MIN JUNG YANG

**Efeito das frações do veneno de *Bothrops jararaca* na
interação bactéria-hospedeiro *in vitro* entre
Escherichia coli enteropatogênica e células epiteliais**

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

São Paulo
2015

MIN JUNG YANG

**Efeito das frações do veneno de *Bothrops jararaca* na
interação bactéria-hospedeiro *in vitro* entre
Escherichia coli enteropatogênica e células epiteliais**

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

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Profa. Dra. Roxane Maria
Fontes Piazza

Versão original

São Paulo
2015

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

Yang, Min Jung.

Efeito das frações do veneno de *Bothrops jararaca* na interação bactéria-hospedeiro *in vitro* entre *Escherichia coli* enteropatogênica e células epiteliais / Min Jung Yang. – São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Roxane Maria Fontes Piazza.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Bacteriologia.

Versão do título para o inglês: Effect of fractions of *Bothrops jararaca* venom in bacteria-host interaction *in vitro* between enteropathogenic *Escherichia coli* and epithelial cell.

1. *Escherichia coli* 2. EPEC 3. *Bothrops jararaca* 4. Veneno de origem animal 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/SBIB086/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Min Jung Yang.

Título da Dissertação: Efeito das frações do veneno de *Bothrops jararaca* na interação bactéria-hospedeiro *in vitro* entre *Escherichia coli* enteropatogênica e células epiteliais.

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

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

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
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) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 547/12 referente ao projeto intitulado: "*Efeito do veneno de Bothrops jararaca na interação hóspede-hospedeiro in vitro entre Escherichia coli enteropatogênica e células epiteliais*" sob a responsabilidade de **Min Jung Yang**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP n°196 de 1996.

São Paulo, 23 de agosto de 2012.

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

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

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEP SH.006/2015.

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Protocolo de Isenção **CEP-ICB nº 547/12**, informo que o título do Projeto foi alterado para "*Efeito das frações do veneno de Bothrops jararaca na interação bactéria-hospedeiro in vitro entre Escherichia coli enteropatogênica e células epiteliais*" sem modificações de seu conteúdo.

São Paulo, 29 de junho de 2015.

Prof. Dr. PAOLO M. A. ZANOTTO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP

Prof. Dr. LUCIANE VALÉRIA SITA
Vice-Coordenadora da Comissão de
Ética no Uso de Animais - ICB/USP

Dedico este trabalho aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Senhor Jesus, meu Deus e Salvador, pela Sua soberania ao me guiar ao longo desta jornada chamada vida.

À minha mãe pelo amor e pelo apoio que sempre me deu do começo ao fim, de todas as formas possíveis, e por ser um exemplo de alguém que se torna sua força pelo simples fato de estar ali.

Ao meu pai, seu Chang, *in memoriam*, pelas suas palavras sábias que me servem como lições de vida até os dias de hoje, e por ter continuado a acreditar em mim até nos momentos em que eu havia parado de acreditar.

À minha irmã Hae e meu cunhado André pela amizade, carinho, e força que eles sempre me dão, se necessário em forma de “puxões de orelha”, mesmo estando com as mãos cheias graças aos gêmeos!

Aos orientadores, Dra. Roxane Maria Fontes Piazza, por me aceitar como sua aluna e por todo o auxílio dado para que este mestrado se tornasse uma realidade, e ao Dr. Marcelo Palma Sircili, por sua amizade e seus ensinamentos, e por ter me oferecido uma oportunidade quando eu não tinha nada a oferecer.

À Dra. Vanessa Bueris pela amizade e por todo o ensinamento (da bancada à cozinha!) e ajuda que recebi desde os dias de estagiária até os dias de hoje, e aos colegas de laboratório, Hebert, Juliana, Samuel, Nathalia, Renato, Isabella, Gustavo, e Camila, pela amizade e por toda a ajuda que vocês me deram ao longo destes anos.

À Gisele Santana, da Pós-Graduação de Microbiologia, por toda sua ajuda ao longo deste mestrado, tirando todas as minhas dúvidas e correndo atrás de mim quando eu esquecia de correr atrás das coisas. Sem você eu estaria literalmente perdida!

Ao Dr. Daniel Pimenta e ao Dr. Ivo Lebrun do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan pela colaboração e pelos equipamentos e materiais necessários para realização do fracionamento do veneno.

Ao Douglas Mariano e à Aline Auada do Laboratório de Bioquímica e Biofísica, e à Daniela Luz do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, por me ensinarem as diferentes técnicas para o fracionamento do veneno.

Ao Dr. André Zaharenko do Laboratório de Genética do Instituto Butantan pela ajuda na realização do HPLC.

Às funcionárias do Laboratório de Genética do Instituto Butantan, Youko, Regina, Dona Maria e Dona Dulce pelo suporte técnico.

Ao pessoal do Laboratório de Genética e do Laboratório de Bacteriologia por toda a ajuda quando necessário.

Ao Prof. Pestana *in memoriam* por ter me aceitado como estagiária no seu laboratório, o primeiro passo que ultimamente me trouxe até aqui.

À minha querida equipe dos *full-timers* e ao nosso grupo de oração de sexta-feira, por todas as orações e por todo o apoio.

À Regina P., que mesmo estando tão longe sempre esteve por perto para oferecer seu apoio em palavras de oração e de encorajamento.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Muito obrigada!

*"Navegue para longe do porto seguro.
Sinta os ventos em suas velas.
Explore. Sonhe. Descubra."*

-Mark Twain.

RESUMO

YANG, M. J. **Efeito das frações do veneno de *Bothrops jararaca* na interação bactéria-hospedeiro *in vitro* entre *Escherichia coli* enteropatogênica e células epiteliais.** 2015. 64 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) é um micro-organismo de grande importância na saúde pública e uma das principais causas de diarreia em crianças nos países em desenvolvimento. EPEC causa uma lesão histopatológica denominada *attaching and effacing* (A/E), caracterizada pela destruição das microvilosidades intestinais e formação de um pedestal, decorrente da adesão íntima da bactéria à célula epitelial e do rearranjo dos componentes do citoesqueleto. Os genes responsáveis por essa lesão são codificados em uma ilha de patogenicidade conhecida como região LEE, que entre outros fatores, está sujeita a regulação por *quorum sensing*, um mecanismo de regulação dependente da densidade celular, que envolve moléculas sinalizadoras de baixo peso molecular denominadas auto-indutores. O veneno de *Bothrops jararaca* é uma mistura complexa de diversos componentes como metaloproteases, serinoproteases, fosfolipase A2, L-aminoácido oxidase, peptídeos potencializadores de bradiginina, entre outros, com diferentes efeitos biológicos tanto em bactérias como em células eucarióticas. Até o presente, a maior parte dos trabalhos realizados com venenos de serpentes foi focada em compostos de alto peso molecular e não há nenhum relato sobre possíveis efeitos nas interações bactéria-hospedeiro. Este trabalho teve como objetivo analisar o efeito de frações de diferentes pesos moleculares na interação de EPEC com células epiteliais *in vitro*, incluindo as frações contendo componentes de baixo peso molecular. Para isso, o veneno de *Bothrops jararaca* foi fracionado por ultrafiltração utilizando membranas de peso molecular de corte de 10 kDa e 3 kDa. Segundo resultados do teste de colorimetria usando resazurina, nenhuma das frações apresentou efeito bactericida contra EPEC. Ensaio de adesão em células HEp-2 contendo diferentes concentrações das distintas frações do veneno demonstraram que, independente da fração testada, a concentração de 100 ng causou um aumento de adesão bacteriana às células em comparação com o controle, mas a adesão diminuiu quando a concentração de fração foi aumentada, sugerindo a possibilidade de que há algum componente(s) no veneno de *Bothrops jararaca* que potencializa a adesão de EPEC às células epiteliais até determinada concentração. O fenótipo observado nas amostras tratadas com uma concentração mais alta de fração foi parecido ao do teste controle, exceto no teste tratado com 1000 ng de fração menor que 3 kDa, no qual a adesão bacteriana foi menor do que no controle, o que indica presença de algum componente(s) de baixo peso molecular com capacidade de afetar negativamente a adesão de EPEC à medida que sua concentração é aumentada. Estes resultados mostram como as frações com diferentes componentes de veneno de serpentes podem afetar a interação entre bactéria-célula hospedeira, além de apresentar um potencial biológico dos componentes de baixo peso molecular presentes no veneno, os quais tendem a ser negligenciados em favor dos de maior peso molecular.

Palavras-chave: *Escherichia coli*. EPEC. *Bothrops jararaca*. Veneno de origem animal

ABSTRACT

YANG, M. J. **Effect of fractions of *Bothrops jararaca* venom in bacteria-host interaction *in vitro* between enteropathogenic *Escherichia coli* and epithelial cells.** 2015. 64 p. Masters thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is a microorganism of great importance in public health, being one of the main causes of diarrhea in children in developing countries. EPEC causes a histopathologic lesion named attaching and effacing (A/E), characterized by destruction of intestine microvilli and formation of a pedestal, due to the intimate adherence of the bacterium to the epithelial cell and rearranging of cytoskeleton. The genes responsible for this lesion are encoded in a pathogenicity island named LEE, which is, among other factors, subject to regulation by quorum sensing, a cell density dependent mechanism that involves low mass signaling molecules known as autoinducers. *Bothrops jararaca* venom is a complex mixture of different components such as metalloprotease, serine protease, phospholipase A2, L-amino acid oxidase, bradykinin potentiating peptides, among others, with different biological effects in both bacteria and eukaryotic cells. To this day, there has not been references describing their effects on bacteria-host interactions, and the major part of the works with snake venom have been focused on components with a high molecular weight. The goal of this work was to analyze the effect of fractions of *Bothrops jararaca* venom with different molecular weights, including that ones containing components with low molecular weight. For this purpose, venom of *Bothrops jararaca* was fractionated by ultrafiltration, using membranes with molecular weight cut-off of 10 kDa and 3 kDa. According to colorimetric assay using resazurin, none of the fractions had bactericidal effect against EPEC. Adherence assay in HEp-2 cells with different concentrations of the different fractions of venom showed that, independent of the fraction tested, a concentration of 100 ng caused an increase of bacterial adherence when compared to the control test, however the adherence decreased when the concentration of the fraction was increased, suggesting the possibility that there is a component in the venom that potentiates the EPEC adherence to the epithelial cells up to a certain concentration. The phenotype observed with samples treated with a higher concentration were similar to that observed in the control test, except for the one with 1000 ng of fraction lower than 3 kDa, in which the bacterial adherence decreased in comparison to the control test, indicating the presence of a component with low molecular weight that is able to negatively affect the EPEC adherence as its concentration is increased. These results show how the fractions of venom of serpents with different molecular weight can affect the bacteria-host cell interaction, and present a biological potential of components of low molecular weight present in the venom, which tend to be neglected in favor of those with a higher molecular weight.

Keywords: *Escherichia coli*. EPEC. *Bothrops jararaca*. Venom of animal origin

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Padrões de adesão observados em DEC em células HEP-2.	18
Figura 2 – Diagrama do REMA realizado para cálculo de atividade antibacteriana.	31
Figura 3 – Diagrama do teste de adesão realizado com as células HEP-2.	33
Figura 4 – RP-HPLC das frações.	35
Figura 5 – Resultado do ensaio de REMA para determinação de atividade antibacteriana.....	36
Figura 6 – Controles do ensaio de adesão com células HEP-2.....	38
Figura 7 – Ensaio de adesão em células HEP-2 com diferentes concentrações da fração I (maior que 10 kDa).....	40
Figura 8 – Ensaio de adesão em células HEP-2 com diferentes concentrações da fração II (menor que 10 kDa e maior que 3 kDa)	41
Figura 9 – Ensaio de adesão em células HEP-2 com diferentes concentrações da fração III (menor que 3 kDa).....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – % de crescimento bacteriano.....	37
--	-----------

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 <i>Escherichia coli</i>	15
1.1.1 <i>Escherichia coli</i> diarreiogênicas (DEC)	15
1.1.2 <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica (EPEC)	17
1.1.3 Lesão <i>Attaching and Effacing</i> (A/E)	18
1.1.4 <i>Quorum sensing</i>	20
1.2 <i>Bothrops jararaca</i>	22
1.2.1 Veneno de <i>Bothrops jararaca</i>	22
2 OBJETIVO	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Amostras Bacterianas	29
3.2 Amostras de veneno de <i>Bothrops jararaca</i>	29
3.3 Fracionamento do veneno	29
3.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa	30
3.5 Ensaio de Resazurina	30
3.6 Ensaio de adesão em células epiteliais <i>in vitro</i>	32
3.6.1 Cultivo e preparo da linhagem celular HEp-2	32
3.6.2 Ensaio de adesão em células HEp-2	32
4 RESULTADOS	34
4.1 Cromatograma de HPLC das frações do veneno de <i>B. jararaca</i>	34
4.2 Ensaio de resazurina para determinação de crescimento bacteriano	36
4.3 Ensaio de adesão em células HEp-2	37
5 DISCUSSÃO	43
6 CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*), pertencente à família Enterobacteriaceae, é um dos micro-organismos mais conhecidos e uma das espécies bacterianas mais estudadas e utilizadas em estudos. Descrita pela primeira vez em 1885 pelo pediatra alemão Theodor Escherich, foi nomeada como é conhecida hoje no início do século XX, em 1919, em homenagem ao pesquisador que a descobriu (CHEN; FRANKEL, 2005).

