NATÁLIA CRISTINA DE FREITAS

**Fímbrias Pil em *Escherichia coli* enteropatogênica atípica:
caracterização e investigação do papel
de PilS e PilV na adesão bacteriana**

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

São Paulo
2012

NATÁLIA CRISTINA DE FREITAS

**Fímbrias Pil em *Escherichia coli* enteropatogênica atípica:
caracterização e investigação do papel
de PilS e PilV na adesão bacteriana**

Dissertação apresentada ao Departamento de
Parasitologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

Área de Concentração:
Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientadora: Profa. Dra. Roxane Maria Fontes
Piazza

Versão Original

São Paulo
2012

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

© reprodução total

Freitas, Natália Cristina de.

Fímbrias Pil em *Escherichia coli* enteropatogênica atípica: caracterização e investigação do papel de PilS e PilV na adesão bacteriana / Natália Cristina de Freitas. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profa. Dra. Roxane Maria Fontes Piazza.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Versão do título para o inglês: Type IV pilus in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization and investigation of PilS and PilV in bacterial adhesion role.

1. *Escherichia coli* 2. Diarreia 3. Fímbrias do Tipo IV 4. Adesão bacteriana 5. Fatores de virulência 6. Fímbria Pil I. Piazza, Profa. Dra. Roxane Maria Fontes II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB070/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Natália Cristina de Freitas.

Título da Dissertação: Fímbrias Pil em *Escherichia coli* enteropatogênica atípica: caracterização e investigação do papel de PilS e PilV na adesão bacteriana.

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

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

☐ **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) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **006** nas fls. **82** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Roxane Maria Fontes Piazza, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Fimbrias do tipo IV em eschericia coli enteropatogênica atípica: caracterização e investigação do possível papel de Pils e PilV na interação com células epiteliais in vitro** do qual participou(aram) o(s) alunos **Nátalia Cristina de Freitas**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **15.03.2010**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 15 de março de 2010.

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

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

Dedico este trabalho às pessoas que mais amo:

*Ao meu querido pai, um homem batalhador e ao mesmo tempo
presente em todos os momentos de minha vida,
sempre me apoiando em qualquer decisão.
Você é meu herói Cacá!*

*À minha estimada mãe, exemplo de mulher forte e dedicada à
família, demonstrando sempre muito amor e paciência.
Sol, você é o alicerce da casa!*

*Ao meu adorado irmão, que sempre foi meu companheiro
nos momentos divertidos, desde a infância até hoje.
Tenho muita admiração por você Cé!*

*Ao meu amado e melhor amigo, Felipe, que sempre esteve
ao meu lado me apoiando e me dando força.
Seu amor e compreensão foram fundamentais
para realização deste trabalho.
Simplesmente TE AMO!*

*À minha família, pelo constante apoio, amizade e incentivo.
Sem vocês ao meu lado, nada disso teria sentido.*

*Aos meus amigos de estimação July, Belinha, Frederico e Jonas,
por fazerem parte da minha vida.*

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pelas oportunidades de crescimento pessoal e profissional, pelas graças diárias, e por ter colocado em meu caminho pessoas tão especiais.

À minha orientadora Dra. Roxane Maria Fontes Piazza, por ter me acolhido em seu laboratório e ter confiado em mim durante todos esses anos. Só tenho a agradecer todo o apoio e incentivo, e principalmente a amizade, o carinho e a atenção que tornaram essa relação tão harmoniosa.

Ao Dr. Waldir Pereira Elias Jr. por todo o apoio e sugestões que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Às pesquisadoras Dra. Denise Horton, Dra. Márcia Franzolin e Dra. Rita Ruiz pelo apoio e incentivo, sempre contribuindo de maneira positiva para minha formação.

À Dra. Karina Araújo Aires, pela contribuição inicial e auxílio na elaboração deste trabalho.

À Dra. Julia Mítico Nara pelos ensinamentos em biologia molecular, fundamentais para o início da minha formação acadêmica e para o desenvolvimento deste trabalho.

À Ms. Christiane Yumi Ozaki, pelos preciosos ensinamentos. Agradeço imensamente pela amizade, paciência e companheirismo. Mesmo de longe sempre esteve presente, obrigada por tudo Xris!

À Dra. Cristiane Santos de Souza, pelos ensinamentos e experiências repassadas. Obrigada pelas contribuições na execução deste trabalho, e acima de tudo pela amizade e confiança.

Ao Dr. Sérgio Paulo Dejato Rocha pelas constantes aulas de biologia molecular e ensinamentos valiosos. Obrigada por sempre estar disposto a me ajudar na condução dos experimentos.

À Dra. Cecília Mari Abe, pela constante colaboração técnica, a qual foi essencial para o desenvolvimento e a conclusão deste trabalho. Obrigada pela atenção e disponibilidade em me ajudar sempre que precisei.

Às queridas amigas Andressa, Cinthya, Gabrielle e Keyde, que sempre estiveram ao meu lado contribuindo intensamente para a realização deste trabalho. Pessoas tão diferentes e tão complementares, grandes exemplos de companheirismo, cumplicidade, senso de humor e acima de tudo amizade.

À querida amiga de faculdade Alessandra Yassui, a qual me trouxe ao “fantástico mundo da ciência”. Agradeço imensamente à você por me apresentar um universo completamente desconhecido por mim, o qual me apaixonei!

Aos queridos companheiros de laboratório Andressa, Cristiane, Leticia, Christiane, Dani Bastos, Dani Luz, Dani Munhoz, Caio, Anderson, Raquel, Julia, Afonso, Claudia, Francielli, Sérgio, Fernanda, Camila, Livia, Keyde, Aline, Thiago, Gabrielle, Tatiane, Rafael, Roseli, Cinthya, Rafael, Cristiane Moda, Hebert, Renato, Fernanda, Juliana, Vanessa, Ludmila, Demétria, Denise, Lígia, agradeço pelos momentos científicos e sugestões construtivas, e acima de tudo pela amizade e convivência harmoniosa. Sempre vou me lembrar das conversas informais e dos “bons drink” compartilhados nos momentos de descontração!

Aos ex-companheiros de laboratório Ana Cláudia, Dani Bastos, Diego, Franciely, Márcio, Marina, Silvio e Tatiane, os quais estiveram presentes no início deste estudo. Obrigada pela amizade, apoio e incentivo. Vocês deixaram saudades!

Aos funcionários do Laboratório de Bacteriologia: Claudia, Demétria, Juliana, Matilde, Thaís, Regina, Juscelino, Suzana, Eliana, Dona Maria, Dona Sebastiana, Edson, Reginaldo que gentilmente contribuíram para a realização deste trabalho. Obrigada pela amizade conquistada durante esse período de convivência.

À todos os pesquisadores, funcionários e alunos do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Às funcionárias da secretaria de pós-graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro Sílvia Camargo, Angela Casemiro e Wilma Souza pela atenção prestada sempre que precisei.

Aos admiráveis professores do departamento de Parasitologia Beatriz Stolf, Cláudio Marinho e Sílvia Boscardin que contribuíram intensamente para minha formação acadêmica e científica.

Aos meus amados pais, Carlos e Solange, por me apoiarem em todas as minhas decisões. Mesmo sem compreender o que eu faço, sempre me incentivaram! Agradeço pelo carinho e amor incondicional.

Ao meu companheiro de longa data Felipe, obrigada pelo constante apoio, paciência e compreensão. Não tenho nem palavras para agradecer o quanto você significa para mim. Sua amizade e carinho foram essenciais.

Ao meu querido irmão César, pela constante torcida e discussões construtivas. Obrigada pela assistência prestada em todos os momentos de desespero! Você foi imprescindível.

À minha querida avó, Dona Nega, pela constante torcida e paciência. Obrigada pelos deliciosos bolos que adoçaram as tardes na qual passei estudando e escrevendo!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida e apoio financeiro.

Muito obrigada!

Este trabalho foi desenvolvido dentro do Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro, sendo as etapas experimentais realizadas no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

*“As espécies que sobreviverão ao tempo,
não são as mais inteligentes nem as mais fortes,
mas aquelas com maior capacidade de
adaptação ao meio”*

Charles Darwin

RESUMO

FREITAS, N. C. **Fímbrias Pil em *Escherichia coli* enteropatogênica atípica**: caracterização e investigação do papel de PilS e PilV na adesão bacteriana. 2012. 119 f. Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Adesinas fimbriais e afimbriais estão envolvidas na virulência de bactérias patogênicas, dentre elas, as fímbrias do tipo IV estão associadas à adesão às células epiteliais e formação de microcolônias, autoagregação, formação de biofilme, twitching-motility e conjugação. Como em *Escherichia coli* enteropatogênica atípica (aEPEC) não há expressão da fímbria *bundle-forming pilus* (BFP), a qual é responsável pelo padrão de adesão localizado das EPEC típicas (tEPEC) após 3 horas de contato com células epiteliais *in vitro*, outras fímbrias podem participar da interação bactéria-célula. O objetivo do presente estudo consistiu na caracterização da fímbria Pil e investigação de seu papel na interação dos isolados de aEPEC BA 558, BA 956 e BA 1244 com células epiteliais HEp-2. Por PCR e RT-PCR foram investigadas a presença e a funcionalidade dos genes do operon Pil nesses isolados. Os resultados de caracterização molecular demonstraram que os genes *pilL*, *pilM*, *pilN*, *pilQ*, *pilR*, *pilS*, *pilT*, *pilU* e *pilV* são transcritos somente nos isolados BA 558 e BA 956. Posteriormente, os genes *pilS* e *pilV* foram clonados em vetor de expressão para obtenção das proteínas Pil recombinantes e produção de anticorpos policlonais. A análise qualitativa dos ensaios de inibição da adesão utilizando concomitantemente os soros de coelho anti-PilS e anti-PilV demonstraram que o isolado BA 558, que apresenta o padrão localizado em 6 horas, passou a apresentar o fenótipo localizado-*like*. Outras funções desempenhadas pela fímbria do tipo IV, como formação de biofilme e autoagregação, também foram pesquisadas nos isolados deste estudo. No entanto, as amostras BA 558 e BA 956 não foram capazes de formar biofilme e autoagregar. Em conjunto, esses resultados nos permitem concluir que o operon Pil está funcional somente nos isolados BA 558 e BA 956, e a expressão da fímbria Pil nessas amostras não está relacionada à ocorrência de formação de biofilme e autoagregação, porém a proteína estrutural fimbrial PilS juntamente com a adesina PilV podem exercer uma função acessória importante na interação do isolado BA 558 às células epiteliais cultivadas *in vitro*.

Palavras-chave: *E. coli*. Diarreia. Fatores de virulência. Fímbrias Pil. Adesão bacteriana.

ABSTRACT

FREITAS, N. C. **Type IV pilus in atypical enteropathogenic *Escherichia coli***: characterization and investigation of PilS and PilV in bacterial adhesion role. 2012. 119 p. Masters thesis (Biology of Pathogen-Host Interaction) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Afimbrial and fimbrial adhesins are involved in the virulence of pathogenic bacteria, among these the type IV fimbriae are associated with adherence to epithelial cells and microcolonies formation, autoaggregation, biofilm formation, twitching-motility and conjugation. *Bundle-forming pilus* (BFP) is responsible for typical enteropathogenic *Escherichia coli* (tEPEC) localized adhesion pattern to epithelial cells in 3 h *in vitro*. The lack of BFP expression by atypical EPEC (aEPEC) suggests other forms of involvement of fimbriae in the bacteria-host cell interaction. The aim of this study was the characterization of the fimbriae Pil and investigation of its role in the interaction of isolates aEPEC BA 558, BA 956 and BA 1244 with HEp-2 epithelial cells. By PCR and RT-PCR we investigated the presence and functionality of *pil* genes operon in these strains. The results showed that molecular characterization of genes *pilL*, *pilM*, *pilN*, *pilQ*, *pilR*, *pilS*, *pilT*, *pilU* and *pilV* were transcribed only in BA 558 and BA 956 isolates. Subsequently, *pilS* and *pilV* genes were cloned into expression vector in order to obtain recombinant proteins and production of polyclonal antibodies. Qualitative analysis of the adherence inhibition assays using simultaneously rabbit anti-PilS and anti-PilV sera showed that the 6-h localized adherence pattern displayed by the BA 558 isolate changed to the localized-*like* adhesion phenotype. Other functions performed by type IV fimbriae, such as biofilm formation and autoaggregation, were also investigated. However, the BA 558 and BA 956 isolates were unable to form biofilm and autoaggregates. Together, these results allow us to conclude that the Pil operon is functional only in the BA 558 and BA 956 isolates and that the expression of Pil fimbriae in aEPEC is not related to biofilm formation and autoaggregation but that the fimbrial structure of PilS protein together with PilV adhesin seem to play an important accessory function in the interaction between the BA 558 isolate and epithelial cells *in vitro*.

Key words: *E. coli*. Diarrhea. Virulence factors. Pil fimbriae. Bacterial adhesion.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema ilustrativo dos principais fatores de virulência das categorias de <i>Escherichia coli</i> diarreiogênicas	26
Figura 2 – Representação esquemática dos quatro estágios da patogênese de EPEC	30
Figura 3 – Representação esquemática dos fatores de virulência de EPEC, codificados em LEE e no plasmídeo EAF	31
Figura 4 – Padrões de aderência de <i>E. coli</i> diarreiogênicas em células HEp-2	33
Figura 5 – Representação esquemática da localização das proteínas envolvidas na biogênese da fímbria Pil de <i>Salmonella enterica</i>	39
Figura 6 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% dos fragmentos amplificados em reações de PCR para detecção do gene <i>pilS</i> em isolados de aEPEC	62
Figura 7 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% dos fragmentos amplificados em reações de PCR para detecção do gene <i>pilV</i> em isolados de aEPEC	63
Figura 8 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% dos fragmentos amplificados em reações de PCR para detecção da presença dos genes do operon Pil no isolado C1096	64
Figura 9 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% dos fragmentos amplificados em reações de PCR para detecção da presença dos genes do operon Pil no isolado BA 558	64
Figura 10 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% dos fragmentos amplificados em reações de PCR para detecção da presença dos genes do operon Pil no isolado BA 956	65
Figura 11 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% dos fragmentos amplificados em reações de PCR para detecção da presença dos genes do operon Pil no isolado BA 1244 ...	65
Figura 12 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% dos fragmentos amplificados em reações de PCR após a transcrição dos genes do operon Pil do isolado C1096	66
Figura 13 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% dos fragmentos amplificados em reações de PCR após a transcrição dos genes do operon Pil do isolado BA 558	67
Figura 14 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% dos fragmentos amplificados em reações de PCR após a transcrição dos genes do operon Pil do isolado BA 956	67
Figura 15 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% dos fragmentos amplificados em reações de PCR após a transcrição dos genes do operon Pil do isolado BA 1244	68

Figura 16 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% dos fragmentos amplificados em reações de PCR após a transcrição do gene <i>rpoA</i>	69
Figura 17 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% dos fragmentos amplificados em reação de PCR do gene <i>pilS</i> para confirmação dos clones pNaS	70
Figura 18 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% dos fragmentos amplificados em reação de PCR do gene <i>pilV</i> para confirmação dos clones pNaV	70
Figura 19 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% da digestão dos clones pNaS e pNaV com as enzimas BamHI e HindIII	71
Figura 20 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% dos fragmentos amplificados em reação de PCR do gene <i>pilS</i> para confirmação dos clones p558S	75
Figura 21 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% dos fragmentos amplificados em reação de PCR do gene <i>pilV</i> para confirmação dos clones p558V	75
Figura 22 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% da digestão dos clones p558S com as enzimas BamHI e HindIII	76
Figura 23 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% da digestão dos clones p558V com as enzimas BamHI e HindIII	77
Figura 24 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida-SDS a 12% do ensaio de indução de células <i>E. coli</i> BL21 (DE3) transformadas com o clone p558S	78
Figura 25 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida-SDS a 12% do ensaio de indução de células <i>E. coli</i> BL21 (DE3) transformadas com o clone p558V	79
Figura 26 – Imunodeteção com o anticorpo anti-His do ensaio de indução de células <i>E. coli</i> BL21 (DE3) transformadas com o clone p558S	80
Figura 27 – Imunodeteção com o anticorpo anti-His do ensaio de indução de células <i>E. coli</i> BL21 (DE3) transformadas com o clone p558V	80
Figura 28 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida-SDS a 12% das etapas de purificação e renaturação da proteína PilS, a partir da fração insolúvel	81
Figura 29 – Imunodeteção com o anticorpo anti-His das etapas de purificação e renaturação da proteína PilS, a partir da fração insolúvel	82
Figura 30 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida-SDS a 12% das etapas de purificação e renaturação da proteína PilV, a partir da fração insolúvel	83
Figura 31 – Imunodeteção com o anticorpo anti-His das etapas de purificação e renaturação da proteína PilV, a partir da fração insolúvel	84

