+) / C600 (-)	GTGCTGGATTCCACTATTCATCG AGT TGG TGA TAA ATC ACC AT	59 °C – 30"	222	Torres et al., 2009
	<i>lpfA1-2</i> ^(c)	FV10094 (+) / C600 (-)	AAG TCT GTA TTT ACT GCT ATG GAA ATA CAG AAC GGT CTG A	57 °C – 30"	273	Torres et al., 2009
	<i>lpfA1-3</i> ^(c)	EDL933 (+) / C600 (-)	GGT TGG TGA CAA ATC CCC G CGT CTG GCC TTT ACT CAG A	62 °C – 30"	244	Torres et al., 2009
	<i>lpfA1-5</i> ^(c)	FV10106 (+) / DH5α (-)	GGT TGG TGA CAA ATC CCC G GAG AAC CGT CTG GCC TGT TT	60 °C – 30"	273	Torres et al., 2009
	<i>lpfA2-1</i> ^(c)	FV10132 (+) / C600 (-)	GGTAGTCTGGCGTCGCCACAGA AAT ACG AAT ACC AAC GCC G	60 °C – 30"	207	Torres et al., 2009

- (a) **Descrição das condições gerais de amplificação dos genes:** desnaturação inicial de 5 min a 95 °C, com as amostras sujeitas a 30 ciclos de desnaturação de 1 min a 94 °C e extensão de 40 segundos (*cofA* e *lngA*) e 1 min a 72 °C, com extensão final de 7 min a 72 °C.
- (b) **Descrição das condições gerais de amplificação dos genes:** desnaturação inicial de 5 min a 94 °C, com as amostras sujeitas a 30 ciclos de desnaturação de 1 min a 94 °C e extensão de 1 min a 72 °C, com extensão final de 8 min a 72 °C.
- (c) **Descrição das condições gerais de amplificação dos genes:** desnaturação inicial de 5 min a 94 °C, com as amostras sujeitas a 35 ciclos de desnaturação de 30 segundos a 94 °C e extensão de 30 segundos a 72 °C, com extensão final de 5 min (A1-B1, A1-C_(F) / A1-C1_(R)) e A2-B1) e 10 min (A1-A e A1-C) a 72 °C.

* Cromossomal

** Plasmidial

4.2.1 Extração do DNA genômico de lisado bacteriano

4.2.1.1 **Choque térmico**

Os estoques bacterianos mantidos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ foram cultivados inicialmente em caldo Luria-Bertani (LB) por 18 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, seguido por semeadura em agar LB por 24 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Próximo ao Bico de Bunsen, uma alçada do cultivo bacteriano, obtida a partir do cultivo em agar, foi transferida para microtubos contendo $500\text{ }\mu\text{L}$ de água MilliQ estéril, submetida à fervura por 10 min e imediatamente colocada em banho de gelo.

4.2.1.2 **Digestão enzimática**

Os isolados de EPEC atípica foram crescidos em 3 mL de LB por 18 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ e o DNA genômico foi extraído de acordo com a metodologia descrita por Van Soolingen et al. (1993) e o procedimento descrito em *Illustra™ bacteria genomicPrep Mini Spin Kit*⁵ (GE Healthcare®).

O DNA genômico purificado dos isolados de EPECa foi utilizado como molde nas reações de PCR com os iniciadores *sfaD-E*, *aafA*, *aggA*, *pilS*, *cotA* (CS2), *lpfA1-3* e *lpfA2-1*, que apresentaram anelamento inespecífico com outros fragmentos de DNA ao utilizarmos as amostras de DNA das bactérias lisadas por fervura. A metodologia de Van Soolingen et al. (1993) foi utilizada na obtenção do DNA molde dos isolados de EPECa BA320, Ec292/84, 9100-83 e BA4013. Porém, para obtenção do DNA molde dos outros 59 isolados de EPECa foi utilizado o *kit* de extração do DNA genômico de fabricação da GE Healthcare®.

5. O kit não especifica a concentração final das soluções, somente o volume a ser usado em cada etapa da extração.

O isopropanol e o etanol utilizados no protocolo de Van Soolingen et al. (1993), foram previamente resfriados a -20 °C. As etapas de extração do DNA genômico foram as seguintes: 1,5 mL de concentrado bacteriano foi centrifugado a 16.000 x g por 5 min. Após a centrifugação, o sedimento bacteriano foi ressuspense em 400 µL de tampão TE [0,01 M de Tris-HCl e 0,001 M de EDTA (pH 8.0)]. Em seguida foi adicionada 50 µL de lisozima na concentração final de 1 mg/mL e a amostra foi incubada a 37 °C por 1 h. Após este período foi adicionada 75 µL da solução SDS/proteinase K [10% de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 10 mg/mL de proteinase K] e a mistura foi incubada a 65 °C por 10 min. Um volume de 100 µL da solução de cloreto de sódio (5 M de NaCl) e o mesmo volume da solução de CTAB/NaCl [10% de brometo de cetiltrimelamônio (CTAB) e 0,7 M de NaCl] foram adicionadas a mistura, que foi novamente incubada. Posteriormente, outro volume de 750 µL da solução de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) foi adicionada a mistura, esta foi homogeneizada no agitador vortex (AD8850, Donner®) por 10 s e centrifugada a 16.000 x g por 7 min. Após a centrifugação, ao sobrenadante coletado foi adicionado 0,6 volumes de isopropanol (resfriado), em seguida a mistura foi incubada a -20 °C por 1h. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 16.000 x g por 15 min a 4 °C. Ao precipitado obtido foi adicionado 1 mL de etanol PA (resfriado), sendo em seguida centrifugado a 16.000 x g por 5 min a 4 °C. Novamente, ao precipitado coletado foi adicionado 1 mL de etanol a 70% (resfriado) e a mistura foi centrifugada. O precipitado obtido foi seco a temperatura ambiente, para a total evaporação do etanol, e o material foi ressuspense em 50 µL de água MilliQ estéril e estocado a -20 °C. Para amostra em uso, o DNA estocado foi diluído em 1:10 em água MilliQ estéril.

As etapas de extração utilizando o Illustra™ *bacteria genomicPrep Mini Spin* foram as seguintes: 1 mL da cultura bacteriana crescida foi centrifugada a 16.000 x g por 30 s. Ao precipitado obtido adicionou-se 40 µL da solução *Lysis Buffer type 2* (GE Healthcare®) que foi homogeneizado até a sua total dissolução, seguido pela adição de 10 µL de Proteinase-K (GE Healthcare®),

previamente mantida a 4 °C. A amostra foi novamente homogeneizada e acrescida de 10 µL de *Lysis Buffer type 3* (GE Healthcare®), seguido por 10 s de homogeneização e rápida centrifugação a 1.000 x g por 5 s. O sobrenadante foi transferido para microtubo de 1,5 mL e incubado a 55 °C por 15 min. Após a incubação adicionou-se 5 µL de RNase A (20 mg/mL) (Invitrogen®), esta mistura foi homogeneizada e rapidamente centrifugada. Durante o processo de purificação da amostra, ao sobrenadante acrescentou-se 500 µL de *Lysis Buffer type 4* (GE Healthcare®), seguido de homogeneização e incubação a temperatura ambiente por 10 min. Após a incubação, a amostra foi transferida para coluna revestida com membrana de sílica e centrifugada a 11.000 x g por 1 min. Novamente, 500 µL da solução *Lysis Buffer type 4* (GE Healthcare®) foram colocados na coluna, sendo em seguida centrifugada. Para lavagem, 500 µL da solução *Wash Buffer type 6* (GE Healthcare®) foram adicionados à coluna e centrifugados a 16.000 x g por 3 min. Na fase de eluição da amostra, 200 µL de *Elution Buffer type 5* (GE Healthcare®) previamente aquecido a 70 °C foi adicionado à coluna, passando por centrifugação a 11.000 x g por 1 min. A amostra eluída foi estocada a -20 °C, até o momento do uso.

O rendimento dos DNA extraídos foi verificado qualitativamente por meio de eletroforese em gel de agarose *high EEO* (Fischer Scientific®) a 0,8% sendo a corrida eletroforética realizada sob voltagem constante a 70 V em solução tampão TAE pH 8.0. O gel foi corado em solução de brometo de etídio 0,01% (Invitrogen®) e a imagem capturada pelo programa *AlphaImage™* 2200.

4.3 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DOS ISOLADOS DE EPECa

Os extratos protéicos das cepas de EPECa BA320, Ec292/84, 9100-83 and BA4013 foram obtidos de acordo com o protocolo a seguir, modificado a partir da metodologia descrita por Girón, Ho e Schoolnik (1991). Os isolados foram previamente cultivados em 3 mL de caldo tripticaseína de soja (TSB) por

18 h a 37 °C, sem agitação. Após este período a pré-cultura bacteriana na diluição de 1:100 foi adicionada a 500 mL de caldo TSB, que foi mantida em crescimento por 18 h a 37 °C sob agitação constante de 65 rpm.

As culturas bacterianas finais foram centrifugadas a 12.800 x g por 10 min e os sedimentos bacterianos resultantes foram ressuspensos em 100 mL de tampão salina-fosfato 0,01M pH 7,2 (PBS) e submetidos a duas extrações sucessivas, utilizando-se o *Omnimixer G20*, com sonda de aço inoxidável de 20 mm (aparelho que permite a retirada de apêndices filamentosos das bactérias) (Omini TH®; Omni International). Este processo consistiu em submeter o sedimento bacteriano a três ciclos sucessivos de 3 min a 4.000 rpm, em *Omnimixer*, sendo cada ciclo seguido de resfriamento estático por 3 min. Após a primeira extração, o produto obtido foi centrifugado a 23.500 x g por 30 min. O sobrenadante foi coletado e mantido a 4 °C. A seguir, foi realizada uma nova extração, nas mesmas condições da primeira. Obtido o segundo sobrenadante, este foi adicionado ao primeiro, sendo então precipitados com sulfato de amônio na concentração final de 50%, por 18 h a 4 °C, sob leve agitação. Os precipitados resultantes, da centrifugação de 28.400 x g por 30 min, foram ressuspensos a 1/10 do volume inicial em tampão Tris 50 mM (pH 8,5) e mantidos a 4 °C sem agitação por 18 h. Posteriormente, este foi centrifugado a 5.000 x g por 10 min e os sedimentos obtidos foram ressuspensos em 2 mL de Tris 50 mM e submetidos à extensivas diálises sob leve agitação no mesmo tampão a 4 °C. Este procedimento foi realizado durante três dias, com duas trocas diárias do tampão de diálise. Após o 3º dia, o extrato protéico foi concentrado em *Vivaspin2* de *cut off* 3.000 Da (GE Healthcare Bio-Sciences®). A concentração protéica foi determinada utilizando-se o reagente de *Bradford* (Sigma-Aldrich®), a seguir o material foi liofilizado e estocado a -20 °C.

4.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

As preparações bacterianas, antes e após a extração com *Omnimixer*, foram lavadas em PBS e coradas negativamente com acetato de uranila 2% sobre grades de níquel revestidos com carbono-*Formvar* e observados com Microscópio LEO 906E (Leica Microsystems BmgH®), operando em 80 kV (KNUTTON, 1995). Os sobrenadantes obtidos após a extração e centrifugação das preparações bacterianas foram aplicados diretamente sobre a grade de níquel, seguido por lavagem com PBS e água destilada sendo posteriormente corados com acetato de uranila 2% (DANIELL et al., 2001).

4.5 GEL BIDIMENSIONAL (2D)

4.5.1 Primeira Dimensão: separação das proteínas por gradiente de pH

4.5.1.1 **Reidratação em *DeStrek***

Posteriormente ao procedimento do **item 4.3**, 200 µg de proteínas extraídas e liofilizadas foram ressuspensas em 300 µL de *DeStreak* (GE Healthcare Bio-Sciences®), contendo 0,8% IPG *buffer* pH 3-10 ou pH 4-7 (GE Healthcare Bio-Sciences®) para reidratação em contato com as fitas de 13 cm (GE Healthcare Bio-Sciences®) de pH 3-10 ou pH 4-7 respectivamente, devidamente acomodada no aparato *Immobliline DryStrip Reswelling Tray* (GE Healthcare Bio-Sciences®), e recoberta com o *Cover Fluid* (GE Healthcare Bio-Sciences®), por 22 h à temperatura ambiente.

4.5.1.2 Focalização da fita

As fitas hidratadas foram focalizadas no equipamento ETTAN IPGphor (GE Healthcare Bio-Sciences®), para separação das proteínas de acordo com o seu ponto isoelétrico, utilizando a programação para fitas de 13 cm. As etapas foram as seguintes: (S1) Stp 500 V por 1 h, (S2) Grd 100 V a 750 Vh, (S3) Grd 8.000 V a 11.250 Vh, (S4) Grd 8000 V a 4.000 Vh, (S5) Stp 200 V a 2.050 Vh, (S6) Stp 100 V por 24 h e (S7) Stp 8.000 V por 30 min.

4.5.1.3 Equilíbrio da fita

As fitas hidratadas contendo os extratos proteicos dos isolados de EPEC atípica foram desnaturadas em 10 mL de tampão de equilíbrio (6 M de uréia, 75 mM de Tris-HCL pH 8.8, 29,3% de glicerol, 2% de SDS e 0,002% de azul de bromofenol) contendo 65 mM de Dithiothreitol (DTT- Gibco®), seguido pela alquilação em tampão de equilíbrio com adição de 135 mM de Iodoacetamida (IAA- Sigma-Aldrich®) durante 15 min (cada etapa), sob agitação à temperatura ambiente.

4.5.2 Segunda Dimensão: separação das proteínas por migração eletroforética

A fita equilibrada foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970) a 15% em *Sistem Hoefler SE600* (Amersham Pharmacia®), para separação das proteínas de acordo com suas massas moleculares. O padrão de massas moleculares *Low Molecular Weight* (LMW) de 14,4 a 97 kDa (Amersham Biosciences®) também foi adicionado ao gel. O programa de separação foi inicialmente de 15 mA por 30 min, seguido de 60 mA até a migração final das proteínas no gel, durante aproximadamente 1 h e 30 min.

4.6 COLORAÇÃO DAS PROTEÍNAS COM NITRATO DE PRATA

O gel 2D foi corado por solução de nitrato de prata, de acordo com a adaptação do protocolo descrito por Blum, Bier e Gross (1987). O gel foi fixado com 50% de metanol, 12% de ácido acético e 0,05% de formaldeído por 30 s a temperatura médio-alta em forno microondas M-200E (CCE®) e 30 min a temperatura ambiente (TA) com leve agitação; seguido por lavagem em solução 30% de metanol por 30 s a temperatura alta em forno microondas e 5 min (TA) com leve agitação. Na fase seguinte, os géis foram incubados com solução de 0,02% de tiosulfato de sódio por 30 s em temperatura alta e 2 min (TA) sob agitação. Em seguida, o gel foi lavado duas vezes com água destilada por 30 seg em temperatura alta e 2 min (TA) com agitação. Após as lavagens, esses foram incubados com 0,2% de nitrato de prata por 30 s em temperatura alta e 5 min (TA) com agitação. Uma última lavagem foi feita com água destilada por 40 s em alta temperatura, anteriormente a adição da solução reveladora contendo 0,05% de formaldeído e 3% de carbonato de sódio por aproximadamente 3 min (TA), a reação foi interrompida com 12% de ácido acético em 50% de metanol.

A imagem foi capturada em densitômetro não-fluorescente *ImageScanner™ III* – LabScan (GE Healthcare Bio-Sciences®) com resolução de 300 dpi e analisada pelo programa *ImageMaster™ 2D Platinum 6.0* (GE Healthcare Bio-Sciences®).

4.7 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Todos os microtubos (Axygen®) utilizados foram lavados duas vezes em metanol e água destilada, seguido por secagem em estufa a 37 °C.

4.7.1 Digestão enzimática *in gel*

4.7.1.1 **Remoção de SDS, redução, alquilação e digestão**

A metodologia a seguir foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Shevchenko et al. (1996). Os géis cortados tiveram o SDS removido por incubação com 0,5 mL de solução *destain* (50% de metanol contendo 5% de ácido acético) por 2 h à temperatura ambiente. Outra incubação foi realizada com nova solução *destain* por mais 1 h. Em seguida os géis foram desidratados por duas vezes com 200 µL de acetonitrila por 5 min cada. O excesso de acetonitrila foi removido e o restante evaporado em *SpeedVac* (Eppendorf®) por 5 min. Para a redução das pontes de dissulfeto, os fragmentos de géis contendo as proteínas foram incubados com 30 µL de solução de DTT 10 mM (Gibco®) em 100 mM de bicarbonato de amônio pH 8,0, sob agitação por 30 min à temperatura ambiente. Na alquilação, os géis foram incubados com 30 µL de solução de IAA 50 mM (Sigma®) em 100 mM de bicarbonato de amônio por 30 min. Seguido pela lavagem dos fragmentos com 100 µL de uma solução 100 mM de bicarbonato de amônio, por 10 min. Os géis foram desidratados com acetonitrila por 5 min à temperatura ambiente e secos no sistema *SpeedVac* (Eppendorf®). Na fase seguinte, os pedaços de gel processados foram incubados com 16 µL de solução de tripsina (Promega®) na concentração de 20 ng/µL por 30 min, em banho de gelo. O excesso de tripsina foi retirado e 20 µL de uma solução 50 mM de bicarbonato de amônio pH 8,0 foram adicionados aos géis, sendo em seguida incubados por 18 h a 37 °C.

4.7.1.2 Extração dos peptídeos tripsínicos

Após 18 h de incubação, foram adicionados 10 µL da solução de extração - 1 (TFA 5%) por 10 min à temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante com os peptídeos foi coletado em microtubos e estocado a 4 °C. Posteriormente, os géis foram incubados por duas vezes, sob agitação, com a solução de extração - 2 (TFA 5% em acetonitrila 50%) em intervalos de 10 min e 30 min, à temperatura ambiente. O sobrenadante coletado foi adicionado ao anterior e concentrado no sistema *SpeedVac* (Eppendorf®) por 25 min, até o volume de aproximadamente 10 µL. O armazenamento permanente dos peptídeos feito em *freezer* a -20 °C.

4.8 PEPTIDE MASS FINGERPRINT (PMF)

4.8.1 Análise dos peptídeos tripsínicos por *Electrospray Quadrupole – Time of Flight Mass Spectrometry* (ESI-Q-Tof/MS)

Os peptídeos digeridos enzimaticamente *in gel* (Shevchenko et al., 1996) foram mantidos em solução de extração (TFA 5% em acetonitrila 50%) e armazenados em *freezer* a -20 °C.

Os peptídeos descongelados foram secos no sistema *SpeedVac* (Eppendorf®) e as amostras ressuspensas em 10 µL de solução de ácido fórmico a 0,1% foram aplicados no sistema de LC-MS/MS (Acquity-UPLC ESI-Q-Tof Waters) para separação dos peptídeos, determinação de massa molecular e fragmentação para posterior identificação dos fragmentos da proteína precursora. O sistema foi continuamente calibrado (*lock-mass*) com ácido fosfórico. Um total de 59 *spots* com massa molecular (MM) entre 14,4 a 35 kDa foram selecionados nos géis 2D dos isolados de EPEC atípica BA320,

Ec292/84, BA4013 e 9100-83. Este intervalo de massa foi selecionado, uma vez que as MM teóricas obtidas *in silico* das pilinas fimbriais das *E. coli* patogênicas, que foram pesquisadas por PCR nos quatro isolados de EPECa (**item 5.1**), estão no intervalo de MM entre 14 a 22 kDa (**Tabela 5**). Os experimentos para a análise dos peptídeos tripsínicos foram realizados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas.

Tabela 5 - Massa molecular (MM) e ponto isoelétrico (pI) das fímbrias dos patotipos de *E. coli*

Patotipo	Gene	Fímbria	Proteína MM (kDa) / pI ⁽¹⁾	
UPEC*	<i>fimA</i>	Tipo 1 (Fim)	18,55 / 5,52	
	<i>fimH</i> (adesina)		31,42 / 7,59	
	<i>papA</i>	P (Pap)	18,96 / 6,07	
	<i>sfaD-E</i> (chaperonina)	S (Sfa)	-----	
EPECt	<i>bfpA</i>	BFP	19,5 / 5,3	
	<i>ecpA</i>	ECP	21 / 4,65	
EPECa	<i>dafaE</i>	Dafa (fibrilina)	17,24 / 6,9	
	<i>ldaH</i> (afimbrial)	Lda	28,86 / 4,92	
EAECT	<i>aggA</i>	AAF/II	15,6 / 9,55	
	<i>aafA</i>	AAF/II	17,09 / 9,75	
	<i>agg3A</i>	AAF/III	17,95 / 9,37	
	<i>Agg4A / hdaA</i>	AAF/IV	17,9 / 8,99	
EAECa	<i>pilS</i>	Pil	19,1 / 8,69	
	<i>pilV</i> (adesina)		42,62 / 8,77	
ETEC	CS21/ <i>IngA</i>	Longus (CS21)	22 / 9,59	
	CFA/I	CFA/I	15 / 7,92	
	CS1/ <i>cooA</i>	CFA/II	CS1	16,8 / 6,82
	CS2/ <i>cotA</i>		CS2	15,4 / 5,77
	CS3		CS3	17,46 / 6,04
	CFA/III/ <i>cofA</i>	CFA/III	20,5 / 9,02	
	CS4/ <i>csfA</i>	CFA/IV	CS4	17 / 4,87
	CS5		CS5	20,84 / 4,54
	CS6/ <i>cssA</i> (afimbrial)		CS6	16,95 / 5,64
	DAEC**	<i>daaC</i> (<i>usher</i>)	F1845	12,72 / 9,97
STEC	<i>sfpA</i>	Fermentadora de Sorbitol (Sfp)	17,93 / 5,84	
	<i>lpfA</i> _{O113}	LPFA	19,67 / 4,97	
EHEC	<i>lpfA1-1</i> ^(a)	LPFA(A1-A)	18,05 / 4,6	
	<i>lpfA1-2</i> ^(a)	LPFA(A1-B1)	18,20 / 4,65	
	<i>lpfA1-3</i> ^(a)	LPFA(A1-C)	18,52 / 4,58	
	<i>lpfA1-5</i> ^(a)	LPFA(A1-C[F]/A1-C1[R])	12,9 / 4,59	
	<i>lpfA2-1</i> ^(a)	LPFA(A2-B1)	19,66 / 4,97	

(1) MM / pI teóricos foram obtidos *in silico* usando o programa ExPasy ProtParam tool (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>)

* *sfaA* (SfaA): pilina da fímbria S expressa por UPEC (MM= 18,44 kDa / pI= 5,64)

** *daaE* (DaaE): pilina da fímbria F1845 expressa por DAEC (MM= 14,3 kDa / pI= 6,05)

(a) Variantes polimórficos de LPF

4.8.2 Parâmetros MASCOT utilizados para a identificação das proteínas em banco de dados

A interpretação dos espectros para dedução da sequência dos peptídeos (*sequence-tags*) e posterior identificação das proteínas decorrentes dos experimentos realizados por ESI-Q-ToF (Ultima API®, Waters), foi feita utilizando-se o software MASCOT (<http://www.matrixscience.com/>) de interpretação de bancos de dados, ajustado com os seguintes parâmetros previamente selecionados: banco de dados (NCBIInr), enzima (tripsina), permitir até 2 (*missed cleavages*), desvio de massas do ion precursor (0.4 Da), desvio de massa dos íons filhos \pm (0.2 Da), modificação fixa (*Carbamidomethyl - C*), modificação variável (*Oxidation - M*), carga do peptídeo (1+, 2+ ou 3+), formato dos dados (*Mascot generic*) e instrumento (ESI-QUAD-TOF).

5 RESULTADOS

5.1 PESQUISA DOS GENES DE ADESINAS NOS ISOLADOS DE EPECa BA320, EC292/84, 9100-83 E BA4013

A presença dos genes, descritos na **Tabela 4**, foi pesquisada por PCR a partir do DNA molde dos isolados de EPEC atípica BA320 (localizada-*like*), Ec292/84 (agregativa), 9100-83 (difusa) e BA4013 (não aderente).

As quatro EPEC atípicas testadas foram positivas para a presença dos genes *fimA* (**Figura 10**), *fimH* (**Figura 11**) e *ecpA* (**Figura 12**). O gene *lpfA*_{O113}, foi observado somente no isolado de EPECa BA4013 (**Figura 13**, linha 6). Enquanto, os variantes polimórficos de *lpfA*, denominados *lpfA1-2*, *lpfA1-3* e *lpfA2-1*, somente foram encontrados nos isolados BA320 (**Figuras 14** [*lpfA1-2*] e **15** [*lpfA1-3*], linha 3) e BA4013 (**Figuras 14** [*lpfA1-2*] e **16** [*lpfA2-1*], linha 6).