Embora faça parte da microbiota intestinal do homem e de outros animais, existem linhagens de *E. coli* que apresentam fatores de virulência específicos, causando infecções intestinais ou extra-intestinais em seu hospedeiro. Cepas patogênicas que colonizam o intestino são denominadas *E. coli* extra-intestinais (ExPEC), e estas podem levar a infecções do trato urinário, sepse, e meningite. As cepas patogênicas de *E. coli* associadas à infecção intestinal são chamadas de *E. coli* diarreio gênicas (DEC) (NATARO; KAPER, 1998).

1.1.1 *Escherichia coli* diarreio gênicas (DEC)

A diarreia é considerada uma das maiores causas de mortalidade infantil em crianças com menos de cinco anos de idade, sendo responsável pela morte de cerca de 760,000 a cada ano. A diarreia infecciosa pode ser causada por bactérias, vírus, ou parasitas, sendo o rotavírus e a *E. coli* os agentes etiológicos mais comuns em países em desenvolvimento (World Health Organization, 2013).

Atualmente, há mais de 180 sorogrupos O de *E. coli* conhecidos, os quais podem ser sub-classificados em mais de 60 sorotipos O:H, indicando um número bastante restrito de sorotipos associados à diarreia, se levada em consideração a possibilidade de mais de 10.000 combinações de antígenos (CAMPOS; FRANZOLIN; TRABULSI, 2004). Hoje, as DEC estão divididas em seis categorias ou patótipos, com base nos mecanismos de patogenicidade comuns, síndromes clínicas, características epidemiológicas e padrão de adesão às células epiteliais em cultura de tecido: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* de aderência difusa (DAEC), e *E. coli* enteropatogênica (EPEC). Devido à grande distinção de

alguns micro-organismos incluídos nestes patótipos, EAEC e EPEC foram subdivididas em típicas e atípicas, e EHEC passou a constituir uma subcategoria de *E. coli* produtora da toxina de Shiga (STEC) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

ETEC é o principal causador de diarreia do viajante em adultos (NATARO; KAPER, 1998). Esses micro-organismos colonizam uma pequena superfície da mucosa do intestino e liberam enterotoxinas que aumentam a secreção intestinal. A adesão e colonização da mucosa intestinal pelas cepas de ETEC são mediadas por fatores de colonização denominados fímbrias, que parecem ser espécie-específicas e são codificadas por plasmídeos. Podem produzir enterotoxina termolábil (LT; variantes LT-I e LT-II) e/ou uma enterotoxina termoestável (ST; variantes ST-I e ST-II), além do fator de colonização (CFA) (JAKABI; FRANCO, 1991; MENG; FENG; DOYLE, 2001).

A patogenicidade de EAEC parece estar relacionada com adesão à mucosa intestinal, principalmente do cólon, mediada por fímbrias identificadas e denominadas *Aggregative Adherence Fimbriae* (AAFs), envolvidas na aderência de EAEC às células em cultura (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Amostras de EAEC têm como característica principal o padrão de adesão, denominado adesão agregativa (AA), em determinadas linhagens celulares cultivadas *in vitro*, como as células HeLa e HEp-2 (MATHEWSON; JOHNSON; DUPONT, 1986).

EIEC causa inflamação no cólon, invadindo as células epiteliais e em seguida provocando a lise do vacúolo endocítico. A bactéria inicia o processo de invasão com a endocitose do enterócito, rompendo a célula, multiplicando-se e invadindo as células vizinhas. No local da invasão ocorre um acúmulo de actina que acarreta no desarranjo da estrutura celular, determinando a morte da célula. Proteínas denominadas IPA, mediadas por plasmídeos *invasion* (pINV), estão diretamente relacionadas com esse processo (FRANCO; LANDGRAF, 1996; TRABULSI; TOLEDO, 1989).

A patogenicidade da DAEC foi pouco estudada, entretanto sabe-se que geralmente não produzem toxinas (MENG; FENG; DOYLE, 2001) e são caracterizadas por apresentarem um padrão de aderência difuso às células HEp-2. Este microrganismo tem se demonstrado causador de diarreia em crianças maiores de 1 ano de idade, particularmente (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

STEC é caracterizada pela produção da toxina de Shiga, que danifica as células endoteliais do rim, podendo causar uma severa complicação renal conhecida

como síndrome hemolítica urêmica (SHU) (LEVINE, 1987). EHEC, uma subcategoria de STEC, se destaca como a principal causadora de diarreia hemorrágica. As cepas de EHEC possuem como característica a capacidade de produzir a lesão histopatológica denominada *attaching and effacing* (A/E), semelhante ao que se observa em EPEC (NATARO; KAPER, 1998).

1.1.2 *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)

EPEC foi o primeiro patótipo de *E. coli* diarreiogênica a ser descrito (NETER et al., 1955). Em 1995, as cepas de EPEC foram subclassificadas em típicas e atípicas, de acordo com a presença ou ausência do plasmídeo EAF (EPEC-*Adherence Factor*), respectivamente (KAPER, 1996). Embora em países desenvolvidos a incidência de diarreia em crianças causada por EPEC tenha virtualmente desaparecido, EPEC ainda é considerada uma importante causa de diarreia em crianças menores de dois anos nos países em desenvolvimento (NATARO; KAPER, 1998).

A principal característica associada com infecções de EPEC é conhecida como *attaching and effacing* (A/E), uma lesão histopatológica que pode ser identificada tanto em biópsias de pacientes ou de animais infectados, como em culturas celulares (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Outra característica distinta de EPEC é observada no padrão de adesão das bactérias em culturas celulares. Amostras de EPEC típica, após 3h de interação com células epiteliais, apresentam um padrão de adesão denominado adesão localizada (LA – *localized adherence*), caracterizado pela formação de microcolônias compactas aderidas a determinadas regiões da superfície da célula hospedeira (SCALETSKY et al., 1984).

As EPEC atípicas apresentam um padrão de adesão semelhante ao padrão LA, denominado adesão localizada-like (LAL – *localized adherence-like*). Este padrão também é caracterizado pela formação de microcolônias das bactérias sobre determinadas regiões da superfície celular do hospedeiro, porém os agrupamentos formados são frouxos; este padrão é observado após 6h de interação com as células epiteliais (ABE et al., 2009; DULGUER et al., 2003; GOMES et al., 2004; PELAYO et al., 1999; RODRIGUES et al., 1996; SCALETSKY et al., 1999; VIEIRA et al., 2001). Entretanto, além do padrão LAL, a EPEC atípica também pode apresentar padrões

de adesão difusa ou agregativa, enquanto o padrão de adesão de algumas amostras é considerado indeterminado, e outras simplesmente não aderem às células (ABE et al., 2009; DULGUER et al., 2003; NUNES et al., 2003; ROBINS-BROWNE et al., 2004; VIEIRA et al., 2001).

Figura 1 – Padrões de adesão observados em DEC em células HEp-2. (A) Padrão de adesão localizada (LA); (B) Padrão de adesão difusa (DA); (C) Padrão de adesão agregativa (AA); (D) Padrão de adesão localizada-like (LAL).

Fonte: Scaletsky et al. (1999).

1.1.3 Lesão *Attaching and Effacing* (A/E)

Os sorotipos de EPEC têm em comum a capacidade de causar uma lesão característica no epitélio intestinal, conhecida como *attaching and effacing* (A/E). A lesão A/E foi descrita por Moon et al. (1983), que a partir de experimentos realizados em porcos e coelhos, utilizando amostras isoladas de humanos e uma amostra isolada de coelhos, foram capazes de causar a lesão intestinal nos sistemas testados. Lesões similares já haviam sido observadas por Polotsky et al. (1977) em trabalhos realizados com coelhos e amostras de EPEC isoladas de humanos, e Cravioto et al. (1979) observaram que cepas de EPEC isoladas de surtos de diarreia

apresentaram uma proporção mais elevada de adesão em células HEP-2, em comparação com cepas que não eram EPEC.

A lesão A/E é caracterizada pela perda de microvilosidades intestinais e rearranjo dos componentes do citoesqueleto dos enterócitos, resultando na condensação dos filamentos de actina em estruturas na forma de pedestais, logo abaixo do local onde a bactéria se encontra intimamente aderida (FINLAY et al., 1992; KNUTTON et al., 1987; ROTHBAUM et al., 1982).

Previamente, a detecção da lesão A/E era possível apenas através de observação via microscopia eletrônica, porém em 1989, Knutton et al. desenvolveram o teste de FAS (*fluorescence actin-staining*), um ensaio que utiliza a proteína faloidina marcada com isotiocianato de fluoresceína, a qual se liga especificamente aos filamentos de actina que está concentrada no local da adesão bacteriana, permitindo uma identificação indireta da lesão A/E.

Os genes responsáveis pela formação da lesão A/E são codificados em uma ilha de patogenicidade denominada região LEE (*locus of enterocyte effacement*), descrita pela primeira vez por McDaniel et al. em 1995. A região LEE está ausente em amostras de *E. coli* comensais, mas presente em cepas patogênicas associadas com a lesão A/E, tais como EPEC e EHEC (NATARO; KAPER, 1998). Para a verificação de que estes genes de fato influenciam na patogenicidade da bactéria, esta região foi introduzida em cepas de *E. coli* K-12; a transferência desta ilha de patogenicidade para estas amostras não virulentas conferiram a capacidade de formar a lesão A/E (MCDANIEL; KAPER, 1997). A região LEE está organizada em cinco operons, denominados LEE1, LEE2, LEE3, LEE4 e LEE5 (MELLIES et al., 1999).

Os operons LEE1, LEE2 e LEE3 contêm os genes que codificam as proteínas necessárias para o sistema de secreção do tipo III (TTSS), o qual exporta proteínas efetoras diretamente ao citoplasma das células epiteliais, permitindo à bactéria modular os processos celulares e facilitando assim, a colonização no hospedeiro (JARVIS et al., 1995). São estas as proteínas: Esc (*EPEC secretion*) e Sep (*Secretion of EPEC protein*), além de Ler (*Lee-encoded regulator*), codificado pelo gene *ler* e que age como o principal regulador de LEE (ELLIOT et al., 2000). Em LEE4 encontram-se os genes que codificam as proteínas secretadas da família Esp (*EPEC-secreted proteins*), produzidas e secretadas por TTSS durante o período da infecção (NATARO; KAPER, 1998).

LEE5 contém os genes *eae* (*EPEC attaching and effacing*) e *tir* (*translocated intimin receptor*), que codificam respectivamente a intimina, uma adesina bacteriana que medeia a ligação íntima de EPEC às células epiteliais e rearranjo dos feixes de actina sob o local da adesão, resultando na formação de pedestais (DONNENBERG; YU; KAPER, 1993; JERSE et al., 1990; JERSE; KAPER, 1991); e Tir, proteína que é produzida e translocada pela própria EPEC, e funciona como o receptor da intimina após sua inserção na membrana da célula hospedeira (KENNY et al., 1997). Embora este seja um exemplo de um patógeno que produz o seu próprio receptor para a ligação às células eucariontes, existem relatos sobre proteínas eucarióticas que também podem agir como receptores para a intimina. Muza-Moons et al. (2003) mostraram que EPEC pode romper a polaridade celular, causando a migração de proteínas basolaterais da membrana, em particular as integrinas β_1 , para a superfície apical da célula, onde estas podem se ligar à intimina.