Figura 32 – Limite de detecção do anticorpo policlonal de coelho anti-PilS por ensaio de ELISA indireto	85
Figura 33 – Limite de detecção do anticorpo policlonal de coelho anti-PilV por ensaio de ELISA indireto	86
Figura 34 – Imunodeteção da proteína PilS utilizando soro de coelho anti-PilS não-adsorvido e adsorvido	87
Figura 35 – Imunodeteção da proteína PilV utilizando soro de coelho anti-PilV não-adsorvido e adsorvido	87
Figura 36 – Comparação entre os padrões de adesão e inibição da adesão da amostra BA 558 após 6 horas de incubação com células HEp-2	89
Figura 37 – Comparação entre os padrões de adesão e inibição da adesão da amostra BA 956 após 6 horas de incubação com células HEp-2	90
Figura 38 – Comparação entre os padrões de adesão e inibição da adesão da amostra C1096 após 6 horas de incubação com células HEp-2	91
Figura 39 – Capacidade de formação e inibição de biofilme em poliestireno apresentada pelas amostras de aEPEC	93
Figura 40 – Capacidade de autoagregação das amostras de aEPEC	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais características que definem tEPEC e aEPEC	29
Tabela 2 – Principais características das amostras de aEPEC utilizadas neste estudo	43
Tabela 3 – Iniciadores empregados nas reações de PCR e RT-PCR	45
Tabela 4 – Genes transcritos do operon Pil encontrados nos isolados de aEPEC	68
Tabela 5 – Alinhamento entre as sequências do gene <i>pilS</i> e dos insertos sequenciados a partir do clone pNaS_558	72
Tabela 6 – Alinhamento entre as sequências do gene <i>pilV</i> e dos insertos sequenciados a partir do clone pNaV_558	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Adesão agregativa
AAF	Fímbria de Aderência Agregativa
AD	Adesão difusa
aEAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa atípica
aEPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica atípica
AL	Adesão localizada
ALL	Adesão localizada-like
ATV	Associação Tripsina Versene
BFP	<i>Bundle-forming pilus</i>
BSA	Soro Albumina Bovina
cDNA	DNA complementar
CFA	Fatores Antigênicos de Colonização
CH	Colite Hemorrágica
DAB	3,3-Diaminobenzidina
DAEC	<i>Escherichia coli</i> que adere difusamente às células epiteliais
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
dCTP	Desoxicitidina trifosfato
DEC	<i>Escherichia coli</i> diarreiogênica
dGTP	Desoxiguanosina trifosfato
DMEM	Meio Essencial Mínimo de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfato
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxitimidina trifosfato
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EAF	EPEC adherence factor
ECP	<i>E. coli</i> common pilus
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasora
ELISA	Ensaio imunoenzimático de fase sólida
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
EPS	Exopolissacarídeo
Esp	EPEC secreted proteins (proteínas secretadas por EPEC)
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
F	iniciador Forward
FAS	Fluorescent-Actin Staining
IgG	Imunoglobulina G
IND	Indeterminado
IPTG	Isopropil β -D-1-Tiogalactopiranosídeo
LB/LBA	caldo ou ágar Lúria Bertani
LEE	Locus of enterocyte effacement
Ler	LEE encoded regulator

Lesão A/E	Lesão attaching and effacing (adesão e apagamento)
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Toxina Termo-lábil
Map	Mitochondrial-associated protein
NA	Não aderente
NCBI	National Center of Biotechnology Information
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPD	O-fenilenodiamina
ORF	Open Reading Frames (região de leitura aberta)
PBS	Solução Salina tamponada com Fosfato
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
Per	Plasmid encoded regulator
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfato
R	iniciador Reverse
RNA	Ácido Ribonucléico
RT-PCR	Transcriptase Reversa da Reação em Cadeia da Polimerase
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
SHU	Síndrome Hemolítica-Urêmica
SST3	Sistema de Secreção do Tipo Três
ST	Toxina Termo-estável
STEC	<i>Escherichia coli</i> produtora da toxina de Shiga
Stx	Toxina de Shiga
TAE	Tampão tris-acetato com ácido etilenodiaminotetracético
tEAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa típica
tEPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica típica
Tir	Translocated intimin receptor
TR	enzima Transcriptase Reversa
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UV	luz ultravioleta

UNIDADES DE MEDIDA

°C	Grau Celsius	mg	Miligrama
µg	Micrograma	mL	Mililitro
µL	Microlitro	mM	Milimolar
µm	Micrômetro	N	Normal
µM	Micromolar	ng	Nanograma
Da	Dalton	nm	Nanômetro
g	Força gravitacional	pb	Pares de base
Kb	Kilo base	pmol	Picomol
kDa	Kilodalton	psi	Libra força por polegada quadrada
kV	Kilo Volts	rpm	Rotações por minuto
M	Molar	U	Unidade
mA	Miliampère	V	Volts
MDa	Mega Dalton	X	Veze

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 <i>Escherichia coli</i>	22
1.2 <i>Escherichia coli</i> diarreio gênica	23
1.3 <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica	27
1.3.1 Histórico	27
1.3.2 Epidemiologia	27
1.3.3 Fatores de virulência e patogenicidade	28
1.3.4 Mecanismos de adesão	32
1.3.5 Fímbrias: potenciais fatores de virulência	34
1.3.6 Fímbrias do Tipo IV	37
1.3.7 Fímbrias Pil	38
2 OBJETIVO	41
3 MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1 Meios de cultura e soluções	42
3.2 Amostras bacterianas	42
3.3 Desenho dos iniciadores para amplificação dos genes	44
3.4 Extração de DNA bacteriano através de lise por fervura	44
3.5 Detecção das sequências de DNA por Reação em Cadeia da Polimerase	44
3.6 Extração de RNA bacteriano e síntese de cDNA	46
3.7 Análise da transcrição dos genes do operon Pil	47
3.8 Clonagem dos genes <i>pilS</i> e <i>pilV</i> em vetor pGEM-T Easy	47
3.8.1 Amplificação por PCR dos genes <i>pilS</i> e <i>pilV</i> e reação de adição da Adenina	48
3.8.2 Ligação dos insertos em vetor de clonagem pGEMT-Easy	48
3.8.3 Transformação bacteriana por choque térmico	49
3.8.4 Extração de DNA plasmidial	49
3.8.5 Análise de restrição e obtenção dos fragmentos <i>pilS</i> e <i>pilV</i>	50
3.9 Sub-clonagem dos genes <i>pilS</i> e <i>pilV</i> em vetor de expressão pET28a	50
3.9.1 Ligação dos insertos em vetor de expressão pET28a	50

3.9.2 Análise dos clones obtidos	51
3.10 Sequenciamento de DNA	51
3.11 Transformação em células BL21 (DE3)	51
3.12 Expressão das proteínas recombinantes	52
3.12.1 Obtenção da fração insolúvel das proteínas PilS e PilV	52
3.13 Cromatografia de afinidade ao Níquel	53
3.13.1 Renaturação das proteínas PilS e PilV após purificação	53
3.14 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio	54
3.15 Western-blot	54
3.16 Imunodeteção com anticorpo anti-His	55
3.17 Imunização de animais para obtenção de anticorpos policlonais anti-PilS e anti-PilV	55
3.17.1 Titulação dos anticorpos policlonais anti-PilS e anti-PilV	56
3.18 Imunodeteção das proteínas recombinantes com soro anti-PilS e anti-PilV	56
3.19 Adsorção de soro imune	57
3.20 Manutenção das linhagens de células HEp-2	58
3.20.1 Ensaio de interação bacteriana com células epiteliais in vitro	58
3.20.2 Ensaio de inibição da adesão bacteriana às células epiteliais in vitro	59
3.21 Ensaio de formação de biofilme em superfície abiótica	59
3.21.1 Ensaio de inibição da formação de biofilme em superfície abiótica	60
3.22 Ensaio de autoagregação	60
4 RESULTADOS	62
4.1 Pesquisa de genes do operon Pil em isolados de aEPEC	62
4.2 Análise de transcrição dos genes do operon Pil em isolados de aEPEC	66
4.3 Clonagem dos fragmentos pilS e pilV em vetor pGEM-T Easy	69
4.4 Clonagem dos fragmentos pilS e pilV em vetor de expressão pET28a	74
4.5 Expressão e purificação das proteínas PilS e PilV	78
4.6 Obtenção de anticorpos policlonais anti-PilS e anti-PilV	84
4.6.1 Titulação dos anticorpos anti-PilS e anti-PilV	84
4.7 Detecção das proteínas recombinantes por immunoblotting	86
4.8 Interação bacteriana com células HEp-2	88

4.9 Formação de biofilme à superfície abiótica	92
4.10 Interação bacteriana por mecanismo de autoagregação	93
5 DISCUSSÃO	95
6 CONCLUSÃO	107
REFERÊNCIAS	108

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli compreende um grupo de micro-organismos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, os quais são classificados como bacilos gram-negativos, anaeróbios facultativos e que colonizam o trato gastrointestinal de humanos e animais de sangue quente (DRASAR; HILL, 1974). Alguns estudos demonstram que a composição de *E. coli* no intestino humano geralmente consiste de 3 ou 4 linhagens, sendo que uma delas é denominada residente, permanecendo no organismo do hospedeiro por meses, e as outras são transitórias, e duram algumas semanas (SEARS; BROWNLEE; UCHIYAMA, 1950).

Geralmente as *E. coli* permanecem inofensivas confinadas ao lúmen intestinal, entretanto, em situações adversas onde o hospedeiro encontra-se debilitado, imunodeprimido ou quando barreiras intestinais são violadas, cepas não patogênicas podem causar infecção. Além disso, indivíduos saudáveis também podem ser susceptíveis à infecção por *E. coli*, a qual nos últimos anos vem evoluindo sua capacidade de causar um amplo espectro de doenças em humanos (NATARO; KAPER, 1998).

E. coli é sem dúvida uma das espécies bacterianas mais versáteis, devido a sua incrível capacidade de se adaptar a diferentes ambientes e, também por apresentar características peculiares quanto aos mecanismos de virulência e patogenicidade. Algumas variedades de *E. coli* estão diretamente associadas à doenças infecciosas, podendo causar no homem infecções intestinais e extra-intestinais. Como resultado dessas ações patogênicas, o indivíduo pode desencadear síndromes clínicas como infecção do trato urinário, meningite de recém-nascido, sepse e diarreia (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

A diarreia, manifestação comum de doenças infecciosas intestinais, é causada por uma ampla gama de patógenos, incluindo bactérias, vírus e protozoários. Os agentes infecciosos bacterianos frequentemente isolados em surtos de diarreia são *E. coli*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni* e *Vibrio cholerae*. O modo de transmissão da maioria desses patógenos ocorre via fecal-oral, e a alta incidência de surtos diarreicos está diretamente associada a fatores sócio-ambientais, como a falta de saneamento básico, condições sanitárias precárias, além da contaminação de água e a higiene inadequada dos alimentos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

Dados recentes da Organização Mundial da Saúde revelam que a diarreia ainda é a segunda causa de morte mais comum entre crianças menores de cinco anos de idade em países em desenvolvimento, ficando atrás apenas da pneumonia. Em conjunto, essas duas doenças são responsáveis por 40% das mortes infantis em todo o mundo (WHO, 2009). No Brasil, principalmente nas regiões norte e nordeste, a doença diarreica representa grande causa de morbidade e mortalidade infantil, refletindo as condições sócio-econômicas de nossa população (GUERRANT et al., 1983).

1.2 *Escherichia coli* diarreiogênica

Amostras de *E. coli* capazes de causar infecções entéricas são conhecidas como *Escherichia coli* diarreiogênicas (DEC). Recentemente foi estabelecida uma classificação que divide esse patógeno em seis categorias ou patotipos, considerando-se seus mecanismos de virulência específicos, síndromes clínicas e aspectos epidemiológicos (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

A partir desses critérios, as DEC são classificadas em: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* produtora da toxina de Shiga (STEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), e *E. coli* que adere difusamente às células epiteliais (DAEC) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; NATARO; KAPER, 1998).

Essa classificação é capaz de distinguir grupos específicos de DEC, mas vários estudos vêm demonstrando que alguns patotipos possuem amostras com diferentes perfis de virulência. Assim, as EPEC e as EAEC são subdivididas em típicas e atípicas (HARRINGTON et al., 2006; KAPER, 1996), e as STEC contém uma subcategoria conhecida como *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). As bactérias pertencentes a cada uma dessas categorias causam diarreia por mecanismos distintos, afetam diferentes grupos populacionais e expressam diferentes fatores de virulência (NATARO; KAPER, 1998).

ETEC é um importante patógeno causador da diarreia aguda, que acomete crianças menores de cinco anos de idade em países em desenvolvimento. Além disso, também é considerado o principal agente etiológico da chamada “diarreia dos viajantes”, que acomete turistas provenientes de países desenvolvidos, que visitam áreas endêmicas (QADRI et al., 2005; WENNERAS et al., 1999). Isolados desse patotipo colonizam o intestino delgado através de estruturas adesivas denominadas Fatores Antigênicos de Colonização (CFA), que

juntamente com as enterotoxinas causam um desbalanço eletrolítico, levando o indivíduo a diarreia aguda aquosa (LEVINE et al., 1983). Essas toxinas são conhecidas como termo-lábeis (LT) e termo-estáveis (ST), sendo que os isolados desta categoria podem produzir somente LT, ou ST, ou ambas. Essas toxinas diferem quanto à tolerância a temperatura, estrutura, mecanismo de ação e imunogenicidade. As enterotoxinas termo-estáveis podem ser divididas em duas classes: STa e STb, as quais diferem quanto à estrutura e mecanismos de ação. Já as enterotoxinas termo-lábeis são classificadas em LT I e LT II (NATARO; KAPER, 1998).

Amostras de EIEC podem causar diarreia aquosa, colite inflamatória e, ocasionalmente, disenteria em humanos. O principal mecanismo de ação dessas bactérias é caracterizado pela invasão da mucosa intestinal, seguida de fagocitose e lise do vacúolo endocítico, multiplicação intracelular, movimentação no citoplasma e passagem para as células adjacentes (NATARO; KAPER, 1998). A capacidade invasora de EIEC está associada à presença do plasmídeo pINV, com tamanho molecular de aproximadamente 140 Kb, que contém genes codificadores e reguladores da produção de proteínas associadas com a adesão, invasão e disseminação bacteriana intra e intercelularmente (SEARS; KAPER, 1996).

Isolados de DAEC são assim denominados devido ao padrão de adesão que apresentam quando colocados em contato com células epiteliais cultivadas *in vitro* (NATARO et al., 1987; SCALETSKY et al., 1984). As bactérias aderem-se de forma difusa sobre a superfície celular, e essa adesão pode ser mediada por duas estruturas adesivas, sendo a adesina fimbrial denominada F1845, codificada por genes cromossomais ou plasmidiais (BILGE et al., 1989), e a adesina afimbrial denominada AIDA-I, caracterizada como uma proteína de membrana externa codificada por genes plasmidiais (BENZ; SCHMIDT, 1992). A associação de DAEC com a diarreia é controversa, podendo estar associada ou não à diarreia em crianças maiores e menores de 12 meses, respectivamente (SCALETSKY et al., 2002).

EAEC é um patógeno importante que tem sido associado à diarreia aguda e persistente, acometendo principalmente crianças e idosos em países em desenvolvimento. Isolados dessa categoria formam agregados bacterianos que se aderem tanto à superfície celular quanto à superfície abiótica (lamínula de vidro), em um padrão denominado agregativo (NATARO et al., 1987). A diarreia causada pela EAEC se inicia com a adesão agregativa da bactéria à mucosa intestinal, mediada pelas fímbrias AAF (Fímbrias de Adesão Agregativa), seguido da produção de muco formando uma espessa camada de biofilme. Em

seguida ocorre a produção de toxinas desencadeando um processo inflamatório, o qual resulta em danos à mucosa intestinal (NATARO; KAPER, 1998).

As STEC causam desde diarreia leve até doenças severas, como colite hemorrágica (CH) e síndrome hemolítica urêmica (SHU). Isolados dessa categoria produzem as toxinas Stx 1 e Stx 2, as quais pertencem a uma família de potentes toxinas denominadas Shiga (NATARO; KAPER, 1998). As STEC possuem ainda uma subcategoria, denominada EHEC (*E. coli* enterohemorrágica), sendo que a principal diferença se dá pela capacidade das EHEC em produzirem uma lesão histopatológica, denominada *attaching and effacing* (lesão A/E), mecanismo o qual também é compartilhado pelas EPEC (NATARO; KAPER, 1998).

EPEC tem sido identificada como o principal agente etiológico da diarreia aguda e acometem não só adultos e indivíduos imunocomprometidos (GOMES et al., 2004), mas principalmente, crianças menores de cinco de anos de idade em países em desenvolvimento (NATARO; KAPER, 1998). Isolados desta categoria, assim como isolados de EHEC, são capazes de causar um efeito histopatológico característico em biópsias intestinais e em culturas celulares, conhecido como lesão A/E (MOON et al., 1983). Outros fatores de virulência importantes desta categoria serão descritos adiante.