No entanto, os demais genes pesquisados não foram encontrados em nenhum dos quatro isolados de EPECa. O resumo dos resultados obtidos nas reações por PCR podem ser observados na **Tabela 6**.

Tabela 6 - Prevalência dos genes de adesinas de *E. coli* patogênicas nos quatro isolados de EPECa

<i>E. coli</i>	Genes	Fímbria	BA320 (ALL)	Ec292/84 (AA)	9100-83 (DA)	BA4013 (NA)
UPEC	<i>fimA</i>	Tipo 1	+	+	+	+
	<i>fimH</i>	Tipo 1 (adesina)	+	+	+	+
	<i>papA</i>	P	-	-	-	-
	<i>sfaD-E</i>	S (chaperonina)	-	-	-	-
EPECt	<i>bfpA</i>	BFP	-	-	-	-
	<i>ecpA</i>	ECP	+	+	+	+
EPECa	<i>ldaH</i>	Menor subunidade de Lda ^(a)	-	-	-	-
	<i>dafaE</i>	fibrilina	-	-	-	-
ETEC	<i>IngA</i>	Longus (CS21)	-	-	-	-
	-	CFA/I	-	-	-	-
	<i>coaA</i>	CFA/II	CS1	-	-	-
	<i>cotA</i>		CS2	-	-	-
	-		CS3	-	-	-
	<i>cofA</i>	CFA/III	-	-	-	-
	<i>csfA</i>	CFA/IV	CS4	-	-	-
	-		CS5	-	-	-
	<i>cssA</i>		CS6	-	-	-
EAECT	<i>aggA</i>	AAF/I	-	-	-	-
	<i>aafA</i>	AAF/II	-	-	-	-
	<i>agg3A</i>	AAF/III	-	-	-	-
	<i>agg4A / hdaA</i>	AAF/IV	-	-	-	-
EAECa	<i>pilS</i>	Pil	-	-	-	-
	<i>pilV</i>	Pil (adesina)	-	-	-	-
DAEC	<i>daaC</i>	F1845 (<i>usher</i>)	-	-	-	-
STEC	<i>sfpA</i>	Fermentadora de Sorbitol	-	-	-	-
	<i>lpfA_{O113}</i>	LPFA	-	-	-	+
EHEC	<i>lpfA1-1</i>	LPFA(A1-A) ^(b)	-	-	-	-
	<i>lpfA1-2</i>	LPFA(A1-B1) ^(b)	+	-	-	+
	<i>lpfA1-3</i>	LPFA(A1-C) ^(b)	+	-	-	-
	<i>lpfA1-5</i>	LPFA(A1-C _[F] / A1-C1 _[R]) ^(b)	-	-	-	-
	<i>lpfA2-1</i>	LPFA(A2-B1) ^(b)	-	-	-	+

^(a)*locus for diffuse adherence* (afimbrial), ^(b)Variantes polimórficos de LPF, UPEC (*E. coli* uropatogênica), EPEC [a, t] (*E. coli* enteropatogênica [típica, atípica]), ETEC (*E. coli* enterotoxigênica), EAEC [a, t] (*E. coli* enteroagregativa [típica, atípica], DAEC (*E. coli* difusamente aderente), STEC (*E. coli* produtora da toxina *Shiga*, LEE negativo) e EHEC (*E. coli* enterohemorrágica). ALL (localizada-like); AA (agregativa); DA (difusamente aderente); NA (não aderente).

Figura 10 - Perfil eletroforético em gel de agarose (1,2%) dos fragmentos amplificados nas reações com o gene *fimA* (*amplicon* de 161 pb). 1. J96 (controle positivo); 2. UEL13 (controle negativo); 3. BA320; 4. Ec292/84; 5. 9100-83; 6. BA4013.

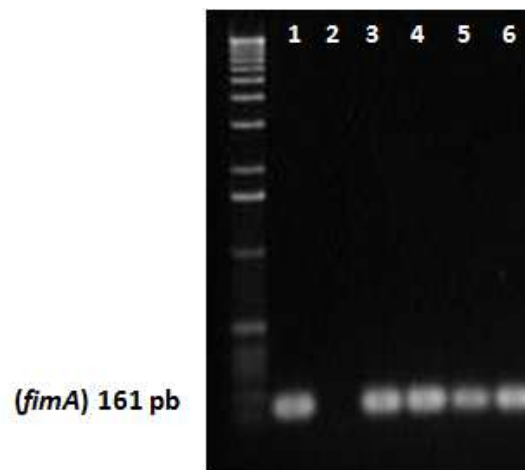


Figura 11 - Perfil eletroforético em gel de agarose (1,2%) dos fragmentos amplificados nas reações com o gene *fimH* (*amplicon* de 508 pb). 1. J96 (controle positivo); 2. UEL13 (controle negativo); 3. BA320; 4. Ec292/84; 5. 9100-83; 6. BA4013.

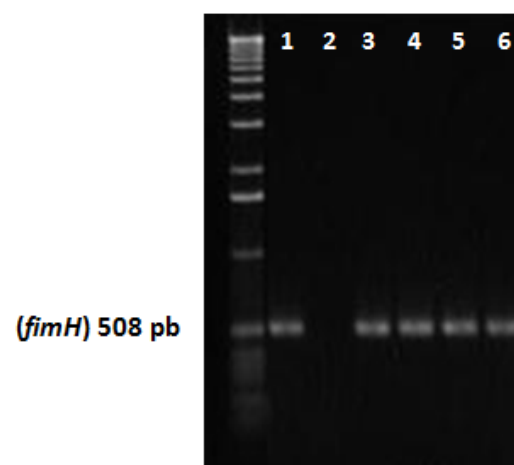


Figura 12 - Perfil eletroforético em gel de agarose (1,2%) dos fragmentos amplificados nas reações com o gene *ecpA* (*amplicon* de 384 pb). **1.** E2348/69 (controle positivo); **2.** *S. aureus* (controle negativo); **3.** BA320; **4.** Ec292/84; **5.** 9100-83; **6.** BA4013.

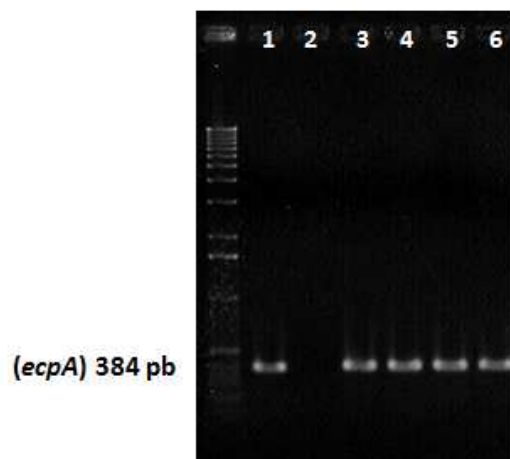


Figura 13 - Perfil eletroforético em gel de agarose (1,2%) dos fragmentos amplificados nas reações com o gene *lpfAO113* (*amplicon* de 573 pb). **1.** STEC50 (controle positivo); **2.** DH5 α (controle negativo); **3.** BA320; **4.** Ec292/84; **5.** 9100-83; **6.** BA4013.

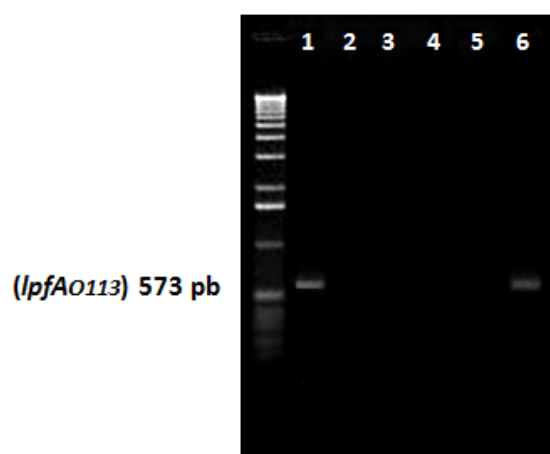


Figura 14 - Perfil eletroforético em gel de agarose (1,2%) dos fragmentos amplificados nas reações com o gene *lpfA1-2* (amplicom de 273 pb). 1. FV10094 (controle positivo); 2. C600 (controle negativo); 3. BA320; 4. Ec292/84; 5. 9100-83; 6. BA4013.

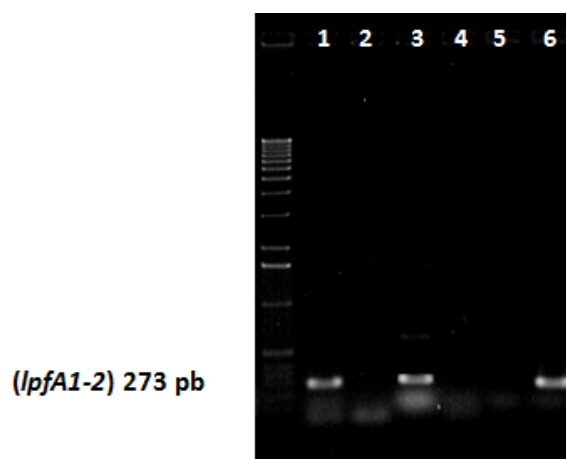


Figura 15 - Perfil eletroforético em gel de agarose (1,2%) dos fragmentos amplificados nas reações com o gene *lpfA1-3* (amplicom de 244 pb). 1. EDL 933 (controle positivo); 2. C600 (controle negativo); 3. BA320; 4. Ec292/84; 5. 9100-83; 6. BA4013.

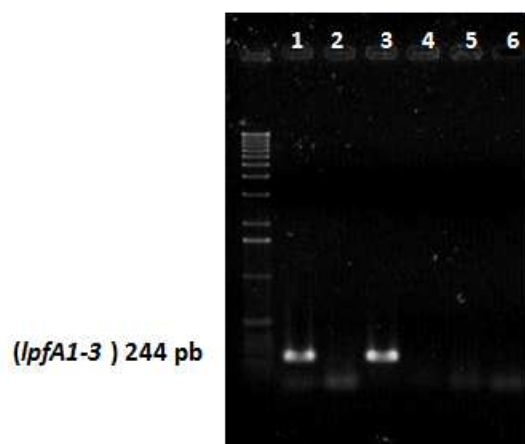
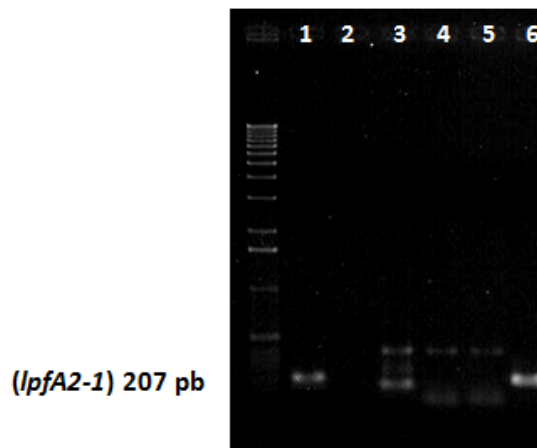


Figura 16 - Perfil eletroforético em gel de agarose (1,2%) dos fragmentos amplificados nas reações com o gene *lpfA2-1* (*amplicom* de 207 pb). 1. FV10132 (controle positivo); 2. C600 (controle negativo); 3. BA320; 4. Ec292/84; 5. 9100-83; 6. BA4013.



5.2 PESQUISA DOS GENES DE ADESINAS EM 59 ISOLADOS DE EPECa

Após a pesquisa dos genes que codificam as adesinas fimbriais e não fimbriais nos quatro isolados bacterianos protótipos BA320 (ALL), Ec292/84 (AA), 9100-83 (DA) e BA4013 (NA), as reações de PCR padronizadas foram utilizadas na determinação da prevalência desses genes em outros 59 isolados de EPECa. Os resultados da pesquisa realizada podem ser observados na **Tabela 7**, no qual diferentes isolados de EPECa com os sorotipos ONT:H5 e O88:H25, apresentaram positividade para os mesmos genes pesquisados. No entanto, no isolado BA852 (O88:H25) verificou-se a ausência do gene *fimA*, apesar da presença de *fimH*. Por outro lado, nos demais isolados de EPECa não foi observada uma correlação entre os genes e os sorotipos bacterianos.

Os genes (*bfpA*, *sfaD-E*, CFA/I, CS1 [*cooA*], CS2 [*cotA*], CS3, CFA/III [*cofA*], CS4 [*csfA*], CS5, CS6 [*cssA*] e CS21 [*lngA*]), *aggA*, *aafA*, *agg3A*, e *lpfA1-5*) pesquisados não foram encontrados em nenhum dos isolados de EPECa.

Tabela 7 - Genes de adesinas e padrões de aderência dos 59 isolados de EPEC atípica

EPECa	Sorotipo	genes	Padrão de aderência
BA1244	O55:H7	<i>fimA, fimH, papA, pilS, pilV, lpfA1-2, lpfA1-3, lpfA2-1, ecpA, daaC</i>	ALL
BA4147	O55:H7	<i>fimA, fimH, papA, lpfA1-3, ecpA</i>	ALL
BA3378	O104:H2	<i>fimA, fimH, pilS, ecpA</i>	ALL
BA356	O33:H7	<i>fimA, fimH, pilS, lpfA1-1, ecpA</i>	NA
BA956	O111:H15	<i>fimA, fimH, pilS, pilV, lpfA1-1, ecpA</i>	NA
BA589	O5:H2	<i>fimA, fimH, pilS, lpfA1-2, lpfA2-1, ecpA</i>	NA
BA86	O76:H19	<i>fimA, fimH, lpfA1-2, lpfA2-1, ecpA, daaC</i>	NA
BA4009	O114:H25	<i>fimA, fimH, lpfA_{O113}, lpfA1-1, lpfA2-1, ecpA</i>	DA
BA3148	O35:H19	<i>fimA, fimH, lpfA_{O113}, lpfA1-2, ecpA</i>	NA
BA2103	O26:H11	<i>fimA, fimH, lpfA_{O113}, lpfA1-2, lpfA2-1, ecpA</i>	ALL
BA2145	O105:H7	<i>fimA, fimH, lpfA_{O113}, lpfA1-2, lpfA2-1, ecpA</i>	AA
BA2468	ONT:H19	<i>fimA, fimH, lpfA_{O113}, lpfA1-2, lpfA2-1, ecpA</i>	NA
BA2775	O113:H19	<i>fimA, fimH, lpfA_{O113}, lpfA1-2, lpfA2-1, ecpA</i>	NA
BA2297	O153:H11	<i>fimA, fimH, lpfA_{O113}, lpfA2-1, ecpA</i>	DA
BA2923	O34:H6	<i>fimA, fimH, lpfA_{O113}, lpfA1-2, lpfA1-3, lpfA2-1, ldaH, ecpA</i>	NA
BA2991	O34:H ⁻	<i>fimA, fimH, lpfA1-2, lpfA2-1, ldaH, ecpA</i>	NA
BA2613	O101:H33	<i>fimA, fimH, lpfA1-2, ldaH, ecpA</i>	NA
BA179	O23:H16	<i>fimA, fimH, ldaH, ecpA</i>	NA
BA1738	O80:H26	<i>fimA, fimH, lpfA1-2, lpfA2-1, ecpA</i>	NA
BA3851	ONT:H38	<i>fimA, fimH, lpfA1-1, lpfA1-2, lpfA2-1, ecpA</i>	ALL
BA4132	O51:H48	<i>fimA, fimH, lpfA1-1, lpfA1-2, lpfA2-1, ecpA</i>	ALL
BA4135	O108:H25	<i>fimA, fimH, lpfA1-1, lpfA1-2, lpfA2-1, ecpA</i>	NA
BA3977	ONT:H45	<i>fimA, fimH, lpfA1-1, lpfA1-2, sfpA, ecpA</i>	ALL
BA585	O157:H16	<i>fimA, fimH, lpfA1-2, lpfA1-3, ecpA</i>	AA
BA1250	ONT:H6	<i>fimA, fimH, lpfA1-2, ecpA</i>	ALL
BA2073	ONT:H5	<i>fimA, fimH, lpfA1-1, lpfA1-2, ecpA</i>	DA
BA2065	ONT:H5	<i>fimA, fimH, lpfA1-1, lpfA1-2, ecpA</i>	NA
BA2117	ONT:H5	<i>fimA, fimH, lpfA1-1, lpfA1-2, ecpA</i>	NA
BA151	ONT:H9	<i>fimA, fimH, lpfA1-2, lpfA2-1, ecpA</i>	NA
BA365	ONT:H19	<i>fimA, fimH, lpfA1-2, lpfA2-1, ecpA</i>	NA
BA655	O88:H25	<i>fimA, fimH, lpfA1-2, lpfA2-1, ecpA</i>	NA
BA2975	O88:H25	<i>fimA, fimH, lpfA1-2, lpfA2-1, ecpA</i>	NA
BA3443	O88:H25	<i>fimA, fimH, lpfA1-2, lpfA2-1, ecpA</i>	NA
BA852	O88:H25	<i>fimH, lpfA1-2, lpfA2-1, ecpA</i>	NA
BA1324	O34:H45	<i>fimA, fimH, lpfA1-1, lpfA2-1, ecpA</i>	ALL
BA3157	O119:H2	<i>fimA, fimH, lpfA1-2, lpfA2-1, ecpA</i>	ALL
BA4077	O64:H23	<i>fimA, fimH, lpfA1-2, lpfA2-1, ecpA</i>	ALL
BA3574	ONT:H38	<i>fimA, fimH, lpfA1-2, lpfA2-1, ecpA</i>	ALL
BA3160	O110:H ⁻	<i>fimA, fimH, lpfA1-2, lpfA2-1, ecpA</i>	NA
BA3836	ONT:H19	<i>fimA, fimH, lpfA1-2, lpfA2-1, ecpA</i>	NA
BA3690	O111:H38	<i>fimA, fimH, lpfA1-2, lpfA2-1, ecpA</i>	AA
BA4047	O1:H16	<i>fimA, fimH, lpfA1-3, lpfA2-1, ecpA</i>	ALL
BA4095	O4:H45	<i>fimA, fimH, lpfA1-1, ecpA</i>	ALL
BA2294	O9:H33	<i>fimA, fimH, lpfA1-1, ecpA</i>	NA
BA3392	O124:H11	<i>fimA, fimH, lpfA1-2, ecpA</i>	NA
BA3800	ONT:H19	<i>fimA, fimH, lpfA1-2, ecpA</i>	NA
BA442	O35:H19	<i>fimA, fimH, lpfA1-2, ecpA</i>	NA
BA580	O119:H2	<i>fimA, fimH, lpfA1-2, ecpA</i>	NA
BA2034	ONT:H10	<i>fimA, fimH, lpfA1-2, ecpA</i>	ALL
BA3733	O119:H19	<i>fimA, fimH, lpfA1-2, ecpA</i>	ALL
BA2482	O119:H11	<i>fimA, fimH, lpfA1-2, ecpA</i>	AA
BA1649	O111:H38	<i>fimA, fimH, lpfA2-1, ecpA</i>	ALL
BA92	O2:H16	<i>fimA, fimH, ecpA</i>	AA
BA1652	O131:H4	<i>fimA, fimH, ecpA</i>	ALL
BA2853	ONT:H10	<i>fimA, fimH, ecpA</i>	ALL
BA4157	ONT:H25	<i>fimA, fimH, ecpA</i>	AA
BA487	O55:H7	<i>fimA, lpfA1-3, ecpA</i>	ALL
BA4058	O20:H ⁻	<i>fimH, lpfA1-1, ecpA</i>	NA
BA714	O111:H ⁻	<i>fimH, lpfA1-2, ecpA</i>	ALL

Padrão de aderência após 6 h de incubação com células HEp-2: ALL (adesão localizada-like), AA (adesão agregativa), DA (difusamente aderente) e NA (não aderente)

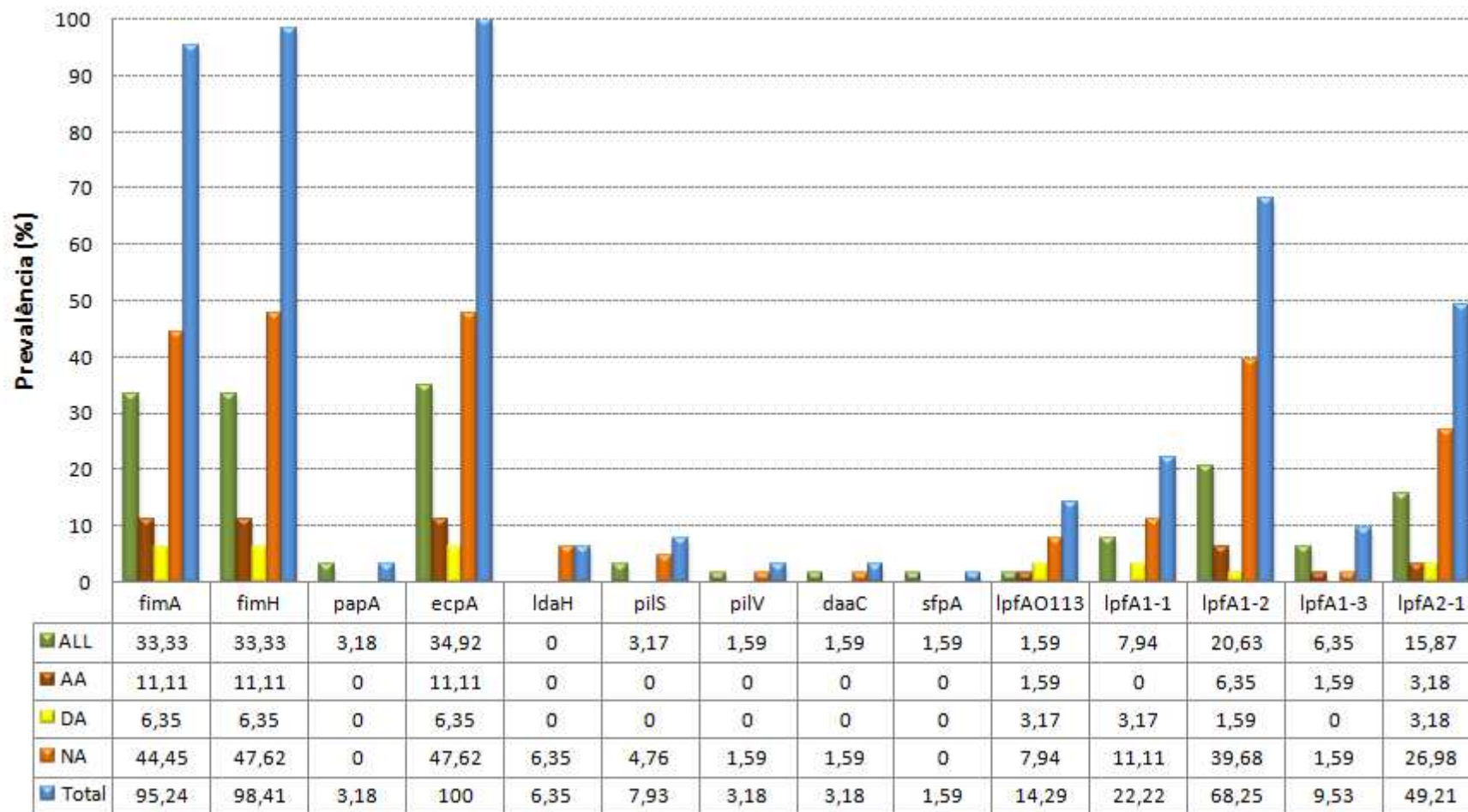
5.3 PREVALÊNCIA DOS GENES DAS ADESINAS DE *E. coli* PATOGÊNICAS NAS EPECa

A prevalência dos genes foi observada em 63^(*) isolados de EPECa, que apresentam os fenótipos de adesão localizado-*like* (ALL), difuso (DA), agregativo (AA) e também em isolados não aderentes (NA).

Na **Figura 17** observa-se que os genes encontrados com maior frequência foram *fimA* (60 [95,24%]), *fimH* (62 [98,41%]), *ecpA* (63 [100%]), *lpfA1-2* (43 [68,25%]) e *lpfA2-1* (31 [49,21%]). Por outro lado, genes tais como: *papA* (2 [3,18%]), *idaH* (4 [6,35%]), *pilS* (5 [7,93%]), *pilV* (2 [3,18%]), *daaC* (2 [3,18%]), *sfpA* (1 [1,59%]), *lpfA_{O113}* (9 [14,29%]), *lpfA1-1* (14 [22,22%]) e *lpfA1-3* (6 [9,53%]) foram encontrados nos isolados de EPECa com menor frequência.

^(*) Para fins de cálculo, na coleção de 59 EPECa foram acrescentados os isolados BA320 (ALL), Ec292/84 (AA), 9100-83 (DA) e BA4013 (NA).