Além da região LEE, EPEC possui um plasmídeo de aproximadamente 60 Mda denominado *EPEC adherence factor* (EAF), e este contém genes que codificam uma adesina fimbrial tipo IV denominada *bundle-forming pilus* (BFP), que promove ligações entre as bactérias, resultando na formação das microcolônias que caracterizam o padrão LA (GIRÓN et al., 1991). EAF também contém o operon *per*, que codifica o regulador Per (*plasmid encoded regulator*), responsável pela ativação da transcrição do operon *bfp*, e ativação da região LEE ao ativar transcrição de *ler* em LEE1 (MELLIES et al., 1999). Embora sua importância seja discutida devido à sua ausência em certos microorganismos capazes de formar a lesão A/E, como a EHEC e a EPEC atípica (BUSTAMANTE et al., 2011), foi demonstrado que a lesão A/E é estabelecida mais rapidamente em EPEC atípica quando esta é complementada com *per* (BUERIS et al., 2015).

1.1.4 Quorum sensing

Estudos sugerem que os genes envolvidos na lesão A/E são também regulados por *quorum sensing*, um mecanismo de sinalização entre células no qual a bactéria produz e responde a moléculas sinalizadoras denominadas autoindutores (SPERANDIO et al., 1999). Dependente de densidade celular, esse mecanismo está envolvido na modulação da regulação de genes de virulência em EPEC (SIRCILI et al., 2004). Atualmente pelo menos quatro sistemas de *quorum sensing* são

reconhecidos: em bactérias gram-negativas, são encontrados sistemas utilizando autoindutor-1 (AI-1) e autoindutor-3 (AI-3), enquanto em bactérias gram-positivas é descrito um sistema de autoindução polipeptídica (AIP). O sistema utilizando autoindutor-2 (AI-2) é encontrado tanto em gram-negativas como em gram-positivas (PARKER; SPERANDIO, 2009),

No sistema AI-1, *lux I* sintetiza uma molécula de homoserina lactona (AHL) denominada AI-1, a qual é secretada e reconhecida por *luxR*, ativando a transcrição gênica (FUQUA; WINANS; GREENBERG, 1994).

O gene responsável pela síntese de AI-2 foi identificado como *luxS*, e o autoindutor produzido foi identificado como uma molécula de furanosil borato diester (CHEN et al., 2002; SURETTE; BASSLER, 1999). A molécula é produzida a partir de S-adenosilmetionina (SAM), um precursor comum tanto para AI-1 como para AI-2 (SCHAUDER et al., 2001). Em *Vibrio harveyi*, a proteína LuxP, receptor de AI-2 na bactéria, reconhece o autoindutor e forma um complexo que desencadeia uma reação em cascata levando à ativação do operon da luciferase, resultando na bioluminescência característica da bactéria (BASSLER; WRIGHT; SILVERMAN, 1994).

O sistema AI-3 se destaca pela sua capacidade de reconhecer não somente as moléculas secretadas pelas bactérias, mas é também capaz de reconhecer e desencadear a transcrição gênica através das moléculas secretadas pelo hospedeiro, como adrenalina e noradrenalina. Estas moléculas são reconhecidas pelo sistema de dois componentes QseBC, no qual o gene *qseC* codifica um sensor histidina quinase que reconhece o autoindutor e as moléculas secretadas pela célula hospedeira, e ativa a transcrição do regulador *qseB*, resultando na transcrição de genes incluindo os de virulência, como é observado em EHEC (CLARKE et al., 2006).

A ideia de causar interferência neste mecanismo de regulação, *quorum quenching*, tem emergido como uma possível estratégia para o controle da doença, visando inibir a virulência da bactéria sem necessariamente causar efeito bactericida (CLATWORTHY; PIERSON; HUNG, 2007). Esta estratégia oferece uma possível alternativa de terapia antimicrobiana ao uso de antibióticos, tendo como alvo apenas as funções essenciais à infecção tais como fatores de virulência, diminuindo assim, em teoria, a pressão seletiva bacteriana frequentemente observada em tratamentos envolvendo antibióticos.

1.2 *Bothrops jararaca*

Pertencente à família Viperidae, sub-família Crotalinae, gênero *Bothrops*, *Bothrops jararaca* é a espécie de serpente mais comum que ocorre na América do Sul. É considerada uma das mais importantes do ponto de vista médico, sendo responsável pela maioria dos casos de acidentes ofídicos no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001; RIBEIRO; JORGE, 1997).

Os sintomas do envenenamento causado por esta serpente, tais como edema ou incoagulabilidade do sangue (SANTORO, 2008), devem-se às três principais atividades do veneno: proteolítica, com edema inflamatório local na área da mordida da serpente; hemorrágica, com dano do endotélio e sangramento sistêmico; e pró-coagulante, que leva ao consumo dos fatores de coagulação e o rompimento do equilíbrio da coagulação sanguínea (MATSUI; FUJIMURA; TITANI, 2000; VARANDA; GIANNINI, 1999).

1.2.1 Veneno de *Bothrops jararaca*

Segundo Russel (1980), venenos são definidos como “substâncias tóxicas produzidas por plantas ou animais em um órgão secretor bem desenvolvido, ou mesmo, num grupo de células, as quais são liberadas durante o ato da picada ou mordida”. Venenos de serpentes são complexas misturas de proteínas, peptídeos, carboidratos, lipídeos, íons metálicos e compostos orgânicos, e destes, as proteínas e peptídeos constituem aproximadamente 90% da massa seca. A função primária do veneno de serpentes, incluindo *B. jararaca*, é de imobilizar e matar as presas (AIRD, 2002).

De acordo com os resultados da análise do transcrito das glândulas de veneno de *B. jararaca* realizada por Cidade et al. (2006), os transcritos dos componentes do veneno desta espécie incluem metaloproteases, serinoproteases, lectinas tipo C, fosfolipase A₂, proteínas ricas em cisteína, L-aminoácido oxidases, precursores de peptídeos potencializadores de bradicinina, entre outros.

As metaloproteases compreendem a maior porcentagem da composição do veneno de *B. jararaca* (CIDADE et al., 2006). As metaloproteases dos venenos de serpentes (SVMP – *Snake Venom Metalloprotease*) são enzimas proteolíticas com

importantes funções biológicas em seres vivos, incluindo o homem. Estão associadas com importantes processos fisiológicos como a fibrinólise e a coagulação, e estão também envolvidas em atividades como a migração de células e o reparo tecidual, além de estarem relacionados com efeitos patológicos como o câncer (HOOPER, 1994). Uma das SVMPs mais conhecidas e estudadas da *B. jararaca* é a jararagina, a primeira a ser isolada do veneno desta espécie com a sua estrutura primária completa caracterizada (PAINE et al., 1992). As SVMPs são sintetizadas na glândula de veneno em forma de precursores inativos, proteínas de múltiplos domínios incluindo o domínio pró-enzima e um domínio catalítico protease zinco-dependente, que também se conservam na molécula. Estes precursores passam por processamentos proteolíticos, originando enzimas biologicamente ativas (BJARNASON; FOX, 1994; GUTIÉRREZ, 2002). A classificação das SVMPs é feita de acordo com a organização dos seus domínios, fornecendo importantes informações para compreender os mecanismos de ação destas enzimas. De acordo com esta classificação, temos os seguintes grupos de SVMPs: classe PI, a qual possui apenas o domínio metaloprotease; classe PII, a qual possui domínio metaloprotease e domínio desintegrina; classe PIII, a qual possui domínio metaloprotease e domínios tipo desintegrina e rico em cisteína. A classe PIV, também conhecida como classe P-III_d, compreende as enzimas com todos os domínios da classe PIII mais o domínio lectina (BJARNASON; FOX, 1994; FOX; SERRANO, 2008). O efeito biológico mais estudado das SVMPs é o distúrbio no sistema hemostático. Baseado neste aspecto, elas podem ser classificadas como enzimas coagulantes ou anticoagulantes. Enquanto as enzimas do primeiro grupo se caracterizam por ativarem a protrombina e o fator X, fatores da cascata da coagulação, as enzimas pertencentes ao grupo das enzimas anticoagulantes possuem atividades fibrinolíticas, clivando as cadeias α , β , e γ do fibrinogênio com variáveis específicas de cadeia e tornando a proteína não-coagulável (RAMOS; SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006). A atividade proteolítica da SVMP está também relacionada com a indução da hemorragia, inflamação, e necrose *in vivo* que caracteriza a lesão local normalmente observada em envenenamento por serpentes da família Viperidae, através da degradação das proteínas da matriz extracelular (ECM – *Extracellular matrix*), plasma e superfície celular (GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000; LAING et al., 2003). Outros efeitos biológicos observados em SVMPs incluem migração celular e fosforilação da quinase de adesão focal (FAK –

focal adhesion kinase) estimuladas em células epiteliais, o que induz o rearranjo do citoesqueleto, o aumento da polimerização da actina e formação de processos celulares associados à motilidade, enquanto inibe a adesão celular ao substrato (COSTA; SANTOS, 2004).

O domínio desintegrina das SVMPs das classes PII e PIII é um produto da autoproteólise dessas toxinas; suas formas livres são geralmente um produto da clivagem dos precursores contendo o domínio metaloprotease (BJARNASON; FOX, 1994; YAMADA; SHIN; MORITA, 1999). As desintegrinas são estruturas constituídas por uma sequência RGD (Arg-Gly-Asp), as quais reconhecem integrinas, glicoproteínas essenciais para a ligação entre o citoesqueleto de uma célula e a matriz extracelular, localizadas em todos os tipos de células (GOULD et al., 1990; HYNES, 1987). Entre os efeitos biológicos das desintegrinas, destaca-se a inibição de agregação plaquetária, agindo como antagonista da ligação do fibrinogênio à plaqueta integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, devido ao motivo RGD em sua sequência de aminoácidos (HUANG et al., 1987; MARUYAMA et al., 1997). Outro efeito é a inibição de adesão celular dependente de integrinas, como pode ser observado em resultados de trabalhos como os de Beviglia et al. (1995) e Danen et al. (1998), nos quais se observou a inibição do desenvolvimento de metástases, sugerindo que as desintegrinas possam ser de grande valor na terapia do câncer.

A segunda maior porcentagem da composição do veneno de *Bothrops jararaca* corresponde às serinoproteases (CIDADE et al., 2006). Serinoproteases em venenos de serpentes são enzimas que afetam a hemostase e trombose durante o envenenamento, agindo em uma variedade de componentes da cascata de coagulação e causando subsequentemente um desequilíbrio do sistema hemostático da presa (MATSUI; FUJIMURA; TITANI, 2000). Estas enzimas são caracterizadas por um mecanismo catalítico que inclui um resíduo de serina altamente reativo que forma um sítio ativo dentro de resíduos de histidina e ácido aspártico. Um exemplo de serino-protease isolado de *B. jararaca* é o KN-BJ (SERRANO et al., 1998), uma enzima responsável pela liberação da bradicinina, peptídeo que causa a dilatação dos vasos sanguíneos e leva à queda da pressão sanguínea (ROCHA E SILVA; BERALDO; ROSENFELD, 1949).

Fosfolipases A_2 (PLA₂s) são enzimas que catalisam a hidrólise das ligações éster na posição sn2 dos glicerofosfolipídeos, liberando ácidos graxos e lisofosfolipídeo como produto (DA SILVA CUNHA; FULY; DE ARAÚJO, 2011). De

acordo com a sua localização, regulação, mecanismo, sequência de aminoácidos e estrutura, a super-família de PLA₂ é classificada em 15 grupos, e inclui cinco diferentes tipos de enzimas: PLA₂s secretadas (sPLA₂), PLA₂s citosólicas (cPLA₂), PLA₂s independentes de Ca²⁺ (iPLA₂), PAF (fator de ativação plaquetária) acetilidrolases, e PLA₂s lisossomais (BURKE; DENNIS, 2009; SCHALOSKE; DENNIS, 2006; SIX; DENNIS, 2000). As PLA₂s encontradas em venenos de serpentes (svPLA₂ – *snake venom PLA₂*) pertencem à categoria de PLA₂s secretadas, e pertencem aos grupos I e II, de acordo com esta classificação, e destes, as encontradas nos venenos de serpentes da família Viperidae pertencem ao grupo II (SAMY et al., 2012). As svPLA₂s têm a capacidade de modular a adesão e a proliferação celulares *in vitro*, e também possuem propriedades antiangiogênicas (BAZAA et al., 2009, 2010; KHUNSAP et al., 2011). Há pelo menos um estudo relatado sobre PLA₂ afetando a permeabilidade da membrana interna da bactéria, no caso da *E. coli* K12 (ARAGÃO; CHIOATO; WARD, 2008). No caso do veneno de *Bothrops*, as PLA₂s são os principais componentes responsáveis pelos sérios danos locais observados em casos de acidentes ofídicos provocados por este gênero; entretanto, no caso da espécie *B. jararaca*, o índice de danos musculares causados pelo veneno é relativamente mais baixo que de algumas outras espécies, como a *B. moojeni* e *B. newiedi* (ZAMUNER et al., 2004). Este fato é consistente com o fato de apenas 0,7% dos transcritos da toxina corresponderem aos da PLA₂s, indicando que os danos sistêmicos, causados por metaloproteases e serinoproteases e lectinas tipo C são mais significantes que os danos locais (CIDADE et al., 2006).