Além dessas características individuais, as *E. coli* apresentam antígenos de superfície que possibilitam sua classificação em sorogrupos e sorotipos bem definidos. Assim, cada isolado passou a ser tipado pelo antígeno somático O, que corresponde à porção polissacarídica do lipopolissacarídeo da membrana externa (LPS), e o antígeno H, que corresponde às proteínas flagelares (KAUFFMANN, 1947). Vários estudos vêm demonstrando a participação de determinados sorotipos de *E. coli* em surtos de diarreia em crianças, ressaltando a importância da identificação desse micro-organismo através da caracterização dos seus antígenos de superfície. Atualmente são identificados mais de 180 sorogrupos O em *E. coli*, que podem ser subclassificados em mais de 60 sorotipos O:H, possibilitando mais de 10.000 combinações. Porém, o número de sorotipos relacionados à diarreia ainda é muito restrito (CAMPOS; FRANZOLIN; TRABULSI, 2004).

Devido à sua importância médica, o diagnóstico das DEC pode ser realizado por diferentes metodologias, como sorotipagem, teste de adesão em células HeLa ou Hep-2, teste de *Fluorescent-Actin Staining* (FAS) e técnicas de biologia molecular (CRAVIOTO; VASQUEZ, 1988; NATARO; KAPER, 1998).

Ensaio de adesão em células epiteliais cultivadas *in vitro* HEp-2 permitem caracterizar fenotipicamente certas categorias de DEC quanto ao padrão de adesão bacteriana à essas células, classificadas em adesão localizada (AL), adesão localizada-like (ALL), adesão difusa (AD) e adesão agregativa (AA) (CRAVIOTO et al., 1979; TORRES; ZHOU; KAPER, 2005). O teste de FAS também é uma alternativa de ensaio fenotípico amplamente utilizado em estudos epidemiológicos e pesquisa básica (KNUTTON et al., 1989). Ensaio moleculares permitem caracterizar genotipicamente os isolados de DEC, através da amplificação por PCR dos principais genes que codificam fatores de virulência específicos de cada categoria.

Para ilustrar as diferentes características das *E. coli*, na figura 1 encontram-se esquematizados os principais mecanismos de ação, os tipos de interação com células epiteliais *in vitro*, assim como os fatores de virulência específicos de cada uma das seis categorias de DEC.

Figura 1 – Esquema ilustrativo dos principais fatores de virulência das categorias de *Escherichia coli* diarréio-gênicas.

FONTE: Kaper, Nataro e Mobley (2004).

1.3 *Escherichia coli* enteropatogênica

1.3.1 Histórico

O termo *E. coli* enteropatogênica foi criado em 1955 por Erwin Neter para designar um grupo de cepas de *E. coli* associados à diarreia infantil, distinguindo-se assim das demais cepas encontradas em indivíduos normais ou em pacientes com processo de infecção extra-intestinal (NETER et al., 1955). No entanto, apesar da EPEC ser a primeira categoria de *E. coli* diarreiogênica a ser identificada, seu potencial patogênico só foi confirmado e amplamente aceito após estudos realizados com voluntários, onde cepas de EPEC foram ingeridas, confirmando-se os sintomas evidentes de diarreia (LEVINE et al., 1978).

Durante décadas, os mecanismos pelos quais as EPEC causavam diarreia ainda eram desconhecidos, e este patotipo só poderia ser identificado com base no sorotipo O:H. Em 1987, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconheceu doze sorogrupos de EPEC, denominados O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 e O148 (WHO, 1987), os quais também são conhecidos como sorogrupos clássicos de EPEC (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002).

Em 1995, durante o segundo Simpósio Internacional de EPEC, realizado em São Paulo, uma nova nomenclatura foi estabelecida definindo as EPEC em dois subgrupos: EPEC típica (tEPEC) e EPEC atípica (aEPEC). Essa classificação permitiu diferenciar isolados de tEPEC pela presença de um plasmídeo de alto peso molecular denominado *EPEC Adherence Factor* (pEAF), o qual estava ausente em isolados de aEPEC (KAPER, 1996). A partir da década de 90 inúmeros avanços fizeram com que a patogênese de EPEC fosse melhor compreendida, e seus principais mecanismos de virulência fossem elucidados.

1.3.2 Epidemiologia

Durante décadas, estudos sobre a epidemiologia da diarreia infecciosa demonstravam que tEPEC era o enteropatógeno mais prevalente em casos de diarreia envolvendo crianças menores de um ano de idade, principalmente crianças pobres de centros urbanos nos primeiros seis meses de vida (GOMES et al., 1989, 1991; NATARO; KAPER, 1998). Considerado um grave problema de saúde pública, os principais sintomas clínicos da doença

causada por EPEC são diarreia aquosa acompanhada de febre, mal-estar e vômitos (LEVINE, 1987), embora alguns casos de diarreia persistente também foram relatados (DONNENBERG, 1995; FAGUNDES-NETO, 1996; LEVINE; EDELMAN, 1984).

Até meados da década de 90, tEPEC era considerada o principal agente etiológico da diarreia infantil no Brasil (GOMES et al., 1991; ROSA et al., 1998; SCALETISKY et al., 1999; TOLEDO et al., 1983; TRABULSI et al., 1961, 1985) e em outros países em desenvolvimento, embora fosse rara em países desenvolvidos (NATARO; KAPER, 1998).

Nos últimos anos, com a introdução da subdivisão de EPEC nos grupos típica e atípica, houve uma frequente observação do predomínio da incidência de aEPEC no Brasil, e um declínio na incidência de tEPEC (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002). De fato, estudos epidemiológicos recentes demonstram que as aEPEC configuram um grupo de patógenos emergentes (ARAUJO et al., 2007; BUERIS et al., 2007; FRANZOLIN et al., 2005; HERNANDES et al., 2009; MORENO et al., 2010; ORLANDI et al., 2006; SCALETISKY et al., 2009; TRABULSI et al., 2002).

O aumento na incidência destes micro-organismos reforça a necessidade de mais estudos sobre sua epidemiologia, patogênese e papel nas diferentes formas de diarreia. Além disso, investigar aspectos como distribuição geográfica, reservatórios, faixa etária e fatores sócio-econômicos da população afetada por EPEC contribuem, de um modo geral, para o entendimento da interação patógeno-hospedeiro.

1.3.3 Fatores de virulência e patogenicidade

Conforme mencionado anteriormente, as EPEC são divididas em duas subcategorias: típica e atípica. Essa classificação baseia-se na presença ou ausência do plasmídeo EAF, respectivamente, e ausência dos genes *stx* que codificam as toxinas Shiga de STEC (KAPER, 1996). O plasmídeo EAF contém genes envolvidos na biogênese de uma adesina fimbrial denominada *bundle-forming pilus* (BFP), além da sequência genética referente ao fragmento sonda EAF e do operon *per* (*plasmid encoded regulator*), o qual codifica um complexo regulador de genes de virulência de EPEC (TOBE et al., 1999). O fragmento sonda EAF é críptico, sendo utilizado de forma complementar na identificação de EPEC (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002).

Porém, a melhor definição para diferenciar aEPEC e tEPEC é a de Trabulsi, Keller e Gomes (2002), os quais acrescentam à definição de Kaper (1996) a necessidade de se verificar a expressão de BFP, já que existem relatos de amostras de EPEC que não reagem com a sonda para a detecção do pEAF, mas expressam BFP, e de amostras que reagem com essa sonda genética, mas não expressam BFP (BORTOLINI et al., 1999; GHILARDI et al., 2003). Estudos recentes corroboram com essa definição, demonstrando que apenas cepas de tEPEC expressam BFP (ABE et al., 2009; HERNANDES et al., 2009; NARA et al., 2010).

BFP é considerada um importante fator de virulência das tEPEC, uma vez que essa fímbria é responsável pelo padrão de adesão localizado das bactérias às células epiteliais, além de promover e estabilizar a aderência bacteriana dentro das microcolônias. Classificada como uma fímbria do tipo IV, a biogênese de BFP é codificada por 14 genes, os quais compõem o operon *bfp* (GIRÓN; HO; SCHOOLNIK, 1991; STONE et al., 1996). Outros estudos também confirmam a importância de BFP na patogênese de tEPEC, demonstrando que além de promover a agregação bacteriana em microcolônias, essa fímbria também está envolvida com o evento de dispersão na mucosa intestinal. Além disso, uma amostra mutante em *bfpA* (gene que codifica a pilina da fímbria BFP) apresentou uma virulência 200 vezes inferior, quando comparada com a amostra protótipo de tEPEC E2348/69 (BIEBER et al., 1998).

Desta forma, as principais características que definem as tEPEC e aEPEC estão apresentadas, resumidamente, na tabela 1.

Tabela 1 – Principais características que definem tEPEC e aEPEC.

Características	EPEC típica	EPEC atípica
Lesão A/E	+	+
Genes <i>stx</i>	-	-
Sequência da sonda EAF	+	-
Gene <i>bfpA</i>	+	- / +
Expressão da fímbria BFP	+	-
Padrão de adesão	AL (3h)	AL (6h) / ALL / AA / AD / NA / IND

NOTA: AL = adesão localizada; ALL = adesão localizada-like; AA = adesão agregativa; AD = adesão difusa; NA = não aderente; IND = indeterminado.

FONTE: Adaptado de Hernandez et al. (2009).

O mecanismo central da patogênese de EPEC, assim como nas EHEC, é a lesão histopatológica denominada *attaching and effacing* (lesão A/E), a qual é caracterizada pela adesão da bactéria ao epitélio intestinal, desencadeando uma cascata de sinais transmembrânicos e intracelulares que levam à destruição das microvilosidades locais, e ao acúmulo de actina polimerizada e componentes do citoesqueleto no local de contato entre a célula epitelial e a bactéria, formando então uma estrutura semelhante à um pedestal com a bactéria em sua superfície (MOON et al., 1983).

Em um modelo proposto por Clarke et al. (2003) as etapas da patogênese de EPEC que levam à formação da lesão A/E foram, didaticamente, divididas em quatro estágios (Figura 2). Inicialmente ocorre (1) a adesão da bactéria às células epiteliais intestinais, mediada pela fímbria BFP e filamentos de EspA; em seguida ocorre (2) a destruição das microvilosidades, e moléculas efetoras são translocadas para dentro da célula hospedeira através do Sistema de Secreção do Tipo III (SST3); na sequência (3) a bactéria perde os filamentos de EspA e ocorre uma adesão íntima da bactéria ao enterócito, mediada pela interação intimina-Tir, provocando acúmulo de actina polimerizada e outros componentes do citoesqueleto no local da adesão; e por fim (4) estas alterações no citoesqueleto vão levar à formação de uma estrutura semelhante a um pedestal, com a EPEC aderida em sua superfície. Essas alterações nos enterócitos levam ao desbalanço eletrolítico, que culmina na diarreia (CLARKE et al., 2003; CROXEN; FINLAY, 2010).

Figura 2 – Representação esquemática dos quatro estágios da patogênese de EPEC.

FONTE: Clarke et al. (2003).

A intimina, uma proteína de membrana externa codificada pelo gene *eae*, é responsável pela adesão íntima da bactéria à célula eucariótica. Uma vez aderida, promove o rearranjo dos feixes de actina logo abaixo do local da adesão, o que, juntamente com outras proteínas do citoesqueleto, levam à formação do pedestal (JERSE et al., 1990). O receptor da intimina é a proteína Tir, a qual é sintetizada e translocada pela bactéria (KENNY et al., 1997). Tir é uma proteína integral de membrana que possui uma estrutura semelhante a um grampo, onde as regiões carboxi e amino terminais localizam-se dentro da célula hospedeira, e a alça extracelular entre as duas regiões atua como domínio de ligação com a intimina (De GRADO et al., 1999; HARTLAND et al., 1999; KENNY, 1999; LUO et al., 2000).

1.3.4 Mecanismos de adesão

Um passo importante no início da colonização do trato gastrointestinal humano por um patógeno é a adesão do micro-organismo na superfície da mucosa do hospedeiro. Embora essa adesão seja essencial para manter os membros da microbiota do intestino, também é considerada uma fase crítica no início da infecção diarreica causada por determinadas linhagens de *E. coli* patogênicas (TORRES; ZHOU; KAPER, 2005).

Amostras de tEPEC produzem um padrão de aderência característico em linhagens celulares cultivadas *in vitro* denominado adesão localizada (AL) (Figura 4-A), sendo visualizado após três horas de contato bactéria-célula (SCALETSKY; SILVA; TRABULSI, 1984). No padrão AL as bactérias aderem em áreas localizadas da superfície celular, formando microcolônias compactas (*clusters* bacterianos) devido à participação da fímbria BFP (GIRÓN; HO; SCHOOLNIK, 1991). Além de BFP, tem sido demonstrado que EspA participa da adesão inicial, seguido da adesão íntima mediada pela interação intimina-Tir (CLEARY et al., 2004). Também foi observada a participação de uma fímbria comumente encontrada em DEC, chamada *E. coli common pilus* (ECP), a qual atua na formação da compacta microcolônia bacteriana (SALDAÑA et al., 2009).

Já as aEPEC podem aderir ou não às células epiteliais cultivadas *in vitro*. As aderentes podem apresentar um padrão semelhante ao AL, denominado adesão localizada-like (ALL) (Figura 4-D) caracterizado pela formação de microcolônias frouxas das bactérias sobre determinadas regiões da superfície celular, sendo visualizado após seis horas de contato (RODRIGUES et al., 1996). O padrão ALL, segundo relatos, parece ser o mais frequente em

isolados de aEPEC (DULGUER et al., 2003; GOMES et al., 2004; PELAYO et al., 1999; SCALETISKY et al., 1999; VIEIRA et al., 2001).

Amostras de aEPEC também podem apresentar o padrão de adesão localizada, entretanto alguns estudos demonstram a ocorrência de variações no padrão AL devido à ausência de BFP, sendo visualizado grupos bacterianos menos compactos após seis horas de incubação com células epiteliais (ABE et al., 2009; HERNANDES et al., 2008; VIEIRA et al., 2001).

Além do padrão AL e ALL, as aEPEC podem apresentar o padrão de adesão difusa (AD), onde as bactérias aderem-se de maneira difusa por toda a superfície celular (Figura 4-B); o padrão de adesão agregativa (AA), caracterizado por bactérias que aderem formando agregados na lamínula e na superfície da célula eucariótica (Figura 4-C); ou ainda há amostras que aderem em um padrão indeterminado/não característico (ABE et al., 2009; DULGUER et al., 2003; GOMES et al., 2004; NUNES et al., 2003; ROBINS-BROWNE et al., 2004; SCALETISKY et al., 1999, 2010; VIEIRA et al., 2001). Outros estudos também demonstram um grande número de cepas não aderentes *in vitro* (ABE et al., 2009).

Figura 4 – Padrões de aderência de *E. coli* diarreiogênicas em células HEp-2.

NOTA: (A) adesão localizada; (B) adesão difusa; (C) adesão agregativa; (D) adesão localizada-like.
 FONTE: Scaletsky et al. (1999).

Além de aderir individualmente, alguns micro-organismos também possuem a capacidade de adesão formando aglomerados bacterianos. Essas comunidades complexas formadas por bactérias aderidas às superfícies sólidas ou semi-sólidas envoltas por uma matriz de exopolissacarídeos (EPS) são definidos como biofilmes (DONLAN; COSTERTON, 2002).

Os biofilmes, geralmente, são compostos por uma comunidade de micro-organismos capazes de aderir às superfícies abióticas, como vidro, poliestireno, fibra de aço, e até superfícies bióticas, como células e tecidos (DAVEY; O'TOOLE, 2000). A capacidade de formar biofilme é compartilhada por várias espécies bacterianas (COSTERTON et al., 1995), as quais possuem estruturas que se projetam sobre a superfície celular, como fímbrias, flagelos, LPS, EPS e outras proteínas adesivas, que atuam no processo de adesão (DONLAN, 2002).

EPEC também é capaz de formar biofilme em superfícies abióticas, como vidro e poliestireno, e em superfícies celulares pré-fixadas. Moreira et al. (2006) demonstraram que BFP e EspA são importantes para a formação de microcolônias durante a adesão às células epiteliais, uma vez que estas adesinas estão envolvidas no processo de agregação bacteriana que resulta na formação de biofilme (MOREIRA et al., 2006). Outros estudos evidenciam ainda a participação de um sorotipo específico de aEPEC (O55:H7) capaz de formar biofilme a 26 °C, e não a 37 °C (WEISS-MUSZKAT et al., 2010). Recentemente, Culler (2010) também verificou a capacidade de formação de biofilme em amostras de aEPEC que apresentam os diferentes padrões de adesão em células epiteliais. Dentre as amostras estudadas, as não aderentes apresentaram forte capacidade de formação de biofilme após 24 horas de contato bactéria-célula, indicando que essas amostras aderem às superfícies bióticas e abióticas, porém em períodos mais prolongados. Além disso, também foi demonstrado que a ausência do gene *bfpA*, que codifica a fímbria BFP, parece não ter relação com a formação de biofilme em aEPEC (CULLER, 2010).