Figura 17 - Prevalência dos genes de adesinas de *E. coli* patogênicas em EPECa



5.4 QUANTIFICAÇÃO DO EXTRATO PROTÉICO EXTRAÍDO COM OMNIMIXER G20

A partir de 500 mL de meio TSB cultivado com os isolados de EPECa foram obtidos 2 mL de um concentrado protéico, que teve sua quantidade de proteína estimada por *Bradford*: 105 µg/mL de extrato protéico da BA320, 302 µg/mL da Ec292/84, 140 µg/mL da BA4013 e 76 µg/mL da 9100-83. Para cada gel 2D realizado, foram utilizados 200 µg de concentrado protéico.

5.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

A presença de diferentes genes fimbriais levou-nos inicialmente a pesquisar, por MET, a presença de estruturas filamentosas ancoradas à superfície bacteriana, como aquelas que podem ser observadas na **Figura 18**, nos isolados EPECa BA320, Ec292/84, 9100-83 e BA4013. Por outro lado, a fim de se verificar a integridade celular dos isolados bacterianos após a extração utilizando *Omnimixer G20*, o sedimento bacteriano e o sobrenadante coletado após cada etapa de extração foram submetidos à coloração negativa e observados por microscopia. Na **Figura 19** pode-se observar no sedimento lavado somente com tampão PBS a ausência de lise bacteriana (**A** e **B**). Após a extração mecânica, observa-se ainda a integridade do corpo bacteriano e a perda dos apêndices filamentosos (**C** e **D**). Além de filamentos, outras estruturas protéicas podem ser observadas no sobrenadante ressuspenso em tampão PBS (**E**).

Figura 18 - Microscopia Eletrônica de Transmissão. Coloração negativa com 2% de acetato de uranila da EPECa BA320 (A), Ec292/84 (B), 9100/83 (C) e BA4013 (D), mostrando a presença de estruturas filamentosas. Barra 0,2 μm .

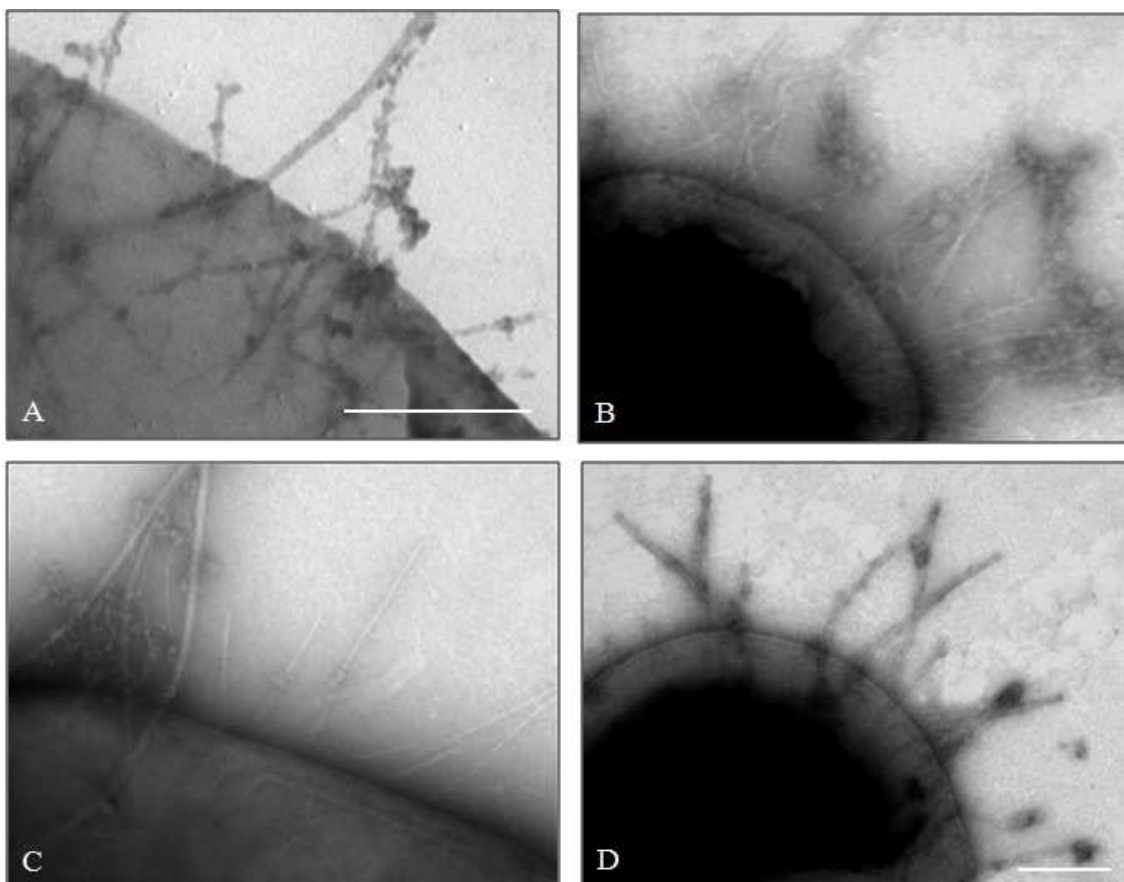
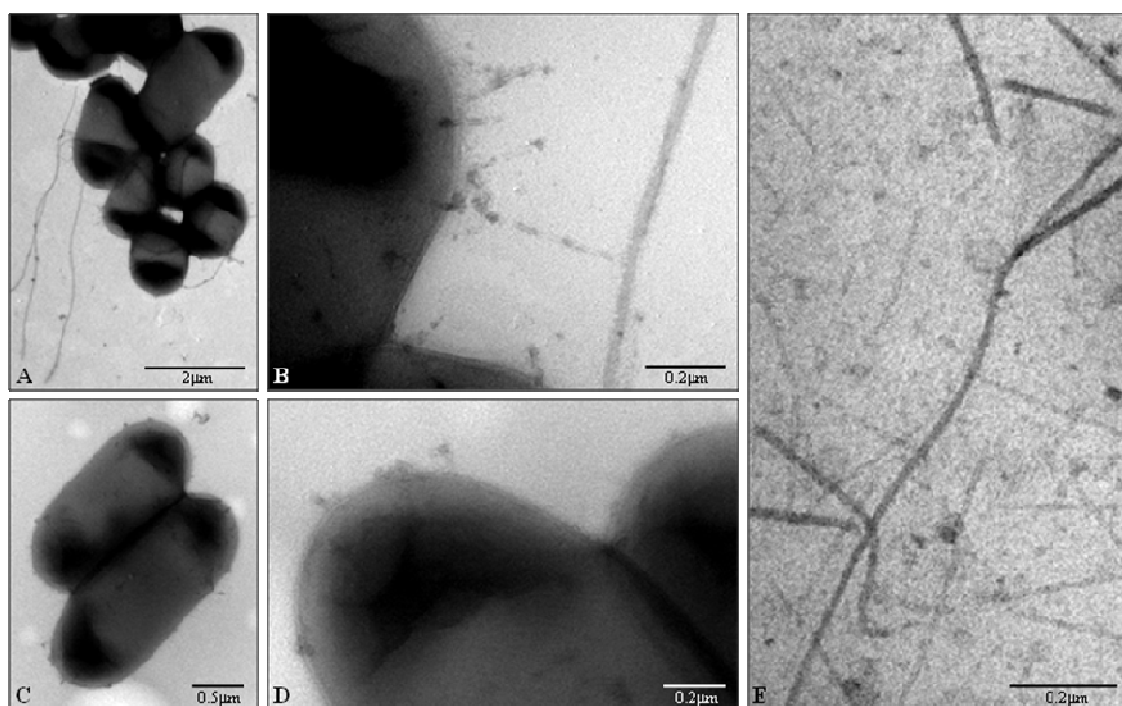


Figura 19 - Microscopia Eletrônica de Transmissão. Coloração negativa com 2% de acetato de uranila da EPECa 9100-83. (A e B) antes e (C, D e E) após a extração com *Omnimixer G20*. Barra 0,2 μm .



5.6 GEL BIDIMENSIONAL (2D)

Inicialmente, o extrato proteico do isolado 9100-83 (**Figura 20**) foi reidratado e focalizado em fita de pH no intervalo de 3-10. Na **Figura 21** observa-se os géis dos extratos proteicos das cepas BA320 (**A**), Ec292/84 (**B**) e 9100-83 (**C**) e BA4013 (**D**) que foram obtidos após a utilização de fitas de focalização isoeletrica na faixa de pH 4-7.

Por análise computacional utilizando o programa *ImageMaster*TM 2D Platinum 6.0 (GE Healthcare Bio-Sciences®) determinamos os parâmetros experimentais de massa molecular (MM) e ponto isoeletrico (pI) das proteínas presentes nos extratos proteicos dos quatro isolados. A partir desses dados foram selecionadas *spots* com MM entre 14 kDa a 35 kDa.

A **Tabela 8** apresenta outros parâmetros (área, volume e intensidade) gerados pelo *ImageMaster*TM 6.0, a partir dos *spots* marcados nos géis BA320 (6ALL, 7ALL e 15ALL), Ec292/84 (5AA, 10AA e 11AA), 9100-83 (6DA, 10DA, 12DA, 13DA, 14DA e 18DA) e BA4013 (2NA e 4NA). Com base nesses dados, foi possível selecionar os *spots* 12DA e 13DA na faixa de MM acima citada, para a produção de imagens tridimensionais (**Figura 22**), que possibilitaram a avaliação qualitativa dos *spots*, confirmando assim a presença de uma única proteína por ponto selecionado.

Figura 20 - Eletroforese Bidimensional (2D). **A.** Extrato proteico do isolado **9100-83** na concentração de 200 μg , hidratado e focalizado com 18.193 Vh, por 24h58min em fita de pH 3-10. **B.** Aumento da região com os *spots* selecionados na faixa de MM entre 14,4 kDa a 23 kDa, com variação de pI entre 3,867 (16 kDa) a 5,867 (20 kDa).

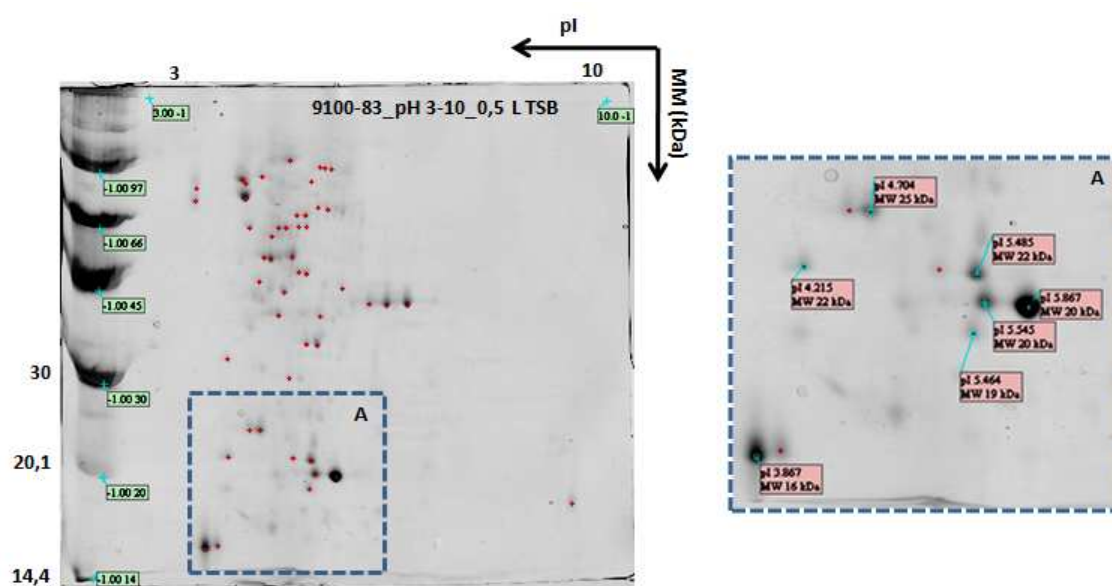


Figura 21 - Eletroforese Bidimensional (2D). Extratos proteicos na concentração de 200 μ g adicionado em fita de pH 4-7. E o aumento da região dos géis com os spots selecionados na faixa de MM entre 14,4 kDa a 35 kDa dos isolados (A) BA320, (B) Ec292/84, (C) 9100-83 e (D) BA4013.

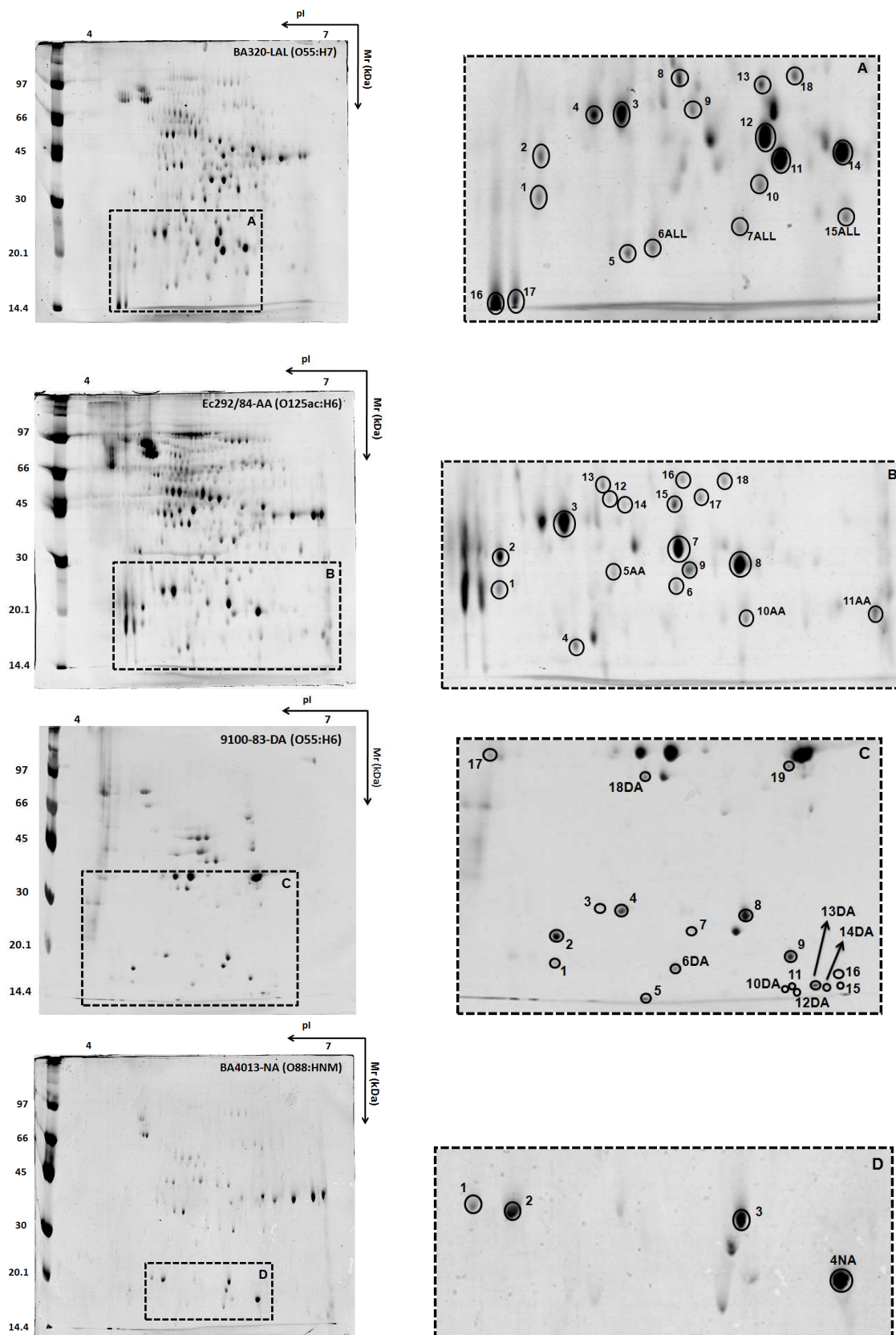


Tabela 8 - Valores de área, volume e intensidade dos *spots* selecionados a partir do gel 2D contendo extratos protéicos das EPECa.

EPECa	Spot	Área (mm ²)	Volume %	Intensidade %
BA320 (ALL)	6	10,22	0,53	0,45
	7	11,26	0,54	0,38
	15	10,29	0,57	0,49
Ec292/84 (AA)	5	13,16	0,64	0,19
	10	12,44	0,70	0,23
	11	12,59	1,13	0,34
9100-83 (DA)	6	5,38	1,19	0,94
	10	2,42	0,17	0,29
	12	1,89	0,18	0,38
	13	2,82	1,31	1,87
	14	5,18	0,51	0,44
BA4013 (NA)	2	6,01	0,92	2,36
	4	6,97	2,34	3,82

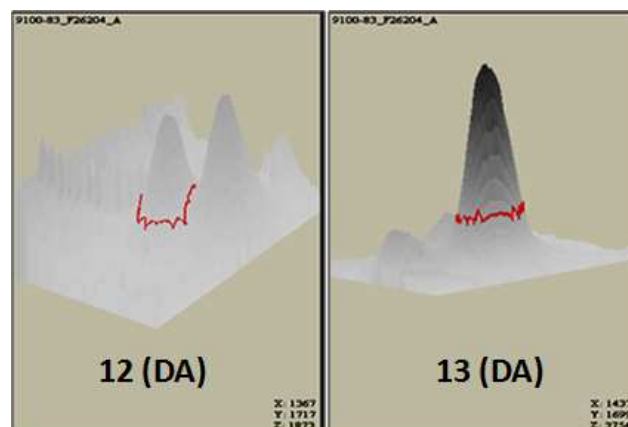
ALL: Adesão Localizada-Like

AA: Adesão Agregativa

DA: Difusamente Aderente

NA: Não Aderente

Figura 22 - Imagens tridimensionais (3D) gerados pelo *ImageMaster™* 6.0 a partir dos *spots* selecionados nos géis 2D do extrato protéico 9100-83.



5.7 PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR MASCOT

Os *spots* marcados na **Figura 21** foram analisados por LC-ESI-Q-Tof/MS-MS (Waters Corp) e as proteínas obtidas identificadas pelo *software* MASCOT, onde 59 proteínas foram identificadas nos quatro isolados de EPECa. Individualmente, foram identificadas 18 proteínas nos extratos BA320 (ALL, Adesão Localizada-Like) (**Tabela 9**) e Ec292/84 (AA, Adesão Agregativa) (**Tabela 10**), 19 proteínas no isolado 9100-83 (DA, Difusamente Aderente) (**Tabela 11**), enquanto no isolado BA4013 (NA, Não Aderente) somente 4 proteínas foram identificadas (**Tabela 12**), no intervalo de massa molecular entre 14 – 35 kDa.

Na **Figura 23** estão apresentadas as funções, de acordo com aquelas anotadas nos bancos de dados, das proteínas identificadas a partir dos extratos proteicos dos quatro isolados de EPECa. Pode-se notar que foram identificadas proteínas que podem estar envolvidas nos processos funcionais das adesinas fímbrias (**Tabela 13**), dentre as quais destacamos a proteína de regulação transcricional H-NS (7ALL) identificada no isolado BA320, as proteínas metabólicas pertencentes ao *cluster* Usp denominadas UspA (BA320, 6ALL) e UspD (9100-83, 14DA e 15DA). Uma OmpX, proteína de membrana externa, também foi identificada nos extratos proteicos dos isolados Ec292-84 (5AA) e 9100-83 (6DA). Ainda na 9100-83 foram identificadas as proteínas FucU- *L-fucose mutarotase* (10DA) e a proteína MglB- *galactose-binding transport protein* (18DA). Além disso, nos isolados BA320 (15ALL), Ec292/84 (10AA) e 9100-83 (12DA) que apresentam fenótipos de adesão foi identificada uma provável proteína filamentosa. Por outro lado, a proteína hipotética Z0175 somente foi identificada nos isolados de fenótipo agregativo (11AA) e difuso (13DA). Enquanto isso, no isolado BA4013 não aderente, identificou-se duas outras proteínas hipotéticas Z3776 (1NA) e Z2335 (2NA), presente somente neste isolado. Também se observou que, a maioria das proteínas identificadas (**Tabela 13**), que aparentemente podem ter atividades correlacionadas às adesinas fimbriais são produtos de genes originalmente identificados no genoma de EHEC O157:H7 (EDL933).

Tabela 9 - Proteínas identificadas em EPECa BA320 extraídas com *Omnimixer G20*. As proteínas foram identificadas utilizando o programa MASCOT

Spot ALL nº	pI / MM (kDa)		Nº de acesso NCBI	Descrição da proteína (gene)
	Experimental ^(a)	Teórico ^(b)		
1	4.79/19	4.77/19.42	NP_288340.1	Ferritina [<i>E. coli</i> O157:H7, EDL933] (<i>ftr</i>)
2	4.80/21	4.73/18.12	NP_416912.1	Enzima glicose-específica IIA, componente de PTS [<i>E. coli</i> MG1655] (<i>crr</i>)
3, 4 ^(c)	5.17/24	5.03/20.63	NP_286332.1	Hidroperóxido alkil redutase, subunidade C [<i>E. coli</i> EDL933] (<i>ahpC</i>)
5	5.20/16	5.09/14.28	NP_289137	Cofator radical glicil Autonomo, GrcA [<i>E. coli</i> EDL933] (<i>yfiD</i>)
6	5.31/17	5.12/15.94	NP_290066.1	Proteína universal de stress, UspA [<i>E. coli</i> EDL933] (<i>uspA</i>)
7	5.70/17	5.44/15.41	NP_287482.1	Regulador transcricional DNA- <i>binding</i> , H-NS [<i>E. coli</i> EDL933] (<i>hns</i>)
8	5.43/27	5.84/27.01	NP_752963.1	Proteína hipotética c1034 [<i>E. coli</i> CFT073] (<i>ycaC</i>)
9, 10 ^(d)	5.49/25	5.59/20.86	AAA24759.1	Flavoproteína [<i>E. coli</i> K12] (<i>wrbA</i>)
11	5.82/23	5.72/18.56	NP_286576.1	Proteína de proteção de fase estacionária, Dps [<i>E. coli</i> EDL933] (<i>dps</i>)
12	5.89/21	5.58/21.13	1ISA_A	Estrutural funcional do Ferro superóxido dismutase [<i>E. coli</i>]
13	5.80/27	5.57/22.28	NP_288287.1	Aldolase KHG/KDPG [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933] (<i>eda</i>)
14	6.17/21	5.52/18.61	ZP_03070543.1	Biosíntese de cofator de molibdênio, proteína B [EAEC atípica101-1] (<i>moaB</i>)
15	6.19/18	5.77/15.96	NP_310024.2	Provável proteína filamentosa [<i>E. coli</i> O157:H7, Sakai]
16, 17 ^(e)	4.59/14	4.60/12.16	NP_290617.1	Proteína ribossomal 50S, L7/L12 [<i>E. coli</i> EDL933] (<i>rplL</i>)
18	5.95/27	5.55/21.56	NP_286179.1	Protease caseinolítica [<i>E. coli</i> EDL933] (<i>clpP</i>)

^(a) pI/MM experimentais foram gerados pelo programa *ImageMaster™ 2D Platinum 6.0* através da análise do gel 2D.

^(b) pI/MM teóricos foram obtidos *in silico* usando o programa ExPasy ProtParam tool (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>).

^(c, d, e) Proteínas de mesmo *match* identificadas em diferentes *spots* (pI diferentes).

Tabela 10 - Proteínas identificadas em EPECa Ec292/84 extraídas com *Omnimixer G20*. As proteínas foram identificadas utilizando o programa MASCOT.