Correspondentes a 0,5% do transcrito total do veneno de *B. jararaca* (CIDADE et al., 2006), as L-Aminoácido oxidases (LAOs) são flavoenzimas amplamente distribuídas em diferentes espécies incluindo serpentes, e pertencem à classe de oxiredutases que catalisam a desaminação de L-aminoácidos, produzindo o alfa-ceto ácido correspondente, além de peróxido de hidrogênio e amônia (TAN; FUNG, 2008). Geralmente são homodímeros, com co-fatores FAD (*Flavin Adenine Dinucleotide* – Dinucleotídeo de flavina e adenina) ou FMN (*Flavin Mononucleotide* – Mononucleotídeo de flavina) ligados covalentemente à sua estrutura química (IZIDORO et al., 2013). Na área farmacológica, LAOs têm sido objetos de estudo de grande interesse devido às suas propriedades bactericidas. Em testes realizados por Ciscotto et al. (2009), as LAOs presentes no veneno de *B. jararaca* apresentaram efeito bactericida contra Gram-positivos como *Staphylococcus aureus* e Gram-

negativos como *Pseudomonas aeruginosa*, embora não aparentem ter o mesmo efeito contra algumas espécies bacterianas, como a *Escherichia coli*. Efeitos antiparasitários também foram observados, tanto no estudo acima como nos experimentos realizados por Deolindo et al. (2010), os quais indicaram que a atividade de LAO presente nas frações do veneno de *B. jararaca* é responsável pela indução da morte celular programada em *Trypanosoma cruzi*.

Os peptídeos potencializadores de bradicinina (BPP) constituem 6,2% dos transcritos de toxina do veneno (CIDADE et al., 2006). Uma entre duas importantes descobertas que resultaram do estudo do veneno da serpente *B. jararaca*—sendo a outra a descoberta da bradicinina (FERREIRA; BARTELT; GREENE, 1970; ROCHA E SILVA; BERALDO; ROSENFELD, 1949)—foi a identificação de BPPs, que consistem de piroglutamil, oligopeptídeos ricos em prolina de 5 a 14 resíduos de aminoácido. Os BPPs geralmente apresentam um resíduo de piroglutamil na porção N-terminal e uma prolina na região C-terminal, com os peptídeos maiores apresentando em comum a sequência Ile-Pro-Pro (IPP) na região C-terminal. São conhecidos por inibirem a enzima conversora da metaloprotease endotelial angiotensina (ACE, *Angiotensin-converting Enzyme*), a qual produz angiotensina II, um vasoconstritor, a partir da hidrólise da angiotensina I (HAYASHI; CAMARGO, 2005; IANZER et al., 2004). ACE é responsável por manter o nível normal da pressão sanguínea, e é também capaz de inibir a bradicinina, a qual é liberada no sangue das vítimas dos acidentes botrópicos através da ação das serinoproteases. Sendo conhecida a propriedade da bradicinina de causar queda da pressão sanguínea, a observação de hipotensão nas vítimas após envenenamento indica claramente o envolvimento dos BPPs do veneno neste processo, e estes peptídeos têm sido utilizados como modelos para o desenvolvimento de novas drogas com propriedades anti-hipertensivas (FERNANDEZ; NESHICH; CAMARGO, 2004). Foi a partir dos BBPs que o primeiro fármaco inibidor do sítio ativo do ACE, Captopril, foi desenvolvido (ONDETTI; CUSHMAN, 1981).

Tendo em vista os diferentes efeitos biológicos dos diversos componentes do veneno de serpentes nos diferentes organismos, de bactérias a células eucarióticas, é interessante notar uma aparente ausência de estudos realizados sobre os possíveis efeitos biológicos do veneno ou dos seus componentes em interações de bactérias com as células hospedeiras. Outro ponto importante a ser observado aqui, é que a maioria destes exemplos de componentes de veneno mencionados são

compostos de massa molecular mais alta, com 10 kDa ou mais. Grande parte dos estudos relacionados ao veneno de serpentes e seus componentes estão focados nestes componentes, e suas funções estão bem descritas na literatura. Entretanto, vale lembrar que parte da composição da peçonha inclui também compostos com baixa massa molecular (5 kDa ou menos). Estes tendem a ser ignorados em favor dos componentes com massa molecular maior, e quase não existem estudos publicados referentes a esses compostos. A observação do efeito do veneno e de seus componentes nestes tipos de interações, incluindo componentes de baixa massa molecular, possivelmente oferecerá importantes contribuições para futuras pesquisas.

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi observar o efeito das diferentes frações do veneno do *Bothrops jararaca* na interação bactéria-hospedeiro entre *Escherichia coli* enteropatogênica típica e células epiteliais *in vitro*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras Bacterianas

Para este trabalho foi utilizada a amostra protótipo de EPEC típica E2348/69 (O127:H6). As bactérias foram cultivadas a 37 °C em Caldo Lúria Bertani (LB) ou Tryptic Soy Broth (TSB). Os meios de cultura para o cultivo das amostras foram preparados conforme recomendações do fabricante.

As culturas em meio líquido foram incubadas por 18 h em condições estáticas. A amostra foi mantida em estoques congelados a -20 °C em caldo TSB ou LB acrescido de 40% (v/v) de glicerol.

3.2 Amostras de veneno de *Bothrops jararaca*

As amostras liofilizadas de veneno de *Bothrops jararaca* foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan.

3.3 Fracionamento do veneno

O fracionamento do veneno foi realizado via ultrafiltração, separando as diferentes partes do veneno segundo o seu peso molecular. Esta etapa foi realizada com a colaboração do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan.

Inicialmente, 100 mg de veneno bruto foram resuspendidos em água, e esta amostra foi colocada em colunas para ultrafiltração (VivaSpin 6, GE Healthcare) com membrana de peso molecular de corte (*molecular weight cut-off* (MWCO)) de 10 kDa, e centrifugada por 10 min a 4000 g e 4 °C. O processo foi repetido até toda a amostra ser filtrada, aumentando a velocidade da centrífuga em até 9000 g, e resuspendendo a parte retida em 1-2 mL de água destilada conforme necessário em cada repetição do processo. A fração retida na membrana foi recuperada com auxílio de um pipetador, após adicionar água destilada à membrana para sua resuspensão. Ambas frações, tanto a filtrada como a retida recuperada (**fração I**, fração do veneno com peso molecular acima de 10 kDa), foram liofilizadas.

Para a etapa seguinte, o filtrado liofilizado foi resuspendido em água destilada, e colocado em uma coluna de spin para ultrafiltração, com membrana de peso

molecular de corte de 3 kDa (Amicon® Ultra-4, Millipore). A amostra foi filtrada conforme mencionado acima. Tanto o filtrado (**fração III**, fração do veneno com peso molecular menor que 3 kDa) como a parte retida na membrana (**fração II**, fração do veneno com peso molecular maior que 3 kDa e menor que 10 kDa), recuperada seguindo os mesmos passos usados na etapa anterior, foram aliquotadas em tubos de 1,5 mL e liofilizadas para quantificação e para obtenção de perfil via HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência).

3.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa

Para realização da HPLC em fase reversa (*high-performance liquid chromatography* (RP-HPLC)), uma alíquota de fração previamente liofilizada foi resuspendida em 1 mL de água destilada, e desta 50 µL foram aplicados em uma coluna para RP-HPLC, C18 para a fração menor que 3 kDa e C8 para a fração maior que 10 kDa (Capcell Pak, Shiseido, Japão), para realização deste passo. Devido à quantidade final limitada, a fração maior que 3 kDa e menor que 10 kDa foi reservada inicialmente para os ensaios biológicos.

A coluna foi equilibrada com 0,1% ácido trifluoroacético (TFA) (solvente A) e eluída com um gradiente linear de concentração de acetonitrila mais 0,1% TFA (solvente B), de 10 a 40% para a fração menor que 3 kDa e de 10% a 60% para a fração maior que 10 kDa, em velocidade de fluxo de 0,5 mL por minuto durante uma hora. Os perfis de eluição foram monitorados a 214 nm, 254 nm, e 280 nm utilizando-se um sistema cromatográfico ÄKTA (GE Healthcare).

3.5 Ensaio de Resazurina

O ensaio de microtitulação de resazurina (*Resazurin Microtitration Assay* (REMA)) para determinação de crescimento bacteriano foi realizado conforme protocolo adaptado das metodologias descrita por Ahmed et al. (1994) e Goegan et al. (1995). Uma solução estoque 10 vezes concentrada de resazurina foi preparada para o teste, dissolvendo-se 2 mg de resazurina (sal de sódio, Sigma-Aldrich) em 1 mL de água destilada, a qual foi mantida em temperatura ambiente ao abrigo de luz até ser usada.

Todas as amostras foram testadas em triplicata. Em placa de 96 poços, para as amostras testes, foram adicionados 1 μL de cultura bacteriana em cada poço mantida por 18 horas em caldo LB, mais 10 μL de fração de veneno com diferentes concentrações (10 ng, 50 ng, 100 ng, 250 ng, 500 ng, 1000 ng por volume), completando com meio LB para total volume de 100 μL por poço. Para controle negativo de crescimento bacteriano, foram acrescentados 100 ng de ampicilina por poço, e para controle positivo foi colocado apenas a cultura bacteriana. Para o cálculo do fator de correção a ser realizado no final do ensaio, foram utilizadas duas triplicatas contendo apenas meio LB. A placa foi mantida em temperatura de 37 °C por 18 horas. A **Figura 2** mostra um diagrama do teste realizado, cada retângulo pequeno representando um poço.

Fração I			Fração II			Fração III			10ng
									50ng
									100ng
									250ng
									500ng
									1000ng
Ampicilina						LB com resazurina			
Somente bactéria						LB sem resazurina			

Figura 2 – Diagrama do REMA realizado para cálculo de atividade antibacteriana.

Após o período de incubação, foram acrescentados nos poços testes 20 μL de resazurina (0,2 mg/mL). O mesmo foi realizado com os controles, com exceção de um dos dois grupos triplicatas contendo apenas meio. A placa foi incubada em temperatura ambiente por uma hora, e a mudança de coloração foi anotada. Por fim, foi medida a absorbância da microplaca em comprimento de onda de 550 nm e em comprimento de onda de 595 nm. Estes valores foram utilizados para determinar o percentual de crescimento bacteriano das frações de veneno em diferentes concentrações.

3.6 Ensaios de adesão em células epiteliais *in vitro*

3.6.1 Cultivo e preparo da linhagem celular HEp-2

A linhagem celular HEp-2 foi cultivada em meio DMEM contendo antibiótico (Cultilab, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Brasil), em garrafas de 25 mL (TPP, Suíça), incubadas em estufa a 37 °C contendo 5% de CO₂ (CO₂ Water Jacketed Incubator, Forma Scientific Inc., EUA), durante 2 a 3 dias. Após esse período, o meio de cultivo foi removido e a monocamada celular lavada com 10 ml de PBS estéril (solução tampão salina-fosfato- cloreto de sódio 137 mM; cloreto de potássio 2,7 mM; fosfato de sódio dibásico 8,1 mM; fosfato de potássio monobásico 1,5 mM; pH 7,4). Essa solução foi desprezada, adicionando-se posteriormente 1 mL de TrypLE Express (Gibco) para o descolamento da monocamada celular, a qual foi mantida em contato com a monocamada celular por 5 min em estufa de CO₂. Após esse período foram adicionados 3 mL de DMEM-SFB a 10% e a suspensão celular foi então ajustada através de contagem em câmara de Neubauer (Glastécnica) e diluída em DMEM-SFB a 10% de maneira a obter uma concentração final de 5×10^4 células/mL. Volumes de 1 mL foram transferidos para placas de poliestireno de 24 poços contendo lamínulas de vidro esterilizadas. As placas foram mantidas a 37 °C em estufa de CO₂ por 48 h, até atingir semi-confluência de crescimento celular.