1.3.5 Fímbrias: potenciais fatores de virulência

Diversos fatores podem contribuir para a adesão bacteriana às células hospedeiras. Em geral, as bactérias apresentam adesinas fimbriais e/ou afimbriais que auxiliam na interação com receptores específicos do hospedeiro (NOUGAYRÈDE; FERNANDES; DONNENBERG, 2003). Essas interações são necessárias para que ocorra a colonização ou a internalização do

patógeno, e tal evento envolve uma cascata de sinais moleculares complexos na interface bactéria-célula hospedeira (SOTO; HULTGREN, 1999).

Em EPEC, fatores de virulência adicionais aos mencionados anteriormente, também desempenham papel importante na adesão bacteriana (STONE et al., 1996). Várias estruturas de superfície, como fímbrias e fibrilas, têm sido amplamente caracterizadas e implicadas na patogênese de EPEC em um processo multifatorial (GIRÓN; HO; SCHOOLNIK, 1993). Alguns relatos sugerem ainda que os flagelos também podem estar envolvidos na adesão de EPEC às células epiteliais (GIRÓN et al., 2002; SAMPAIO et al., 2009).

Vários estudos demonstram a prevalência de adesinas fimbriais em amostras de aEPEC, e associam essas estruturas como potenciais fatores de virulência. Além disso, estudos utilizando modelos de linhagens celulares epiteliais e intestinais *in vitro* têm sido realizados no sentido de investigar a existência e a natureza de novas adesinas tanto em amostras de STEC como em amostras de aEPEC. Dessa maneira, genes que codificam adesinas descritas em outros patótipos de *E. coli* diarreiogênicas, já foram detectados em EPEC.

Após o sequenciamento da amostra protótipo de tEPEC E2348/69 foi demonstrado que, além do gene *eae* que codifica a adesina intimina presente na região LEE, há pelo menos nove regiões homólogas que codificam potenciais adesinas fimbriais, e dez regiões que codificam adesinas afimbriais. Uma destas regiões identificadas contém genes que codificam a fímbria de tipo I, considerada importante fator de virulência expresso por diferentes patótipos de *E. coli*, que podem causar infecções intestinais e extra-intestinais (ABE et al., 2008; JONES et al., 1995; KROGFELT et al., 1990; WRIGHT et al., 2007).

Afset et al. (2006) verificaram a presença de genes de virulência associados com diarreia causada por aEPEC isoladas de crianças na Noruega. Dentre os genes pesquisados, os mais frequentes foram *efa1/lifA*, *nleB*, *nleE* e *sen* pertencentes à ilha de patogenicidade O-122 da EHEC EDL933 (MORABITO et al., 2003), e o gene que codifica a fímbria polar longa (*lpfA*) descrito em amostras de EHEC pertencente ao sorogrupo O113 (DOUGHTY et al., 2002). Outros genes também foram encontrados evidenciando a associação com a diarreia (AFSET et al., 2006).

Vieira et al. (2010) investigaram a presença dos genes *efa1/lifA*, *sen*, *pagC*, *nleB* e *nleE* em amostras de tEPEC e aEPEC. A ocorrência de todos os genes foi demonstrada através de análises estatísticas, associando esses fatores de virulência encontrados em aEPEC com a

diarreia. Através da detecção completa da ilha de patogenicidade O122 esses resultados podem auxiliar na identificação de aEPEC (VIEIRA et al., 2010).

O gene *toxB* codifica uma proteína necessária para a adesão de EHEC do sorotipo O157:H7 às células Caco-2 (TATSUNO et al., 2001). Tozzoli et al. (2005) demonstraram que amostras do sorogrupo O26 de EHEC e EPEC também apresentam o gene *toxB* (TOZZOLI; CAPRIOLI; MORABITO, 2005), demonstrando alta heterogeneidade dessas amostras.

Scaletsky et al. (2005) identificaram uma adesina afimbrial, denominada locus para adesão difusa (*Lda*), que participa da adesão localizada de amostras de aEPEC do sorogrupo O26. Estudos moleculares permitiram identificar os genes que codificam essa adesina em uma provável ilha de patogenicidade inserida no cromossomo, responsável pela biogênese da adesina. O gene *IdaH* do locus *Ida* também foi detectado em amostras dos sorogrupos O5, O111 e O145 (SCALETSKY et al., 2005).

A fímbria *E. coli common pilus* (ECP) está presente em muitos isolados de DEC, e parece agir em conjunto com a fímbria BFP durante a interação de tEPEC com a célula hospedeira (SALDAÑA et al., 2009). Recentemente, Scaletsky et al. (2010) descreveram o achado do gene *ecpA*, que codifica a pilina dessa fímbria em amostras de aEPEC (SCALETSKY et al., 2010).

Recentemente, Gomes et al. (2011) verificaram a prevalência de seis genes que codificam adesinas de STEC, associando-as com amostras de tEPEC e aEPEC isoladas de crianças e adultos. Ao comparar os resultados, observaram que o gene *lpfA* foi mais prevalente em ambos os grupos, entretanto o gene *paa* encontrado em amostras de aEPEC foi o único associando à diarreia (GOMES et al., 2011).

Em outro estudo conduzido pelo mesmo grupo, Hernandez et al. (2011) investigaram a prevalência de genes fimbriais em amostras de aEPEC isoladas de crianças com e sem diarreia, provenientes do Brasil e da Austrália. Tais genes, associados com aderência e/ou formação de biofilme foram encontrados em diferentes prevalências, como *hcpA*, *ecpA*, *fimA*, *elfA* e *csgA*. Um fato importante demonstrado por Hernandez et al. (2011) é que somente a amplificação de genes por PCR não indicou a ocorrência de expressão dessas fímbrias, sendo necessária a utilização de outros métodos, conforme abordado (HERNANDES et al., 2011).

Em um recente estudo realizado em nosso laboratório foram pesquisados 31 genes fimbriais em uma coleção de amostras de aEPEC. Dentre os genes pesquisados, alguns foram mais prevalentes, como *fimA* (95,2%) e *fimH* (98,4%) que codificam a fímbria do tipo I, e o gene *ecpA* (100%) que codifica a fímbria ECP. As variantes do gene *lpf* foram encontrados em diferentes prevalências, *lpfA1-2* (68,2%), *lpfA2-1* (49,2%), *lpfAO113* (14,2%), *lpfA1-1* (22,2%) e *lpfA1-3* (9,5%) nas amostras testadas. Entretanto, alguns genes foram encontrados em menor prevalência, como *pilS* (7,9%) e *pilV* (3,1%) que codificam uma fímbria do tipo IV descrita em uma amostra de aEAEC. (FREITAS, 2008; NARA, 2012). O gene *pilS* codifica a proteína estrutural da fímbria Pil, e o gene *pilV* codifica a adesina desta fímbria.

Muitas bactérias são capazes de expressar diferentes adesinas ao mesmo tempo, as quais podem pertencer a diferentes sub-classes. Essa estratégia pode ser uma adaptação à diferentes condições ambientais ou à diferentes hospedeiros (GERLACH; HENSEL, 2007). De qualquer maneira, estes achados reforçam a idéia de que a distribuição dos fatores de virulência em aEPEC é altamente heterogênea.

1.3.6 Fímbrias do Tipo IV

As fímbrias do tipo IV são expressas por diferentes bactérias gram-negativas, sendo caracterizadas por longas estruturas fibrilares que atuam em vários processos bacterianos (STROM; LORY, 1993). Contudo, essa fímbria é considerada um importante fator de virulência presente em *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *Moraxella bovis*, *Myxococcus xanthus*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella enterica* sorovar Typhi, *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) e *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (DUDLEY et al., 2006; HULTGREN; JONES; NORMARK, 1996; STROM; LORY, 1993)

A família de fímbrias do tipo IV é dividida em dois grupos, que se diferem pela sequência e quantidade de aminoácidos. O grupo A possui uma pequena sequência inicial de 5-6 aminoácidos, os quais apresentam a fenilalanina como o aminoácido metilado na porção N-terminal. E o grupo B, possui uma sequência inicial formada por 15-30 aminoácidos, com a pilina apresentando metionina, leucina ou valina na porção N-terminal. A fímbria do tipo IV A é mais comumente encontrada em patógenos como *Neisseria ssp*, *P. aeruginosa*, *Dichelobacter nodosus*, *M. bovis*, *M. nonliquifaciens*, *Eikenella corrodens*, *Azoarcus sp.* e *Bdellovibrio bacteriovorus* (CRAIG; PIQUE; TAINER, 2004). Enquanto que a tipo IV B é

encontrada exclusivamente em bactérias que colonizam o trato gastrointestinal humano, como *V. cholerae* (FAAST et al., 1989; SHAW; TAYLOR, 1990), *S. enterica* sorovar Typhi (ZHANG et al., 2000), e *E. coli* enteropatogênica e enterotoxigênica (DONNENBERG et al., 1992; GIRÓN et al., 1991; TANIGUCHI et al. 1995).

Em EPEC importantes fenótipos estão associados à expressão da fímbria do tipo IV, como adesão às células epiteliais e formação de microcolônias (GIRÓN; HO; SCHOOLNIK, 1991), autoagregação (BIEBER et al., 1998; KNUTTON et al., 1999), formação de biofilme (CULLER, 2010; MOREIRA et al., 2006) e twitching-motility (MATTICK, 2002). A combinação desses fatores podem tornar as bactérias resistentes à resposta imune do hospedeiro ou à agentes terapêuticos, levando às infecções persistentes que são difíceis de eliminar (CRAIG; PIQUE; TAINER, 2004).

1.3.7 Fímbrias Pil

A família dos genes *pil* está envolvida na biogênese de uma fímbria, classificada como tipo IV, que pode ser expressa por diferentes patógenos. Os primeiros genes dessa família a serem descritos foram *pilA*, *pilB*, *pilC* e *pilD*, os quais estão inseridos em uma região cromossômica presente em *P. aeruginosa* (NUNN; BERGMAN; LORY, 1990). Posteriormente, outros genes dessa família também foram descritos em patógenos distintos, demonstrando a presença do operon Pil em diversos plasmídeos (DUDLEY et al., 2006; KIM; KOMANO, 1997; KOMANO et al., 2000; LEYTON et al., 2003; YOSHIDA et al., 1998).

Alguns estudos sugerem que a função da fímbria Pil está relacionada, unicamente, ao mecanismo de conjugação plasmidial, o qual foi amplamente caracterizado em um plasmídeo de *Salmonella* denominado R64 (ISHIWA; KOMANO, 2004; KIM; KOMANO, 1997, 1999; YOSHIDA). Entretanto, outros plasmídeos também foram descritos, e o papel dessa fímbria parece estar relacionado aos fenótipos de adesão agregativa às células epiteliais, formação de biofilme às superfícies abióticas e conjugação plasmidial. Esses fenótipos foram atribuídos aos genes *pilL*, *pilM*, *pilN*, *pilO*, *pilQ*, *pilR*, *pilS*, *pilT*, *pilU* e *pilV*, os quais que estão inseridos em diferentes plasmídeos, como por exemplo os plasmídeos pSERB1 e pSERB2 da amostra de aEAEC C1096 isolada na Sérvia (DUDLEY et al., 2006).

Em um modelo proposto por Sakai e Komano (2002) é possível visualizar como estão organizadas as proteínas envolvidas na biogênese da fímbria Pil de *S. enterica* (Figura 5). Os genes responsáveis por codificar as estruturas envolvidas na montagem da fímbria encontram-se localizados em um operon, o qual está inserido no plasmídeo R64. Pelo menos nove genes estão envolvidos na montagem da fímbria, dentre eles os genes *pilL* e *pilM*, que codificam lipoproteínas; o gene *pilN* responsável por codificar uma secretina (SAKAI et al., 2001); o gene *pilQ* que codifica uma ATPase (SAKAI; KOMANO, 2002); o gene *pilR* que codifica uma proteína integral de membrana; o gene *pilS* que codifica a proteína estrutural fimbrial (YOSHIDA et al., 1998); o gene *pilT* responsável por codificar uma transglicosidase lítica; o gene *pilU* que codifica uma peptidase da prepilina (YOSHIDA et al., 1998); e o gene *pilV* que codifica a adesina fimbrial (KOMANO, 1999; SAKAI; KOMANO, 2002; YOSHIDA et al., 1998).

Figura 5 – Representação esquemática da localização das proteínas envolvidas na biogênese da fímbria Pil de *Salmonella enterica*.

NOTA: O tamanho e o arranjo espacial de cada proteína Pil são hipotéticos. OM: membrana externa; PG: camada de peptidoglicano; PS: espaço periplasmático; IM: membrana interna; CS: espaço citoplasmático.
 FONTE: Sakai e Komano, 2002.

Dados na literatura mostram que as fímbrias apresentam um papel importante na interação bacteriana às superfícies bióticas e abióticas, além de outras funções. Uma vez que isolados de aEPEC não expressam a fímbria BFP, a qual tem um papel preponderante na adesão de tEPEC, a caracterização de outras adesinas fimbriais são de extrema importância para o estudo de novos fatores de virulência em aEPEC.

Conforme relatado anteriormente, em um recente estudo realizado no laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan foram pesquisados 31 genes fimbriais em 72 isolados de aEPEC. Os resultados obtidos demonstraram que alguns genes foram encontrados em maior prevalência que outros, dentre eles, o gene *pilS* detectado em 7,9% e o gene *pilV* foi detectado em 3,1% dos isolados estudados. Interessantemente, estes genes foram descritos em uma amostra de aEAEC, a qual codifica uma fímbria do tipo IV responsável por mediar diferentes processos bacterianos (DUDLEY et al., 2006).

A partir desses dados publicados por Dudley et al. (2006), surgiram os seguintes questionamentos:

- a) qual seria o papel da fímbria Pil em aEPEC?
- b) essa estrutura estaria mediando a aderência bacteriana às células epiteliais *in vitro*?
- c) o envolvimento dessa fímbria nos fenótipos encontrados por esses autores, como formação de biofilme e adesão às células epiteliais, também poderiam ser observados em aEPEC?

Uma vez que até o presente momento a presença e o papel da fímbria Pil na patogênese de EPEC ainda não foram descritos, consideramos importante avaliar a presença da proteína estrutural fimbrial PilS, como também da adesina PilV em amostras de aEPEC, além de caracterizar o papel da fímbria Pil nos diferentes padrões de adesão observados nestes isolados.

2 OBJETIVO

O presente estudo tem como objetivo caracterizar e investigar o papel da fímbria Pil em isolados de *Escherichia coli* enteropatogênica atípica, por meio da interação das estruturas fimbriais PilS e PilV na adesão bacteriana.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Meios de cultura e soluções

Todos os meios de cultura utilizados para o cultivo e manutenção das amostras bacterianas, assim como as soluções utilizadas nas diversas técnicas descritas a seguir, foram preparados de acordo com Sambrook et al. (1989). Exceto quando indicado, os meios de cultivo bacteriano foram de procedência Difco® (Difco Laboratories, Reino Unido) ou Merck® (Merck, Alemanha) e os sais e reagentes de procedência Sigma® (Sigma-Aldrich, EUA), Synth (Synth, Brasil) ou Merck.

3.2 Amostras bacterianas

Neste estudo foram selecionadas três cepas bacterianas obtidas a partir de um estudo epidemiológico realizado na cidade de Salvador (BA), no período de 2003. Essas amostras, isoladas das fezes de crianças menores de cinco anos de idade com diarreia aguda, foram caracterizadas como pertencentes ao patotipo de EPEC atípica pela presença do gene *eae*, e pela ausência da sonda EAF e dos genes de virulência que caracterizam os outros patotipos de *E. coli* diarreiogênicas (BUERIS et al., 2007). Os padrões de adesão e os subtipos de intimina também foram previamente caracterizados por Abe et al. (2009).

A escolha das amostras baseou-se nos resultados obtidos durante o estudo realizado sobre a prevalência de genes fimbriais em amostras de aEPEC (FREITAS, 2008). A partir desses dados, os critérios de seleção utilizados basaram-se na presença de ambos os genes fimbriais *pilS* e *pilV*, os quais codificam estruturas da fímbria Pil do tipo IV, e no tipo de interação desses isolados bacterianos quando colocados em contato com linhagens celulares *in vitro* (padrão de adesão em células HEp-2). Sendo assim, as principais características apresentadas por estas amostras encontram-se descritas na tabela 2.

Tabela 2 – Principais características das amostras de aEPEC utilizadas neste estudo.

Amostra	Sorotipo ^A	Padrão de adesão em HEp-2 ^B	Genes fimbriais ^C
BA 558	O111:H40	AL	<i>pilS</i> , <i>pilV</i> , <i>lpfA1</i> (A1-B1), <i>lpfA1</i> (A1-C _[F]), <i>ecpA</i>
BA 956	O111:H15	NA	<i>fimA</i> , <i>fimH</i> , <i>pilS</i> , <i>pilV</i> , <i>lpfA1</i> (A1-A), <i>ecpA</i>
BA 1244	O55:H7	ALL	<i>fimA</i> , <i>fimH</i> , <i>papA</i> , <i>pilS</i> , <i>pilV</i> , <i>lpfA1</i> (A1-B1), <i>lpfA1</i> (A1-C _[F]), <i>lpfA2</i> (A2-B1), <i>ecpA</i> , <i>daaC</i>

NOTA: AL = adesão localizada; NA = não aderente; ALL = adesão localizada-like.