Spot AA nº	pI / MM (kDa)		Nº de acesso NCBI	Descrição da proteína (gene)
	Experimental ^(a)	Teórico ^(b)		
1	4.71/19	4.77/19.42	NP_288340.1	Ferritina [<i>E. coli</i> O157:H7, EDL933](<i>ftn</i>)
2	4.72/21	4.73/18.12	NP_416912.1	Enzima glicose-específica IIA, componente de PTS [<i>E. coli</i> MG1655] (<i>crr</i>)
3	5.11/24	5.03/20.63	NP_286332.1	Hidroperóxido alkil redutase, subunidade C [<i>E. coli</i> EDL933] (<i>ahpC</i>)
4	5.18/16	5.09/14.27	YP_670471	Cofator radical glicil Autonomo, GrcA [<i>E. coli</i> 536] (<i>grcA</i>)
5	5.42/20	5.04/16.36	1QJ8_A	Proteína de membrana externa, OmpX [<i>E. coli</i>]
6	5.80/19	5.59/20.86	AAA24759.1	Proteína repressora ligante, Trp [<i>E. coli</i> K12] (<i>wrbA</i>)
7	5.81/21	5.58/21.13	1ISA_A	Estrutura funcional do Ferro superóxido dismutase [<i>E. coli</i>]
8, 9 ^(c)	6.19/20	5.72/18.71	1DPS_A	Ferritina-like de proteção ao DNA, Dps
10	6.22/17	5.77/15.96	NP_310024.2	Provável proteína filamentosa [<i>E. coli</i> O157:H7, Sakai]
11	7.01/18	6.61/15.10	NP_285859.1	Proteína hipotética Z0175 [<i>E. coli</i> O157:H7, EDL933] (<i>yaeH</i>)
12	5.39/27	5.22/24.17	NP_289797.1	Proteína A <i>stringent starvation</i> [<i>E. coli</i> EDL933] (<i>sspA</i>)
13	5.35/28	5.20/22.86	NP_755370.1	Isomerase A ribose-5-fosfato [<i>E. coli</i> CFT073] (<i>rpiA</i>)
14, 15 ^(d)	5.48/26	5.57/22.28	NP_288287.1	Aldolase KHG/KDPG [<i>E. coli</i> EDL933] (<i>eda</i>)
16	5.83/29	5.50/23.99	NP_752595.1	Dihidropteridina redutase [<i>E. coli</i> CFT073] (<i>nfnB</i>)
17	5.94/27	5.55/21.56	NP_286179.1	Protease caseinolítica [<i>E. coli</i>] (<i>clpP</i>)
18	6.09/29	5.67/24.57	NP_290648.1	Peptidase E [<i>E. coli</i> EDL933] (<i>pepE</i>)

^(a) pI/MM experimentais foram gerados pelo programa *ImageMaster™ 2D Platinum 6.0* através da análise do gel 2D.

^(b) pI/MM teóricos foram obtidos *in silico* usando o programa ExPasy ProtParam tool (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>).

^(c, d) Proteínas de mesmo *match* identificadas em diferentes spots (pI diferentes).

Tabela 11 - Proteínas identificadas em EPECa 9100-83 extraídas com *Omnimixer G20*. As proteínas foram identificadas utilizando o programa MASCOT

Spot DA nº	pI / Mr (kDa)		Nº de acesso NCBI	Descrição da proteína (gene)
	Experimental ^(a)	Teórico ^(b)		
1	4.65/15	5.25/14.05	ZP_06655887	Proteína hipotética conservada [<i>E. coli</i> B354]
2	4.66/17	4.65/17.32	1F3G_A	Cadeia A da proteína fosfocarreadora de Glc [<i>E. coli</i>]
3	4.92/19	5.03/19.72	YP_002332003.1	Pirofosfatase inorgânica [<i>E. coli</i> E2348/69] (<i>ppA</i>)
4	5.03/18	4.99/20.39	NP_756494	Proteína hipotética c4636 [<i>E. coli</i> CFT073] (<i>yjeF</i>)
5	5.17/14	5.09/14.27	YP_670471	Cofator radical glicil Autonomo, GrcA [<i>E. coli</i> 536]
6	5.35/15	5.04/16.40	1ORM_A	Proteína de membrana externa, OmpX [<i>E. coli</i>]
7	5.45/17	4.94/16.81	YP_444131.1	Proteína hipotética O2ColV76 [<i>E. coli</i> A2363, cepa patogênica de ave]
8	5.75/18	5.72/18.71	AAA21855.1	Proteína de ligação ao DNA, PexB (<i>pexB</i>)
9	6.01/16	5.66/16.19	BAA84485.1	Superóxido dismutase ferro-containing [<i>E. coli</i> ATCC25922] (<i>sodB</i>)
10	5.95/14	5.57/15.47	NP_289359.1	Proteína de operon de fucose [<i>E. coli</i> O157:H7, EDL933] (<i>fucU</i>)
11	6.01/14	6.17/15.77	NP_290833.1	Proteína ribossomal 50S, L9 [<i>E. coli</i> EDL933] (<i>rplI</i>)
12	6.03/14	5.77/15.96	NP_310024.2	Provável proteína filamentosa [<i>E. coli</i> O157:H7, Sakai]
13	6.15/14	6.61/15.10	NP_285859.1	Proteína hipotética Z0175 [<i>E. coli</i> O157:H7, EDL933] (<i>yaeH</i>)
14,15 ^(c)	6.22/14	6.37/16.28	NP_290552.1	Proteína Universal de stress, UspD [<i>E. coli</i> EDL933] (<i>yjiT</i>)
16	6.30/15	6.84/17.03	NP_285874.1	(3R)-hidroximiristoil-ACP desidratase [<i>E. coli</i> EDL933] (<i>fabZ</i>)
17	4.28/35	4.55/33.30	NP_286383.1	Provável proteína transportadora [<i>E. coli</i> EDL933] (<i>corC</i>)
18	5.17/32	5.68/35.74	NP_288733.1	Proteína de transporte galactose-binding [<i>E. coli</i> EDL933] (<i>mgIB</i>)
19	6.00/33	5.89/33.51	NP_754079.1	Proteína hipotética c2185 [<i>E. coli</i> CFT073]

^(a) pI/MM experimentais foram gerados pelo programa *ImageMaster™ 2D Platinum 6.0* através da análise do gel 2D.

^(b) pI/MM teóricos foram obtidos *in silico* usando o programa Expasy ProtParam tool (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>).

^(c) Proteínas de mesmo *match* identificadas em diferentes spots (pI diferentes).

Tabela 12 - Proteínas identificadas em EPECa BA4013 extraídas com *Omnimixer G20*. As proteínas foram identificadas utilizando o programa MASCOT.

Spot NA nº	pI / Mr (kDa)		Nº de acesso NCBI	Descrição da proteína (gene)
	Experimental ^(a)	Teórico ^(b)		
1	4.86/20	5.03/20.63	NP_286332	Hidroperóxido alkil redutase, subunidade C [<i>E. coli</i> O157:H7, EDL933] (<i>ahpC</i>)
2	5.00/20	5.07/22.21	NP_289066.1	Proteína hipotética Z3776 [<i>E. coli</i> EDL933]
3	5.84/19	5.59/20.86	AAA24759.1	Proteína repressora ligante, Trp [<i>E. coli</i> K12] (<i>wrbA</i>)
4	6.19/17	5.77/15.96	NP_287771.1	Proteína hipotética Z2335 [<i>E. coli</i> EDL933] (<i>ynaF</i>)

^(a) pI/MM experimentais foram gerados pelo programa *ImageMaster™ 2D Platinum 6.0* através da análise do gel 2D.

^(b) pI/MM teóricos foram obtidos *in silico* usando o programa ExPasy ProtParam tool (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>).

Figura 23 - Funções das proteínas identificadas pelo MASCOT nos isolados de EPECa.

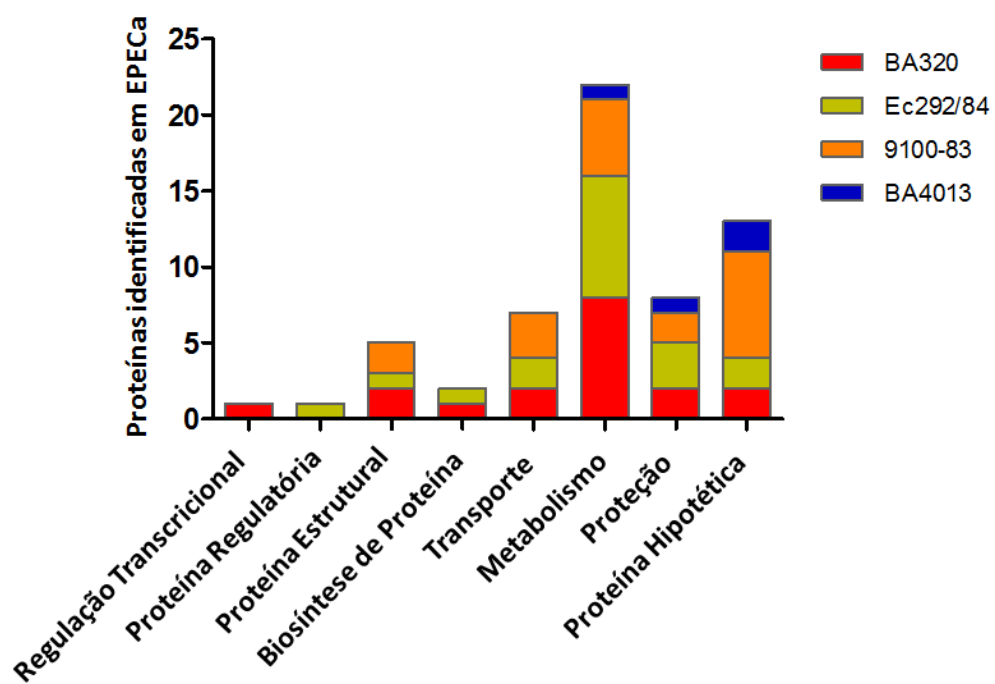


Tabela 13 - Proteínas identificadas em EPECa BA320 (ALL), Ec292/84 (AA), 9100-83 (DA) e BA4013 (NA) funcionalmente relacionadas as adesinas fimbriais de *E. coli*.

EPECa	Spot nº	pI / MM (kDa)		Nº de acesso NCBI	Descrição da proteína (gene)
		Experimental ^(a)	Teórico ^(b)		
BA320 (ALL)	6	5.31/17	5.12/15.94	NP_290066.1	Proteína universal de stress, UspA [<i>E. coli</i> EDL933] (<i>uspA</i>)
	7	5.70/17	5.44/15.41	NP_287482.1	Regulador transcricional DNA-binding, H-NS [<i>E. coli</i> EDL933] (<i>hns</i>)
	15	6.19/18	5.77/15.96	NP_310024.2	Provável proteína filamentosa [<i>E. coli</i> O157:H7, Sakai]
Ec292/84 (AA)	5	5.42/20	5.04/16.36	1QJ8_A	Proteína de membrana externa, OmpX [<i>E. coli</i>]
	10	6.22/17	5.77/15.96	NP_310024.2	Provável proteína filamentosa [<i>E. coli</i> O157:H7, Sakai]
	11	7.01/18	6.61/15.10	NP_285859.1	Proteína hipotética Z0175 [<i>E. coli</i> O157:H7, EDL933] (<i>yaeH</i>)
9100-83 (DA)	6	5.35/15	5.04/16.40	1ORM_A	Membrane protein OmpX from Escherichia coli
	10	5.95/14	5.57/15.47	NP_289359.1	Proteína de operon de fucose [<i>E. coli</i> O157:H7, EDL933] (<i>fucU</i>)
	12	6.03/14	5.77/15.96	NP_310024.2	Provável proteína filamentosa [<i>E. coli</i> O157:H7, Sakai]
	13	6.15/14	6.61/15.10	NP_285859.1	Proteína hipotética Z0175 [<i>E. coli</i> O157:H7, EDL933] (<i>yaeH</i>)
	14, 15 ^(c)	6.22/14	6.37/16.28	NP_290552.1	Proteína Universal de stress, UspD [<i>E. coli</i> EDL933] (<i>yiiT</i>)
18	5.17/32	5.68/35.74	NP_288733.1	Proteína de transporte galactose-binding [<i>E. coli</i> EDL933] (<i>mgIB</i>)	
BA4013 (NA)	2	5.00/20	5.07/22.21	NP_289066.1	Proteína hipotética Z3776 [<i>E. coli</i> O157:H7, EDL933]
	4	6.19/17	5.77/15.96	NP_287771.1	Proteína hipotética Z2335 [<i>E. coli</i> EDL933] (<i>ynaF</i>)

^(a) pI/MM experimentais foram gerados pelo programa *ImageMaster™ 2D Platinum 6.0* através da análise do gel 2D.

^(b) pI/MM teóricos foram obtidos *in silico* usando o programa ExPasy ProtParam tool (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>).

^(c) Proteínas de mesmo *match* identificadas em diferentes spots (pI diferentes).

6 DISCUSSÃO

Dentre os patógenos causadores da diarreia, as EPECa emergiu mundialmente como uma significativa causa de diarreia persistente em crianças (HERNANDES, 2011), podendo estar ou não associadas a outros enteropatógenos (FRANZOLIN et al., 2005). EPECa são extremamente heterogêneas no que se refere aos sorotipos, aos padrões de adesão e a presença de fatores de virulência extra-LEE (HERNANDES et al., 2009). Essa heterogeneidade é intrigante e originou diversos estudos utilizando diferentes abordagens, visando melhor compreender a patogênese da diarreia causada por este patógeno (MOREIRA et al., 2008; ABE et al., 2009; MORA et al., 2009; SAMPAIO et al., 2011; YAMAMOTO et al., 2009; SCALETSKY et al., 2005, 2009, 2010; NARA et al., 2010; ROCHA et al., 2011; TADDEI et al., 2011).

Sendo assim, diferentemente das EPEC típicas, as EPEC atípicas com seus diferentes fenótipos de adesão, sugere-nos a existência de outros fatores de virulência que possam estar envolvidos neste mecanismo. Assim, a pesquisa e a caracterização de adesinas são importantes na contribuição e no conhecimento do processo de adesão das EPECa ao enterócito. As adesinas envolvidas no processo de adesão podem ser do tipo fimbrial ou afimbrial, porém outros mecanismos podem estar envolvidos neste processo de forma direta ou indireta através da formação de complexos protéicos responsáveis pela regulação e modulação das atividades funcionais e montagem das adesinas.

Na investigação dos 59 isolados de EPECa, incluindo os isolados BA320 (localizada-like), Ec292/84 (agregativa), 9100-83 (difusa) e BA4013 (não aderente), por PCR verificou-se a presença dos genes fimbriais *fimA*, *fimH* e *papA* de UPEC (BAGA et al., 1987; MOL; OUDEGA, 1996), *ecpA* de EPECT (RENDON et al., 2007), *lpfA*_{O113} de STEC (DOUGHTY et al., 2002), *IdaH* de EPECa (SCALETSKY et al., 2005), *pilS* e *pilV* de EAECa (DUDLEY et al., 2006), *daaC* de DAEC (BILGE et al., 1989), *sfpA* de STEC (BRUNDER et al., 2001) e os variantes polimórfico *lpfA1-1*, *lpfA1-2*, *lpfA1-3* e *lpfA2-1* de EHEC

(TORRES et al., 2004). A variedade de genes fimbriais encontrados nos isolados de EPECa sugere a existência de vários *operons* fimbrias, que potencialmente podem ser expressos em diferentes nichos favorecendo a colonização e sobrevivência intra e extra intestinal das bactérias (HERNANDES et al., 2011).

Em nossa pesquisa verificou-se que 95% de *fimA* e 98% de *fimH* estão presentes nesses isolados de EPECa. Dentre estes dados, observou-se a presença de *fimH* e a ausência de *fimA* no isolado BA852 (O88:H25), podendo inferir que este isolado possui uma deleção e/ou deficiência no gene *fimA*, por isso essa sequência não foi amplificada pelo ensaio de PCR. Além disso, observou-se que todos os isolados de sorotipo O88:H25 não foram aderentes em células HEp-2 (ABE et al., 2009). Com exceção do sorotipo O88:H25, os demais resultados obtidos não mostraram qualquer relação entre os genes encontrados neste estudo e os fenótipos de adesão observados por Abe et al. (2009) nos isolados de EPECa. Recentemente, a presença de *fimA* também foi pesquisada por Hernandez et al. (2011), que verificaram uma prevalência de 76% deste gene em cepas EPECa, que foram isoladas tanto em crianças saudáveis como em crianças com diarreia no Brasil e na Austrália. Por outro lado, Afset et al. (2006) verificaram uma positividade de 100% para os genes *fimA* e *fimH* em amostras de EPECa, isoladas de crianças norueguesas saudáveis e diarreicas.

Em 2004, Cleary e colaboradores trabalhando com mutantes para os genes (*bfpA*, *eae* e *espA*) sugeriram que a expressão do filamento EspA pode compreender outra função, além de conectar a bactéria a células hospedeiras para translocação de proteínas efetoras (KNUTTON et al., 1998), podendo atuar também como fator inicial de fixação à célula epitelial na ausência da fímbria BFP. A presença da fímbria comum de *E. coli* (ECP) aparentemente também contribui para a interação de EPEC típica a células epiteliais, durante o processo infeccioso *in vitro* (SALDAÑA et al., 2009). Em nosso estudo o gene *ecpA*, que codifica a fímbria ECP, foi encontrado em 63 (100%) isolados de EPECa. Esses dados corroboram outros estudos, que também verificaram a

presença de *ecpA* em cepas de EPECa (SCALETSKY et al., 2009; HERNANDES et al., 2011) sugerindo, que a fímbria ECP, tal como o filamento EspA, também pode contribuir com o processo de adesão das EPECa na ausência de BFP.

Em nossa investigação, nos isolados de EPECa contendo a região LEE, observou-se que tanto as cepas que apresentam os fenótipos de aderência, quanto as cepas não aderentes apresentam o gene *lpfA*_{O113}. Nossos resultados confirmam os obtidos por Afset et al. (2006), que também verificaram a presença deste gene em isolados de EPECa, sem contudo demonstrar o tipo de aderência apresentado pelas cepas. O gene *lpfA*_{O113} também aparece em diversos sorogrupos isolados em São Paulo, os quais incluíam O157 e outros não O157, caracterizadas como LEE negativo ou LEE positivo (CERGOLE-NOVELLA et al., 2007). A prevalência de cepas de STEC LEE negativa contendo o gene *lpfA*_{O113} foi determinada principalmente em animais de criadouro (gado bovino) e alimentos manufaturados (carne moída). Por outro lado, as cepas de STEC LEE positivos contendo o gene *lpfA*_{O113} foram isoladas principalmente a partir de pacientes com infecções diarreicas. Além disso, Trabulsi, Keller e Gomes (2002) sugerem que algumas cepas de EPECa são de fato cepas de EPECT ou EHEC, que perderam espontaneamente o plasmídeo EAF ou o gene *stx* que codifica a toxina *Shiga*.

Por outro lado, a baixa prevalência dos genes (*pilS*, *pilV*, *stfA*, *IdaH*, *papA* e *daaC*) ou a total ausência de outros [*hdaA*, *sfa(D-E)* e *dafaE*] também foi verificada em nossos isolados de EPECa. Ainda, verificou-se a total ausência dos genes que codificam os fatores de colonização (CFA/I, CS1[*coaA*], CS2 [*cotA*], CS3, CFA/III [*cofA*], CS4 [*csfA*], CS5, CS6 [*cssA*] e CS21 [*lngA*]) de ETEC nos isolados de EPECa estudados, o que nos levou a acreditar que, predominantemente, os fatores de colonização (CF) somente são encontrados em cepas de ETEC, nas quais mais de um tipo de CF podem ser co-expressos pela mesma cepa bacteriana (GAASTRA; SVENNERHOLM,

1996; WOLF, 1997; NISHIMURA et al., 2002; GHOSAL et al., 2007), no entanto a presença do fator CS20 foi identificado em três isolados de DAEC (OCHOA et al., 2010).

A fímbria Pil, caracterizada por Dudley et al. (2006), está envolvida no padrão de aderência agregativa e na formação de biofilme em superfície abiótica, é apresentada pelas cepas atípicas de EAEC. Em nosso estudo, observou-se que a presença dos genes *pilS* e *pilV* está associada às cepas de aderência localizada-*like* e às cepas não aderentes de EPECa, em ensaio de adesão em células HEp-2. Esses dados confirmam aqueles obtidos por Abe et al. (2008), nos quais cepas de UPEC, apresentando um padrão agregativo de aderência, não apresentaram o gene *pilS*. Além disso, verificou-se também a ausência do gene *pilV* nos isolados de EPECa BA356, BA589 e BA3378 que apresentaram *pilS*, sugerindo assim a ocorrência de uma deleção e/ou uma deficiência em *pilV*. Outra possibilidade é a existência de subtipos de *pilV* que codifiquem adesinas com variações na região C-terminal da proteína (CROSSMAN et al., 2010). Essas ocorrências com *pilV* podem interferir no processo de adesão da fímbria, além de impossibilitar a amplificação de este gene por PCR.

Em 2002, Bernier e colaboradores observaram que todos os isolados de EPECa que apresentaram *pilS* foram negativos para os genes *aggA*, *aafA* e *agg3A*, envolvidos respectivamente na síntese das fímbrias AAF/I, AAF/II e AAF/III expressos pelas cepas típicas de EAEC. Portanto, aparentemente *pilS* parece estar associado somente ao padrão agregativo das EAEC atípicas.

Por sua vez, Boisen et al. (2009) verificaram a presença do gene *agg4A* (*hdaA*), responsável pela expressão da fímbria AAF/IV (Hda), somente em cepas de EAEC, entretanto nas demais cepas estudadas (*Shigella*, EPEC, EHEC, DAEC, *E. coli* enteroinvasora e *E. coli* não patogênicas) não foi pesquisada a presença deste gene. Os mesmos autores verificaram que a maioria das EAEC que albergam *agg4A*, não possuem a presença dos demais

genes *aggA*, *aafA* e *agg3A*, sendo que somente umas poucas cepas que apresentaram *agg4A* foram positivas também para *aggA*. Em nosso estudo, observou-se que os isolados de EPECa (BA320, Ec292/84, 9100-83 e BA4013) pesquisados que foram negativos para os genes *aggA*, *aafA* e *agg3A*, também foram negativos para *agg4A*.

Genes do *operon* de locus para aderência difusa (*Ida*) são encontrados nos sorotipos (*eae+* e *bfp-*) de EPEC O5:H⁻, O111:H⁻, O26:[H11, H⁻] e O145:H16, sugerindo que esta região pode ser parte de um elemento móvel introduzido como um bloco no cromossomo de *E. coli*. Por outro lado, o gene *IdaG* (maior subunidade estrutural) somente foi encontrado no sorogrupo O26 (SCALETSKY et al., 2005). Corroborando os dados obtidos por esses autores, em nosso estudo também se verificou a baixa prevalência do gene *IdaH* (6,35%), presente somente nos sorotipos O23:H6, O34:[H6, H⁻] e O101:H33, enquanto nos sorotipos O26:H11 e O111:H⁻ o gene do locus *Ida* não foi encontrado.

O gene *sfpA* contido no plasmídeo pSFO157 é encontrado em cepas de *E. coli* O157:NM fermentadoras de sorbitol (FRIEDRICH et al., 2004; MÜSKEN et al., 2008) e EHEC O165:[H25, NM] (BIELASZEWSKA et al., 2009). Neste estudo, o gene *sfpA* (1,59%) somente foi encontrado no isolado de EPECa ONT:H45, o que sugere que esta ocorrência é decorrente da transferência do plasmídeo albergando *sfpA*, como ocorre entre as cepas de STEC e EHEC, ou que *sfpA* encontrado na EPECa pode ser cromossomal.

Também foram encontrados, com menor frequência os genes *papA* (3,17%) e *daaC* (3,17%), enquanto o gene *sfa(D-E)* está ausente nos isolados de EPECa. Em outros estudos, resultados divergentes foram encontrados, dos quais podemos citar: (i) Os dados obtidos por Tennant et al. (2009) que demonstraram ausência dos genes *pap* e *sfa* em isolados australianos de EPECa de origem clínica, quando investigados por ensaio de PCR. (ii) A ausência do gene *daaC*, pesquisado por hibridização de DNA em isolados de EPECa com o fenótipo localizado-*like* (SCALETSKY et al., 1999). (iii) Os resultados obtidos por Gomes et al. (2004) demonstrando que algumas cepas

de EPEC supostamente atípicas (*ea*⁺, *EAF*⁻ e *stx*⁻) foram positivas para a presença dos genes *pap*, *daaC* e *sfa*, quando analisados por hibridização de DNA ou PCR.

No estudo realizado com o isolado 9100-83 por Keller et al. (2002), foi identificado, por hibridização, o gene *daaC* e, por *immunoblotting*, uma proteína de ~16 kDa idêntica à adesina afimbrial AfaE-1 de UPEC (LABIGNE-ROUSSEL et al., 1984). Estes autores denominaram a nova proteína descoberta como Afa (*diffuse adherence fibrillar adhesin*), codificada pelos genes que compõem o *operon dafa*, caracterizada no isolado de EPEC O55 (135/12) que apresenta simultaneamente o fenótipo de adesão localizado e difuso *in vitro* (KELLER et al., 2002). Todavia, tanto por ensaio de PCR quanto por proteômica não se identificou nas amostras extraídas do isolado 9100-83, os genes *daaC* e *dafaE* e as proteínas fimbriais F1845 (BILGE et al., 1989) e as adesinas difusas Afa (KELLER et al., 2002) e/ou AfaE-1 (LABIGNE-ROUSSEL et al., 1984). Os diferentes resultados obtidos por nós, na pesquisa dos genes *daaC* e *dafaE*, em comparação aos dados publicado por Keller et al. (2002), podem estar relacionados ao grau de sensibilidade das metodologias empregadas em ambos os estudos.