3.6.2 Ensaio de adesão em células HEp-2

O teste de adesão foi realizado segundo a metodologia descrita por Cravioto et al. (1979), utilizando-se monocamada semi-confluente de células dispostas em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro. Essas monocamadas semi-confluentes foram lavadas com PBS estéril pH 7,4 e, 960 µL de DMEM foram adicionados a cada poço da placa. Posteriormente, foram acrescentados 40 µL de cultura bacteriana mantida por 18 h em caldo LB ou TSB, acrescidos de diferentes concentrações (100 ng, 500 ng ou 1000 ng por volume) das frações I, II, ou III. O diagrama com os tratamentos realizados está apresentado na **Figura 3**. A preparação foi mantida em temperatura de 37 °C por um período de três horas. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Células + 100ng fração	Cél + E23 + 100ng fração	Células + 500ng fração	Cél + E23 + 500ng fração	Células + 1000ng fração	Cél + E23 + 1000ng fração
Células + 100ng fração	Cél + E23 + 100ng fração	Células + 500ng fração	Cél + E23 + 500ng fração	Células + 1000ng fração	Cél + E23 + 1000ng fração
Células + 100ng fração	Cél + E23 + 100ng fração	Células + 500ng fração	Cél + E23 + 500ng fração	Células + 1000ng fração	Cél + E23 + 1000ng fração
Células	Células	Células	Células + E23	Células + E23	Células + E23

Figura 3 – Diagrama do teste de adesão realizado com as células HEP-2.

Após esse período os poços foram lavados com PBS estéril e as células fixadas com metanol 100% por 30 min em temperatura ambiente. Em seguida, foram coradas com solução May-Grünwald 0,2% (Merk, Alemanha) por 5 minutos, e por fim, com corante Giemsa (Merk, Alemanha) por 20 minutos após desprezar o corante anterior. As lamínulas de vidro foram enxaguadas em água corrente até a retirada do excesso do corante. Finalmente, após a secagem em temperatura ambiente e fixação das lamínulas de vidro com Entellan (Merk, Alemanha), a observação foi feita em microscópio óptico, em aumento de 1000 vezes.

4 RESULTADOS

4.1 Cromatograma de HPLC das frações do veneno de *B. jararaca*

Após ultrafiltração do veneno, as frações obtidas foram submetidas ao processo de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa para observação do seu perfil.

Na **Figura 4** estão apresentados os cromatogramas das frações testadas. Como observa-se na **Figura 4-A**, a fração originalmente retida na membrana de MWCO 10 kDa é mais hidrofóbica segundo seu perfil de eluição, havendo necessidade de um gradiente maior (até 60%) de solvente orgânico (acetonitrila) para a eluição completa dos componentes dentro da fração.

No caso da fração ultrafiltrada utilizando membrana de MWCO 3 kDa, um gradiente de até 40% de acetonitrila foi suficiente para total eluição dos componentes, como pode ser observado no cromatograma apresentado na **Figura 4-B**.

Figura 4 – RP-HPLC das frações: (A) maior que 10 kDa. (B) menor que 3 kDa. Os perfis de eluição foram monitorados a 214 nm, 254 nm, e 280 nm.

4.2 Ensaio de resazurina para determinação de crescimento bacteriano

O ensaio de resazurina foi realizado para determinar se as frações do veneno afetam de algum modo o crescimento bacteriano. Na **Figura 5** está apresentado o resultado visual do ensaio realizado. A mudança de cor da resazurina do azul para rosa resulta da ocorrência de redução do reagente, o que indica existência de crescimento bacteriano na amostra. Com exceção das amostras com apenas meio LB ou com adição de ampicilina, todas apresentaram redução da resazurina, indicando que houve crescimento bacteriano independentemente da concentração das frações de veneno testadas.

Figura 5 – Resultado do ensaio de REMA para determinação de atividade antibacteriana. Todas as amostras contendo frações de veneno apresentaram redução da resazurina (indicado pela mudança de cor de azul para rosa), indicando existência de crescimento bacteriano.

Os valores de absorbância das amostras testadas no ensaio estão listados na **Tabela 1**. A porcentagem de redução da resazurina, que indica a porcentagem de crescimento bacteriano na amostra, foi calculada usando os valores de absorbância seguindo as instruções na metodologia descrita por Goegan et al. (1995).

Tabela 1– % de crescimento bacteriano (equivalente à % de redução da resazurina). Esta porcentagem foi calculada segundo a metodologia descrita por Goegan et al. (1995).

Tratamento	Conc. (ng/10 μ L)	Abs. 550nm	Abs. 595nm	% Red. Resaz.	% Cresc. Bact.
I	10	1.381	0.886	93.8	101.16
	50	1.383	0.982	89.3	96.23
	100	1.343	0.942	87.2	94.02
	250	1.342	0.969	85.8	92.46
	500	1.358	0.994	86.2	92.91
	1000	1.387	0.996	89.0	95.94
II	10	1.419	0.887	97.6	105.19
	50	1.367	0.961	88.7	95.64
	100	1.311	0.948	83.7	90.26
	250	1.308	0.946	83.6	90.08
	500	1.324	0.953	84.8	91.41
	1000	1.301	0.952	82.5	88.95
III	10	1.458	1.051	93.4	100.64
	50	1.342	1.036	82.5	88.94
	100	1.294	0.999	79.5	85.70
	250	1.301	1.003	80.0	86.28
	500	1.308	0.985	81.6	87.98
	1000	1.331	0.965	84.9	91.50
Ampicilina (-)	N/A	0.510	0.942	4.0	4.33
Somente bactéria (+)	N/A	1.403	0.952	92.8	100.00

4.3 Ensaio de adesão em células HEp-2

Sabendo-se que a principal característica da EPEC típica é o padrão de adesão localizada (LA), foi realizado ensaio de adesão em células HEp-2 para observar como a interação entre a bactéria e a célula-hospedeiro pode ser afetada na presença de diferentes frações do veneno de *B. jararaca*.

Na **Figura 6** pode-se observar os controles do ensaio de adesão, sendo a **Figura 6-A** correspondente às células HEp-2 sem adição de bactéria e sem adição de nenhuma fração do veneno, enquanto a **Figura 6-B** mostra a interação entre a bactéria e a célula epitelial sem adição de fração de veneno, podendo-se observar o padrão LA, caracterizado por colônias bacterianas compactas em determinadas regiões da célula.

Figura 6 – Controles do ensaio de adesão com células HEp-2, observados em microscopia óptica em aumento de 1000X. (A) células HEp-2, sem adição de bactéria ou fração de veneno; (B) interação de 3h entre células HEp-2 e EPEC típica E2348/69 (O127:H6), sem adição de fração de veneno.

Na **Figura 7** estão apresentados os resultados das interações bactéria-célula hospedeira na presença de diferentes concentrações da fração I, contendo componentes maiores que 10 kDa. As Figuras **7-A**, **7-B**, e **7-C** mostram as células tratadas com 100 ng, 500 ng, e 1000 ng de fração I, respectivamente, sem adição de bactérias. A **Figura 7-D** apresenta o resultado após 3 horas de interação entre as células HEp-2 e a EPEC típica E2348/69 (O127:H26), na presença de 100 ng de fração I. É possível observar um aumento do número de bactérias aderidas às células HEp-2 em comparação com o resultado do teste controle (**Figura 6-B**). Entretanto, quando a concentração da fração I foi aumentada para 500 ng, a quantidade de bactérias aderidas diminuiu, apresentando um resultado similar ao do controle, como pode ser observado na **Figura 7-E**. Não foi observada diferença significativa na quantidade de bactérias aderidas às células, quando a concentração foi aumentada para 1000 ng (**Figura 7-F**), em comparação com o teste de adesão com 500 ng ou com o teste controle.

Os resultados do ensaio de adesão com as células HEp-2 na presença da fração II, fração menor que 10 kDa porém maior que 3 kDa, estão apresentados na **Figura 8**. As células tratadas com as diferentes concentrações da fração, 100 ng, 500 ng, e 1000 ng, sem adição de bactérias podem ser observadas nas **Figuras 8-A**, **8-B**, e **8-C**, respectivamente. A **Figura 8-D** apresenta o resultado do teste de adesão após 3 horas de interação bactéria/célula na presença de 100 ng de fração II. Pode-se observar um aumento de bactérias aderidas às células em comparação com o controle. A **Figura 8-E** apresenta o resultado do teste realizado com 500 ng

de fração II. A quantidade de bactérias diminuiu, e o resultado é muito parecido ao observado no teste controle. Este resultado não aparentou ser afetado quando a concentração da fração II foi aumentada para 1000 ng (**Figura 8-F**).

A **Figura 9** corresponde aos resultados da interação entre as células e as bactérias na presença de diferentes concentrações da fração III, contendo componentes do veneno menores que 3 kDa. As **Figuras 9-A, 9-B, e 9-C** apresentam as células tratadas com as diferentes concentrações da fração III sem adição de bactéria, 100 ng, 500 ng, e 1000 ng, respectivamente. A **Figura 9-D** apresenta o resultado do ensaio de adesão de 3 horas na presença de 100 ng de fração III. Observou-se aqui um aumento significativo de bactérias aderidas às células quando comparado ao teste controle. A **Figura 9-E** mostra o resultado do ensaio realizado com 500 ng de fração III. Com o aumento da quantidade de fração, o número de bactérias aderidas às células diminuiu, e o resultado está semelhante ao que se observou no teste controle. Quando a concentração da fração foi aumentada para 1000 ng, a quantidade de bactérias que aderiram às células diminuiu ainda mais, apresentando um número menor de bactérias aderidas quando comparado ao teste controle. O resultado pode ser observado na **Figura 9-F**.

Figura 7 – Ensaio de adesão em células HEp-2 com diferentes concentrações da fração I (maior que 10 kDa), observados em microscopia óptica em aumento de 1000X. Células sem adição de bactérias: (A) 100 ng fração I; (B) 500 ng fração I; (C) 1000 ng fração I. Interação de 3 h entre as células e EPEC típica E2348/69 (O127:H6): (D) 100 ng fração I; (E) 500 ng fração I; (F) 1000 ng fração I.

Figura 8 – Ensaio de adesão em células HEp-2 com diferentes concentrações da fração II (menor que 10 kDa e maior que 3 kDa), observados em microscopia óptica em aumento de 1000X. Células sem adição de bactérias: (A) 100 ng fração II; (B) 500 ng fração II; (C) 1000 ng fração II. Interação de 3 h entre as células e EPEC típica E2348/69 (O127:H6): (D) 100 ng fração II; (E) 500 ng fração II; (F) 1000 ng fração II.

Figura 9 – Ensaio de adesão em células HEp-2 com diferentes concentrações da fração III (menor que 3 kDa), observados em microscopia óptica em aumento de 1000X. Células sem adição de bactérias: (A) 100 ng fração III; (B) 500 ng fração III; (C) 1000 ng fração III. Interação de 3 h entre as células e EPEC típica E2348/69 (O127:H6): (D) 100 ng fração III; (E) 500 ng fração III; (F) 1000 ng fração III.

5 DISCUSSÃO

As *Escherichia coli* enteropatogênicas são até hoje importantes agentes causadores de diarreia em crianças menores de 2 anos de idade em países em desenvolvimento (KAPER; NATARO, 1998). Entre 1945 e 1965, as EPEC típicas eram frequentemente relacionadas a surtos de diarreia nos países desenvolvidos. Hoje em dia, raramente são isoladas, havendo prevalência de sorotipos de EPEC atípica (TRABULSI et al., 2002). Estudos epidemiológicos mais recentes têm demonstrado que o mesmo vem ocorrendo no Brasil (FERNANDES-FILHO, 2004), posicionando as EPEC atípicas como patógenos emergentes.

Os genes envolvidos na lesão *attaching and effacing* (A/E), fenótipo característico de amostras EPEC (MOON et al., 1983), estão localizados na ilha de patogenicidade conhecida como região LEE (MCDANIEL et al., 1995), e sua transcrição é regulada em parte por *quorum sensing*, um mecanismo de sinalização entre células que envolve produção de compostos conhecidos como autoindutores, que permitem a bactéria reconhecer a presença da sua população e também das outras espécies bacterianas no ambiente em que se encontra (SPERANDIO et al., 1999). A presença destes compostos em suficientes concentrações, resultante diretamente do aumento da densidade populacional, permite uma comunicação intercelular que leva à regulação da transcrição gênica que determina se um específico fenótipo da espécie será ou não manifestado. Estudos sugerem que *quorum sensing* possui um papel importante na modulação da virulência das EPEC, e o rompimento deste mecanismo pode ter significativo efeito na sua patogênese, incluindo a adesão e o sistema de secreção tipo III (SIRCILI et al., 2004). A ideia de causar interferência neste mecanismo de regulação, *quorum quenching*, tem emergido como uma possível estratégia para o controle da doença, visando inibir a virulência da bactéria sem necessariamente atacar a própria bactéria (CLATWORTHY; PIERSON; HUNG, 2007).