FONTE: A – Bueris et al.(2007); B – Abe et al. (2009); C – Freitas (2008).

Como controle positivo para todos os ensaios foi utilizada a cepa C1096 (sorogrupo O4:HNT), caracterizada como EAEC atípica por ser sonda negativa para o gene *aggR*, e por não apresentar nenhum dos membros do *Regulon AggR* (CZECZULIN et al., 1999). Essa cepa patogênica foi isolada de uma UTI neonatal na Sérvia em 1995, por apresentar resistência à múltiplos antibióticos (COBELJIC et al., 1996). A C1096 carrega um grande plasmídeo (pSERB1) que codifica uma fímbria do tipo IV funcional (DUDLEY et al., 2006). Também foi utilizada como controle positivo nos ensaios de biofilme e autoagregação a amostra 042 (sorotipo O44:H18) isolada de um caso de diarreia no Peru (NATARO et al., 1985), a qual apresenta o padrão de adesão agregativo típico, e tem sido amplamente empregada na caracterização dos fatores de virulência descritos em EAEC. Como controle negativo nas reações de PCR, ensaios de adesão, formação de biofilme e autoagregação foi empregada a amostra de *E. coli* não patogênica C600 (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Nos ensaios de clonagem e expressão das proteínas recombinantes foram utilizadas como hospedeiras as linhagens JM109, para o vetor pGEMT-Easy (Promega, EUA), e BL21 (DE3) para o vetor pET28a (Novagen, EUA), respectivamente.

Todas as amostras bacterianas foram mantidas em caldo Lúria Bertani (1% de bacto-triptona, 0,5% de extrato de levedura, 1% de cloreto de sódio) acrescido de glicerol 80%, e armazenadas em congeladores a -80 °C.

3.3 Desenho dos iniciadores para amplificação dos genes

Oligonucleotídeos específicos aos genes *pilL*, *pilM*, *pilN*, *pilQ*, *pilR*, *pilS*, *pilT*, *pilU* e *pilV* foram desenhados com auxílio do programa *Gene Runner*®, baseando-se nas sequências depositadas no banco de dados do NCBI (NZ_ABHS01000025.1) dos genes do operon Pil contidos no plasmídeo pSERB1 de EAEC atípica (DUDLEY et al., 2006). Os sítios de restrição BamHI e HindIII foram adicionados aos iniciadores *forward* e *reverse*, respectivamente, apenas nos genes *pilS* e *pilV* para facilitar posteriormente a clonagem em vetor de expressão (pET28a).

Como controle endógeno nos ensaios de Transcriptase Reversa da Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR), foi utilizado o gene *rpoA* (maior subunidade da RNA polimerase). Para isso, oligonucleotídeos específicos ao gene *rpoA* foram desenhados com auxílio do programa *Gene Runner*®, baseando-se na sequência depositada no banco de dados do NCBI (FN554766.1) do genoma da amostra protótipo de EAEC 042 (CHAUDHURI et al., 2010).

3.4 Extração de DNA bacteriano através de lise por fervura

As cepas bacterianas foram cultivadas primeiramente em caldo LB a 37 °C por 18 horas, seguido por semeadura em placa de Petri com meio Ágar Lúria Bertani (LBA) e incubadas a 37 °C por 18 horas. Em condições de esterilidade, uma alçada bacteriana da placa foi transferida para microtubos contendo 250 µL de água ultrapura estéril, submetidos à fervura por 10 minutos e imediatamente colocados em banho de gelo.

3.5 Detecção das sequências de DNA por Reação em Cadeia da Polimerase

Por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi investigada a presença dos genes do operon Pil nos três isolados de EPEC atípica. Além dos genes *pilS* e *pilV*, detectados anteriormente, os genes *pilL*, *pilM*, *pilN*, *pilQ*, *pilR*, *pilT* e *pilU* também foram pesquisados por PCR nesses isolados. As sequências dos pares de iniciadores, as temperaturas de anelamento e o tamanho dos fragmentos amplificados de cada gene encontram-se descritos na tabela 3. As cepas C1096 e C600 descritas anteriormente foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

Tabela 3 – Iniciadores empregados nas reações de PCR e RT-PCR.

Gene	Sequência dos iniciadores	Temperatura Anelamento	Tamanho	Referência
<i>pilL</i>	(F) CTTCTGCCGTCATTACTCA (R) CATCGATGCTGTAGTTGACA	55 °C	907 pb	DUDLEY, 2006
<i>pilM</i>	(F) ATGGGATGGGTTACGGGTTT (R) CAGGGAGCGTGATGGAAATA	55 °C	400 pb	Este estudo ^a
<i>pilN</i>	(F) AGTTCTGACACGACACTTCC (R) CTGGTTGATGGTTTTTCAGAT	55 °C	1014 pb	DUDLEY, 2006
<i>pilQ</i>	(F) ACGTCATAAAGGGAACACAG (R) GACCTGACCACTGTTGATTT	55 °C	998 pb	DUDLEY, 2006
<i>pilR</i>	(F) GGAAAGACTCAACAATACGG (R) GAAGAGAAATACCAGCAGACC	55 °C	1030 pb	Este estudo ^a
<i>pilS</i>	(F) GGATCC ATGAGCGTCATAACCTGTTC (R) AAGCTT TTAACTGTTGGTTTCCAGTTT	50 °C	537 pb	Este estudo ^a
<i>pilT</i>	(F) TGTTATGCTCACTTCCTTCC (R) CTAACGTCCCTGCATGTAA	55 °C	449 pb	DUDLEY, 2006
<i>pilU</i>	(F) CATTATCCTGCGTCTTTATCA (R) CAAAGGGAAGTTCTCTGGTA	55 °C	416 pb	Este estudo ^a
<i>pilV</i>	(F) GGATCC ATGCAAAAAGACAACGATAA (R) AAGCTT TTAATTGAGCGTTACACACG	50 °C	1194 pb	Este estudo ^a
<i>rpoA</i>	(F) AGTCAATTCCAGATCGTCAA (R) GTATTCTGCTCTCATCGATG	56 °C	656 pb	Este estudo ^b

^a As sequências de iniciadores desenhadas neste estudo foram baseadas na sequência dos genes do operon Pil contida no plasmídeo pSERB1 de aEAEC, depositada no banco de dados do NCBI sob o número de acesso NZ_ABHS01000025.1; ^b As sequências de iniciadores desenhadas foram baseadas na sequência da amostra protótipo de EAEC 042, depositada no banco de dados do NCBI sob o número de acesso FN554766.1. Em **vermelho** está destacada a sequência de oligos da enzima BamHI, e em **azul** está destacada a sequência de oligos da enzima HindIII. (F) iniciador *forward*; (R) iniciador *reverse*.

FONTE: Freitas (2012).

As reações foram preparadas em banho de gelo, em microtubos de polipropileno (Axygen, EUA), adicionando-se os seguintes componentes: 20 pmol de cada um dos iniciadores (*forward* e *reverse*), 1 U de *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen, EUA), 1,5 mM de cloreto de magnésio, 200 µM da mistura de dNTPs (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 2,5 µL de tampão de reação de PCR (Invitrogen) e água ultrapura estéril para um volume final de 25 µL. Em cada reação foi adicionado 1 µL do DNA molde, obtido em extração de lise por fervura (ver 3.4). A seguir, as preparações foram colocadas em termociclador *GeneAmp PCR*

System 9700 (Applied Biosystems, EUA), e submetidos às condições de amplificação, conforme segue: desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, com as amostras sujeitas a 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento por 1 minuto, extensão a 72 °C por 1 minuto, e extensão final a 72 °C por 7 minutos.

Após amplificação, 5 µL de cada reação foram analisadas por eletroforese em gel de agarose. Os géis de agarose foram preparados por aquecimento, dissolvendo-se a agarose (Invitrogen) em tampão TAE (40 mM de tris-acetato; 2 mM de ácido etilenodiaminotetracético) na concentração final de 0,8%. As amostras de DNA amplificadas foram misturadas à 2 µL de tampão de amostra para DNA (0,25% de azul de bromofenol; 0,25% de xileno cianol; 30% de glicerol), e como marcadores de peso molecular foram utilizados *1 Kb DNA Ladder* ou *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen). A migração foi realizada sob voltagem constante de 70 V em tampão TAE. Ao término da corrida, os géis foram corados em solução de brometo de etídio 0,5 µg/mL (Invitrogen), observados em transiluminador de luz UV e fotografadas com o auxílio do sistema de imagem *AlphaImager™2200* (Alpha Innotech, EUA).

3.6 Extração de RNA bacteriano e síntese de cDNA

As cepas bacterianas submetidas à extração de RNA foram cultivadas em caldo LB a 37 °C por 18 horas. Em seguida, 300 µL de cada um dos cultivos bacterianos foram centrifugados a 4.000 g por 5 minutos (Centrifuge 5402, Eppendorf, Alemanha), e os sedimentos obtidos foram utilizados para a extração de RNA com o auxílio do *RNA Protect e RNeasy Mini kit* (Qiagen, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. A pureza do RNA obtido para cada amostra foi quantificada por espectrofotômetro, através de leituras de absorbâncias em comprimentos de onda de 260 e 280 nm (Ultrospec 2100 pro, Amersham / Biosciences, EUA).

Após a extração dos RNAs bacterianos, estes foram submetidos à reação de digestão com DNase, utilizando o kit *Deoxyribonuclease I Amplification Grade* (Invitrogen). As reações foram preparadas em banho de gelo, em microtubos estéreis (Axygen), adicionando-se os seguintes componentes: 8 µL de RNA total (contendo aproximadamente 1 µg de RNA), 1 µL de tampão de reação DNase I e 1 µL de enzima *DNase I*. As preparações foram incubadas a

temperatura ambiente por 15 minutos, e em seguida foram adicionados em cada tubo 2,5 mM de EDTA e incubados a 65 °C por 10 minutos.

Ao término da digestão, os cDNAs foram sintetizados à partir dos RNAs utilizando-se o kit *SuperScrip III First-Strand Synthesis Systems for RT-PCR* (Invitrogen). Primeiramente, em cada reação foram adicionados: 3 µL de RNA digerido, 1 µL de *random hexamer primers*, 1 mM da mistura de dNTPs (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) e água ultrapura estéril para um volume final de 10 µL. As reações foram incubadas a 65 °C por 5 minutos, e imediatamente incubadas em banho de gelo por 1 minuto. Em seguida, foram adicionados à cada tubo 2 µL de tampão de reação RT, 5 mM de cloreto de magnésio, 10 mM de DTT, 2 U de *RNAseOUT™*, 2,5 U de *SuperScript™III RT* e água ultrapura estéril para um volume final de 20 µL. A seguir, as preparações foram colocadas em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems) e submetidas às temperaturas de 50 °C por 50 minutos, seguido de 85 °C por 5 minutos. Após retirar as reações do termociclador, foram adicionados a cada tubo 0,1 U de *RNAse H* e incubados a 37 °C por 20 minutos. Ao término da síntese de cDNA, as reações foram mantidas a -80 °C até o momento do uso.

3.7 Análise da transcrição dos genes do operon Pil

Após a obtenção do cDNA a partir do RNA bacteriano, as amostras foram submetidas ao ensaio de PCR (ver 3.5) para detecção dos genes *pilL*, *pilM*, *pilN*, *pilQ*, *pilR*, *pilS*, *pilT*, *pilU* e *pilV*. As sequências de iniciadores, as temperaturas de anelamento e o tamanho dos fragmentos amplificados de cada gene encontram-se descritos na tabela 3. O gene *rpoA* foi utilizado como controle endógeno das reações de RT-PCR. Após amplificação, 5 µL de cada reação foram analisadas por eletroforese em gel de agarose.

3.8 Clonagem dos genes *pilS* e *pilV* em vetor pGEM-T Easy

A técnica de PCR foi utilizada para avaliar a presença dos genes fimbriais *pilS* e *pilV* nos isolados de EPEC atípica, objetos deste estudo. Após a detecção dos genes de interesse e a confirmação da ocorrência de transcrição gênica, foram selecionados os isolados que apresentaram amplificação de ambos os genes para posterior clonagem.

3.8.1 Amplificação por PCR dos genes *pilS* e *pilV* e reação de adição da Adenina

Para dar continuidade às etapas de clonagem, esses isolados foram submetidos à amplificação por PCR, com algumas modificações. Os componentes utilizados na reação foram: 20 pmol de cada um dos iniciadores (*forward* e *reverse*), 2,5 μ M de *Platinum® Pfx DNA Polymerase* (Invitrogen), 1,5 mM de sulfato de magnésio, 200 μ M da mistura de dNTPs (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 20 μ L de tampão de reação de PCR e água ultrapura estéril para um volume final de 100 μ L. Em cada reação foi adicionado 10 μ L do DNA molde, e as preparações foram colocadas em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems), e submetidas às condições de amplificação. Os produtos obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, e em seguida foram extraídos e purificados com o kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare, Reino Unido). Após a eluição, as amostras foram submetidas à reação de adição de Adenina, utilizando 1U de *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen), 1,5 mM de cloreto de magnésio, 200 μ M de dATP, 4 μ L de tampão de reação de PCR e água ultrapura estéril para um volume final de 40 μ L. Em cada reação foi adicionado 27 μ L do DNA molde, e as preparações foram colocadas em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems), e submetidas a 72 °C durante 20 minutos e mantidas a 4 °C até o início da etapa de ligação.

3.8.2 Ligação dos insertos em vetor de clonagem *pGEMT-Easy*

Após reação de adição de adenina, os produtos obtidos foram submetidos à reação de ligação ao vetor de clonagem *pGEMT-Easy*, através do kit *pGEM-T Easy Vector Systems* (Promega). Para cada 1 μ L de vetor contendo 50 ng foram utilizados 3 μ L de fragmento, com concentração igual a 40 ng, sendo adicionados à reação 5 μ L de tampão de ligação e 1 μ L de *T4 DNA ligase*, para um volume final de 10 μ L. A reação de ligação foi incubada por uma hora à temperatura ambiente, seguido de incubação a 4 °C por 18 horas. Os plasmídeos obtidos a partir da ligação dos insertos ao vetor de clonagem foram designados pNaS (para *pilS*) e pNaV (para *pilV*). Após a obtenção dos plasmídeos recombinantes, estes foram transformados por choque térmico em linhagens de *E. coli* JM109 competentes, conforme segue.

3.8.3 Transformação bacteriana por choque térmico

Para esse procedimento foi adicionado 10 µL de cada plasmídeo pNaS e pNaV em 50 µL de suspensão celular (células JM109 competentes), sendo incubados em banho de gelo por 30 minutos. As células foram submetidas a choque térmico a 42 °C por 2 minutos e mantidas novamente em gelo por 2 minutos. A cada alíquota de células foram acrescentados 950 µL de meio SOC (2% de triptona; 0,5% de extrato de levedura; 0,05% de cloreto de sódio; 2,5 mM de cloreto de potássio; 100 mM de cloreto de magnésio; 20 mM de glicose), sendo mantidas sob agitação de 200 rpm (C25 Incubator Shaker – New Brunswick Scientific) a 37 °C por 2 horas.

Após o cultivo das células contendo os respectivos plasmídeos recombinantes, 150 µL da suspensão bacteriana foram plaqueadas, em duplicata, em LBA contendo 100 µg/mL de ampicilina (Invitrogen), 40 µg/mL de X-Gal (Invitrogen) e 1 mM de Isopropil β-D-1-Tiogalactopiranosídeo (IPTG) (Sigma-Aldrich), sendo incubadas a 37 °C por 18 horas. Colônias brancas resultantes do crescimento bacteriano foram selecionadas de cada placa, e cultivadas em 3 mL de caldo LB contendo 100 µg/mL de ampicilina (Invitrogen). Após cultivo bacteriano dos clones, foi realizada lise por fervura destas amostras, seguido da reação de PCR para confirmação dos resultados.

3.8.4 Extração de DNA plasmidial

Para a obtenção do DNA plasmidial, foi realizada etapa de minipreparação (MiniPrep). Duzentos microlitros dos clones em estoque de glicerol 80% foram adicionados em 10 mL de caldo LB contendo 100 µg/mL de ampicilina (Invitrogen), e incubados sob agitação de 200 rpm (C25 Incubator Shaker – New Brunswick Scientific) a 37 °C por 18 horas. A minipreparação foi realizada através do kit *PureLink Quick Plasmid Miniprep* (Invitrogen), conforme as recomendações do fabricante. Após eluição, o perfil plasmidial de cada amostra foi analisado por eletroforese em gel de agarose.