Na análise proteômica dos isolados de EPECa BA320 (ALL), Ec292/84 (AA), 9100-83 (DA) e BA4013 (NA) foram identificadas proteínas com diferentes funções. Dentre essas proteínas foram identificadas: moléculas envolvidas no processo de regulação transcricional (H-NS), proteínas de membrana (OmpX), proteínas metabólicas (Usp), glicoproteínas (FucU) e proteínas transportadoras (MglB) associadas ao processo de funcionamento das adesinas fimbriais de *E. coli* (OTTO et al., 2004; NACHIN et al., 2005; HAN et al., 2007; TORRES et al., 2008; LEE et al., 2009).

O regulador transcricional H-NS é uma proteína citoplasmática, que desempenha uma atividade na condensação do DNA cromossômico pela ligação ao DNA, conseqüentemente podendo influenciar a expressão de muitos genes de forma direta ou indireta (DAME et al., 2000; HOMMAIS et al., 2001). A transcrição e / ou a tradução de mais de 60 proteínas de *E. coli* são

controladas por H-NS (BARTH et al., 1995; ATLUNG et al., 1997; HOMMAIS et al., 2001). Vários genes modulados por H-NS são sensíveis a mudanças de condições ambientais, tais como: pH, osmolaridade e temperatura (BARTH et al., 1995; ATLUNG et al., 1997; LAURENT-WINTER et al., 1997; HOMMAIS et al., 2001). O envolvimento de H-NS na modulação de genes, em resposta a estímulos ambientais, torna o H-NS um importante regulador da virulência em vários patógenos, incluindo *Shigella* e *Salmonella* (TOBE et al., 1993; HARRISON et al., 1994; ROBBE-SAULE et al., 1997; FALCONI et al., 1998).

H-NS expresso por *E. coli* tem atividade na regulação do operon *pap* (GORANSON et al., 1990) e *fim* (KAWULA et al., 1991). Além disso, está envolvido na regulação negativa do operon de CFA/I (JORDI et al., 1992) e do gene *lpf* (TORRES et al., 2008). H-NS expressa pelas cepas de EHEC e EPEC atua como um regulador externo sobre a ilha de patogenicidade LEE, que contém genes que codificam proteínas responsáveis pela lesão *attaching and effacing* (A/E) (MILLIES et al., 2007). Em 2008, Torres e colaboradores demonstraram que H-NS funciona como um silenciador de transcrição, enquanto LEE ativado por Ler atua de forma contrária como um anti-silenciador da expressão da fímbria polar longo (LPF) pela interação direta com a região promotora do gene *lpf*.

Neste estudo uma combinação dos diferentes genes alelos (*lpfA1-1*, *lpfA1-2*, *lpfA1-3* e *lpfA2-1*), que compõem os variantes polimórfico de LPF, foi encontrada em diversos sorotipos de EPECa. Os mesmos resultados foram observados em outros estudos com os variantes de *lpfA1* e *lpfA2* (TORRES et al., 2009, GOMES et al., 2011). Por outro lado, somente o gene *lpfA1-5* não foi encontrado em nenhum sorotipo de EPECa estudado. Resultado similar foi obtido por Torres et al. (2009), na qual nenhuma cepa positiva para o gene *lpf1-5* foi observada entre os isolados brasileiros de EPECa em seu estudo com cepas provenientes do Brasil, Chile e Espanha. Porém, os mesmos autores verificaram a presença deste gene em alguns isolados coletados nos outros dois países (Chile e Espanha).

Em nossos resultados por análise proteômica das proteínas extraídas da cepa de EPECa BA320 de fenótipo localizado-*like* identificou-se o *spot* 7LAL como sendo a proteína H-NS. Os dados apresentados por Torres et al. (2008) sugerem, em nossos resultados, que a ausência da expressão da fímbria LPF nos isolados de EPECa BA320 e BA4013, que apresentam os genes *lpfA1-2*, *lpfA1-3* e *lpfA2-1* pode ser devido à atividade silenciadora de H-NS, que se liga a sequência regulatória de *lpfA*.

A proteína de membrana externa OmpX pertence a uma família de proteínas que confere distintos fenótipos de virulência, nos quais estão inclusos: Pag e Rck de *Salmonella enterica serovar Typhimurium* (HEFFERNAN et al., 1992), OmpX de *Enterobacter cloacae* (STOORVOGEL et al., 1991; de KORT et al. 1994), OmpK17 de *Klebsiella pneumoniae* (CLIMENT et al., 1997) e Ail de *Yersinia enterocolitica* (MILLER et al., 2001). As proteínas Ail e Rck estão envolvidas na resistência, adesão e invasão bacteriana à célula hospedeira (OTTO et al., 2004).

Otto et al. (2001) observaram que, aparentemente, OmpX não é uma proteína autotransportadora. Porém, uma vez que várias proteínas de membrana externa são expressas em níveis mais baixos durante a adesão, isto pode sugerir que OmpX seja co-regulada ou que possa interagir com poros de membrana externa possibilitando a importação de moléculas hidrofóbicas (OTTO et al., 2001). Em 2004, Otto e colaboradores verificaram que a supressão de OmpX gerou um aumento significativo no contato de linhagens fimbriadas em superfícies celulares, demonstrando que OmpX está relacionada às alterações nas propriedades adesivas de *Escherichia coli* (OTTO et al., 2004).

Identificou-se a presença de OmpX em dois isolados de EPECa que apresentam os seguintes fenótipos: agregativo (5AA, Ec292/84) e difuso (6DA, 9100-83) de aderência *in vitro*. Com base em dados obtidos por Otto et al. (2004) sugere-se que, a expressão de OmpX pelos isolados de EPECa, também possa estar envolvida no processo de aderência dessas cepas, devido

a aparente atividade regulatória de OmpX em associação com outras proteínas expressas.

Em nosso estudo, realizado na fase estacionária do crescimento bacteriano, também identificou-se proteínas expressas durante o processo de stress da bactéria. As proteínas UspA (6ALL) expressa pela BA320 e a UspD (14DA) expressa pela 9100-83. *E. coli* possuem seis genes *usp* responsáveis pela expressão das proteínas Usp (-A, -C, -D, -E, -F e -G), que são acionados por alterações ambientais (KVINT et al., 2003; NACHIN et al., 2005). Isto sugere que exista uma relação inversamente proporcional entre os nutrientes e a população bacteriana, e que esta ocorra devido à diminuição de nutrientes do meio que seriam consumidos pelo elevado número de bactérias durante a fase estacionária, induzindo um processo competitivo que poderia levar ao estado de estresse das bactérias, com consequente expressão de proteínas diretamente envolvidas neste estado. De acordo com Nachin et al. (2005), ambas proteínas Usp (-A e -D) atuam na defesa contra agentes superóxidos, além disso, UspD aparentemente também atua no controle dos níveis intracelulares de ferro. Por outro lado, Usp (-C e -E) estão ligadas à motilidade celular, enquanto as proteínas Usp (-F e -G) parecem estar envolvidas no processo de adesão celular. Nachin et al. (2005) sugerem, portanto, que as proteínas Usp evoluíram com diferentes funções fisiológicas, com o intuito de reprogramar as células para defesa e fuga durante o processo de estresse celular.

Carboidratos são conhecidos por constituírem sítios de ligações específicos para receptores proteicos de patógenos (BOCK et al. 1988; HOOPER; GORDON, 2001), portanto é de grande interesse estabelecer as relações estruturais e funcionais entre as proteínas bacterianas e os carboidratos do hospedeiro (KOSTLÁNOVÁ et al., 2005).

No isolado de EPECa 9100-83 identificou-se as proteínas expressas *L-fucose mutarotase* (FucU – 10DA) e a *galactose-binding transport protein* (MglB – 18DA).

A atividade piranase de FucU (RYU et al., 2004) foi originalmente descrita como envolvida no metabolismo de fontes de carbono em *E. coli* K12 MG1655 (AUTIERI et al., 2007). Os mesmos autores também sugerem que, as variedades de metabólitos intermediários produzidos pela ação da piranase, regulam a seleção de nutrientes usados pela bactéria, possibilitando assim a sua máxima colonização.

A proteína periplasmática MglB foi previamente identificada no genoma da EHEC EDL933 e de *Salmonella enterica* sorovar *typhimurium*. Através de um algoritmo de comparação de sequências, verificou-se que a proteína MglB de *S. typhimurium* (GenBank nº de acesso NP_461135.1) possui 93% de identidade a MglB de *E. coli* enterohemorrágica EDL933 (GenBank nº de acesso NP_288733.1), que possui função similar a proteína transportadora periplasmática PapD de *E. coli*. Ambas proteínas MglB e PapD possuem função de chaperone-like, exercida durante o dobramento da proteína pela interação com intermediários da proteína desdobrada (HAN et al., 2007). PapD também é conhecida por seu envolvimento na montagem da pilina que constitui a fímbria P (HULTGREN et al., 1991).

Por outro lado, Inoue et al. (2007) sugerem que os genes *fucU* e *mglB* podem estar envolvidos com o *swarming motility* de *E. coli*, uma vez que a mutação dos genes *fucU* e *mglB* provocaram uma acentuada repressão do *swarming*, quando observado em meio semi-sólido Eiken, sem que o *swimming* flagelar não tenha sido alterado. Em 2000, Köhler e colaboradores relataram uma similar observação com *Pseudomonas aeruginosas*, na qual a mutação do gene *pilA* (codifica a maior subunidade da fímbria tipo IV), causou a completa inibição do *swarming*.

A nosso ver, devido aos diferentes relatos relacionados às proteínas (HN-S, OmpX, Usp, FucU e MglB) e sua associação com as diferentes atividades fimbriais, seria interessante investigar seu papel no mecanismo de adesão dos isolados de EPEC atípica, uma vez que este mecanismo ainda é desconhecido.

Além disso, a presença de diferentes estruturas filamentosas ancoradas à membrana externa nos quatro isolados de EPECa observadas por microscopia eletrônica de transmissão e a identificação por MASCOT de proteínas hipotéticas, no qual se inclui uma provável proteína filamentosa, nos leva a crer na presença de uma ou mais adesinas fimbriais ainda não caracterizadas.

A análise proteômica não confirmou a presença das proteínas fimbriais codificadas pelos genes presentes nos isolados de EPECa BA320, Ec292/84, 9100-83 e BA4013, fato que pode ter ocorrido devido à ausência de expressão dessas proteínas, uma vez que a transcrição pode ser dependente da presença de outros genes como, por exemplo, ocorre com a fímbria tipo 1 de *E. coli* uropatogênica, que depende de um mecanismo denominado de fases *on/off* para que ocorra a expressão da maior subunidade estrutural da fímbria. A fase *on*, responsável pela transcrição do gene *fimA* é mediada pela atividade de duas recombinases, denominadas FimE e FimB (GALLY; LEATHART; BLOMFIELD, 1996). A mesma situação foi observada para a síntese da fímbria LPF de *Salmonella*, que tem sua expressão também controlada pelo sistema regulatório *on/off* (BÄUMLER; TSOLIS; HEFFRON, 1996). Ou ainda, como ocorre com a fímbria fermentadora de sorbitol (Sfp), ou seja, a expressão de outras fímbrias pode depender de condições ambientais (meio, osmolaridade, temperatura e pH) que mimetizem o ambiente natural do hospedeiro, e/ou do ambiente intestinal em particular (MÜSKEN et al., 2008). Ou mesmo a expressão de outras proteínas com atividade reguladora como a H-NS, também pode inibir a expressão de outras proteínas fimbriais como ocorre com a fímbria LPF (TORRES et al., 2008). Além disso, as ausências de outros genes que compõem o *operon* da fímbria são da maior importância para a sua montagem estrutural, tal como ocorre na fímbria P de UPEC, na qual a biogênese para a construção da fímbria é constituída pelo sistema *chaperone-usher* (WAKSMAN; HULTGREN, 2009). Portanto, para futuras investigações seria interessante a verificação da expressão dos genes presentes em EPECa

por *Real-Time* PCR, também poderia-se verificar a expressão das proteínas codificadas por estes genes utilizando ensaios imunossorológicos e/ou imunocitoquímicos.

Além disso, trabalhos combinando estudos bioquímicos e estruturais da adesina AfaE-III, demonstraram que o padrão afimbrial de AfaE é o resultado do colapso da estrutura fimbrial presente na superfície bacteriana (ANDERSON et al., 2004; PETTIGREW et al., 2004). Portanto, outro ponto interessante a ser estudado é o mecanismo envolvido na ausência de adesão das bactérias de fenótipo não aderentes *in vitro* e se o mesmo ocorre *in vivo* em condições laboratoriais, pois aparentemente em condições ambientais, as bactérias não aderentes possuem um comportamento aderente durante certo período de tempo, suficiente para promover as alterações celulares e causar os distúrbios diarreicos, diagnosticados nos pacientes doadores dessas cepas bacterianas.

Em resumo nossos resultados demonstraram que:

- ✓ A aparente ausência de expressão protéica dos genes fimbriais identificados por PCR nos isolados que apresentam os fenótipos de adesão provavelmente pode ser devido ao envolvimento de outras proteínas expressas, de funções regulatórias, que poderiam atuar negativamente sobre os genes fimbriais impedindo a sua transcrição e/ou tradução. Por proteôma foram identificadas algumas proteínas (H-NS, Usp, OmpX, MglB e FucU) que podem estar envolvidas neste processo.
- ✓ O menor número de *spots* extraídos do gel 2D do isolado não aderente EPECa BA4013, no intervalo de massa molecular entre 14 a 35 kDa, diferentemente dos outros isolados de EPECa que apresentam fenótipos de adesão *in vitro*, pode ser um indicativo que o isolado não aderente, nessas condições de cultivo, deixa de expressar várias proteínas envolvidas na modulação e regulação das adesinas fimbriais e de outras proteínas envolvidas no processo de adesão, uma vez que por ensaio de PCR, verificou-se a presença dos genes fimbriais (*fimA*, *fimH*, *ecpA*, *lpfA*_{O113} e os variantes *lpfA1-2* e *lpfA2-1*) no genoma deste isolado.
- ✓ As proteínas hipotéticas expressas pelos quatro isolados de EPECa, nessas condições de cultivo, podem também estar envolvidas no processo de modulação e regulação (negativa ou positiva) de adesinas fimbriais e afimbriais, atuando na inibição ou adesão das EPECa sobre os enterócitos, além de terem deixado de ser hipotéticas.
- ✓ Dentre as proteínas hipotéticas identificadas, observou-se em particular a proteína NP_310024.2 (nº de acesso NCBI), com provável característica filamentosa, que se encontra presente somente nos isolados de EPECa que apresentam os fenótipos de adesão localizado-*like*, agregativo e difuso. Está proteína filamentosa talvez possa representar uma estrutura fimbrial ainda não caracterizada ou um filamento envolvido no processo de adesão como ocorre com a EspA nos isolados de EHEC e na EPEC típica.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram concluir que: (i) Os genes que codificam a fímbria tipo 1 e a fímbria comum de *E. coli* são altamente prevalentes nos isolados de EPECa. (ii) A presença de filamentos ancorados à superfície bacteriana e a identificação de uma provável proteína filamentosa, juntamente com a ausência de expressão dos genes fimbriais de outros patótipos, supõem a existência de novas adesinas fimbriais nas EPECa. (iii) O proteoma comparativo dos extratos protéicos, dos quatro isolados de EPECa, identificou proteínas envolvidas em atividades (metabólicas, na biossíntese, no transporte, na formação estrutural e na proteção) da bactéria que podem funcionar como complexos protéicos, direta ou indiretamente, envolvidos no processo de adesão desses isolados de EPECa.

REFERÊNCIAS

ABBA, K.; SINFIELD, R.; HART, C. A.; GARNER, P. Pathogens associated with persistent diarrhoea in children in low and middle income countries: systematic review. **BMC Infect. Dis.**, v. 9, p. 1-15, 2009.

ABE, C. M.; TRABULSI, L. R.; BLANCO, J.; BLANCO, M.; DAHBI, G.; BLANCO, J. E.; MORA, A.; FRANZOLIN, M. R.; TADDEI, C. R.; MARTINEZ, M. B.; PIAZZA, R. M.; ELIAS, W. P. Virulence features of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* identified by the eae(+) EAF-negative stx(-) genetic profile. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 64, p. 357-365, 2009.

ABE, C. M.; SALVADOR, F.; FALSETTI, I. N.; VIEIRA, A. M. M.; BLANCO, J.; BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; MACHADO, A. M. O.; ELIAS, W. P.; HERNANDES, R.; GOMES, T. A. T. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** v. 52, p. 397-406, 2008.

ADAMS, L. M.; SIMMONS, C. P.; REZMANN, L.; STRUGNELL, R. A.; ROBINS-BROWNE, R. M. Identification and characterization of a K88- and CS31A-like operon of a rabbit enteropathogenic *Escherichia coli* strain which encodes fimbriae involved in the colonization of rabbit intestine. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 5222-5230, 1997

AEBERSOLD, R. A mass spectrometric journey into protein and proteome research. **J. Am. Soc. Mass Spectrom.**, v. 14, p. 685-695, 2003

ADU-BOBIE, J.; FRANKEL, G.; BAIN, C.; GONCALVES, A. G.; TRABULSI, L. R.; DOUCE, G.; KNUTTON, S.; DOUGAN, G. Detection of intimins alpha, beta, gamma, and delta, four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 662-668, 1998.

AFSET, J. E.; BRUANT, G.; BROUSSEAU, R.; HAREL, J.; ANDERSSON, E.; BEVANGER, L.; BERGH, K. Identification of virulence genes linked with diarrhea due to atypical enteropathogenic *Escherichia coli* by DNA microarray analysis and PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, p. 3703-3711, 2006.

De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

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

AKTAN, I.; SPRIGINGS, K. A.; LA RAGIONE, R. M.; FAULKNER, L. M.; PAIBA, G. A.; WOODWARD, M. J. Characterization of attaching-effacing *Escherichia coli* isolated from animals at slaughter in England and Wales. **Vet. Microbiol.**, v. 103, p. 43-53, 2004.

ANDERSON, K. L.; COTA, E.; SIMPSON, P.; CHEN, H. A.; DU MERLE, L.; BOUGUENEC, C. L.; MATTHEWS, S. Complete resonance assignments of a 'donor-strand complemented' AfaE: the afimbrial adhesin from diffusely adherent *E. coli*. **J. Biomol. NMR**, v. 29, p. 409-410, 2004.

ARAUJO, J. M.; TABARELLI, G. F.; ARANDA, K. R.; FABBRICOTTI, S. H.; FAGUNDES-NETO, U.; MENDES, C. M.; SCALETSKY, I. C. Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, p. 3396-3399, 2007.

ATLUNG, T.; INGMER, H. H-NS: A modulator of environmentally regulated gene expression. **Mol. Microbiol.**, v. 24, p. 7-17, 1997.

AUTIERI, S. M.; LINS, J. J.; LEATHAM, M. P.; LAUX, D. C.; CONWAY, T.; COHEN, P. S. L-fucose stimulates utilization of D-ribose by *Escherichia coli* MG1655 DeltafucAO and *E. coli* Nissle 1917 DeltafucAO mutants in the mouse intestine and in M9 minimal medium. **Infect. Immun.**, v. 75, p. 5465-5475, 2007.

BAGA, M.; NORNGREN, M.; NORMARK, S. Biogenesis of *E. coli* Pap pili: PapH, a minor pilin subunit involved in cell anchoring and length modulation. **Cell**, v. 49, p. 241-251, 1987.

BALDINI, M. M.; KAPER, J. B.; LEVINE, M. M.; CANDY, D. C. A.; MOON, H. W. Plasmid mediated adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli*. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 2, p. 534-538, 1983.

BARNHART, M. M.; PINKNER, J. S.; SOTO, G. E.; SAUER, F. G.; LANGERMANN, S.; WAKSMAN, G.; FRIEDEN, C.; HULTGREN, S. J. PapD-like chaperones provide the missing information for folding of pilin proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 97, p. 7709-7714, 2000.

BARROS, S. F.; ABE, C. M.; ROCHA, S. P.; RUIZ, R. M.; BEUTIN, L.; TRABULSI, L. R.; ELIAS, W. P. *Escherichia coli* O125ac:H6 encompasses atypical enteropathogenic *E. coli* strains that display the aggregative adherence pattern. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, p. 4052-4055, 2008.

BÄUMLER, A. J.; TSOLIS, R. M.; HEFFRON, F. The *lpf* fimbrial operon mediates adhesion of *Salmonella typhimurium* to murine Peyer's patches. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 93, p. 279-283, 1996.

BÄUMLER, A. J.; HEFFRON, F. Identification and sequence analysis of *lpfABCDE*, a putative fimbrial operon of *Salmonella typhimurium*. **J. Bacteriol.**, v. 177, p. 2087-2097, 1995.

BARTH, M.; MARSCHALL, C.; MUFFLER, A.; FISCHER, D.; HENGGE-ARONIS, R. Role for the histone-like protein H-NS in growth phase-dependent and osmotic regulation of σ s and many σ s-dependent genes in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 177, p. 3455-3464, 1995.

BENZ, I.; SCHMIDT, M. A. Cloning and expression of an adhesion (AIDA-I) involved in diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 57, p. 1506-1511, 1989.

BERNET-CAMARD, M.F.; COCONNIER, M.H.; HUDAULT, S.; SERVIN, A.L. Pathogenicity of the diffusely adhering strain *Escherichia coli* C1845: F1845 adhesin-decay accelerating factor interaction, brush border microvillus injury, and actin disassembly in cultured human intestinal epithelial cells. **Infect Immun.**, v. 64, p. 1918-1928, 1996.

BERNIER, C.; GOUNON, P.; LE BOUGUENEC, C. Identification of an aggregative adhesion fimbria (AAF) type III-encoding operon in enteroaggregative *Escherichia coli* as a sensitive probe for detecting the AAF-encoding operon family. **Infect Immun.**, v. 70, p. 4302-4311, 2002.

BEUTIN, L.; MARCHES, O.; BETTELHEIM, K. A.; GLEIR, K.; ZIMMERMANN, S.; SCHMIDT, H.; OSWALD, E. HEp-2 cell adherence, actin aggregation, and intimin types of attaching and effacing *Escherichia coli* strains isolated from healthy infants in Germany and Australia. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 3995-4002, 2003.

BIEBER, D.; RAMER, S. W.; WU, C. Y.; MURRAY, W. J.; TOBE, T.; FERNANDEZ, R.; SCHOOLNIK, G. K. Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Science**, v. 280, p. 2114-2118, 1998.

BIELASZEWSKA, M.; PRAGER, R.; VANDIVINIT, L.; MÜSKEN, A.; MELLMANN, A.; HOLT, N. J.; TARR, P. I.; KARCH, H.; ZHANG, W. Detection and characterization of the fimbrial *sfp* cluster in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O165:H25/NM isolates from humans and cattle. **Appl Environ Microbiol.**, v. 75, p. 64-71, 2009.

BILGE, S. S.; CLAUSEN, C. R.; LAU, W.; MOSELEY, S. L. Molecular characterization of a fimbrial adhesin, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **J. Bacteriol.**, v. 171, p. 4281-4289, 1989.

BILGE, S. S.; APOSTOL JR., J. M.; FULLNER, K. J.; MOSELEY, S. L. Transcriptional organization of the F1845 fimbrial adhesin determinant of *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 7, p. 993-1006, 1993.

BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; ALONSO, M. P.; MORA, A.; BALSALOBRE, C.; MUNOIA, F.; JUAREZ, A.; BLANCO, J. Detection of *pap*, *sfa* and *afa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with expression of adhesins and production of toxins. **Res. Microbiol.**, v. 148, p. 745-755, 1997.

BLANCO, J.E.; BLANCO, M.; BLANCO, J. Enterotoxigenic, verotoxigenic, and necrotoxigenic *Escherichia coli* in food and clinical samples. Role of animals as reservoirs of strains pathogenic for humans]. **Microbiologia**, v. 11, p. 97-110, 1995.

BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; DAHBI, G.; ALONSO, M. P.; MORA, A.; COIRA, M. A.; MADRID, C.; JUÁREZ, A.; BERNÁRDEZ, M. I.; GONZÁLEZ, E. A.; BLANCO, J. Identification of two new intimin types in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Int. Microbiol.**, v. 9, p. 103-110, 2006.

BLATTNER, F. R.; PLUNKETT III, G.; BLOCH, C. A.; PERNA, N. T.; BURLAND, V.; RILEY, M.; COLLADO-VIDES, J.; GLASNER, J. D.; RODE, C. K.; MAYHEW, G. F.; GREGOR, J. N.; DAVIS, W.; KIRKPATRICK, H. A.; GOEDEN, M.; ROSE, A D. J.; MAU, B.; SHAO, Y. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. **Science**, v. 277, p. 1453-1474, 1997.