Os venenos de serpentes possuem uma composição complexa, com diversos componentes que causam diferentes efeitos biológicos (KOH; ARMUGAM; JEYASEELAN, 2006). O potencial das moléculas contidas nos venenos de serpentes tem sido estudado tanto em bactérias como em células eucarióticas, como pode ser observado em trabalhos como os de Ciscotto et al. (2009) e Dumanov et al. (2015). Entretanto, estes trabalhos em geral descrevem os efeitos observados

nas bactérias e nas células eucarióticas separadamente, não em interações entre estas.

Outro detalhe a ser notado é que, embora há uma extensiva pesquisa dos diferentes componentes e seus possíveis efeitos biológicos, grande parte desta atenção é voltada para aqueles de maior peso molecular. Jararagina, com diferentes potenciais biológicos incluindo efeito antitumoral contra o melanoma (KLEIN et al., 2011), é uma metaloprotease presente no veneno de *B. jararaca* com 52 kDa de peso molecular (PAINE et al., 1992). Botropasina, outra metaloprotease presente no veneno e um homólogo da jararagina, tem 48 kDa de peso molecular (MANDELBAUM; REICHEL; ASSAKURA, 1982). BJ-PI2, caracterizada por aumentar a permeabilidade vascular e a migração celular inflamatória *in vivo*, possui 23,08 kDa (DA SILVA et al., 2012). O peso molecular de KN-BJ, serinoprotease presente no veneno caracterizada pela liberação de cininas e coagulação do fibrinogênio, é de 38 a 39 kDa (SERRANO et al., 1998). A L-aminoácido oxidase isolada por Ciscotto et al. (2009), que foi um objeto de interesse de estudo devido à sua característica atividade bactericida, tem 38,2 kDa após deglicosilação. Pouca atenção é dada aos componentes de baixo peso molecular, com exceção talvez dos peptídeos potencializadores de bradicinina (BPP) (CAMARGO et al., 2012), apesar de haver uma grande variedade de pesos moleculares dos compostos do veneno descritos em literatura, de metaloproteases com mais de 50 kDa (PAINE et al., 1992), a BPPs com menos de 1 kDa (IANZER et al., 2004).

Este trabalho visou observar os efeitos causados pelas diferentes frações de veneno de *Bothrops jararaca* nas interações bactéria-hospedeiro entre EPEC e células HEp-2 *in vitro*, e em particular se existe alguma molécula na fração de veneno contendo compostos de baixo peso molecular que interfira no mecanismo de modulação de virulência da bactéria, com ou sem efeito bactericida.

Inicialmente, o veneno foi fracionado de acordo com o peso molecular. Para isso, o veneno foi ultrafiltrado em dois passos, primeiro em membrana de peso molecular de corte de 10 kDa e em seguida em membrana de peso molecular de corte de 3 kDa, separando o veneno em três frações de diferentes faixas de peso molecular: fração contendo compostos maiores que 10 kDa, fração contendo compostos menores que 10 kDa e maiores que 3 kDa, e fração contendo compostos menores que 3 kDa.

A presença de componentes dentro da fração contendo compostos maiores que 10 kDa e da fração com os componentes menores que 3 kDa foi verificada via RP-HPLC, observando-se o seu cromatograma com os seus perfis de eluição (**Figura 4**). Estes cromatogramas oferecem um perfil geral dos tipos de eluentes presentes no veneno de *Bothrops jararaca*, indicando a complexidade da composição do veneno desta espécie. Baseado nestes perfis, observa-se que existe uma necessidade de um gradiente maior de solvente orgânico (apolar), de pelo menos 60%, para a eluição total dos componentes do veneno desta espécie. Este resultado corrobora trabalhos como os realizados por Sousa et al. (2013) e Tashima et al. (2011), realizados com a utilização de um gradiente de solvente orgânico de até 80% para a eluição total do veneno de *Bothrops jararaca*. Os trabalhos acima também mostram a grande variabilidade da composição do veneno das serpentes de diferentes espécies, mesmo pertencendo a um mesmo gênero. Isto é observado até mesmo dentro de uma mesma espécie, como pode ser visto nos resultados de trabalhos como os de Gonçalves-Machado et al. (2015), quando comparou-se os perfis dos venenos de *Bothrops jararaca* extraídos de populações de diferentes regiões do país.

Em seguida, para verificar se as frações de veneno possuíam efeito bactericida ou não, foi realizado um ensaio colorimétrico com resazurina para determinar a porcentagem de crescimento bacteriano, e assim, a porcentagem de inibição das frações do veneno. A resazurina, caracterizada pela cor azul, é reduzida em presença de atividade biológica, tornando-se rosa; esta porcentagem de redução pode ser calculada através da leitura de absorbância em dois diferentes comprimentos de onda, e está diretamente relacionada com a porcentagem de crescimento bacteriano (GOEGAN et al., 1995; O'BRIEN et al., 2000). Os resultados indicaram que não há diferença significativa no crescimento bacteriano nas amostras contendo as diferentes concentrações das frações do veneno em comparação com o teste controle de crescimento, indicando que não existe componente com efeito bactericida contra EPEC nestas frações. Estes resultados corroboram os resultados observados por Ciscotto et al. (2009), onde não foi observado efeito bactericida do veneno de *Bothrops jararaca* contra *Escherichia coli*.

O passo seguinte foi observar como estas frações afetam a interação bactéria-hospedeiro, e para isso, foram realizados ensaios de adesão de 3 horas entre EPEC típica E2348/69 (O127:H6) e células HEp-2, os quais foram tratados com diferentes

concentrações de fração (100 ng, 500 ng ou 1000 ng por volume) para observação não somente dos possíveis efeitos mas também como estes mesmos podem variar uns dos outros dependendo da dosagem de fração adicionada, como observado em trabalhos como os de Dambisya, Lee e Gopalakrishnakone (1995) e de Sugiki et al. (1995).

Observando os resultados das figuras **7-A a 7-C**, **8-A a 8-C**, e **9-A a 9-C**, embora as células aparentam ter sido afetadas quando uma fração do veneno foi adicionada, elas continuaram a crescer e multiplicar normalmente. Esta observação é compatível com o trabalho de Borkow et al. (1994), que observaram que o veneno obtido das diferentes espécies de *Bothrops* não apresentam um efeito citotóxico direto em células endoteliais em concentrações de até 100 µg/mL, e com as observações de Da Silva et al. (2002), que células tumorais tendem a apresentar uma resistência à toxicidade do veneno de *Bothrops jararaca*, mantendo uma viabilidade de até 56,1% mesmo após o contato com o veneno em uma concentração de até 10 µg/mL durante 24 horas *in vitro*.

Todos os ensaios que foram realizados com a utilização de 100 ng de qualquer uma das três frações apresentaram uma potencialização da adesão, observando-se um número significativamente maior de bactérias aderidas às células (**Figuras 7-D, 8-D, e 9-D**) em comparação com os teste controle (**Figura 6-B**). Devido ao grande número de bactérias aderidas, foi mais difícil observar o padrão de adesão localizada (LA) característica de EPEC típica; as bactérias continuaram a aderir de forma agrupada, mas em grupos bem maiores do que se observa normalmente no padrão LA e de uma forma menos compacta, lembrando mais um padrão de adesão localizada-like (LAL).

Esta potencialização de adesão bacteriana e possível efeito no padrão de adesão aparenta ser limitado pela concentração, uma vez que quando a quantidade de fração acrescentada foi aumentada para 500 ng, o número de bactérias aderidas às células HEp-2 diminuiu, não diferindo muito do que se observou nos ensaios de controle, e o padrão LA foi observado novamente (**Figuras 7-E, 8-E, 9-E**).

A observação fenotípica dos testes tratados com concentração de 1000 ng de fração com compostos maiores que 3 kDa não foi significativamente diferente do que foi visto nos testes controle ou nos tratamentos de 500 ng da mesma fração. Entretanto, quando o teste foi tratado com 1000 ng de fração contendo compostos menores que 3 kDa, foi observado que a adesão bacteriana diminuiu mais em

comparação com os testes controle, e enquanto a tendência da bactéria de aderir de forma agrupada ainda está presente, a adesão localizada característica da EPEC típica aparenta levar mais tempo para ser estabelecida (**Figura 9-F**).

Estes resultados indicam que provavelmente existe um ou mais componentes no veneno, que em até certo ponto de concentração tem a capacidade de potencializar a adesão bacteriana nas células do hospedeiro, e que há a possibilidade da presença de algum componente de baixo peso molecular (3 kDa ou menos) que tem a capacidade de afetar negativamente a adesão bacteriana à medida que sua concentração é aumentada. Sabendo-se, baseado nos resultados do ensaio com resazurina, que nenhuma das frações possui efeito bactericida em EPEC, uma hipótese é que esta molécula de baixo peso interfere na regulação dos genes de virulência da EPEC, sugerindo possível componente capaz de *quorum quenching*, inibindo assim a virulência da bactéria sem matá-la, como ocorre no caso dos antibióticos.

Até recentemente, não foi encontrado nenhum estudo focado em possíveis efeitos biológicos nas interações entre as bactérias e as células do hospedeiro, e este trabalho é um dos poucos que focam a atenção nos componentes de baixo peso molecular e seu potencial biológico. Os resultados observados aqui indicam a importância de uma continuidade do estudo destes componentes, principalmente os de baixo peso molecular, que tendem a ser negligenciados em favor dos componentes de maior peso molecular, melhor conhecidos e com suas funções bem descritas em literatura.

6 CONCLUSÕES

- O veneno de *Bothrops jararaca* é composto de diferentes componentes com grande variação de peso molecular, de enzimas maiores que 10 kDa a moléculas menores que 3 kDa.
- As frações do veneno não possuem efeito bactericida contra a EPEC.
- Há possivelmente um ou mais componentes no veneno que potencializa a adesão das bactérias até determinada concentração.
- Há possivelmente um composto de baixo peso molecular que afeta negativamente a adesão bacteriana à medida que sua concentração é aumentada.

REFERÊNCIAS*

- 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. F.; ELIAS, W. P. Virulence features of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* identified by the *ea*æ+ EAF-negative *stx*- genetic profile. **Diag. Microbiol. Infec. Dis.**, v. 64, p. 357-365, 2009.
- AHMED, S.A.; GOGAL Jr., R.M.; WALSH, J.E. A new Rapid and Simple Non-Radioactive assay to Monitor and Determine the proliferation of Lymphocytes: An Alternative to H3-thymidine incorporation assay. **J. Immunol. Methods**, v. 170 p. 211-224, 1994.
- AIRD, S. D. Ophidian envenomation strategies and the role of purines. **Toxicon**, v. 40, p. 335-393, 2002.
- ARAGÃO, E. A.; CHIOATO, L.; WARD, R. J. Permeabilization of *E. coli* K12 inner and outer membranes by bothropstoxin-I, a Lys49 phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu*. **Toxicon**, v. 51, p. 538-546, 2008.
- BASSLER, B. L.; WRIGHT, M.; SILVERMAN, M. R. Multiple signalling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway. **Mol. Microbiol.**, v. 13, n. 2, p. 273-286, 1994.
- BAZAA, A.; LUIS, J.; SRAIRI-ABID, N.; KALLECH-ZIRI, O.; KESSENTINI-ZOUARI, R.; DEFILLES, C.; LISSITZKY, J. C.; EL AYEB, M.; MARRAKCHI, N. MVL-PLA₂, a phospholipase A₂ from *Microvipera lebetine transmediterranea* venom, inhibits tumor cells adhesion and migration. **Matrix Biol.**, v. 28, p. 188-193, 2009.

* De acordo com:

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

BAZAA, A.; PASQUIER, E.; DEFILLES, C.; LIMAM, I.; KESSENTINI-ZOUARI, R.; KALLECH-ZIRI, O.; EL BATTARI, A.; BRAGUER, D.; EL AYEB, M.; MARRAKCHI, N.; LUIS, J. MVL-PLA₂, a snake venom phospholipase A₂, inhibits angiogenesis through an increase in microtubule dynamics and disorganization of focal adhesions. **PLoS One**, v. 5, e10124, 2010.