3.8.5 Análise de restrição e obtenção dos fragmentos *pilS* e *pilV*

A análise de restrição utilizando as enzimas BamHI e HindIII foi realizada para a confirmação da clonagem dos insertos de interesse, como também para obtenção dos mesmos para posterior clonagem em vetor de expressão. As reações foram preparadas em banho de gelo, em microtubos estéreis (Axygen), adicionando-se os seguintes componentes: 3 µL de DNA plasmidial, 1 µL de tampão de reação *REact2* (Invitrogen), 1 µL de enzima BamHI (Fermentas, EUA), 1 µL de enzima HindIII (Invitrogen) e água ultrapura estéril para um volume final de 10 µL. As preparações foram incubadas a 37 °C por 18 horas, sendo posteriormente analisadas por eletroforese em gel de agarose. Os fragmentos liberados foram purificados do gel através do kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare), seguindo as recomendações do fabricante.

3.9 Sub-clonagem dos genes *pilS* e *pilV* em vetor de expressão pET28a

3.9.1 Ligação dos insertos em vetor de expressão pET28a

O vetor pET28a (Novagen) e os fragmentos digeridos (*pilS* e *pilV*) foram ligados, separadamente, em uma reação com volume final de 10 µL. A reação de ligação do fragmento *pilS* foi composta por 5 µL de tampão de ligação (Fermentas), 3 µL de vetor pET28a correspondente a 50 ng, 1 µL de inserto correspondente a 200 ng e 1 µL de enzima *T4 DNA Ligase* (Fermentas). A reação de ligação do fragmento *pilV* foi composta por 4 µL de água ultrapura estéril, 1 µL de tampão de ligação (Fermentas), 3 µL de vetor pET28a correspondente a 50 ng, 1 µL de inserto correspondente a 150 ng e 1 µL de enzima *T4 DNA Ligase* (Fermentas). A reação foi incubada a 16 °C por 18 horas em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems).

Após a reação de ligação, linhagens de *E. coli* JM109 competentes foram transformadas por choque térmico, conforme descrito na subseção 3.8.3. A seleção dos clones recombinantes foi feita após o plaqueamento de 150 µL da cultura bacteriana em LBA contendo 50 µg/mL de canamicina (Invitrogen), e incubação a 37 °C por 18 horas.

3.9.2 Análise dos clones obtidos

Para confirmar se as colônias resultantes do plaqueamento das células JM109 transformadas continham os plasmídeos recombinantes, estas foram submetidas à análise por PCR e eletroforese em gel de agarose. Em seguida foram realizadas extração plasmidial e análise de restrição com as enzimas BamHI e HindIII.

3.10 Sequenciamento de DNA

O sequenciamento dos insertos *pilS* e *pilV* clonados nos vetores pGEMT-Easy e pET28a foi realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Para cada reação de sequenciamento do plasmídeo pGEM-T Easy foram enviados, em duplicatas, 100 ng de DNA plasmidial e 5 pmol/μL dos iniciadores PUC/M13 *forward* (CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC) e *reverse* (TCACACAGGAAACAGCTATGAC). E para o sequenciamento do plasmídeo pET28a foram enviados, também em duplicatas, 20 ng de DNA plasmidial e 5 pmol/μL dos iniciadores *forward* e *reverse* do promotor T7.

As reações de sequenciamento foram realizadas em sequenciador automático *MegaBACE 1000* (Amersham Pharmacia Biotech, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante, e as análises foram feitas com base nas sequências dos genes *pilS* e *pilV* contidas no plasmídeo pSERB1 de EAEC atípica (NCBI: NZ_ABHS01000025.1), que encontra-se depositada no banco de dados NCBI. Os programas *ClustalW2*, *Gene Runner*® e *BioEdit*, e a ferramenta *BLASTn* do NCBI foram utilizados na análise.

3.11 Transformação em células BL21 (DE3)

A linhagem de *E. coli* BL21(DE3) competente foi transformada com os respectivos plasmídeos p558S e p558V por choque térmico. Para cada alíquota de 50 μL de células BL21(DE3) competentes foram adicionados 2 μL de DNA plasmidial, procedendo-se às etapas de transformação por choque térmico.

3.12 Expressão das proteínas recombinantes

Os transformantes de *E. coli* BL21 (DE3) contendo os plasmídeos p558S e p558V foram cultivados em um pré-inóculo de 12 mL de caldo LB contendo 50 µg/mL de canamicina (Invitrogen) e incubados sob agitação de 200 rpm (C25 Incubator Shaker – New Brunswick Scientific) a 37 °C por 18 horas. Após incubação, 10 mL do pré-inóculo foram adicionados a 500 mL de caldo LB contendo 50 µg/mL de canamicina (Invitrogen), e incubados sob agitação de 200 rpm (C25 Incubator Shaker – New Brunswick Scientific) a 37 °C por aproximadamente 4 horas. O crescimento celular foi monitorado através da leitura de densidade óptica a 600 nm até atingir o intervalo entre 0,6 e 0,8 (Spectronic 20 – Genesys). Uma vez nesse intervalo, uma alíquota de 1 mL das culturas foram retiradas para controle da pré-indução. Ao meio foi adicionado 1 mM de IPTG (Sigma-Aldrich), e incubado sob agitação de 200 rpm (C25 Incubator Shaker – New Brunswick Scientific) a 37 °C por 4 horas. Após incubação, outra alíquota foi retirada para o controle da pós-indução. As alíquotas foram centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos (Centrifuge 5402, Eppendorf), e o sedimento foi ressuspensão em tampão de amostra para proteína (60 mM de tris (hidroximetil) aminometano hidrocloreto; 2% de dodecil sulfato de sódio; 10% de glicerol; 5% de β-mercaptoetanol; 1% de azul de bromofenol). Após indução, a cultura bacteriana foi centrifugada a 13.000 g por 20 minutos sob refrigeração a 4 °C (Eppendorf 5804-R, Alemanha). O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensão em 30 mL de tampão de lise (20 mM de fosfato de sódio; 500 mM de cloreto de sódio; 5 mM de imidazol – pH 7.2), acrescidos de 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfato (PMSF) (Sigma-Aldrich). Em seguida, essa suspensão bacteriana foi armazenada a -20 °C para posteriormente ser submetida ao rompimento por pressão.

3.12.1 Obtenção da fração insolúvel das proteínas PilS e PilV

As células bacterianas em suspensão foram rompidas por pressão em *French Pressure* (Thermo Scientific, EUA) a 2000 psi, e o lisado bacteriano foi centrifugado a 13.000 g por 20 minutos sob refrigeração a 4 °C (Eppendorf 5804-R). Após centrifugação, os sedimentos contendo as proteínas sob a forma insolúvel (corpos de inclusão) foram ressuspensos em 50 mL de tampão de solubilização (20 mM de fosfato de sódio; 500 mM de cloreto de sódio; 8 M de ureia – pH 7.2), e submetidos à solubilização sendo incubados sob leve agitação a

4 °C por 18 horas. A solução foi centrifugada a 13.000 g por 30 minutos sob refrigeração a 4 °C (Eppendorf 5804-R), e o sobrenadante foi filtrado em membrana de nitrocelulose com poros de 0,45 µm (Millipore, EUA).

3.13 Cromatografia de afinidade ao Níquel

As proteínas solubilizadas foram adicionadas a 4 mL de resina Ni Sepharose High Performance (GE Healthcare, EUA) previamente equilibrada em tampão de equilíbrio (20 mM de fosfato de sódio; 500 mM de cloreto de sódio – pH 7.2), e foram incubadas sob leve agitação a 4 °C por 18 horas. A resina foi então depositada em coluna C10/10 (GE Healthcare) e com o auxílio de uma bomba peristáltica acoplada à coluna, esta foi lavada com aproximadamente 40 mL de tampão de lavagem (20 mM de fosfato de sódio; 500 mM de cloreto de sódio; 8 M de ureia – pH 7.2) contendo concentrações crescentes de imidazol (lavagem 1 - 10 mM de imidazol; lavagem 2 - 20 mM de imidazol; lavagem 3 - 40 mM de imidazol; lavagem 4 - 60 mM de imidazol; lavagem 5 - 100 mM de imidazol), para remoção das proteínas contaminantes, sendo coletados os primeiros 10 mL de cada lavagem. Para eluição das proteínas PilS e PilV foram utilizados 30 mL de tampão de eluição (500 mM de imidazol; 20 mM de fosfato de sódio; 500 mM de cloreto de sódio; 8 M de ureia – pH 7.2), sendo coletados os primeiros 15 mL do eluído. Todos os processos de lavagem e eluição das proteínas foram monitorados com reagente de Bradford (Sigma-Aldrich). Os controles pré e pós-indução, as lavagens e a eluição da purificação foram analisadas em gel de SDS-PAGE a 12%, corado por *Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution* (Bio-Rad, EUA).

3.13.1 Renaturação das proteínas PilS e PilV após purificação

O processo de renaturação de PilS e PilV foi realizado pelo método de diálise, com concentrações decrescentes de ureia. As respectivas proteínas em solução de eluição foram depositadas, separadamente, em uma membrana de diálise de 3.500 Da, e estas foram incubadas em tampão de renaturação (20 mM de fosfato de sódio; 500 mM de cloreto de sódio – pH 7.2) contendo concentrações decrescentes de uréia (6 M, 4 M, 2 M e 1 M), com trocas ocorrendo a cada 12 horas. Ao tampão de concentração de ureia a 1 M foi adicionado 375 µM de glutatona oxidada (GSSG) para o auxílio da renaturação das pontes dissulfeto. A

última diálise foi realizada com o tampão de renaturação sem ureia, sendo incubada sob leve agitação com a barra magnética por 24 horas, para garantir a saída do agente desnaturante.

As proteínas purificadas e renaturadas foram analisadas em gel de SDS-PAGE, e posteriormente quantificadas pelo kit *Micro BCA Protein Assay* (Pierce, EUA), conforme as recomendações do fabricante.

3.14 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

Todas as proteínas foram analisadas por SDS-PAGE a 12% em condições desnaturantes, segundo protocolo descrito por Laemmli et al. (1970). Os lisados totais bacterianos dos controles pré e pós indução, assim como as frações coletadas durante o processo de purificação foram homogeneizadas em tampão de amostra para proteína (60 mM de tris (hidroximetil) aminometano hidrocloreto; 2% de dodecil sulfato de sódio; 10% de glicerol; 5% de β -mercaptoetanol; 1% de azul de bromofenol), e submetidas à desnaturação a 100 °C por 10 minutos. A migração foi efetuada sob amperagem constante de 20 mA por cerca de 2 horas em tampão de corrida para SDS (3% de tris (hidroximetil) aminometano hidrocloreto; 14% de glicina; 1% de dodecil sulfato de sódio – pH 8.3). Como padrões de massa molecular foram utilizados o *Protein Mixture* (GE Healthcare) e *Kaleidoscope Prestained Standards* (Bio-Rad).

3.15 Western-blot

As proteínas separadas por SDS-PAGE foram transferidas para membrana de nitrocelulose *Hybond-C* (GE Healthcare), seguindo o protocolo descrito por Towbin et al. (1979). A transferência foi realizada sob amperagem constante de 150 mA a 4 °C por 18 horas em tampão de transferência (250 mM de tris (hidroximetil) aminometano hidrocloreto; 192 mM de glicina; 20% de metanol – pH 8.3). Uma vez transferidas, as proteínas foram coradas por *Ponceau S* (Sigma-Aldrich), e descoradas com água destilada.

3.16 Imunodetecção com anticorpo anti-His

A membrana contendo as proteínas separadas por SDS-PAGE foi bloqueada por 2 horas à temperatura ambiente, sob leve agitação, em solução de bloqueio contendo 10% de leite desnatado dissolvido em solução salina tamponada com fosfato (PBS) (137 mM de cloreto de sódio; 2,7 mM de cloreto de potássio; 4,3 mM de fosfato de sódio dibásico; 1,5 mM de fosfato de potássio monobásico – pH 7.4). Em seguida, foi submetida à imunodetecção empregando o anticorpo monoclonal IgG2a anti-His (Invitrogen) diluído 1:6000 em solução de bloqueio, e incubado por 2 horas a temperatura ambiente sob leve agitação. A membrana foi lavada por 3 vezes de 5 minutos cada com PBS-Tween 20 a 0,05% (Synth, EUA), e em seguida o soro de cabra anti IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Sigma-Aldrich) diluído 1:10.000 em solução de bloqueio foi incubado por 1 hora a temperatura ambiente sob leve agitação. Novamente, a membrana foi lavada por 3 vezes de 5 minutos cada com PBS-Tween 0,05% (Synth), e em seguida revelada em solução contendo 5 mg de 3,3-Diaminobenzidina (DAB) (Sigma-Aldrich) diluído em 30 mL de PBS na presença de peróxido de hidrogênio (Merck). A revelação foi interrompida com a adição de água destilada.

3.17 Imunização de animais para obtenção de anticorpos policlonais anti-PiLS e anti-PiLV

Os anticorpos policlonais contra as proteínas PiLS e PiLV foram obtidos a partir da imunização de coelhos albinos fêmeas, linhagem Nova Zelândia, de aproximadamente sessenta dias de idade. A primeira dose foi injetada via intramuscular com 100 µg de PiLS ou PiLV purificadas acrescidas de 2,5 mg de hidróxido de alumínio. Após 15 dias, uma dose reforço contendo a mesma concentração da primeira dose, foi injetada nos respectivos coelhos. Trinta dias depois da primeira dose, foi realizada uma sangria de prova para verificação dos títulos de anticorpos por ensaio imunoenzimático (ELISA). A sangria total foi realizada por punção cardíaca após 40 dias de imunização do animal. O material coletado foi coagulado por uma hora, seguido de centrifugação para retirada de hemácias remanescentes, e os soros obtidos foram armazenados a -20 °C.

3.17.1 Titulação dos anticorpos policlonais anti-PiLS e anti-PiLV

Os anticorpos anti-PiLS e anti-PiLV presentes nos soros de coelho foram titulados por ELISA indireto. Uma placa de poliestireno MaxiSorp (Nunc, EUA) foi sensibilizada com 15 µg/mL das proteínas PiLS ou PiLV purificadas, diluídas em tampão carbonato/bicarbonato (50 mM de carbonato/bicarbonato de sódio – pH 9.6) por 18 horas a 4 °C. Após sensibilização, a placa foi lavada com PBS-Tween 0,05% (Synth) por 4 vezes, e em seguida foram acrescentados 200 µL de solução de bloqueio contendo 5% de leite desnatado dissolvido em PBS, e incubada a 37 °C por 30 minutos. Após bloqueio, a placa foi novamente lavada com PBS-Tween 0,05% (Synth) por 4 vezes, e em seguida foram acrescentados os respectivos soros de coelho anti-PiLS e anti-PiLV em uma diluição seriada de 1:100 até 1:12.800, e incubados a 37 °C por 45 minutos. A placa foi lavada com PBS-Tween 0,05% (Synth) por 4 vezes, sendo o ensaio incubado a 37 °C por 30 minutos com os anticorpos de cabra anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase (Zymed-Invitrogen) diluído 1:5000. Antes de ser revelada, a placa foi novamente lavada com PBS-Tween 0,05% (Synth) por 4 vezes, e revelada com 5 mg de O-fenilenodiamina (OPD) diluído em 10 mL de tampão citrato/fosfato (100 mM de citrato de sódio; 400 mM de fosfato de sódio – pH 5.0) na presença de peróxido de hidrogênio (Merck). Após 15 minutos de incubação, a reação foi interrompida com a adição de ácido clorídrico 1 N, e a leitura realizada em leitor de ELISA a 492 nm (Multiskan EX, Labsystems, EUA). O branco da reação foi realizado sem a adição dos anticorpos policlonais anti-PiLS ou anti-PiLV, e a absorbância obtida utilizando-se os respectivos soros pré-ímmunes foram considerados como controles negativos das reações. As absorbâncias foram analisadas pelo *GraphPad Prism 5.0*®.

3.18 Imunodeteção das proteínas recombinantes com soro anti-PiLS e anti-PiLV

A imunodeteção das proteínas PiLS e PiLV utilizando os anticorpos policlonais obtidos foi realizada de forma semelhante à imunodeteção com soro anti-His. As membranas contendo as respectivas proteínas separadas por SDS-PAGE foram bloqueadas em solução contendo 10% de leite desnatado dissolvido em PBS. Após o bloqueio de proteínas inespecíficas, as membranas foram submetidas à imunodeteção empregando os anticorpos policlonais de coelho anti-PiLS ou anti-PiLV diluídos 1:100 em solução de bloqueio, e

incubadas sob leve agitação a temperatura ambiente por 2 horas. Estas membranas foram lavadas por 3 vezes de 5 minutos cada com PBS-Tween 0,05% (Synth), e em seguida os anticorpos de cabra anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase (Sigma-Aldrich) diluído 1:5000 em solução de bloqueio foram incubados sob leve agitação a temperatura ambiente por 1 hora. Novamente, as membranas foram lavadas por 3 vezes de 5 minutos cada com PBS-Tween 0,05% (Synth), e em seguida reveladas em solução contendo 5 mg de DAB (Sigma-Aldrich) diluído em 30 mL de PBS na presença de peróxido de hidrogênio (Merck). A revelação foi interrompida com a adição de água destilada.