BLUM, H.; BIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant-proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93-99, 1987.

BOCK, K.; KARLSSON, K. A.; STRÖMBERG, N.; TENEBERG, S. Interaction of viruses, bacteria and bacterial toxins with host cell surface glycolipids. Aspects on receptor identification and dissection of binding epitopes. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 228, p. 153-186, 1988.

BOISEN, N.; STRUVE, C.; SCHEUTZ, F.; KROGFELT, K. A.; NATARO, J. P. New adhesin of enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF family. **Infect Immun.**, v. 76, p. 3281-3292, 2008.

BRINTON, C.C. The structure, function, synthesis and genetic control of bacterial pili and a model for DNA and RNA transport in gram negative bacteria. **Trans. N.Y. Acad. Sci.**, v. 27, p. 1003-1054, 1965.

BRUNDER, W.; KHAN, A. S.; HACKER, J.; KARCH, H. Novel type of fimbriae encoded by the large plasmid of sorbitol-fermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H(-). **Infect. Immun.**, v. 69, p. 4447-4457, 2001.

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

BUTTNER, D.; BONAS, U. Port of entry—the type III secretion translocon. **Trends Microbiol.**, v. 10, p. 186-192, 2002.

CAÑAS, B.; LÓPEZ-FERRER, D.; RAMOS-FERNÁNDEZ, A.; CAMAFEITA, E.; CALVO, E. Mass spectrometry technologies for proteomics. **Brief Funct Genomic Proteomic**, v. 4, p. 295-320, 2006.

CANIZALEZ-ROMAN, A.; NAVARRO-GARCIA, F. Fodrin CaM-binding domain cleavage by Pet from enteroaggregative *Escherichia coli* leads to actin cytoskeletal disruption. **Mol. Microbiol.**, v. 48, p. 947-958, 2003.

CERGOLE-NOVELLA, M. C.; NISHIMURA, L. S.; DOS SANTOS, L. F.; IRINO, K.; VAZ, T. M.; BERGAMINI, A. M.; GUTH, B. E. Distribution of virulence profiles related to new toxins and putative adhesins in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from diverse sources in Brazil. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 274, p. 329-334, 2007.

CHOWDHURY, S. K.; KATTA, V.; CHAIT, B. T. An electrospray ionization mass spectrometer with new features. **Rapid Commun Mass Spectrom.**, v. 4, p. 81-87, 1990.

CID, D.; RUIZ-SANTA-QUITERIA, J. A.; MARIN, I.; SANZ, R.; ORDEN, J. A.; AMILS, R.; DE LA FUENTE, R. Association between intimin (*eae*) and *espB* gene subtypes in attaching and effacing *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic lambs and goat kids. **Microbiology**, v. 147, p. 2341-2353, 2001.

CLARK, C. A.; HEUZENROEDER, M. W.; MANNING, P. A. Colonization factor antigen CFA/IV (PCF8775) of human enterotoxigenic *Escherichia coli*: nucleotide sequence of the CS5 determinant. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 1254-1257, 1992.

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

CLIMENT, N.; FERRER, S.; RUBIRES, X.; MERINO, S.; TOMÁS, J. M.; REGUÉ, M. Molecular characterization of a 17-kDa outer-membrane protein from *Klebsiella pneumoniae*. **Res. Microbiol.**, v. 148, 133-143, 1997.

COBELJIĆ, M., MILJKOVIĆ-SELIMOVIĆ, B., PAUNOVIĆ-TODOSIJEVIĆ, D., VELICKOVIĆ, Z., LEPSANOVIĆ, Z., ZEC, N., SAVIĆ, D., ILIĆ, R., KONSTANTINOVIĆ, S., JOVANOVIĆ, B., KOSTIĆ, V. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with an outbreak of diarrhoea in a neonatal nursery ward. **Epidemiol. Infect.**, v. 117, p. 11-16, 1996.

CONNELL, I.; AGACE, W.; KLEMM, P.; SCHEMBRI, M.; MÅRILD, S.; SVANBORG, C. Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 93, p. 9827-9832, 1996.

CORNELIS, G.R. The type III secretion injectisome. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 4, p. 811-825, 2006.

CORRIERE JR., J. N.; SANDERS, T. P.; KURI, D. E.; SCHENBERG, H. W.; MURPHY, J. J. Urinary particle dynamics and vesicoureteral reflux in the human. **J. Urol.**, v. 103, p. 599-602, 1970.

CRAIG, L.; LI, J. Type IV pili: paradoxes in form and function. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 18, p. 267-277, 2008.

CRAIG, L.; PIQUE, M. E.; TAINER, J. A. Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 363-378, 2004.

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

CREPIN, V. F.; SHAW, R.; ABE, C. M.; KNUTTON, S.; FRANKEL, G. Polarity of enteropathogenic *Escherichia coli* EspA filament assembly and protein secretion. **J. Bacteriol.**, v. 187, p. 2881-2889, 2005.

CROSSMAN, L.C.; CHAUDHURI, R. R.; BEATSON, S. A.; WELLS, T. J.; DESVAUX, M.; CUNNINGHAM, A. F.; PETTY, N. K.; MAHON, V.; BRINKLEY, C.; HOBMAN, J. L.; SAVARINO, S. J.; TURNER, S. M.; PALLAN, M. J.; PENN, C. W.; PARKHILL, J.; TURNER, A. K.; JOHNSON, T. J.; THOMSON, N. R.; SMITH, S. G.; HENDERSON, I. R. A commensal gone bad: complete genome sequence of the prototypical enterotoxigenic *Escherichia coli* strain H10407. **J. Bacteriol.**, v.192, p. 5822-5831, 2010.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 8, p. 26-38, 2010.

CZECZULIN, J.R.; BALEPUR, S.; HICKS, S.; PHILLIPS, A.; HALL, R.; KOTHARY, M. H.; NAVARRO-GARCIA, F.; NATARO, J. P. Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 4135-4145, 1997.

DA SILVA DUQUE, S.; SILVA, R. M.; SABRA, A.; CAMPOS, L. C. Primary fecal culture used as template for PCR detection of diarrheagenic *E. coli* virulence factors. **J. Microbiol. Methods**, v. 51, p. 241-246, 2002.

DAME, R. T.; WYMAN, C.; GOOSEN, N. H-NS mediated compaction of DNA visualised by atomic force microscopy. **Nucleic Acids Res.**, v. 28, p. 3504-3510, 2000.

DANIELL, S. J.; TAKAHASHI, N.; WILSON, R.; FRIEDBERG, D.; ROSENSHINE, I.; BOOY, F. P.; SHAW, R. K.; KNUTTON, S.; FRANKEL, G.; AIZAWA, S. The filamentous type III secretion translocon of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Cell Microbiol.**, v. 3, p. 865-871, 2001.

DANIELL, S. J.; KOCSIS, E.; MORRIS, E.; KNUTTON, S.; BOOY, F. P.; FRANKEL, G. 3D structure of EspA filaments from enteropathogenic *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 49, p. 301-308, 2003.

DAVIS, J. M.; RASMUSSEN, S. B.; O'BRIEN, A. D. Cytotoxic necrotizing factor type 1 production by uropathogenic *Escherichia coli* modulates polymorphonuclear leukocyte function. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 5301-5310, 2005.

DE GRAAF, F. K.; GAASTRA, W. Fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli*. In: KLEMM, P. **Fimbriae: adhesion, genetics, biogenesis and vaccines**. Boca Raton, FL: CRC Press Inc., 1994. p. 58-83.

DE KORT, G.; BOLTON, A.; MARTIN, G.; STEPHEN, J.; VAN DE KLUNDERT, J. A. M. Invasion of rabbit ileal tissue by *Enterobacter cloacae* varies with the concentration of OmpX in the outer membrane. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 4722-4726, 1994.

DODSON, K. W.; JACOB-DUBUISSON, F.; STRIKER, R. T.; HULTGREN, S. J. Outer-membrane PapC molecular usher discriminately recognizes periplasmic chaperone-pilus subunit complexes. **Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.**, v. 90, p. 3670-3674, 1993.

DONNENBERG, M. S.; ZHANG, H. Z.; STONE, K. D. Biogenesis of the bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*: reconstitution of fimbriae in recombinant *E. coli* and role of DsbA in pilin stability – a review. **Gene**, v. 192, p. 33-38, 1997.

DONNENBERG, M. S.; WELCH, R. A. Virulence determinants of uropathogenic *Escherichia coli*. In: MOBLEY, H. L.; WARREN, J. W. **Urinary tract infections: molecular pathogenesis and clinical management**. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, 1996. p. 135-174.

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

DUDLEY, E. G.; ABE, C.; GHIGO, J. M.; LATOUR-LAMBERT, P.; HORMAZABAL, J. C.; NATARO, J. P. An Incl1 plasmid contributes to the adherence of the atypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain C1096 to cultured cells and abiotic surfaces. **Infect. Immun.**, v.74, p. 2102-2114, 2006.

DULGUER, M. V.; FABBRICOTTI, S. H.; BANDO, S. Y.; MOREIRA-FILHO, C. A.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I. C. A. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains: phenotypical and genetic profiling reveals a strong association between enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin and diarrhea. **J. Infect. Dis.**, v. 188, p. 1685–1694, 2003.

EBEL, F.; PODZADEL, T.; ROHDE, M.; KRESSE, A. U.; KRAMER, S.; DEIBEL, C.; GUZMAN, C. A.; CHAKRABORTY, T. Initial binding of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* to host cells and subsequent induction of actin rearrangements depend on filamentous EspA-containing surface appendages. **Mol. Microbiol.**, v. 30, p. 147-161, 1998.

EDWARDS, R. A.; PUENTE, J. L. Fimbrial expression in enteric bacteria: a critical step in intestinal pathogenesis. **Trends Microbiol.**, v. 6, p. 282-287, 1998.

ELIAS JR, W. P.; CZEZULIN, J. R.; HENDERSON, I. R.; TRABULSI, L. R.; NATARO, J. P. Organization of biogenesis genes for aggregative adherence fimbria II defines a virulence gene cluster in enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 1779-1785, 1999.

ELLIOTT, S. J.; WAINWRIGHT, L. A.; MCDANIEL, T. K.; JARVIS, K. G.; DENG, Y. K.; LAI, L. C.; MCNAMARA, B. P.; DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. **Mol. Microbiol.**, v. 28, p. 1-4, 1998.

ETO, D. S.; JONES, T. A.; SUNDSBAK, J. L.; MULVEY, M. A. Integrin-mediated host cell invasion by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. **PLoS Pathog.**, v. 3, p. 3-100, 2007.

EVANS, D. G.; EVANS, D. J. New surface-associated heat-labile colonization factor antigen (CFA/II) produced by enterotoxigenic of *Escherichia coli* of serogroups O6 and O8. **Infect. Immun.**, v. 21, p. 638-647, 1978.

EVANS, D. G.; SILVER, R. P.; EVANS JR., D. J.; CHASE, D. G.; GORBACH, S. L. Plasmid-controlled colonization factor associated with virulence in *Escherichia coli* enterotoxigenic for humans. **Infect. Immun.**, v. 12, p. 656-667, 1975.

FALCONI, M.; COLONNA, B.; PROSEDA, G.; MICHELI, G.; GUALERZI, C. O. Thermoregulation of *Shigella* and *Escherichia coli* EIEC pathogenicity. A temperature-dependent structural transition of DNA modulates accessibility of *virF* promoter to transcriptional repressor H-NS. **EMBO J.**, v. 17, p. 7033-7043, 1998.

FENN, J. B.; MANN, M.; MENG, C. K.; WONG, S. F.; WHITEHOUSE, C. M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**, v. 246, p. 64-71, 1989.

FIVAZ, M.; VAN DER GOOT, F. G. The tip of a molecular syringe. **Trends Microbiol.**, v. 7, p. 341-343, 1999.

FLECKENSTEIN, J. M.; HARDWIDGE, P. R.; MUNSON, G. P.; RASKO, D. A.; SOMMERFELT, H.; STEINSLAND, H. Molecular mechanisms of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. **Microbes Infect.**, v. 12, p. 89-98, 2010.

FOWLER JR., J. E.; STAMEY, T. A. Studies of introital colonization in women with recurrent urinary infections. VII. The role of bacterial adherence. **J. Urol.**, v. 117, p. 472-476, 1977.

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

FRIEDRICH, A. W.; NIERHOFF, K. V.; BIELASZEWSKA, M.; MELLMANN, A.; KARCH, H. Phylogeny, clinical associations, and diagnostic utility of the pilin subunit gene (*sfpA*) of sorbitol-fermenting, enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 4697-4701, 2004.

FROEHLICH, B. J.; KARAKASHIAN, A.; SAKELLARIS, H.; SCOTT, J. R. Genes for CS2 pili of enterotoxigenic *Escherichia coli* and their interchangeability with those for CS1 pili. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 4849-4856, 1995.

FRONZES, R.; REMAUT, H.; WAKSMAN, G. Architectures and biogenesis of non-flagellar protein appendages in Gram-negative bacteria. **EMBO J.**, v. 27, p. 2271-2280, 2008.

GAASTRA, W.; SVENNERHOLM, A. M. Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). **Trends Microbiol.**, v. 4, p. 444-452, 1996.

GALLY, D. L., LEATHART, J., BLOMFIELD, I. C. Interaction of FimB and FimE with the fim switch that controls the phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli* K-12. **Mol. Microbiol.** 21:725–738, 1996.

GARDINER, E. M.; PESTONJAMASP, K. N.; BOHL, B. P.; CHAMBERLAIN, C.; HAHN, K. M.; BOKOCH, G. M. Spatial and temporal analysis of Rac activation during live neutrophil chemotaxis. **Curr. Biol.**, v. 12, p. 2029-2034, 2002.

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

GHOSAL, A.; BHOWMICH, R.; NANDY, R. K.; RAMAMURTHY, T.; CHATTERJEE, N. S. PCR-based identification of common colonization factor antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, p. 3068-3071, 2007.

GIAVALISCO, P.; NORDHOFF, E.; KREITLER, T.; KLÖPPEL, K. D.; LEHRACH, H.; KLOSE, J.; GOBOM, J. Proteome analysis of *Arabidopsis thaliana* by two-dimensional gel electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry. **Proteomics**, v. 5, p. 1902-1913, 2005.

GIRALDI, R., GUTH, B.E. Presence of colonization factor antigen IV (CS5CS6) in O29:H21 enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from children with diarrhea in Brazil. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 26, p.1251-1259, 1993.

GIRARDEAU, J. P.; DER VARTANIAN, M.; OLLIER, J. L.; CONTREPOIS M. 1988. CS31A, a new K88-related fimbrial antigen on bovine enterotoxigenic and septicemic *Escherichia coli* strains. **Infect. Immun.**, v. 56, p. 2180-2188, 1988.

GIRÓN, J. A.; GÓMEZ-DUARTE, O. G.; JARVIS, K. G.; KAPER, J. B. Longus pilus of enterotoxigenic *Escherichia coli* and its relatedness to other type 4 pili - a minireview. **Gene**, v. 192, p. 39-43, 1997.

GIRÓN, J. A.; LEVINE, M. M.; KAPER J. B. Longus: a long pilus ultrastructure produced by human enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 12, p. 71-82, 1994.

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

GOFFAUX, F.; CHINA, B.; JANSSEN, L.; MAINIL, J. Genotypic characterization of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated in Belgium from dogs and cats. **Res. Microbiol.**, v. 151, p. 865-871, 2000.

GOMES, T. A.; HERNANDES, R. T.; TORRES, A. G.; SALVADOR, F. A.; GUTH, B. E.; VAZ, T. M.; IRINO, K.; SILVA, R. M.; VIEIRA, M. A. Adhesin-encoding genes from shiga toxin-producing *Escherichia coli* are more prevalent in atypical than in typical enteropathogenic *E. coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 49, p. 3334-3337, 2011.

GOMES, T. A. T.; IRINO, K.; GIRÃO, D. M.; GIRÃO, V. B. C.; GUTH, B. E. C.; VAZ, T. M. I.; MOREIRA, F. C.; CHINARELLI, S. H.; VIEIRA, M. A. M. Emerging enteropathogenic *Escherichia coli* strains? **Emerg. Infect. Dis.**, v. 10, p. 1851–1855, 2004.

GÓMEZ-DUARTE, O. G.; CHATTOPADHYAY, S.; WEISSMAN, S. J.; GIRÓN, J. A.; KAPER, J. B.; SOKURENKO, E. V. Genetic diversity of the gene cluster encoding longus, a type IV pilus of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 189, p. 9145-9149, 2007.

GÓMEZ-DUARTE, O. G.; RUIZ-TAGLE, A.; GÓMEZ, D. C.; VIBOUD, G. I.; JARVIS, K. G.; KAPER, J. B.; GIRÓN, J. A. Identification of *IngA*, the structural gene of longus type IV pilus of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Microbiology**, v. 145, p. 1809-1816, 1999.

GONZÁLEZ, R. R.; FERNÁNDEZ-MORENO, J. L.; BOLAÑOS, P. P.; GARRIDO, A. Empleo de la espectrometría de masas como herramienta para la determinación de tóxicos en alimentos: hacia la seguridad alimentaria. **Rev. Esp. Salud Pública**, v. 81, p. 461-474, 2007.

GORANSSON, M.; SONDEN, B.; NILSSON, P.; DAGBERG, B.; FORSMAN, K.; EMANUELSSON, K.; UHLIN, B. E. Transcriptional silencing and thermoregulation of gene expression in *Escherichia coli*. **Nature**, v. 344, p. 682–685, 1990.

GRUENHEID, S.; DEVINNEY, R.; BLADT, F.; GOOSNEY, D.; GELKOP, S.; GISH, G. D.; PAWSON, T.; FINLAY, B. B. Enteropathogenic *E. coli* Tir binds Nck to initiate actin pedestal formation in host cells. **Nat. Cell Biol.**, v. 3, p. 856-859, 2001.

GUNTHER, N. W.; LOCKATELL, V.; JOHNSON, D. E.; MOBLEY, H. L. *In vivo* dynamics of type 1 fimbria regulation in uropathogenic *Escherichia coli* during experimental urinary tract infection. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 2838-2846, 2001.

GUTH, B. E., AGUIAR, E. G., GRIFFIN, P. M., RAMOS, S. R., GOMES, T. A. Prevalence of colonization factor antigens (CFAs) and adherence to HeLa cells in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from feces of children in São Paulo. **Microbiol Immunol.**; v. 38, p. 695-701, 1994.

GUYER, D. M.; RADULOVIC, S.; JONES, F. E.; MOBLEY, H. L. Sat, the secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*, is a vacuolating cytotoxin for bladder and kidney epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 4539-4546, 2002.

GUYER, D. M.; HENDERSON, I. R.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Identification of Sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 38, p. 53-66, 2000.

HACKER, J.; KESTLER, H.; HOSCHUTZKY, H.; JANN, K.; LOTTSPEICH, F.; KORHONEN, T. K. Cloning and characterization of the S fimbrial adhesin II complex of an *Escherichia coli* O18: K1 meningitis isolate. **Infect. Immun.**, v. 61, p. 544-550, 1993.

HAN, K. Y.; SEO, H. S.; SONG, J. A.; AHN, K. Y.; PARK, J. S.; LEE, J. Transport proteins PotD and Crr of *Escherichia coli*, novel fusion partners for heterologous protein expression. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1774, p. 1536-1543, 2007.

HANISCH, F. G.; HACKER, J.; SCHROTEN, H. Specificity of S fimbriae on recombinant *Escherichia coli*: preferential binding to gangliosides expressing NeuGc alpha (2-3) Gal and NeuAc alpha (2-8) NeuAc. **Infect. Immun.**, v. 61, p. 2108-2115, 1993.

HARRISON, J. A.; PICKARD, D.; HIGGINS, C. F.; KHAN, A.; CHATFIELD, S. N.; ALI, T.; DORMAN, C. J.; HORMAECHE, C. E.; DOUGAN, G. Role of *hns* in the virulence of pathogenic salmonellae. **Mol. Microbiol.**, v. 13, p. 133-140, 1994.

HASAN, R.J.; PAWELCZYK, E.; URVIL, P. T.; VENKATARAJAN, M. S.; GOLUSZKO, P.; KUR, J.; SELVARANGAN, R.; NOWICKI, S.; BRAUN, W. A.; NOWICKI, B. J. Structure-function analysis of decayaccelerating factor: identification of residues important for binding of the *Escherichia coli* Dr adhesin and complement regulation. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 4485-4493, 2002.

HEFFERNAN, E. J.; HARWOOD, J.; FIERER, J.; GUINEY, D. The *Salmonella typhimurium* virulence plasmid complement resistance gene *rck* is homologous to a family of virulence-related outer membrane protein genes, including *pagC* and *ail*. **J. Bacteriol.**, v. 174, p. 84-91, 1992.

HENDERSON, I. R.; CZECZULIN, J.; ESLAVA, C.; NORIEGA, F.; NATARO, J. P. Characterization of Pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 5587-5596, 1999.

HEPTINSTALL, R. H. Experimental pyelonephritis. Ascending infection of rat's kidney by organisms residing in the urethra. **Br. J. Exp. Pathol.**, v. 45, p. 436-441, 1964.

HERNANDES, R. T. **Estudo da aderência localizada de uma amostra de *Escherichia coli* enteropatogênica atípica.** 2006. 109 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, 2006.

HERNANDES, R. T.; ELIAS, W. P.; VIEIRA, M. A.; GOMES, T. A. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 297, p. 137-149, 2009.

HERNANDES, R. T.; VELSKO, I.; SAMPAIO, S. C.; ELIAS, W. P.; ROBINS-BROWNE, R. M.; GOMES, T. A.; GIRÓN, J. A. Fimbrial Adhesins Produced by Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 77, p. 8391-8399, 2011.

HOMMAIS, F.; KRIN, E.; LAURENT-WINTER, C.; SOUTOURINA, O.; MALPERTUY, A.; LE CAER, J. P.; DANCHIN, A.; BERTIN, P. Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid-associated protein, H-NS. **Mol. Microbiol.**, v. 40, p. 20-36, 2001.

HOOPER, L. V.; GORDON, J. I. Glycans as legislators of host-microbial interactions: spanning the spectrum from symbiosis to pathogenicity. **Glycobiology**, v. 11, p. 1R-10R, 2001.

HORWITZ, M. A.; SILVERSTEIN, S. C. Influence of the *Escherichia coli* capsule on complement fixation and on phagocytosis and killing by human phagocytes. **J. Clin. Invest.**, v. 65, p. 82-94, 1980.

HYLAND, R. M.; SUN, J.; GRIENER, T. P.; MULVEY, G. L.; KLASSEN, J. S.; DONNENBERG, M. S.; ARMSTRONG, G. D. The bundlin pilin protein of enteropathogenic *Escherichia coli* is an N-acetyllactosamine-specific lectin. **Cell. Microbiol.**, v. 10, p. 177-187, 2008.

HULL, R. A., GILL, R. E., HSU, P., MINSHEW, B. H., FALKOW, S. Construction and expression of recombinant plasmids encoding type 1 or D-mannose-resistant pili from a urinary tract infection *Escherichia coli* isolate. **Infect. Immun.**, v. 33, p. 933-938, 1981.

HULTGREEN, S. J.; NORMARK, S.; ABRAHAM, S. N. Chaperone-assisted assembly and molecular architecture of adhesive pili. **Annu. Ver. Microbiol.**, v. 45, p. 383-415, 1991.

IDE, T.; LAARMANN, S.; GREUNE, L.; SCHILLERS, H.; OBERLEITHNER, H.; SCHMIDT, M. A. Characterization of translocation pores inserted into plasma membranes by type III-secreted Esp proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Cell. Microbiol.**, v. 3, p. 669-679, 2001.

IGUCHI, A.; THOMSON, N. R.; OGURA, Y.; SAUNDERS, D.; OOKA, T.; HENDERSON, I. R.; HARRIS, D.; ASADULGHANI, M.; KUROKAWA, K.; DEAN, P.; KENNY, B.; QUAIL, M. A.; THURSTON, S.; DOUGAN, G.; HAYASHI, T.; PARKHILL, J.; FRANKEL, G. Complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6 strain E2348/69. **J. Bacteriol.**, v. 191, p. 347-354, 2009.

INOUE, T.; SHINGAKI, R.; HIROSE, S.; WAKI, K.; MORI, H.; FUKUI, K. Genome-wide screening of genes required for swarming motility in *Escherichia coli* K-12. **J. Bacteriol.**, v.189, p. 950-957, 2007.

JACOB-DUBUISSON, F.; HEUSER, J.; DODSON, K.; NORMARK, S.; HULTGREN, S. Initiation of assembly and association of the structural elements of a bacterial pilus depend on two specialized tip proteins. **EMBO J.**, v. 12, p. 837-847, 1993.