BEVIGLIA, L.; STEWART G. J.; NIEWIAROWSKI, S. Effect of four disintegrins on the adhesive and metastatic properties of B16F10 melanoma cells in a murine model. **Oncol. Res.**, v. 7, n. 1, p. 7-20, 1995.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacol. Ther.**, v. 62, p. 325-372, 1994.

BORKOW, G.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; OVADIA, M. Effect of various Viperidae and Crotalidae snake venoms on endothelial cells *in vitro*. **Toxicon**, v. 32, n. 12, p. 1689-1695, 1994.

BUERIS, V.; HUERTA-CANTILLO, J.; NAVARRO-GARCIA, F.; RUIZ, R. M.; CIANCIARULLO, A. M.; ELIAS, W. P. Late establishment of the attaching and effacing lesion caused by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* depends on protein expression regulated by Per. **Infect. Immun.**, v. 83, p. 379-388, 2015.

BURKE, J. E; DENNIS, E. A. Phospholipase A₂ Biochemistry. **Cardiovasc. Drugs Ther.**, v. 23, p. 49-59, 2009.

BUSTAMANTE, V. H.; VILLALBA, M. I.; GARCÍA-ÂNGULO, V. A.; VÁZQUEZ, A.; MARTÍNEZ, L. C.; JIMÉNEZ, R.; PUENTE, J. L. PerC and GrIA independently regulate Ler expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 82, p. 398-415, 2011.

CAMARGO, A. C.; IANZER, D.; GUERREIRO, J. R.; SERRANO, S. M. Bradykinin-potentiating peptides: beyond captopril. **Toxicon**, v. 59, p. 516-523, 2012.

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

CHEN, H. D.; FRANKEL, G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unraveling pathogenesis. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 29, p. 83-98, 2005.

CHEN, X. S.; SCHAUDER, N.; POTIER, A.; VAN DORSSELAER, I.; PELCZER, F.; BASSLER, B. L.; HUGHSON, F. M. Structural Identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. **Nature**, v. 415, p. 545-549, 2002.

CIDADE, D. A. P.; SIMÃO, T. A.; DÁVILA, A. M. R.; WAGNER, G.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; HO, P. L.; BOM, C.; ZINGALI, R. B.; ALBANO, R. M. *Bothrops jararaca* venom gland transcriptome: Analysis of the gene expression pattern. **Toxicon**, v. 48, p. 437-461, 2006.

CISCOTTO, P.; MACHADO DE AVILA, R. A.; COELHO, E. A. F.; OLIVEIRA, J.; DINIZ, C. G.; FARÍAS, L. M.; DE CARVALHO, M. A. R.; MARIA, W. S.; SANCHEZ, E. F.; BORGES, A.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**, v. 53, p. 330-341, 2009.

CLARKE, M. B.; HUGHES, D. T.; ZHU, C.; BOEDEKER, E. C.; SPERANDIO, V. The QseC sensor kinase: A bacterial adrenergic receptor. **PNAS**, v. 103, p. 10420-10425, 2006.

CLATWORTHY, A.E.; PIERSON, E.; HUNG, D.T. Targeting virulence: A new paradigm for antimicrobial therapy. **Nat. Chem. Biol.**, v.3, p. 541–548, 2007.

COSTA, E.P.; SANTOS, M.F. Jararhagin, a snake venom metalloproteinase-disintegrin, stimulates epithelial cell migration in an *in vitro* restitution model. **Toxicon**, v. 44, p. 861–870, 2004.

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

DA SILVA, R. J.; DA SILVA, M. G.; VILELA, L. C.; FECCHIO, D. Antitumor effect of *Bothrops jararaca* venom. **Mediators Inflamm.**, v. 11, n. 2, p. 99-104, 2002.

DA SILVA, I. R. F.; LORENZETTI, R.; RENNO, A. L.; BALDISSERA JR., L.; ZELANIS, A.; SERRANO, S. M. T.; HYSLOP, S. BJ-PI2, a non-hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops jararaca* snake venom. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1820, n. 11, p. 1809-1821, 2012.

DA SILVA CUNHA, K. C.; FULY, A. L.; DE ARAÚJO, E. G. A phospholipase A2 isolated from *Lachesis muta* snake venom increases the survival of retinal ganglion cells *in vitro*. **Toxicon**, v. 57, p. 580-585, 2011.

DAMBISYA, Y. M.; LEE, T. L.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Anticoagulant effects of *Pseudechis australis* (Australian king brown snake) venom on human blood: a computerized thromboelastography study. **Toxicon**, v. 33, n. 10, p. 1378-1382, 1995.

DANEN, E. H. J.; MARCINKIEWICZ, C.; CORNELISSEN, I. M.; VAN KRAATS, A. A.; PACHTER, J. A.; RUITER, D. J.; NIEWIAROWSKI, S.; VAN MUIJEN, G. N. The disintegrin eristostatin interferes with integrin alpha 4 beta 1 function and with experimental metastasis of human melanoma cells. **Exp. Cell Res.**, v. 238, p. 188-196, 1998.

DEOLINDO, P.; TEIXEIRA-FERREIRA, A. S.; DaMATTA, R. A.; ALVES, E. W. L- amino acid oxidase activity present in fractions of *Bothrops jararaca* venom is responsible for the induction of programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*. **Toxicon**, v. 56, p. 944-955, 2010.

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

DOUMANOV, J.; MLADENOVA, K.; TOPOUZOVA-HRISTOVA, T.; STOITSOVA, S.; PETROVA, S. Effects of vipoxin and its components on HepG2 cells. **Toxicon**, v. 94, p. 36-44, 2015.

DULGUER, M. V.; FABBRICOTTI, S. H.; BANDO, S. Y.; MOREIRA-FILHO, C. A.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETISKY, 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.

ELLIOTT, S. J.; SPERANDIO, V.; GIRÓN, J. A.; SHIN, S.; MELLIES, J. L.; WAINWRIGHT, L.; HUTCHESON, S. W.; MCDANIEL, T. K.; KAPER, J. B. The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE and non-LEE- encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 6115-6126, 2000.

FERNANDES-FILHO, A. **Doença diarréica aguda em João Pessoa: prevalência de enteropatógenos e importância dos potenciais fatores de risco e proteção.** 2004. 128 f. Tese (Doutor em Análises Clínicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

FERNANDEZ, J. H.; NESHICH, G.; CAMARGO, A. C. M. Using bradykinin-potentiating peptide structures to develop new antihypertensive drugs. **Genet. Mol. Res.**, v. 3, p. 554-563, 2004.

FERREIRA, S. H.; BARTELT, D. C.; GREENE, L. J. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. **Biochemistry**, v. 9, p. 2583-2593, 1970.

FINLAY, B. B.; ROSENSHINE, I.; DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B. Cytoskeletal composition of attaching and effacing lesions associated with enteropathogenic *Escherichia coli* adherence to HeLa cells. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 2541-2543, 1992.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Insights into and speculation about snake venom metalloproteinases (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **FEBS J.**, v. 275, p. 3016-3030, 2008.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microorganismos patogênicos de importância em alimentos. In: FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAFF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996, cap. 4, p. 33-82.

FUQUA, W. C.; WINANS, S. C.; GREENBERG, E. P. Quorum sensing in bacteria: the LuxR – Lux I family of cell density – responsive transcriptional regulators. **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 269-275, 1994.

GILES, C.; SANGSTER, G. Outbreak of infantile Gastro-enteritis in Aberdeen, p. association of special type of *Bact. coli* with infection. **J. Hyg.**, v. 46, p. 1-9.

GILES, C.; SANGSTER, G; SMITH, J. Epidemic Gastro-Enteritis of Infants in Aberdeen during 1947. **Arch. Dis. Childhood**, v. 24, p. 45-53, 1949.

GIRÓN, J. A; HO, A S. Y.; SCHOOLNIK, G. K. An Inducible Bundle-Forming Pilus of Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Science**, v. 254, p. 710-713, 1991.

GOEGAN, P.; JOHNSON, G.; VINCENT, R. Effects of Serum Protein and Colloid on the alamarBlue Assay in Cell Cultures. **Toxicol. In Vitro**, v. 9, n. 3, p. 257-266, 1995.

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.

GOMES, V. M.; CARVALHO, A. O.; DA CUNHA, M.; KELLER, M. N.; BLOCH JR., C.; DEOLINDO, P.; ALVES, E. W. Purification and characterization of a novel peptide with antifungal activity from *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon**, v. 45, p. 817-827, 2005.

GONÇALVES-MACHADO, L.; PLA, D.; SANZ, L.; JORGE, R. J. B.; LEITÃO-DE-ARAÚJO, M.; ALVES, M. L. M.; ALVARES, D. J.; DE MIRANDA, J.; NOWATZKI, J.; DE MORAIS-ZANI, K.; FERNANDES, W.; TANAKA-AZEVEDO, A. M.; FERNÁNDEZ, J.; ZINGALI, R. B.; GUTIÉRREZ, J. M.; CORRÊA-NETO, C.; CALVETE, J. J. Combined venomomics, venom gland transcriptomics, bioactivities, and antivenomics of two *Bothrops jararaca* populations from geographic isolated regions within the Brazilian Atlantic rainforest. **J. Prot.**, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391915002213>>. Acesso em 24 jun. 2015.

GOULD, R. J.; POLOKOFF, M. A.; FRIEDMAN, P. A.; HUANG, T.; HOLT, J. C.; COOK, J. J.; NIEWIAROWSKI, S. Disintegrins: a family of integrin inhibitory proteins from viper venoms. **Proc. Soc. Biol. Med.**, v. 195, p. 168-171, 1990.

GUTIÉRREZ, J. M. Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. **Rev. Biol. Trop.**, v. 50, p. 377-394, 2002.

GUTIÉRREZ, J.M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v. 82, p. 841–850, 2000.

HAYASHI, M. A. F.; CAMARGO, A.C.M. The bradykinin-potentiating peptides from venom gland and brain of *Bothrops jararaca* contain highly site specific inhibitors of the somatic angiotensin-converting enzyme. **Toxicon**, v. 45, p. 1163-1170, 2005.

HINTON, N. A.; MacGREGOR, R. R. A study of infections due to pathogenic serogroups of *Escherichia coli*. **Canad. MAJ.**, v. 79, p. 359-364, 1958.

HOOPER, N. M. Families of zinc metalloproteases. **FEBS Lett.**, Oct 31, v. 354, p. 1-6, 1994.

HUANG, T. F.; HOLT, J. C.; LUKASIEWICZ, H.; NIEWIAROWSKI, S. Trigramin. A low molecular weight peptide inhibiting fibrinogen interaction with platelet receptors expressed on glycoprotein IIb-IIIa complex. **J. Biol. Chem.**, v. 262, p. 16157-16163, 1987.

HYNES, R. O. Integrins: a family of cell surface receptors. **Cell**, v. 48, p. 549-554, 1987.

IANZER, D.; KONNO, K.; MARQUES-PORTO, R.; VIEIRA PORTARO, F. C.; STOCKLIN, R.; MARTINS DE CAMARGO, A. C.; PIMENTA, D. C. Identification of five new bradykinin potentiating peptides (BPPs) from *Bothrops jararaca* crude venom by using electrospray ionization tandem mass spectrometry after a two-step liquid chromatography. **Peptides**, v. 25, p. 1085-1092.

IZIDORO, L. F. M.; SOBRINHO, J. C.; MENDES, M. M.; COSTA, T. R.; GRABNER, A. N.; RODRIGUES, V. M.; DA SILVA, S. L.; ZANCHI, F. B.; ZULIANI, J. P.; FERNANDES, C. F. C.; CALDERON, L. A.; STÁBELI, R. G.; SOARES, A. M. Snake Venom L-Amino Acid Oxidases: Trends in Pharmacology and Biochemistry. **Biomed Res. Int.**, v. 2014, article ID 196754, 19 pages, 2014.

JAKABI, M.; FRANCO, B. D. G. M. Frequência de Isolamento de Cepas de *Escherichia coli* Patogênica em Alimentos de Origem Animal. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 11., n. 2, p. 170-181, 1991.

JARVIS, K. G.; GIRON, J. A.; JERSE, A. E.; MCDANIEL, T. K.; DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B. Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in a attaching and effacing lesion formation. **PNAS**, v. 92: 7996-8000, 1995.

JERSE, A. E.; KAPER, J. B. The *eae* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes a 94-kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid. **Infect. Immun.**, v. 59, p. 4302-4309, 1991.

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

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

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Rev. Microbiol.** v. 2, p. 123-138, 2004.