3.19 Adsorção de soro imune

Com o intuito de minimizar reconhecimentos inespecíficos por outros anticorpos presentes nos soros obtidos, estes foram submetidos à adsorção¹ contra a *Escherichia coli* BL21 (DE3). Para esse procedimento, a linhagem BL21(DE3) foi cultivada em caldo LB por 18 horas a 37 °C, e em condições de esterilidade, alíquotas de 1 mL de cultivo bacteriano foram centrifugadas a 12.000 g por 20 minutos (Centrifuge 5402, Eppendorf), e o sedimento ressuspenso em PBS acrescido de 1mM de PMSF. As suspensões foram novamente centrifugadas a 10.000 g por 20 minutos (Centrifuge 5402, Eppendorf), e os sedimentos obtidos foram armazenados a -20 °C até o momento de uso.

Cerca de 1 mL de cada soro foram homogeneizados com os sedimentos bacterianos, e mantidos sob agitação a temperatura ambiente por 2 horas, seguido de uma incubação a 4 °C por 18 horas. Essa suspensão foi centrifugada na mesma rotação descrita anteriormente, e o sobrenadante coletado. Esse procedimento foi repetido por 5 vezes com cada soro. Após a última adsorção, os soros foram filtrados em membrana de nitrocelulose com poros de 0,22 µm (Millipore), e mantidos a -20 °C.

¹ Adsorção: incorporação de uma substância à superfície de outra.

3.20 Manutenção das linhagens de células HEp-2

As células HEp-2, originárias de carcinoma de laringe (MOORE; SABACHEWSKY; TOOLAN, 1955) provenientes do Instituto Adolfo Lutz, foram mantidas através de cultivos sucessivos em frascos apropriados para cultura de células (área de crescimento de 75 cm²) (TPP, Suíça), contendo meio essencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (CultiLab, Brasil) acrescidos de 50 µg/mL de gentamicina (Invitrogen), e 10% de soro fetal bovino (SFB) (GIBCO, EUA). Os frascos foram incubados a 37 °C em atmosfera com 5% de gás carbônico e o meio de cultura trocado a cada 2 dias.

Após a formação da monocamada celular na superfície do frasco, a cultura foi lavada com solução PBS e descolada com a adição de solução de associação tripsina-versene (ATV) (Instituto Adolfo Lutz, Brasil), seguida da agitação manual dos frascos. Após o descolamento celular, a tripsina foi inativada com adição de DMEM 10% SFB, e a suspensão centrifugada a 259 g por 5 minutos a 4 °C (Eppendorf 5804-R). Em seguida o sobrenadante foi desprezado e as células foram novamente ressuspensas em meio de cultura para contagem em câmara de Neubauer. Após a determinação do número de células, estas foram diluídas em meio DMEM na concentração final de 5x10⁴ células/poço, e distribuídas em microplacas de 24 poços (TPP) contendo lamínulas de vidro, em volume de 1 mL/poço. As preparações foram incubadas a 37 °C, em atmosfera de 5% de gás carbônico até atingirem o estágio de semi-confluência, que ocorre em 48 horas após terem sido transferidas para microplacas.

3.20.1 Ensaio de interação bacteriana com células epiteliais *in vitro*

Os ensaios de interação bacteriana foram realizados segundo a metodologia descrita por Cravioto et al. (1979) com algumas modificações. Para tanto, as culturas bacterianas dos estoques originais foram cultivadas em caldo LB a 37 °C por 18 horas em condições estáticas. Inicialmente o meio foi retirado dos poços, sendo adicionado 980 µL de meio DMEM sem antibiótico acrescido com 2% de SFB. Em seguida, 20 µL das culturas bacterianas (10⁸ UFC/mL) foram inoculadas nos respectivos poços, e a placa foi incubada a 37 °C em atmosfera com 5% de gás carbônico durante 6 horas. Após a primeira incubação (3 horas), as células foram lavadas com PBS, sendo acrescidas de 1 mL de meio novo para manutenção de pH e concentração de nutrientes. Após incubação por mais 3 horas, as células foram

novamente lavadas com PBS e fixadas com metanol absoluto por 30 minutos a temperatura ambiente. Após fixação, as células foram coradas por 5 minutos com corante eosina-azul de metileno em solução, segundo May Grünwald (Merck) diluído 1:2 em tampão Sørensen (8,6 mM de fosfato de potássio monobásico, 28,6 mM de fosfato de sódio dibásico). Em seguida, esse corante foi desprezado sendo então acrescentada a solução corante azul-eosina-azul de metileno, segundo Giemsa (Merck) diluída 1:3 em tampão Sørensen por 20 minutos. Após lavagem para retirada do excesso de corante, as lamínulas foram secas à temperatura ambiente, montadas em lâminas de vidro com Entellan (Merck) e observadas ao microscópio óptico (Zeiss, Alemanha), com aumentos de 400X e 1000X.

3.20.2 Ensaio de inibição da adesão bacteriana às células epiteliais in vitro

Para verificar se os soros anti-PiLS e/ou anti-PiLV eram capazes de inibir a adesão dos isolados de aEPEC, foram realizados os ensaios de inibição de adesão em células HEp-2. Os soros de coelho anti-PiLS e anti-PiLV foram diluídos em meio DMEM na proporção de 1:5, e em seguida uma alíquota de 100 µL de cultivo bacteriano foi adicionada a 100 µL da diluição dos soros, os quais passaram a ficar em uma concentração final de 1:10. A partir dessa diluição, as amostras foram pré-incubadas a 37 °C durante 1 hora. As suspensões bacterianas foram colocadas em contato com as células HEp-2 e incubadas por 6 horas, procedendo-se ao ensaio de interação bacteriana com células epiteliais conforme descrito na subseção 3.20.1.

3.21 Ensaio de formação de biofilme em superfície abiótica

Os ensaios de formação de biofilme foram realizados segundo o protocolo descrito por Sheikh et al. (2001) com algumas modificações. Para tanto, as culturas bacterianas dos estoques originais foram cultivadas em caldo LB a 37 °C por 18 horas em condições estáticas. Em uma placa de poliestireno de fundo redondo contendo 96 poços (TPP) foram adicionados 200 µL de meio DMEM, sendo inoculados 2 µL do cultivo bacteriano nos respectivos poços, e incubados a 37 °C durante 24 horas. Após incubação, o meio de cultura foi removido e os poços foram lavados com PBS para remoção das bactérias planctônicas. O biofilme foi pré-fixado com 200 µL de etanol 75% por 10 minutos a temperatura ambiente, e em seguida foi

corado com 200 µL de solução de cristal-violeta 0,5% por 5 minutos a temperatura ambiente. O corante foi removido e os poços foram lavados por 3 vezes com PBS, e a placa foi seca a temperatura ambiente por aproximadamente 2 horas. Em seguida, 200 µL de etanol 95% foram adicionados a cada poço para solubilização do corante, e após incubação de 2 minutos a temperatura ambiente, 150 µL desse volume foram transferidos para uma nova placa de poliestireno para leitura da absorbância a 595 nm (Multiskan EX, Labsystems). As amostras 042 (EAEC) e C600 (*E. coli* K-12) foram empregadas como controles positivo e negativo, respectivamente. As densidades ópticas obtidas foram analisadas pelo *GraphPad Prism* 5.0® utilizando o teste *t* de Student e ANOVA, e as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p \leq 0,05$.

3.21.1 Ensaio de inibição da formação de biofilme em superfície abiótica

Para verificar se os soros anti-PilS e/ou anti-PilV eram capazes de inibir a formação de biofilme, estes foram previamente incubados com as amostras de EPEC atípica. Para isso os soros de coelho anti-PilS e anti-PilV foram diluídos em meio DMEM na proporção de 1:25, e em seguida uma alíquota de 50 µL do cultivo bacteriano foi adicionado à 50 µL da diluição dos soros, e pré-incubados a 37 °C durante 1 hora. Após incubação, procedeu-se ao ensaio de formação de biofilme, conforme descrito em 3.21.

3.22 Ensaio de autoagregação

Para analisar a capacidade autoagregante dos isolados de EPEC atípica, foi realizado o ensaio de autoagregação, de acordo com o protocolo descrito por Hasman et al. (1999). Para tanto, as culturas bacterianas dos estoques originais foram cultivadas em caldo LB a 37 °C por 18 horas em condições estáticas, e posteriormente todas elas foram ajustadas na mesma densidade óptica a 600 nm (Spectronic 20 – Genesys). Após os valores serem calculados, 10 mL das culturas bacterianas foram transferidas para tubos de vidro de 20 mL, e submetidas à agitação mecânica em vórtex por 10 segundos consecutivos (Maxi Mix Plus, Thermolyne, EUA), e em seguida foram mantidos em condições estáticas. Em diferentes intervalos de tempo (30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas e 18 horas) alíquotas de 100 µL foram retiradas da superfície do caldo bacteriano, diluídas em

900 µL de solução salina 0,9% e submetidas à leitura da densidade óptica a 600 nm. As amostras 042 (EAEC) e C600 (*E. coli* K-12) foram empregadas como controles positivo e negativo, respectivamente, e as absorbâncias obtidas foram analisadas pelo *GraphPad Prism* 5.0®.

4 RESULTADOS

4.1 Pesquisa de genes do operon Pil em isolados de aEPEC

Para dar início a este estudo, foram realizados novamente ensaios de PCR para detecção dos genes *pilS* e *pilV* nos isolados de aEPEC. Esses resultados permitiram que fosse confirmada a presença de ambos os genes fimbriais nos isolados selecionados para este estudo, pois os iniciadores utilizados anteriormente amplificavam apenas uma região e não o gene inteiro. Além disso, esses iniciadores foram utilizados para a clonagem dos genes *pil*, e posteriormente para a expressão das respectivas proteínas. Como podemos observar, os genes *pilS* (Figura 6) e *pilV* (Figura 7) foram amplificados nas amostras BA 558, BA 956 e BA 1244, além da amostra controle C1096, apresentando aproximadamente 537 pb e 1194 pb, respectivamente.

Figura 6 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% dos fragmentos amplificados em reações de PCR para detecção do gene *pilS* em isolados de aEPEC.

Gel corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador com luz ultravioleta. Canaletas: **PM** – Padrão molecular 1 Kb DNA Ladder; **1.** Isolado C1096 (controle positivo); **2.** Isolado C600 (controle negativo); **3.** Isolado BA 558; **4.** Isolado BA 956; **5.** Isolado BA 1244. A seta indica o fragmento de interesse amplificado de aproximadamente 537 pb.

FONTE: Freitas (2012).

Figura 7 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% dos fragmentos amplificados em reações de PCR para detecção do gene *pilV* em isolados de aEPEC.

Gel corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador com luz ultravioleta. Canaletas: **PM** – Padrão molecular 1 Kb DNA Ladder; **1.** Isolado C1096 (controle positivo); **2.** Isolado C600 (controle negativo); **3.** Isolado BA 558; **4.** Isolado BA 956; **5.** Isolado BA 1244. A seta indica o fragmento de interesse amplificado de aproximadamente 1194 pb.

FONTE: Freitas (2012).

Após a confirmação da presença dos genes fimbriais nos três isolados, foi realizada a pesquisa dos demais genes que compõem o operon Pil. Em conjunto, esses resultados demonstraram que os três isolados apresentaram amplificação para os nove genes do operon: *pilL* (907 pb), *pilM* (400 pb), *pilN* (1014 pb), *pilQ* (998 pb), *pilR* (1030 pb), *pilS* (537 pb), *pilT* (449 pb), *pilU* (416 pb), *pilV* (1194 pb), assim como para o gene *rpoA* (656 pb), utilizado como controle das reações de RT-PCR (Figuras 9, 10 e 11). Uma vez que a cepa C1096 alberga o operon Pil (DUDLEY et al., 2006), esta também apresentou amplificação para os nove genes, além do gene *rpoA* (Figura 8).

Figura 8 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% dos fragmentos amplificados em reações de PCR para detecção da presença dos genes do operon Pil no isolado C1096.

Gel corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador com luz ultravioleta. Canaletas: **PM** – Padrão molecular 1 Kb Plus DNA Ladder; **1.** Gene *pilL* (907 pb); **2.** Gene *pilM* (400 pb); **3.** Gene *pilN* (1014 pb); **4.** Gene *pilQ* (998 pb); **5.** Gene *pilR* (1030 pb); **6.** Gene *pilS* (537 pb); **7.** Gene *pilT* (449 pb); **8.** Gene *pilU* (416 pb); **9.** Gene *pilV* (1194 pb); **10.** Gene *rpoA* (656 pb).

FONTE: Freitas (2012).

Figura 9 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% dos fragmentos amplificados em reações de PCR para detecção da presença dos genes do operon Pil no isolado BA 558.

Gel corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador com luz ultravioleta. Canaletas: **PM** – Padrão molecular 1 Kb Plus DNA Ladder; **1.** Gene *pilL* (907 pb); **2.** Gene *pilM* (400 pb); **3.** Gene *pilN* (1014 pb); **4.** Gene *pilQ* (998 pb); **5.** Gene *pilR* (1030 pb); **6.** Gene *pilS* (537 pb); **7.** Gene *pilT* (449 pb); **8.** Gene *pilU* (416 pb); **9.** Gene *pilV* (1194 pb); **10.** Gene *rpoA* (656 pb).

FONTE: Freitas (2012).

Figura 10 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% dos fragmentos amplificados em reações de PCR para detecção da presença dos genes do operon Pil no isolado BA 956.

Gel corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador com luz ultravioleta. Canaletas: **PM** – Padrão molecular 1 Kb Plus DNA Ladder; **1.** Gene *pilL* (907 pb); **2.** Gene *pilM* (400 pb); **3.** Gene *pilN* (1014 pb); **4.** Gene *pilQ* (998 pb); **5.** Gene *pilR* (1030 pb); **6.** Gene *pilS* (537 pb); **7.** Gene *pilT* (449 pb); **8.** Gene *pilU* (416 pb); **9.** Gene *pilV* (1194 pb); **10.** Gene *rpoA* (656 pb).

FONTE: Freitas (2012).

Figura 11 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% dos fragmentos amplificados em reações de PCR para detecção da presença dos genes do operon Pil no isolado BA 1244.

Gel corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador com luz ultravioleta. Canaletas: **PM** – Padrão molecular 1 Kb Plus DNA Ladder; **1.** Gene *pilL* (907 pb); **2.** Gene *pilM* (400 pb); **3.** Gene *pilN* (1014 pb); **4.** Gene *pilQ* (998 pb); **5.** Gene *pilR* (1030 pb); **6.** Gene *pilS* (537 pb); **7.** Gene *pilT* (449 pb); **8.** Gene *pilU* (416 pb); **9.** Gene *pilV* (1194 pb); **10.** Gene *rpoA* (656 pb).

FONTE: Freitas (2012).

4.2 Análise de transcrição dos genes do operon Pil em isolados de aEPEC

Além da pesquisa dos genes do operon Pil através da técnica de PCR, havia a necessidade de se confirmar se esses genes estavam realmente sendo transcritos. Para isso foi realizado o ensaio de RT-PCR utilizando-se o cDNA desses isolados, a partir da extração de seus RNAs. De acordo com as figuras 13 e 14, podemos observar que os genes *pilL*, *pilM*, *pilN*, *pilQ*, *pilR*, *pilS*, *pilT*, *pilU* e *pilV* estão sendo transcritos nos isolados BA 558 e BA 956 na presença da enzima *Transcriptase Reversa* (TR). De acordo com a figura 15 podemos observar que a transcrição dos genes do operon Pil não ocorre no isolado BA 1244. A transcrição do operon Pil também pode ser observada na cepa C1096, utilizada como controle positivo nas reações (Figura 12).

Figura 12 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% dos fragmentos amplificados em reações de PCR após a transcrição dos genes do operon Pil do isolado C1096.

Gel corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador com luz ultravioleta. Canaletas: **PM** – Padrão molecular 1 Kb Plus DNA Ladder; **1 e 2**. Gene *pilL* (907 pb), na presença e na ausência da enzima TR; **3 e 4**. Gene *pilM* (400 pb) na presença e na ausência da enzima TR; **5 e 6**. Gene *pilN* (1014 pb) na presença e na ausência da enzima TR; **7 e 8**. Gene *pilQ* (998 pb) na presença e na ausência da enzima TR; **9 e 10**. Gene *pilR* (1030 pb) na presença e na ausência da enzima TR; **11 e 12**. Gene *pilS* (537 pb) na presença e na ausência da enzima TR; **13 e 14**. Gene *pilT* (449 pb) na presença e na ausência da enzima TR; **15 e 16**. Gene *pilU* (416 pb); **17 e 18**. Gene *pilV* (1194 pb) na presença e na ausência da enzima TR.

FONTE: Freitas (2012).