JANN, K.; HOSCHUTSKY, H. Nature and organization of adhesins. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 151, p. 55-85, 1991.

JANSSON, L.; TOBIAS, J.; JAREFJÄLL, C.; LEBENS, M.; SVENNERHOLM, A. M.; TENEBERG, S. Sulfatide recognition by colonization factor antigen CS6 from enterotoxigenic *Escherichia coli*. **PLoS One**, v. 4, p. e4487, 2009.

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

JOHNSON, J. R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 4, p. 80-128, 1991.

JOHNSON, J.R., WEISSMAN, S.J., STELL, A.L., TRINTCHINA, E., DYKHUIZEN, D.E., SOKURENKO, E.V. Clonal and pathotypic analysis of archetypal *Escherichia coli* cystitis isolate NU14. **J. Infect. Dis.** v. 184, p. 1556-1565, 2001.

JOHNSON, T. J.; NOLAN, L. K. Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 73, p. 750-774, 2009.

JONES, C. H.; PINKNER, J. S.; ROTH, R.; HEUSER, J.; NICHOLS, A. V.; ABRAHAM, S. N.; HULTGREN, S. J. FimH adhesin of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the Enterobacteriaceae. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 92, p. 2081-2085, 1995.

JORDAN, D. M.; CORNICK, N.; TORRES, A. G.; DEAN-NYSTROM, E. A.; KAPER, J. B.; MOON, H. W. Long polar fimbriae contribute to colonization by *Escherichia coli* O157:H7 in vivo. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 6168-6171, 2004.

JORDI, B. J. A. M.; DAGBERG, B.; DE HAAN, L. A. M.; HAMERS, A. M.; VAN DER ZEIJST, B. A. M.; GAASTRA, W.; UHLIN, B. E. The positive regulator CfaD overcomes the repression mediated by histone-like protein H-NS (H1) in the CFA/I fimbrial operon of *Escherichia coli*. **EMBO J.**, v. 11, p. 2627-2632, 1992.

JORDI, B. J.; WILLSHAW, B. A.; VAN DER ZEIJST, B. A.; GAASTRA, W. The complete nucleotide sequence of region 1 of the CFA/I fimbrial operon of human enterotoxigenic *Escherichia coli*. **DNA Seq.**, v. 2, p. 257-263, 1992.

KACHAR, B.; LIANG, F.; LINS, U.; DING, M.; WU, X. R.; STOFFLER, D.; AEBI, U.; SUN, T. T. Three-dimensional analysis of the 16 nm urothelial plaque particle: luminal surface exposure, preferential head-to-head interaction, and hinge formation. **J. Mol. Biol.**, v. 285, p. 595-608, 1999.

KALMAN, D.; WEINER, O. D.; GOOSNEY, D. L.; SEDAT, J. W.; FINLAY, B. B.; ABO, A.; BISHOP, J. M. Enteropathogenic *E. coli* acts through WASP and Arp2/3 complex to form actin pedestals. **Nat. Cell Biol.**, v.1, p. 389-391, 1999.

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

KAPER, J. B. Defining EPEC. **Rev. Microbiol.**, v. 27, p. 130–133, 1996.

KAWULA, T. H.; ORNDORFF, P. E. Rapid site-specific DNA inversion in *Escherichia coli* mutants lacking the histonelike protein H-NS. **J. Bacteriol.**, v. 173, p. 4116–4123, 1991.

KHAN, A. S.; KNIEP, B.; OELSCHLAEGER, T. A.; VAN DIE, I.; KORHONEN, T.; HACKER, J. Receptor structure for F1C fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 3541-3547, 2000.

KEBARLE, P.; TANG, L. From ions in solution to ions in the gas phase. The mechanism of electrospray mass spectrometry. **Anal. Chem.**, v. 65, p. 972A-986A, 1993.

KELLER, R.; ORDOÑEZ, J. G.; DE OLIVEIRA, R. R.; TRABULSI, L. R.; BALDWIN, T.J.; KNUTTON, S. Afa, a diffuse adherence fibrillar adhesin associated with enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 2681-2689, 2002.

KENNY, B. Phosphorylation of tyrosine 474 of the enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule is essential for actin nucleating activity and is preceded by additional host modifications. **Mol. Microbiol.**, v. 31, p. 1229-1241, 1999.

KENNY, B.; DEVINNEY, R.; STEIN, M.; REINSCHIED, D. J.; FREY, E. A.; FINLAY, B. B. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. **Cell**, v. 91, p. 511-520, 1997.

KHURSIGARA, C.; ABUL-MILH, M.; LAU, B.; GIRÓN, J. A.; LINGWOOD, C. A.; BARNETT- FOSTER, D. E. Enteropathogenic *Escherichia coli* virulence factor bundle-forming pilus has a binding specificity for phosphatidylethanolamine. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 6573-6579, 2001.

KIM, S. R.; KOMANO, T. The plasmid R64 thin pilus identified as a type IV pilus. **J. Bacteriol.**, v. 179, p. 3594-3603, 1997.

KRESSE, A. U.; ROHDE, M.; GUZMAN, C. A. The EspD protein of enterohemorrhagic *Escherichia coli* is required for the formation of bacterial surface appendages and is incorporated in the cytoplasmic membranes of target cells. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 4834-4842, 1999.

KVINT, K.; NACHIN, L.; DIEZ, A.; NYSTRÖM, T. The bacterial universal stress protein: function and regulation. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 6, p. 140–145, 2003.

KNUTTON, S.; ROSENSHINE, I.; PALLEN, M. J.; NISAN, I.; NEVES, B. C.; BAIN, C.; WOLFF, C.; DOUGAN, G.; FRANKEL, G. A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. **EMBO J.**, v. 17, p. 2166-2176, 1998.

KNUTTON, S. Electron microscopical methods in adhesion. **Methods. Enzymol.**, v. 253, p. 145-158, 1995.

KNUTTON, S.; MCCONNELL, M. M.; ROWE, B.; MCNEISH, A. S. Adhesion and ultrastructural properties of human enterotoxigenic *Escherichia coli* producing colonization factor antigens III and IV. **Infect. Immun.**, v. 57, p. 3364-3371, 1989.

KÖHLER, T.; CURTY, L. K.; BARJA, F.; VAN DELDEN, C.; PECHÈRE, J. C. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. **J. Bacteriol.**, v. 182, p. 5990-5996, 2000.

KORHONEN, T. K.; VIRKOLA, R.; HOLTTHOFER, H. Localization of binding sites for purified *Escherichia coli* P fimbriae in the human kidney. **Infect. Immun.**, v. 54, p. 328-332, 1986.

KORHONEN, T. K.; VALTONEN, M. V.; PARKKINEN, J.; VÄISÄNEN-RHEN, V.; FINNE, J.; ORSKOV, F.; ORSKOV, I.; SVENSON, S. B.; MÄKELÄ, P. H. Serotypes, hemolysin production, and receptor recognition of *Escherichia coli* strains associated with neonatal sepsis and meningitis. **Infect. Immun.**, v. 48, p. 486-491, 1985.

KOSTLÁNOVÁ, N.; MITCHELL, E. P.; LORTAT-JACOB, H.; OSCARSON, S.; LAHMANN, M.; GILBOA-GARBER, N.; CHAMBAT, G.; WIMMEROVÁ, M.; IMBERTY, A. The fucose-binding lectin from *Ralstonia solanacearum*. A new type of beta-propeller architecture formed by oligomerization and interacting with fucoside, fucosyllactose, and plant xyloglucan. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 27839-27849, 2005.

KROGFELT, K. A. Bacterial adhesion: genetics, biogenesis, and role in pathogenesis of fimbrial adhesins of *Escherichia coli*. **Rev. Infect. Dis.**, v. 13, p. 721-735, 1991.

KROGFELT, K. A.; BERGMANS, H.; KLEMM, P. Direct evidence that the FimH protein is the mannose-specific adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae. **Infect. Immun.**, v. 58, p. 1995-1998, 1990.

KUEHN, M. J.; HEUSER, J.; NORMARK, S.; HULTGREN, S. J. P pili in uropathogenic *E. coli* are composite fibres with distinct fibrillar adhesive tips. **Nature**, v. 356, p. 252-255, 1992.

KUNIN, C. M.; HALMAGYI, N. E. Urinary-tract infections in schoolchildren. II Characterization of invading organisms. **New England J. Med.**, v. 266, p. 1297-1301, 1962.

LABIGNE-ROUSSEL, A. F.; LARK, D.; SCHOOLNIK, G.; FALKOW S. Cloning and expression of an afimbrial adhesin (AFA-I) responsible for P blood group-independent, mannose-resistant hemagglutination from a pyelonephritic *Escherichia coli* strain. **Infect. Immun.**, v. 46, p. 251-259, 1984.

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

LASARO, M. A.; SALINGER, N.; ZHANG, J.; WANG, Y.; ZHONG, Z.; GOULIAN, M.; ZHU, J. F1C fimbriae play an important role in biofilm formation and intestinal colonization by the *Escherichia coli* commensal strain Nissle 1917. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, p. 246-251, 2009.

LAURENT-WINTER, C.; NGO, S.; DANCHIN, A.; BERTIN, P. Role of *Escherichia coli* histone-like nucleoid-structuring protein in bacterial metabolism and stress response: Identification of targets by two-dimensional electrophoresis. **Eur. J. Biochem.**, 244:767-773, 1997.

LEARY, J. L.; SCHMIDT, R. L. Quadrupole mass spectrometers: an intuitive look at the math. **J. Chem. Edu.**, v. 73, p.1142-1144, 1996.

LE BOUGUÉNEC, C.; SERVIN, A. L. Diffusely adherent *Escherichia coli* strains expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): hitherto unrecognized pathogens. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 256, p. 185-194, 2006.

LE BOUGUÉNEC, C. Adhesins and invasins of pathogenic *Escherichia coli*. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 295, p. 471-478, 2005.

LE BOUGUENEC, C.; ARCHAMBAUD, M.; LABIGNE, A. Rapid and specific detection of the *pap*, *afa*, and *sfa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, p. 1189-1193, 1992.

LEE, K. H.; RYU, K. S.; KIM, M. S.; SUH, H. Y.; KU, B.; SONG, Y. L.; KO, S.; LEE, W.; OH, B. H. Crystal structures and enzyme mechanisms of a dual fucose mutarotase/ribose pyranase. **J. Mol. Biol.**, v. 391, p. 178-191, 2009.

LERM, M.; SCHMIDT, G.; AKTORIES, K. Bacterial protein toxins targeting rho GTPases. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 188, p. 1-6, 2000.

LEVINE, M. M.; RISTAINO, P.; MARLEY, G.; SMYTH, C.; KNUTTON, S.; BOEDEKER, E.; BLACK, R.; YOUNG, C.; CLEMENTS, M. L.; CHENEY, C.; PATNAIK, R. *Coli* surface antigens 1 and 3 of colonization factor antigen II-positive enterotoxigenic *Escherichia coli*: morphology, purification, and immune responses in humans. **Infect. Immun.**, v. 44, p. 409-420, 1984.

LEVINE, M. M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. **J. Infect. Dis.**, v. 155, p. 377-389, 1987.

LEVINE, M. M.; NATARO, J. P.; KARCH, H.; BALDINI, M. M.; KAPER, J. B.; BLACK, R. E. The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. **J. Infect. Dis.**, v. 152, p. 550-559, 1985.

LI, K. Y.; TU, H. H.; RAY, A. K. Change limits on droplets during evaporation. **Langmuir**, v. 21, p. 3786-3794, 2005.

LIMA, A. A. M.; GUERRANT, R. L: Persistent diarrhea in children: epidemiology, risk factors, pathophysiology, nutritional impact, and management. **Epidemiol. Rev.**, v. 14, p. 222-242, 1992.

LOW, A. S.; HOLDEN, N.; ROSSER, T.; ROE, A. J.; CONSTANTINIDOU, C.; HOBMAN, J. L.; SMITH, D. G.; LOW, J. C.; GALLY, D. L. Analysis of fimbrial gene clusters and their expression in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. **Environ. Microbiol.**, v. 8, p. 1033-1047, 2006.

MAIRENA, E. C., NEVES, B. C., TRABULSI, L. R., ELIAS, W. P. Detection of LEE 4 region-encoded genes from different enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Curr. Microbiol.**, v. 48, p. 412-418, 2004.

MARKIDES, K; GRÄSLUND, A. Advanced information on the Nobel Prize in Chemistry 2002. Disponível em:
<http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2002/chemadv02.pdf>.
Acesso em: 28 jan. 2011.

MARRE, R.; HACKER, J.; HENKEL, W.; GOEBEL, W. Contribution of cloned virulence factors from uropathogenic *Escherichia coli* strains to nephropathogenicity in an experimental rat pyelonephritis model. **Infect. Immun.**, v. 54, p. 761-767, 1986.

MARRS, C. F.; ZHANG, L.; FOXMAN, B. *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes? **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 252, p.183-190, 2005.

MARTINEZ, J. J.; MULVEY, M. A.; SCHILLING, J. D.; PINKNER, J. S.; HULTGREN, S. J. Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. **EMBO J.**, v. 19, p. 2803-2812, 2000.

MATHERS, C. D.; BERNARD, C.; MOESGAARD, I. K.; INOUE, M.; MA FAT, D.; SHIBUYA, S.; STEIN, C.; TOMIJIMA, N.; XU, H. **Global burden of disease in 2002: data sources, methods and results.** In *Global programme on evidence for health policy discussion paper no. 54, (revised 2004)*. Geneva: World Health Organization, 2003. Disponível em:
<<http://www.who.int/healthinfo/paper54.pdf>>. Acesso em: 16 jan. 2011.

MAZARIEGO-ESPINOSA, K.; CRUZ, A.; LEDESMA, M. A.; OCHOA, S. A.; XICOHTENCATL-CORTES, J. Longus, a type IV pilus of enterotoxigenic *Escherichia coli*, is involved in adherence to intestinal epithelial cells. **J. Bacteriol.**, v. 192, p. 2791-800, 2010.

McCONNELL, M. M., THOMAS, L.V., WILLSHAW, G. A., SMITH, H. R., ROWE, B. Genetic control and properties of coli surface antigens of colonization factor antigen IV (PCF8775) of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 56, p. 1974-1980, 1988.

McDANIEL, T. K.; KAPER, J. B. A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12. **Mol. Microbiol.**, v. 23, p. 399-407, 1997.

MELLIES, J. L.; BARRON, A. M. S.; CARMONA A. M. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence gene regulation. **Infect. Immun.**, v. 75, p. 4199-4210, 2007.

MELLIES, J.L.; ELLIOTT, S.J.; SPERANDIO, V.; DONNENBERG, M.S.; KAPER, J.B. The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler). **Mol. Microbiol.**, v. 33, p. 296-306, 1999.

MOCH, T.; HOSCHUTZKY, H.; HACKER, J.; KRONCKE, K. D.; JANN, K. Isolation and characterization of the a-sialyl-b-2,3- galactosyl-specific adhesin from fimbriated *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 84, p. 3462-3466, 1987.

MOL, O.; OUDEGA, B. Molecular and structural aspects of fimbriae biosynthesis and assembly in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 19, p. 25-52, 1996.

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

MOON, H. W. Colonization factor antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli* in animals. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 151, p. 147-165, 1990.

MORA, A.; BLANCO, M.; YAMAMOTO, D.; DAHBI, G.; BLANCO, J. E.; LÓPEZ, C.; ALONSO, M. P.; VIEIRA, M. A.; HERNANDES, R. T.; ABE, C.M.; PIAZZA, R.M.; LACHER, D.W.; ELIAS, W. P.; GOMES, T. A.; BLANCO, J. HeLa-cell adherence patterns and actin aggregation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga-toxin-producing *E. coli* (STEC) strains carrying different eae and tir alleles. **Int. Microbiol.**, v. 12, p. 243-251, 2009.

MOREIRA, F. C.; VIEIRA, M. A.; FERREIRA, A. J.; GIRÃO, D. M.; VAZ, T. M.; ROSA, A. C.; KNOBL, T.; IRINO, K.; FREYMÜLLER, E.; GOMES, T. A. *Escherichia coli* strains of serotype O51:H40 comprise typical and atypical enteropathogenic *E. coli* strains and are potentially diarrheagenic. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, p. 1462-1465, 2008.

MORENO, A. C.; FERNANDES-FILHO, A.; GOMES T. A.; RAMOS S. T.; MONTEMOR L. P.; TAVARES, V. C.; SANTOS-FILHO, L.; IRINO, K.; MARTINEZ, M. B. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 66, p. 50-57, 2010.

MORSCHHAUSER, J.; HOSCHUTZKY, H.; JANN, K.; HACKER, J. Functional analysis of the sialic acid-binding adhesion SfaS of pathogenic *Escherichia coli* by site-specific mutagenesis. **Infect. Immun.**, v. 58, p. 2133-2138, 1990.

MORSCHHAUSER, J.; VETTER, V.; KORHONEN, T.; UHLIN, B. E.; HACKER, J. Regulation and binding properties of S fimbriae cloned from *E. coli* strains causing urinary tract infection and meningitis. **Zentralbl. Bakteriol.**, v. 278, p. 165-176, 1993.

MOURA, R. A.; SIRCILI, M. P.; LEOMIL, L.; MATTÉ, M. H.; TRABULSI, L. R.; ELIAS, W. P.; IRINO, K.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Clonal relationship among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from different animal species and humans. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, p. 7399-408, 2009.

MULVEY, M. A. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. **Cell Microbiol.**, v. 4, p. 257-271, 2002.

MÜSKEN, A.; BIELASZEWSKA, M.; GREUNE, L.; SCHWEPPE, C. H.; MÜTHING, J.; SCHMIDT, H.; SCHMIDT, M. A.; KARCH, H.; ZHANG, W. Anaerobic conditions promote expression of Sfp fimbriae and adherence of sorbitol-fermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:NM to human intestinal epithelial cells. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 74, p. 1087-1093, 2008.

NACHIN, L.; NANNMARK, U.; NYSTRÖM, T. Differential roles of the universal stress proteins of *Escherichia coli* in oxidative stress resistance, adhesion, and motility. **J. Bacteriol.**, v. 187, p. 6265-6272, 2005.

NARA, J. M.; CIANCIARULLO, A. M.; CULLER, H. F.; BUERIS, V.; HORTON, D. S.; MENEZES, M. A.; 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. Interactions of the commensal flora with the human gastrointestinal tract. In: NATARO, J. P.; COHEN, P. S.; MOBLEY, H. L. T.; WEISER, J. N.; (editors). **Colonization of mucosal surfaces**. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2005. p. 179-186.

NATARO, J. P. Diarrhoeagenic *Escherichia coli*. In: SUSSMAN, M. (ed.). **Molecular medical microbiology**. vol. 2. London, United Kingdom: Academic Press, 2001. p. 1463-1504.

NATARO, J. P.; DENG, Y.; MANEVAL, D. R.; GERMAN, A. L.; MARTIN, W. C.; LEVINE, M. M. Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEP-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 2297-2304, 1992.

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

NATARO, J. P.; KAPER, J. B.; ROBINS-BROWNE, R.; PRADO, V.; VIAL, P.; LEVINE, M. M. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEP-2 cells. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 6, p. 829–831, 1987.

NATARO, J. P.; STEINER, T.; GUERRANT, R. L. Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 4, p. 251-261, 1998.

NATARO, J. P., YIKANG, D., GIRON, J. A., SAVARINO, S. J., KOTHARY, M. H., HALL, R. Aggregative adherence fimbriae I expression in enteroaggregative *Escherichia coli* requires two unlinked plasmid regions. **Infect. Immun.** v. 61, p. 1126-1131, 1993.

NATARO, J. P.; YIKANG, D.; YINGKANG, D.; WALKER, K. AggR, a transcriptional activator of aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 4691-4699, 1994.

NEWTON, H. J.; SLOAN, J.; BENNETT-WOOD, V.; ADAMS, L. M.; ROBINS-BROWNE, R. M.; HARTLAND, E. L. Contribution of long polar fimbriae to the virulence of rabbit-specific enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 1230-1239, 2004

NGUYEN, R. N.; TAYLOR, L. S.; TAUSCHEK, M.; ROBINS-BROWNE, R. M. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* infection and prolonged diarrhea in children. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 12, p. 597-603, 2006.

NISHIMURA, L. S.; GIRÓN, J. A.; NUNES, S. L.; GUTH, B. E. Prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains harboring the longus pilus gene in Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 2606-2608, 2002.

NORIEGA, F. R.; LIAO, F. M.; FORMAL, S. B.; FASANO, A.; LEVINE, M. M. Prevalence of *Shigella* enterotoxin 1 among *Shigella* clinical isolates of diverse serotypes. **J. Infect. Dis.**, v.172, p. 1408-1410, 1995.

NOWICKI, B.; LABIGNE, A.; MOSELY, S.; HULL, R.; HULL, S.; MOULDS, J. The Dr hemagglutinin, afimbrial adhesins AFA-I and AFA-III, and F1845 fimbriae of uropathogenic and diarrhea-associated *Escherichia coli* belong to a family of hemagglutinins with Dr receptor recognition. **Infect. Immun.**, v. 58, p. 279-281, 1990.

NOWROUZIAN, F.L., MONSTEIN, H. J., WOLD, A. E., ADLERBERTH, I. Effect of human milk on type 1 and P-fimbrial mRNA expression in intestinal *Escherichia coli* strains. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 40, p. 74-80, 2005.

OCHOA, T. J.; BARLETTA, F.; CONTRERAS, C.; MERCADO, E. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 102, p. 852-856, 2008.

OCHOA, T. J.; RIVERA, F. P.; BERNAL, M.; MEZA, R.; ECKER, L.; GIL, A. I.; CEPEDA, D.; MOSQUITO, S.; MERCADO, E.; MAVES, R. C.; HALL, E. R.; SVENNERHOLM, A. M.; MCVEIGH, A.; SAVARINO, S.; LANATA, C. F. Detection of the CS20 colonization factor antigen in diffuse-adhering *Escherichia coli* strains. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 60, p. 186-189, 2010.

OLESEN, B.; NEIMANN, J.; BOTTIGER, B.; ETHELBERG, S.; SCHIELLERUP, P.; JENSEN, C.; HELMS, M.; SCHEUTZ, F.; OLSEN, K. E.; KROGFELT, K.; PETERSEN, E.; MOLBAK, K.; GERNER-SMIDT, P. Etiology of diarrhea in young children in Denmark: a case-control study. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 3636-3641, 2005.

ORLANDI, P. P.; MAGALHÃES, G. F.; MATOS, N. B.; SILVA, T.; PENATTI, M.; NOGUEIRA, P. A.; SILVA, L. H. Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho (Rondonia, Western Amazon region, Brazil). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 39, p. 507-17, 2006.

OSEK, J.; WEINER, M.; HARTLAND, E. L. Prevalence of the *lpf*₀₁₁₃ gene cluster among *Escherichia coli* O157 isolates from different sources. **Vet. Microbiol.**, v. 96, p. 259-266, 2003.

OTTO, K.; HERMANSSON, M. Inactivation of ompX causes increased interactions of type 1 fimbriated *Escherichia coli* with abiotic surfaces. **J. Bacteriol.**, v. 186, p. 226-34, 2004.

OTTO, K.; NORBECK, J.; LARSSON, T.; KARLSSON, K. A.; HERMANSSON, M. Adhesion of *Escherichia coli* to abiotic surfaces leads to altered composition of outer membrane proteins. **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 2445–2453, 2001.

PARKKINEN, J.; HACKER, J.; KORHONEN, T. K. Enhancement of tissue plasminogen activator-catalyzed plasminogen activation by *Escherichia coli* S fimbriae associated with neonatal septicaemia and meningitis. **Thromb. Haemostasis**, v. 65, p. 483-486, 1991.

PARKKINEN, J.; KORHONEN, T. K.; PERE, A.; HACKER, J.; SOINILA, S. Binding sites in the rat brain for *Escherichia coli* S fimbriae associated with neonatal meningitis. **J. Clin. Invest.**, v. 81, p. 860-865, 1988.

PEIFFER, I.; BERNET-CAMARD, M. F.; ROUSSET, M.; SERVIN, A. L. Impairments in enzyme activity and biosynthesis of brush border-associated hydrolases in human intestinal Caco-2/TC7 cells infected by members of the Afa/Dr family of diffusely adhering *Escherichia coli*. **Cell. Microbiol.**, v. 3, p. 341-357, 2001.

PEIFFER, I.; SERVIN, A. L.; BERNET-CAMARD, M. F. Piracy of decay-accelerating factor (CD55) signal transduction by the diffusely adhering strain *Escherichia coli* C1845 promotes cytoskeletal F-actin rearrangements in cultured human intestinal INT407 cells. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 4036-4042, 1998.