KAUFFMANN, F. The serology of the *coli* group. **J. Immunol.**, v. 57, p. 71-100, 1947.

KAUFFMANN, F.; DUPONT, A. *Escherichia* strains from infantile epidemic gastroenteritis. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.**, v. 27, p. 552-564, 1950.

KENNY, B.; DEVINNEY, R.; STEIN, M.; REINSCH, 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.

KHUNSAP, S.; PAKMANEE, N.; KHOW, O.; CHANHOM, L.; SITPRIJA, V.; SUNTRAVAT, M.; LUCENA, S. E.; PEREZ, J. C.; SÁNCHEZ, E. E. Purification of a phospholipase A₂ from *Daboia russelli siamensis* venom with anticancer effects. **J. Venom. Res.**, v. 2, p. 42-51, 2011.

KLEIN, A.; CAPITANIO, J. S.; MARIA, D. A.; RUIZ, I. R. Gene expression in SK-Mel-28 human melanoma cells treated with the snake venom jararhagin. **Toxicon**, v. 57, n. 1, p. 1-8, 2011.

KNUTTON, S.; BALDINI, M. M.; KAPER, J. B.; McNEISH, A. S. Role of plasmid-encoded factors in adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **Infect. Immun.**, v. 55, p. 78-85, 1987.

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

KOH, D. C. I.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 63, p. 3030-3041, 2006.

LAING, G. D.; CLISSA, P. B.; THEAKSTON, R. D.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; TAYLOR, M. J. Inflammatory pathogenesis of snake metalloproteinase-induced skin necrosis. **Eur. J. Immunol.**, v. 33, p. 3458-3463, 2003.

LEVINE, M. M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. **J. Infect. Disc.**, v. 155, p. 377-390, 1987.

MANDELBAUM, F. R.; REICHEL, A. P.; ASSAKURA, M. T. Isolation and characterization of a proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops jararaca* (jararaca). **Toxicon**, v. 20, n. 6, p. 955-972, 1982.

MARUYAMA, K.; KAWASAKI, T.; SAKAI, Y.; TANIUCHI, Y.; SHIMIZU, M.; KAWASHIMA, H.; TAKENAKA, T. Isolation and amino acid sequence of flavostatin, a novel disintegrin from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. **Peptides**, v. 18, p. 73-78, 1997.

MATHEWSON, J. J.; JOHNSON, P. C.; DUPONT, H. L. Pathogenicity of enteroadherent *Escherichia coli* in adult volunteers. **J. Infect. Dis.**, v. 154, p. 524-527, 1986.

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting haemostasis and thrombosis. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1477, p. 146–156, 2000.

MCDANIEL, T. K.; JARVIS, K. G.; DONNENBERG, M. S., KAPER, J. B. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **PNAS**, v. 92, p. 1664–1668, 1995.

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

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

MENG, J.; FENG, P.; DOYLE, M. P. Pathogenic *Escherichia coli*. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examinations of Foods**. 4th ed., Washington: APHA, 2001, cap. 35, p. 331-341

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília, DF: 2001. 120 p.

MOON, H. W.; WHIP, S. C.; ARGENZIO, R. A.; LEVINE, M. M.; GIANELLA, L. 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.

MUZA-MOONS, M. M.; KOUTSOURIS, A.; HECHT, G. Disruption of cell polarity by Enteropathogenic *Escherichia coli* enables basolateral membrane proteins to migrate apically and to potentiate physiological consequences. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 7069-7078, 2003.

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

NETER, E.; WESTPHAL, O.; LUDERITZ, O.; NEEDELL, M. H. Demonstration of antibodies against enteropathogenic *Escherichia coli* in sera of children of various ages. **Pediatrics**, v. 16, p. 801-808, 1955.

NUNES, E. B.; SARIDAKIS, H. O.; IRINO, K. PELAYO, J. S. Genotypic and phenotypic characterization of attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC) isolated from children with and without diarrhea in Londrina, Brasil. **J. Med. Microbiol.**, v. 52, p. 499-504, 2003.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **Eur J Biochem**, v. 267, p. 5421-5426, 2000.

ONDETTI, M. A.; CUSHMAN, D. W. Angiotensin converting enzyme inhibitors: biochemical properties and biological activities. In: SOFFER, R.L. (Ed.), **Biochemical Regulation of Blood Pressure**. New York: Wiley, 1981, p. 165-204

PAINE, M. J.; DESMOND, H. P.; THEAKSTON, R. D.; CRAMPTON, J. M. Purification, Cloning, and Molecular Characterization of a High Molecular Weight Hemorrhagic Metalloprotease, Jararhagin, from *Bothrops jararaca* Venom. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 22869-22876, 1992.

PARKER, C. T.; SPERANDIO, V. Cell-to-cell signaling during pathogenesis. **Cell. Microbiol.**, v. 11, p. 363-369, 2009.

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.

POLOTSKY, Y. E.; DRAGUNSKAYA, E. M.; SELIVERSTOVA, V.G.; AVDEEVA, T. A.; CHAKHUTINSKAYA, M. G.; KETI, I.; VERTENYI, A.; RALOVICH, B.; EMODY, L., MALOVICS, I.; SAFONOVA, N. V.; SNIGIREVSKAYA, E. S.; KARYAGINA, E. I. Pathogenic effect of enterotoxigenic *Escherichia coli* e *Escherichia coli* causing infantile diarrhea. **Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.**, v. 24, p. 221-236, 1979.

RAMOS, O. H. P.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. Snake venom metalloproteases — structure and function of catalytic and disintegrin domains. **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.**, v. 142, p. 328-346, 2006.

RAPPAPORT, F.; HENIG, E. Media for the isolation and differentiation of pathogenic *Escherichia coli* (serotypes O111 and O55). **J. Clin. Pathol.**, v. 5, p. 361-362, 1952.

RIBEIRO, L.A.; JORGE, M.T. Acidente por serpentes do gênero *Bothrops*: série de 3.139 casos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 30, p. 475–480, 1997.

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

ROCHA E SILVA, M.; BERALDO, W. T.; ROSENFELD, G. Bradykinin, a hypotensive and a smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venom and by trypsin. **Am. J. Physiol.**, v. 156, p. 261-270, 1949.

RODRIGUES, J.; SCALETSKY, I. C. A.; CAMPOS, L. C.; GOMES, T. A. T.; 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.

ROTHBAUM, R.; McADAMS, A. J.; GIANELLA, R.; PARTIN, J. C. A clinicopathologic study of enterocyte-adherent *Escherichia coli*: a cause of protracted diarrhea in infants. **Gastroenterology**, v. 83, p. 441-454, 1982.

RUSSEL, F. E. **Snake Venom Poisoning**. Philadelphia: J. P. Lippincott, 1980. 526 p.

SAMY, R. P.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; STILES, B. G.; GIRISH, K. S.; SWAMY, S. N.; HEMSHEKHAR, M.; TAN, K. S.; ROWAN, E. G.; SETHI, G.; CHOW, V. T. K. Snake venom phospholipases A₂: a novel tool against bacterial diseases. **Current Med. Chem.**, v. 19, p. 6150-6162, 2012.

SANTORO, M. L.; SANO-MARTINS, I. S.; FAN, H. W.; CARDOSO, J. L.; THEAKSTON, R. D.; WARRELL, D. A.; BUTANTAN INSTITUTE ANTIVENOM STUDY GROUP. Haematological evaluation of patients bitten by the jararaca, *Bothrops jararaca*, in Brazil. **Toxicon**, v. 51, p. 1440-1448, 2008.

SCALETISKY, I. C. A.; PEDROSO, M. Z.; OLIVA, C. A. G.; CARVALHO, R. L. B.; MORAIS, M. B. D.; FAGUNDES-NETO, U. A. A localized adherence-like pattern as a second pattern of adherence of classic enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2

cells that is associated with infantile diarrhea. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 3410-3415, 1999.

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

SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1761, p. 1246-1259, 2006.

SCHAUDER, S.; KEVAN, S.; SURETTE, M. G.; BASSLER, B. L. The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum sensing signal molecule. **Mol. Microbiol.**, v. 41, p. 463-476, 2001.

SEARS, H. J.; BROWNLEE, I.; UCHIYAMA, J. K. Persistence of individual strains of *Escherichia coli* in the intestinal tract of man. **J. Bacteriol.**, v. 59, p. 293-301, 1949.

SERRANO, S. M. T.; HAGIWARA, Y.; MURAYAMA, N.; HIGUCHI, S.; MENTELE, R.; SAMPAIO, C. A. M.; CAMARGO, A. C. M.; FINK, E. Purification and characterization of a kinin-releasing and fibrinogen-clotting serine proteinase (KN-BJ) from the venom of *Bothrops jararaca*, and molecular cloning and sequence analysis of its cDNA. **Eur. J. Biochem.**, v. 251, p. 845–853, 1998.

SIRCILI, M. P.; WALTERS, L. R.; TRABULSI, L. R.; SPERANDIO, V. Modulation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) virulence by quorum sensing. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 2329-2337, 2004.

SIX, D. A.; DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization, **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1488, p. 1-19, 2000.

SPERANDIO, V.; MELLIES, J. L.; NGUYEN, W.; SHIN, S.; KAPER, J. B. Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. **PNAS**, v. 96, p. 15196-15201, 1999.

SOUSA, L. F.; NICOLAU, C. A.; PEIXOTO, P. S.; BERNARDONI, J. L.; OLIVEIRA, S. S.; PORTES-JUNIOR, J. A.; MOURÃO, R. H. V.; LIMA-DOS-SANTOS, I.; SANO-MARTINS, I. S.; CHALKIDIS, H. M.; VALENTE, R. H.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Comparison of Phylogeny, Venom Composition and Neutralization by Antivenom in Diverse Species of *Bothrops* complex. **PloS Negl. Trop. Dis.**, v. 7, n. 9, e2442. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.002442>>. Acesso em 24 jun. 2015.

SUGIKI, M.; MARUYAMA, M.; YOSHIDA, E.; MIHARA, H.; KAMIGUTI, A. S.; THEAKSTON, D. G. Enhancement of plasma fibrinolysis in vitro by jararhagin, the main haemorrhagic metalloproteinase in *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon**, v. 33, n. 12, p. 1605-1617, 1995.

SURETTE, M. G.; BASSLER, B. L. Chemical communication among bacteria. **PNAS**, v. 100, p. 14549-14554, 2003.

TAN, N. H.; FUNG, S. Y. Snake Venom L-Amino Acid Oxidases and Their Potential Biomedical Applications. **Malays. J. Biochem. Mol. Biol.**, v. 16, n. 1, p. 1-10, 2008.

TASHIMA, A.K.; ZELANIS, A.; KITANO, E. S.; IANZER, D.; MELO, R. L.; RIOLI, V.; SANT'ANNA, S. S.; SCHENBERG, A. C.; CAMARGO, A. C.; SERRANO, S. M. Peptidomics of three *Bothrops* snake venoms: insights into the molecular diversification of proteomes and peptidomes. **Mol. Cell Proteomics**, v. 11, n. 11, p. 1245-1262, 2012.

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

TRABULSI, L. R.; TOLEDO, M. R. F. *Escherichia*. In: TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1989. cap. 13, p. 149-155.

VARANDA, E.A.; GIANNINI, M.J.M. Bioquímica de venenos de serpentes. In: BARRAVIERA, B. (Ed.), **Venenos: aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos**. Rio de Janeiro: EPUB, 1999. p. 205–223.

VIEIRA, M. A. M.; ANDRADE, J. R. C.; TRABULSI, L. R.; ROSA, A. C. P.; DIAS, A. M. G.; RAMOS, S. R.; FRANKEL, G.; GOMES, T. A. Phenotypic and genotypic characteristics of *Escherichia coli* strains of non-enteropathogenic *Escherichia 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.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO Media Centre. **Diarrhoeal disease**. Fact sheet N°330. Geneva, 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/>> Acesso em: 11 jun. 2015.

YAMADA, D.; SHIN, Y.; MORITA, T. Nucleotide sequence of a cDNA encoding a common precursor of disintegrin flavostatin and hemorrhagic factor HR2a from the venom of *Trimeresurus flavoridis*. **FEBS Lett.**, v. 451, p. 299-302, 1999.

ZAMUNER, S. R.; CRUZ-HOFLING, M. A.; CORRADO, A. P.; HYSLOP, S.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian *Bothrops* venoms and their neutralization by commercial antivenom. **Toxicon**, v. 44, p. 259-271, 2004.