PELAYO, J. S.; SCALETSKY, I. C.; PEDROSO, M. Z.; SPERANDIO, V.; GIRÓN, J. A.; FRANKEL, G.; TRABULSI, L. R. Virulence properties of atypical EPEC strains. **J. Med. Microbiol.**, v. 48, p. 41-49, 1999.

PENG, J.; GYGI, S. P. Proteomics: the move to mixtures. **J. Mass Spectrom.**, v. 36, p. 1083-1091, 2001.

PEREZ-CASAL, P.; SWARTLEY, J. S.; SCOTT, J. R. Gene encoding the major subunit of CS1 pili of human enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 58, p. 3594–3600, 1990.

PERNA, N. T.; PLUNKETT G, R. D.; BURLAND, V.; MAU, B.; GLASNER, J. D.; ROSE, D. J.; MAYHEW, G. F.; EVANS, P. S.; GREGOR, J.; KIRKPATRICK, H. A.; PÓSFAL, G.; HACKETT, J.; KLINK, S.; BOUTIN, A.; SHAO, Y.; MILLER, L.; GROTBECK, E. J.; DAVIS, N. W.; LIM, A.; DIMALANTA, E. T.; POTAMOUSIS, K. D.; APODACA, J.; ANANTHARAMAN, T. S.; LIN, J.; YEN, G.; SCHWARTZ, D. C.; WELCH, R. A.; BLATTNER, F. R. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Nature**, v. 409, p. 529-533, 2001.

PETTIGREW, D.; ANDERSON, K. L.; BILLINGTON, J.; COTA, E.; SIMPSON, P.; URVIL, P.; RABUZIN, F.; ROVERSI, P.; NOWICKI, B.; DU MERLE, L.; LE BOUGUÉNEC, C.; MATTHEWS, S.; LEA, S. M. High resolution studies of the Afa/Dr adhesin DraE and its interaction with chloramphenicol. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 46851-46857, 2004.

POUTTU, R.; WESTERLUND-WIKSTROM, B.; LANG, H.; ALSTI, K.; VIRKOLA, R.; SAARELA, U.; SIITONEN, A.; KALKKINEN, N.; KORHONEN, T. K. *matB*, a common fimbriin gene of *Escherichia coli*, expressed in a genetically conserved, virulent clonal group. **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 4727-4736, 2001.

PRASADARAO, N. V.; WASS, C. A.; HACKER, J.; JANN, K.; KIM, K. S. Adhesion of S-fimbriated *Escherichia coli* to brain glycolipids mediated by *sfaA* gene encoded protein of S-fimbriae. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 10356-10363, 1993.

QADRI, F.; SVENNERHOLM, A. M.; FARUQUE, A. S. G.; SACK, R. B. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 18, p. 465-483, 2005.

RENDÓN, M. A.; SALDAÑA, Z.; ERDEM, A. L.; MONTEIRO-NETO, V.; VÁZQUEZ, A.; KAPER, J. B.; PUENTE, J. L.; GIRÓN, J. A. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. **Proc. Natl. Acad. Sci U S A**, v. 104, p. 10637-10642, 2007.

RHEN, M.; VAISANEN-RHEN, V.; SARASTE, M.; KORHONEN, T. K. Organization of genes expressing the blood-group-M-specific hemagglutinin of *Escherichia coli*: identification and nucleotide sequence of the M-agglutinin subunit gene. **Gene**, v. 49, p. 351-360, 1986.

ROBBE-SAULE, V.; SCHAEFFER, F.; KOWARZ, L.; NOREL, F. Relationships between H-NS, *os*, SpvR and growth phase in the control of *spvR*, the regulatory gene of the *Salmonella* plasmid virulence operon. **Mol. Gen. Genet.**, v. 256, p. 333-347, 1997.

ROBINSON, C. V. Watching and weighting-chaperone complexes in action. **Nat. Methods**, v. 2, p. 331-332, 2005.

----- Protein secondary structure investigated by electrospray ionization. **Methods Mol. Biol.**, v. 61, p. 129-139, 1996.

ROCHA, S. P.; ABE, C. M.; SPERANDIO, V.; BANDO, S. Y.; ELIAS, W. P. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* that contains functional locus of enterocyte effacement genes can be attaching-and-effacing negative in cultured epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 79, p. 1833-1841, 2011.

ROCHA, S. P. D., ELIAS, W. P., CIANCIARULLO, A. M., MENEZES, M. A., NARA, J. M., PIAZZA, R. M. F., SILVA, M. R. L., MOREIRA, C. G., PELAYO, J. S. Aggregative adherence of uropathogenic *Proteus mirabilis* to cultured epithelial cells. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 51, p. 319–326, 2007.

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

RODRIGUES, J.; THOMAZINI, C. M.; MORELLI, A.; DE BATISTA, G. C. M. Reduced etiological role for enteropathogenic *Escherichia coli* in cases of diarrhea in brazilian infants. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 398-400, 2002.

RUSSELL, P. W.; ORNDORFF, P. E. Lesions in two *Escherichia coli* type 1 pilus genes alter pilus number and length without affecting receptor binding. **J. Bacteriol.**, v. 174, p. 5923-5935, 1992.

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

RUSSO, T. A.; MCFADDEN, C. D.; CARLINO-MACDONALD, U. B.; BEANAN, J. M.; BARNARD, T. J.; JOHNSON, J. R. IroN functions as a siderophore receptor and is a urovirulence factor in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 7156-7160, 2002.

RYU, K. S.; KIM, C.; KIM, I.; YOO, S.; CHOI, B. S.; PARK, C. NMR application probes a novel and ubiquitous family of enzymes that alter monosaccharide configuration. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 25544-25548, 2004.

SAKAI, D.; KOMANO, T. Genes required for plasmid R64 thin pilus biogenesis: identification and localization of products of the *pilK*, *pilM*, *pilO*, *pilP*, *pilR*, and *pilT* genes. **J. Bacteriol.**, v. 184, p. 444-451, 2002.

SALDAÑA, Z.; ERDEM, A. L.; SCHÜLLER, S.; OKEKE, I. N.; LUCAS, M.; SIVANANTHAN, A.; PHILLIPS, A. D.; KAPER, J. B.; PUENTE, J. L.; GIRÓN, J. A. The *Escherichia coli* common pilus and the bundle-forming pilus act in concert during the formation of localized adherence by enteropathogenic *E. coli*. **J. Bacteriol.**, v. 191, p. 3451-3461, 2009.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. p. A9-A13.

SAMPAIO, S. C.; ANDRADE, J. R.; SAMPAIO, J. L.; CARNEIRO, C. R.; FREYMÜLLER, E.; GOMES, T. A. distinct interaction of two atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains with enterocytes in vitro. **Open Microbiol. J.**, v. 5, p. 65-71, 2011.

SAUER, F. G.; REMAUT, H.; HULTGREN, S. J.; WAKSMAN, G. Fiber assembly by the chaperone-usher pathway. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1694, p. 259-267, 2004.

SAVAGE, D. C. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 31, p. 107-133, 1977.

SAVARINO, S. J.; FASANO, A.; WATSON, J.; MARTIN, B. M.; LEVINE, M. M.; GUANDALINI, S.; GUERRY, P. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 90, p. 3093-3097, 1993.

SAVARINO, S. J.; FOX, P.; DENG, Y.; NATARO, J. P. Identification and characterization of a gene cluster mediating enteroaggregative *Escherichia coli* aggregative adherence fimbria I biogenesis. **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 4949-4957, 1994.

SCALETISKY, I. C.; ARANDA, K. R.; SOUZA, T. B.; SILVA, N. P. Adherence factors in atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains expressing the localized adherence-like pattern in HEp-2 cells. **J. Clin. Microbiol.**, v. 48, p. 302-306, 2010.

SCALETISKY, I. C.; ARANDA, K. R.; SOUZA, T. B.; SILVA, N. P.; MORAIS, M. B. Evidence of pathogenic subgroups among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. **J. Clin. Microbiol.**, v. 47, p. 3756-3759, 2009.

SCALETISKY, I. C.; FABBRICOTTI, S. H.; CARVALHO, R. L.; NUNES, C. R.; MARANHÃO, H. S.; MORAIS, M. B.; FAGUNDES-NETO, U. Diffusely adherent *Escherichia coli* as a cause of acute diarrhea in young children in northeast Brazil: a case-control study. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 645-648, 2002.

SCALETISKY, I. C.; MICHALSKI, J.; TORRES, A. G.; DULGUER, M. V.; KAPER, J. B. Identification and characterization of the locus for diffuse adherence, which encodes a novel afimbrial adhesion found in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 4753-4765, 2005.

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

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

SCHMOLL, T.; HOSCHUTZKY, H.; MORSCHHAUSER, J.; LOTTSPREICH, F.; JANN, K.; HACKER, J. Analysis of genes coding for the sialic acid-binding adhesin and two other minor fimbrial subunits of the S-fimbrial adhesin determinant of *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 3, p. 1735-1744, 1989.

SCIBELLI, A.; ROPERTO, S.; MANNA, L.; PAVONE, L. M.; TAFURI, S.; DELLA-MORTE, R.; STAIANO, N. Engagement of integrins as a cellular route of invasion by bacterial pathogens. **Vet. J.**, v. 173, p. 482-491, 2007.

SERVIN, A. L. Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 18, p. 264-292, 2005.

SHEVCHENKO, A.; WILM, M.; VORM, O.; MANN, M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. **Anal. Chem.**, v. 68, p. 850-858, 1996.

SHIMODA, E.; MUTO, T.; HORIUCHI, T.; FURUYA, N.; KOMANO, T. Novel class of mutations of pilS mutants, encoding plasmid R64 type IV prepilin: interface of PilS-PilV interactions. **J. Bacteriol.**, v. 190, p. 1202-1208, 2008.

SJOBERG, P. O.; LINDAHL, M.; PORATH, J.; WADSTROM T. Purification and characterization of CS2, a sialic acid-specific haemagglutinin of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Biochem. J.**, v. 255, p. 105-111, 1988.

SOHEL, I.; PUENTE, J. L.; MURRAY, W. J.; VUOPIO-VARKILA, J.; SCHOOLNIK, G. K. Cloning and characterization of the bundle-forming pilin gene of enteropathogenic *Escherichia coli* and its distribution in *Salmonella* serotypes. **Mol. Microbiol.**, v. 7, p. 563-575, 1993.

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

STEEL, C.; HENCHMAN, M. Understanding the quadrupole mass filter through computer stimulation. **J. Chemical Edu.**, v. 75, p. 1049-1054, 1998.

STEINER, T. S.; LIMA, A. A. M.; NATARO, J. P.; GUERRANT, R. L. Enteroaggregative *Escherichia coli* produce intestinal inflammation and growth impairment and cause interleukin-8 release from intestinal epithelial cells. **J. Infect. Dis.**, v. 177, p. 88-96, 1998.

STEINSLAND, H.; VALENTINER-BRANTH, P.; PERCH, M.; DIAS, F.; FISCHER, T. K.; AABY, P.; MOLBAK, K.; SOMMERFELT, H. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infections and diarrhea in a cohort of young children in Guinea-Bissau. **J. Infect. Dis.**, v. 186, p. 1740-1747, 2002.

STONE, K. D.; ZHANG, H. Z.; CARLSON, L. K.; DONNENBERG, M. S. A cluster of fourteen genes from enteropathogenic *Escherichia coli* is sufficient for the biogenesis of a type IV pilus. **Mol. Microbiol.**, v. 20, p. 325-337, 1996.

STOORVOGEL, J.; VAN BUSSEL, M. J. A. W. M.; VAN DE KLUNDERT, J. A. M. Biological characterization of an *Enterobacter cloacae* outer membrane protein (OmpX). **J. Bacteriol.**, v. 173, p. 161-167, 1991.

SVANBORG-EDEN, C.; HANSSON, H. A. *Escherichia coli* pili as possible mediators of attachment to human urinary tract epithelial cells. *Infect. Immun.*, v. 21, p. 229-237, 1978.

SZALO, I. M.; GOFFAUX, F.; PIRSON, V.; PIERARD, D.; BALL, H.; MAINIL, J. Presence in bovine enteropathogenic (EPEC) and enterohaemorrhagic (EHEC) *Escherichia coli* of genes encoding for putative adhesins of human EHEC strains. *Res. Microbiol.*, v. 153, p. 653-8, 2002.

TADDEI, C. R.; FASANO, A.; FERREIRA, A. J.; TRABULSI, L. R. MARTINEZ, M. B. Secreted autotransporter toxin produced by a diffusely adhering *Escherichia coli* strain causes intestinal damage in animal model assays. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 250, p. 263-269, 2005.

TADDEI, C. R.; OLIVEIRA, F. F.; PIAZZA, R. M. F.; PAES LEME, A. F.; KLITZKE, C. F.; SERRANO, S. M. T.; et al. A comparative study of the proteomic profile from an atypical and a typical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Open J. Microbiol.**, v. 5, p. 83-90, 2011.

TANIGUCHI, T.; FUJINO, Y.; YAMAMOTO, K.; MIWATANI, T.; HONDA, T. Sequencing of the gene encoding the major pilin of pilus colonization factor antigen III (CFA/III) of human enterotoxigenic *Escherichia coli* and evidence that CFA/III is related to type IV pili. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 724-728, 1995.

TARR, P. I.; BILGE, S. S.; VARY, J. C.; JELACIC, S.; HABEEB, R. L.; WARD, T. R.; BAYLOR, M. R.; BESSER, T. E. Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 1400-1407, 2000.

TAYLOR, R. K.; MILLER, V. L.; FURLONG, D. B.; MEKALANOS, J. J. Use of *phoA* gene fusions to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 84, p. 2833-2837, 1987.

TENNANT, J. M.; MATTICK, J. S. Type 4 fimbriae. In: KLEMM, P. **Fimbriae: adhesion, genetics, biogenesis and vaccines**. Boca Raton, FL: CRC Press, Inc., 1994. p. 127-146.

TENNANT, S. M.; TAUSCHEK, M.; AZZOPARDI, K.; BIGHAM, A.; BENNETT-WOOD, V.; HARTLAND, E. L.; QI, W.; WHITTAM, T. S.; ROBINS-BROWNE, R. M. Characterisation of atypical enteropathogenic *E. coli* strains of clinical origin. **BMC Microbiol.**, v. 9, p. 1-11, 2009

THANASSI, D. G.; SAULINO, E. T.; LOMBARDO, M. J.; ROTH, R.; HEUSER, J.; HULTGREN, S. J. The PapC usher forms an oligomeric channel: implications for pilus biogenesis across the outer membrane. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 3146-3151, 1998.

THIEDE, B.; HÖHENWARTER, W.; KRAH, A.; MATTOW, J.; SCHMID, M.; SCHMIDT, F.; JUNGBLUT, P. R. Peptide mass fingerprinting. **Methods**, v. 35, p. 237-247, 2005.

THOMAS, L.V., CRAVIOTO, A., SCOTLAND, S. M., ROWE, B. New fimbrial antigenic type (E8775) that may represent a colonization factor in enterotoxigenic *Escherichia coli* in humans. **Infect. Immun.**, v. 35, p. 1119-1124, 1982.

TOBE, T.; YOSHIKAWA, M.; MIZUNO, T.; SASAKAWA, C. Transcriptional control of the invasion regulatory gene *virB* of *Shigella flexneri*: activation by VirF and repression by H-NS. **J. Bacteriol.**, v. 175, p.6142-6149, 1993.

TORRES, A. G.; BLANCO, M.; VALENZUELA, P.; SLATER, T. M.; PATEL, S. D.; DAHBI, G.; LÓPEZ, C.; BARRIGA, X. F.; BLANCO, J. E.; GOMES, T. A.; VIDAL, R.; BLANCO, J. Genes related to long polar fimbriae of pathogenic *Escherichia coli* strains as reliable markers to identify virulent isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 47, p. 2442-2451, 2009.

TORRES, A. G.; SLATER, T. M.; PATEL, S. D.; POPOV, V. L.; ARENAS-HERNÁNDEZ, M. M. Contribution of the Ler- and H-NS-regulated long polar fimbriae of *Escherichia coli* O157:H7 during binding to tissue-cultured cells. **Infect. Immun.**, v. 76, p. 5062-5071, 2008.

TORRES, A. G.; MILFLORES-FLORES, L.; GARCIA-GALLEGOS, J. G.; PATEL, S. D.; BEST, A.; LA RAGIONE, R. M.; MARTINEZ-LAGUNA, Y.; WOODWARD, M. J. Environmental regulation and colonization attributes of the long polar fimbriae of *Escherichia coli* O157:H7. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 297, p. 177-185, 2007.

TORRES, A. G.; KANACK, K. J.; TUTT, C. B.; POPOV, V.; KAPER, J. B. Characterization of the second long polar (LP) fimbriae of *Escherichia coli* O157:H7 and distribution of LP fimbriae in other pathogenic *E. coli* strains. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 238, p. 333-344, 2004.

TORRES, A. G.; KAPER, J. B. PAIs of intestinal *E. coli*. In: HACKER, J. KAPER, J. B. (ed.). **Pathogenicity islands and the evolution of pathogenic microbes**, vol. 1. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 2001. p. 31-48.

TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; GOMES, T. A. T. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, p. 508-13, 2002.

TRIFILLIS, A. L.; DONNENBERG, M. S.; CUI, X.; RUSSELL, R. G.; UTSALO, S. J.; MOBLEY, H. L.; WARREN, J. W. Binding to and killing of human renal epithelial cells by hemolytic P-fimbriated *E. coli*. **Kidney Int.**, v. 46, p. 1083-1091, 1994.

UMAMAHESWARI, B.; BISWAL, N.; ADHISIVAM, B.; PARIJA, S. C.; SRINIVASAN, S. Persistent Diarrhea: Risk Factors and Outcome. **Indian J. Pediatr.**, v. 77, p. 885-888, 2010.

UNICEF; WHO; UNESCO; UNFPA; UNDP; UNAIDS; WFP; WORLD BANK. Facts for Life. 4 ed. 2010. Disponível em <www.factsforlifeglobal.org> Acesso em: 28 jan. 2011.

VAN SOOLINGEN, D.; HERMANS, P. W.; DE HAAS, P. E.; SOLL, D. R.; VAN EMBDEN, J. D. Occurrence and stability of insertion sequences in Mycobacterium tuberculosis complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 29, p. 2578-2586, 1991.

VANROBAEYS, F.; VAN COSTER, R.; DHONDT, G.; DEVREESE, B.; VAN BEEUMEN, J. Profiling of myelin proteins by 2D-gel electrophoresis and multidimensional liquid chromatography coupled to MALDI TOF-TOF mass spectrometry. **J. Proteome Res.**, v. 4, p. 2283-2293, 2005.

VAZ, T. M., IRINO, K., NISHIMURA, L. S., CERGOLE-NOVELLA, M. C., GUTH, B. E. Genetic heterogeneity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated in Sao Paulo, Brazil, from 1976 through 2003, as revealed by pulsed-field gel electrophoresis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, p. 798-804, 2006.

VIAL, P. A.; ROBINS-BROWNE, R.; LIOR, H.; PRADO, V.; KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MANEVAL, D.; ELSAYED, A.; LEVINE, M. M. Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. **J. Infect. Dis.**, v. 158, p. 70-79, 1988.

VIEIRA, M. A.; ANDRADE, J. R.; TRABULSI, L. R.; ROSA, A. C.; DIAS, A. M.; RAMOS, S. R.; FRANKEL, G.; GOMES, T. A. Phenotypic and genotypic characteristics of *Escherichia coli* strains of non-enteropathogenic *E. coli* (EPEC) serogroups that carry EAE and lack the EPEC adherence factor and Shiga toxin DNA probe sequences. **J. Infect. Dis.**, v. 183, p. 762-772, 2001.

WAKSMAN, G.; HULTGREN, S. J. Structural biology of the chaperone-usher pathway of pilus biogenesis. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 7, p. 765-774, 2009.

WARAWA, J.; KENNY, B. Phosphoserine modification of the enteropathogenic *Escherichia coli* Tir molecule is required to trigger conformational changes in Tir and efficient pedestal elongation. **Mol. Microbiol.**, v. 42, p. 1269-1280, 2001.

WEICKHARDT, C.; MORITZ, F.; GROTEMEYER, J. Time-of-flight mass spectrometry: state-of-the-art in chemical analysis and molecular science. **Mass Spectrom. Rev.**, v. 15, p. 139-162, 1996.

WHO - Diarrhoeal disease The World Health Report. World Health Organization 2009. Disponível em:
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/index.html>>. Acesso em: 17 jan. 2011.

WHO - Diarrhoeal disease control programme. Persistent diarrhoea in children in developing countries: Report of a World Health Organisation meeting. Geneva: WHO, 1988.14p.

WILM, M.; SHEVCHENKO, A.; HOUTHAEVE, T.; BREIT, S.; SCHWEIGERER, L.; FOTSIS, T.; MANN, M. Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. **Nature**, v. 379, p. 466-469, 1996.

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

WOLF, M. K. Occurrence, distribution, and association of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 10, p. 569-584, 1997.

WOLF, M. K.; ANDREWS, G. P.; TALL, B. D.; MCCONNELL, M. M.; LEVINE, M. M.; BOEDEKER, E. C. Characterization of CS4 and CS6 antigenic components of PCF8775, a putative colonization factor complex from enterotoxigenic *Escherichia coli* E8775. **Infect. Immun.**, v. 57, p. 164-173, 1989.

WRIGHT, K. J.; SEED, P. C.; HULTGREN, S. J. Development of intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* depends on type 1 pili. **Cell Microbiol.**, v. 9, p. 2230-2241, 2007.

WRIGHT, K. J.; HULTGREN, S. J. Sticky fibers and uropathogenesis: bacterial adhesins in the urinary tract. **Future Microbiol.**, v. 1, p. 75-87, 2006.

YANG, Y.; THANNHAUSER, T. W.; LI, L.; ZHANG, S. Development of an integrated approach for evaluation of 2-D gel image analysis: impact of multiple proteins in single spots on comparative proteomics in conventional 2-D gel/MALDI workflow. **Electrophoresis**, v. 28, p. 2080-2094, 2007.

YOSHIDA, T.; KIM, S. R.; KOMANO, T. Twelve *pil* genes are required for biogenesis of the R64 thin pilus. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 2038-2043, 1999.

YUSTE, M.; ORDEN, J. A.; DE LA FUENTE, R.; RUIZ-SANTA-QUITERIA, J. A.; CID, D.; MARTÍNEZ-PULGARÍN, S.; DOMÍNGUEZ-BERNAL, G. Polymerase chain reaction typing of genes of the locus of enterocyte effacement of ruminant attaching and effacing *Escherichia coli*. **Can. J. Vet. Res.**, v. 72, p. 444-448, 2008.

ZAMBONI, A., FABBRICOTTI, S. H., FAGUNDES-NETO, U., SCALETSKY, I. C. ENTEROAGGREGATIVE *Escherichia coli* virulence factors are found to be associated with infantile diarrhea in Brazil. **J. Clin. Microbiol.** v. 42, p. 1058-1063, 2004.

ZHANG, H. Z.; DONNENBERG, M. S. DsbA is required for stability of the type IV pilin of enteropathogenic *escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 21, p. 787-797, 1996.

ZHOU, G.; MO, W. J.; SEBBEL, P.; MIN, G.; NEUBERT, T. A.; GLOCKSHUBER, R.; WU, X. R.; SUN, T. T.; KONG, X. P. Uroplakin Ia is the urothelial receptor for uropathogenic *Escherichia coli*: evidence from in vitro FimH binding. **J. Cell Sci.**, v. 114, p. 4095-4103, 2001.

ANEXOS

Artigos de Periódicos

I. Publicados

Rocha SP, Elias WP, Cianciarullo AM, Menezes MA, **Nara JM**, Piazza RM, Silva MR, Moreira CG, Pelayo JS. Aggregative adherence of uropathogenic *Proteus mirabilis* to cultured epithelial cells. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 51, p. 319-326, 2007.

Menezes MA, Rocha LB, Koga PC, Fernandes I, **Nara JM**, Magalhães CA, Abe CM, Ayala CO, Burgos YK, Elias WP, Castro AF, Piazza RM. Identification of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains by immunoserological detection of intimin. **J. Appl. Microbiol.**, v. 108, p. 878-887, 2010.

Nara, J. M.; Cianciarullo, A. M.; Culler, H. F.; Bueris, V.; Horton, D. S.; Menezes, M. A.; Franzolin, M. R.; Elias, W. P.; Piazza, R. M. 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.

II. Submetido

Nara JM, Pimenta DC, Abe CM, Abreu PAE, Pedroso de Moraes CT, Freitas NC, Elias WP, Piazza RMF. Proteomic analyses of four atypical enteropathogenic *Escherichia coli* isolates presenting different adherence patterns.