Figura 13 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% dos fragmentos amplificados em reações de PCR após a transcrição dos genes do operon Pil do isolado BA 558.

Gel corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador com luz ultravioleta. Canaletas: **PM** – Padrão molecular 1 Kb Plus DNA Ladder; **1 e 2.** Gene *pilL* (907 pb), na presença e na ausência da enzima TR; **3 e 4.** Gene *pilM* (400 pb) na presença e na ausência da enzima TR; **5 e 6.** Gene *pilN* (1014 pb) na presença e na ausência da enzima TR; **7 e 8.** Gene *pilQ* (998 pb) na presença e na ausência da enzima TR; **9 e 10.** Gene *pilR* (1030 pb) na presença e na ausência da enzima TR; **11 e 12.** Gene *pilS* (537 pb) na presença e na ausência da enzima TR; **13 e 14.** Gene *pilT* (449 pb) na presença e na ausência da enzima TR; **15 e 16.** Gene *pilU* (416 pb); **17 e 18.** Gene *pilV* (1194 pb) na presença e na ausência da enzima TR.

FONTE: Freitas (2012).

Figura 14 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% dos fragmentos amplificados em reações de PCR após a transcrição dos genes do operon Pil do isolado BA 956.

Gel corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador com luz ultravioleta. Canaletas: **PM** – Padrão molecular 1 Kb Plus DNA Ladder; **1 e 2.** Gene *pilL* (907 pb), na presença e na ausência da enzima TR; **3 e 4.** Gene *pilM* (400 pb) na presença e na ausência da enzima TR; **5 e 6.** Gene *pilN* (1014 pb) na presença e na ausência da enzima TR; **7 e 8.** Gene *pilQ* (998 pb) na presença e na ausência da enzima TR; **9 e 10.** Gene *pilR* (1030 pb) na presença e na ausência da enzima TR; **11 e 12.** Gene *pilS* (537 pb) na presença e na ausência da enzima TR; **13 e 14.** Gene *pilT* (449 pb) na presença e na ausência da enzima TR; **15 e 16.** Gene *pilU* (416 pb); **17 e 18.** Gene *pilV* (1194 pb) na presença e na ausência da enzima TR.

FONTE: Freitas (2012).

Figura 15 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% dos fragmentos amplificados em reações de PCR após a transcrição dos genes do operon Pil do isolado BA 1244.

Gel corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador com luz ultravioleta. Canaletas: **PM** – Padrão molecular 1 Kb Plus DNA Ladder; **1 e 2**. Gene *pilL* (907 pb), na presença e na ausência da enzima TR; **3 e 4**. Gene *pilM* (400 pb) na presença e na ausência da enzima TR; **5 e 6**. Gene *pilN* (1014 pb) na presença e na ausência da enzima TR; **7 e 8**. Gene *pilQ* (998 pb) na presença e na ausência da enzima TR; **9 e 10**. Gene *pilR* (1030 pb) na presença e na ausência da enzima TR; **11 e 12**. Gene *pilS* (537 pb) na presença e na ausência da enzima TR; **13 e 14**. Gene *pilT* (449 pb) na presença e na ausência da enzima TR; **15 e 16**. Gene *pilU* (416 pb); **17 e 18**. Gene *pilV* (1194 pb) na presença e na ausência da enzima TR.

FONTE: Freitas (2012).

A tabela 4 resume os dados obtidos a partir das reações de RT-PCR dos genes do operon Pil, utilizando os cDNA dos isolados de aEPEC como molde. Com base nesses resultados de caracterização molecular, as amostras BA 558 e BA 956 foram selecionadas para dar continuidade ao estudo, e investigar o possível papel das estruturas fimbriais PilS e PilV em aEPEC.

Tabela 4 – Genes transcritos do operon Pil encontrados nos isolados de aEPEC.

Isolados	Genes pesquisados								
	<i>pilL</i>	<i>pilM</i>	<i>pilN</i>	<i>pilQ</i>	<i>pilR</i>	<i>pilS</i>	<i>pilT</i>	<i>pilU</i>	<i>pilV</i>
BA 558	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BA 956	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BA 1244	-	-	-	-	-	-	-	-	-

FONTE: Freitas (2012).

A transcrição do gene *rpoA* também foi confirmada por RT-PCR, utilizando como molde os cDNAs obtidos dos isolados de aEPEC. Como podemos observar na figura 16, o gene *rpoA* foi amplificado na presença da enzima transcriptase reversa.

Figura 16 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% dos fragmentos amplificados em reações de PCR após a transcrição do gene *rpoA*.

Gel corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador com luz ultravioleta. Canaletas: **PM** – Padrão molecular 1 Kb Plus DNA Ladder; **1 e 2**. Isolado C1096 na presença e na ausência da enzima TR; **3 e 4**. Isolado BA 558 na presença e na ausência da enzima TR; **5 e 6**. Isolado BA 956 na presença e na ausência da enzima TR; **7 e 8**. Isolado BA 1244 na presença e na ausência da enzima TR. A seta indica o fragmento de interesse amplificado de aproximadamente 656 pb.

FONTE: Freitas (2012).

4.3 Clonagem dos fragmentos *pilS* e *pilV* em vetor pGEM-T Easy

Os fragmentos amplificados dos genes *pilS* e *pilV* foram ligados ao vetor pGEM-T Easy e transformados por choque térmico em células JM109 competentes. Colônias brancas resultantes da transformação foram selecionadas aleatoriamente, sendo testadas por PCR para confirmação da clonagem, como podemos observar nas figuras 17 e 18, com a amplificação de fragmentos com aproximadamente 537 pb para *pilS* e 1194 pb para *pilV*.

Figura 17 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% dos fragmentos amplificados em reação de PCR do gene *pilS* para confirmação dos clones pNaS.

Gel corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador com luz ultravioleta. Canaletas: **PM** – Padrão molecular 1 Kb DNA Ladder; **1.** Isolado C1096 (controle positivo); **2.** Isolado BA 558 clone 1; **3.** Isolado BA 558 clone 1*; **4.** Isolado BA 558 clone 2; **5.** Isolado BA 558 clone 3; **6.** Isolado BA 956 clone 1; **7.** Isolado BA 956 clone 2. A seta indica o fragmento de interesse amplificado de aproximadamente 537 pb.

FONTE: Freitas (2012).

Figura 18 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% dos fragmentos amplificados em reação de PCR do gene *pilV* para confirmação dos clones pNaV.

Gel corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador com luz ultravioleta. Canaletas: **PM** – Padrão molecular 1 Kb DNA Ladder; **1.** Isolado BA 558 clone 1; **2.** Isolado BA 558 clone 2; **3.** Isolado BA 558 clone 3; **4.** Isolado BA 558 clone 4; **5.** Isolado BA 558 clone 5; **6.** Isolado BA 956 clone 1; **7.** Isolado BA 956 clone 2; **8.** Isolado BA 956 clone 3; **9.** Isolado BA 956 clone 4; **10.** Isolado BA 956 clone 5. A seta indica o fragmento de interesse amplificado de aproximadamente 1194 pb.

FONTE: Freitas (2012).

Dos vários clones originados, alguns foram escolhidos aleatoriamente para extração plasmidial e análise de restrição. Após seleção, o plasmídeo recombinante foi extraído, digerido, purificado e submetido à eletroforese em gel de agarose a 0,8%. A partir da análise de restrição realizada com as enzimas BamHI e HindIII, verificou-se a presença de um fragmento de, aproximadamente, 3015 pb referente ao vetor pGEM-T Easy, um fragmento de, aproximadamente, 537 pb referente ao gene *pilS*, como também um fragmento de, aproximadamente, 1194 pb referente ao gene *pilV* (Figura 19).

Figura 19 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% da digestão dos clones pNaS e pNaV com as enzimas BamHI e HindIII.

Gel corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador com luz ultravioleta. Canaletas: **PM** – Padrão molecular 1 Kb DNA Ladder; **1 e 3**. Clone 2 do plasmídeo BA 558; **2 e 4**. Clone 2 do plasmídeo BA 956. As setas indicam os fragmentos de interesse liberados.

FONTE: Freitas (2012).

Para verificar a identidade entre as sequências dos genes fimbriais clonados no vetor pGEM-T Easy com as respectivas sequências presentes no plasmídeo pSERB1, assim como a fase de leitura e a presença de possíveis mutações, foram realizadas reações de sequenciamento dos clones selecionados de cada isolado.

Os resultados indicaram que todas as sequências analisadas apresentaram 100% de identidade entre os genes *pilS* e *pilV* clonados e os genes contidos no plasmídeo pSERB1 de EAEC atípica, confirmando a clonagem em fase de leitura correta e ausência de mutações.

Embora as análises tenham sido feitas nos dois isolados testados, as tabelas 5 e 6 apresentam os resultados dos alinhamentos entre os fragmentos amplificados do isolado BA 558 e as sequências dos genes *pilS* e *pilV* presentes no plasmídeo pSERB1. Uma vez confirmado o sucesso da clonagem, os plasmídeos recombinantes foram denominados pNaS (para *pilS*) e pNaV (para *pilV*).

Tabela 5 – Alinhamento entre as sequências do gene *pilS* e dos insertos sequenciados a partir do clone pNaS_558.

pilS	ATGAGCGTCATAACCTGTTCGTATTTCAGAACATAATATTCGTCACCTTCAGAACGATGAT	60
pNaS_558	ATGAGCGTCATAACCTGTTCGTATTTCAGAACATAATATTCGTCACCTTCAGAACGATGAT	60

pilS	AAAGGCATGACCCTGCTGGAAGTCCTCGGTGTTCTGGTCGTCGCTGCCATTGTTATTGGT	120
pNaS_558	AAAGGCATGACCCTGCTGGAAGTCCTCGGTGTTCTGGTCGTCGCTGCCATTGTTATTGGT	120

pilS	GCCGTGATGGGACTTATGTCCGATACCCTGTCTCTTCAGACAACCAGAAGGAACCTCAA	180
pNaS_558	GCCGTGATGGGACTTATGTCCGATACCCTGTCTCTTCAGACAACCAGAAGGAACCTCAA	180

pilS	AACCTGCAGACAATCGCCACCAAAATGAAAGCCAGAAATTCAGGGGCAGTATACAGGT	240
pNaS_558	AACCTGCAGACAATCGCCACCAAAATGAAAGCCAGAAATTCAGGGGCAGTATACAGGT	240

pilS	ACTGACTACGTCAAAAATCCTGACCGAAAGTGGTGGCCTGCCTGCCGATATGATCGCCGGT	300
pNaS_558	ACTGACTACGTCAAAAATCCTGACCGAAAGTGGTGGCCTGCCTGCCGATATGATCGCCGGT	300

pilS	GGTAATAAGGCGAAAAATGCCTGGGGTGGTGC GGTAACCATCAAAGTCAGTTCAGATAAA	360
pNaS_558	GGTAATAAGGCGAAAAATGCCTGGGGTGGTGC GGTAACCATCAAAGTCAGTTCAGATAAA	360

pilS	TACTCCTACGTTATTGAATCCAGCAATGTGCCGAAGAAAACTGTATTGATCTGGTCACC	420
pNaS_558	TACTCCTACGTTATTGAATCCAGCAATGTGCCGAAGAAAACTGTATTGATCTGGTCACC	420

pilS	AGCCTGCGCAGTTCATCCATGTTTACAAAAATCAACGGCAATGTGACGAATAAAGTTGAC	480
pNaS_558	AGCCTGCGCAGTTCATCCATGTTTACAAAAATCAACGGCAATGTGACGAATAAAGTTGAC	480

pilS	CCGTCTACAGTATGTAACGCAGATAAAACTACTATCAAAC TGGAACCAACAGTTAA	537
pNaS_558	CCGTCTACAGTATGTAACGCAGATAAAACTACTATCAAAC TGGAACCAACAGTTAA	537

FONTE: Freitas (2012).

Tabela 6 – Alinhamento entre as sequências do gene *pilV* e dos insertos sequenciados a partir do clone pNaV_558.

		(Continua)
<i>pilV</i>	ATGCAAAAAGACAACGATAAAGGTTTTGCACTTCTTGAAATTCTGGGAGGACTGGTTGTC	60
pNaV_558	ATGCAAAAAGACAACGATAAAGGTTTTGCACTTCTTGAAATTCTGGGAGGACTGGTTGTC	60

<i>pilV</i>	ATCAGCCTGCTCATGCCGCTGTTCTGGTCTTACATTGAAGACTACCTGAATGAAATGCGC	120
pNaV_558	ATCAGCCTGCTCATGCCGCTGTTCTGGTCTTACATTGAAGACTACCTGAATGAAATGCGC	120

<i>pilV</i>	AACCAGAGCGCCGCATTTTCATGCAGATGCCTACAATACTGCAGCCAGGACCTACATCGCC	180
pNaV_558	AACCAGAGCGCCGCATTTTCATGCAGATGCCTACAATACTGCAGCCAGGACCTACATCGCC	180

<i>pilV</i>	GATAACAATGCCCGCCTGCATAGTGAACGCTTCCTGCCACCTTCACGGCGGATGAGTTA	240
pNaV_558	GATAACAATGCCCGCCTGCATAGTGAACGCTTCCTGCCACCTTCACGGCGGATGAGTTA	240

<i>pilV</i>	ATCCGGAAGGATATCTGAAGGCTCTTAACCGCTCGCCCTTTGGGCAGAGTTATACCACC	300
pNaV_558	ATCCGGAAGGATATCTGAAGGCTCTTAACCGCTCGCCCTTTGGGCAGAGTTATACCACC	300

<i>pilV</i>	GGCATCCGTCGTAATACGAGTACCGGTCGTCTGGAGGCCCTGACCTGCTCCACCGGAGGG	360
pNaV_558	GGCATCCGTCGTAATACGAGTACCGGTCGTCTGGAGGCCCTGACCTGCTCCACCGGAGGG	360

<i>pilV</i>	GAGAATATCAAAGACGATGCCCTGCGCAGTATCGCCAGCCAGCTCCCCAGTCTGGGCGGA	420
pNaV_558	GAGAATATCAAAGACGATGCCCTGCGCAGTATCGCCAGCCAGCTCCCCAGTCTGGGCGGA	420

<i>pilV</i>	TTTATAGGAAAAAATGGCACAGCAACCGGTGTTTTTGGTGGATGGACAGATAAACCCGGC	480
pNaV_558	TTTATAGGAAAAAATGGCACAGCAACCGGTGTTTTTGGTGGATGGACAGATAAACCCGGC	480

<i>pilV</i>	GACTATGGACTCAGCTGCAATGGCGGGCACATCGCCATCGTAATGATGGGTGATGACCTG	540
pNaV_558	GACTATGGACTCAGCTGCAATGGCGGGCACATCGCCATCGTAATGATGGGTGATGACCTG	540

<i>pilV</i>	CAGGAAAGCGATCGCCTGTATCGCTTTCAGGTACCGGGACGACCGGAGCTGAACCAGATG	600
pNaV_558	CAGGAAAGCGATCGCCTGTATCGCTTTCAGGTACCGGGACGACCGGAGCTGAACCAGATG	600

<i>pilV</i>	AACACGGCCATCAATATGGGAGGGAACAACCTGAACAATGCAGGAAACATCAATGGACAA	660
pNaV_558	AACACGGCCATCAATATGGGAGGGAACAACCTGAACAATGCAGGAAACATCAATGGACAA	660

<i>pilV</i>	AGTGCAAACTGAAAAGGTGATGTTACAAGTAAAAACGGCTGGTTAATCACCAAAAATGAT	720
pNaV_558	AGTGCAAACTGAAAAGGTGATGTTACAAGTAAAAACGGCTGGTTAATCACCAAAAATGAT	720

<i>pilV</i>	AAAGGCTGGAAGAACATCACCTATGGTGGCGGTTTTACGATGACAGACAGCCAGTGGATA	780
pNaV_558	AAAGGCTGGAAGAACATCACCTATGGTGGCGGTTTTACGATGACAGACAGCCAGTGGATA	780

<i>pilV</i>	CGCGCAGTCGGTGGTAAAGGAATTATAACCACAGGGGAAATCAAAGGAGGAAAAGTCAGT	840
pNaV_558	CGCGCAGTCGGTGGTAAAGGAATTATAACCACAGGGGAAATCAAAGGAGGAAAAGTCAGT	840

<i>pilV</i>	GGGGGGACAGTCCGGTCTGACGGTCGCCTTTCCACAGGTGAGTATTTACAGCTGGATAAA	900
pNaV_558	GGGGGGACAGTCCGGTCTGACGGTCGCCTTTCCACAGGTGAGTATTTACAGCTGGATAAA	900

(Conclusão)

<i>pilV</i>	ACAGCCGTAGCAAATACAAAGTGTTACCAGATGGACTTGTAGGCCGCGACAGCAAAGGG	960
pNaV_558	ACAGCCGTAGCAAATACAAAGTGTTACCAGATGGACTTGTAGGCCGCGACAGCAAAGGG	960

<i>pilV</i>	ACAATACTTTCGTGCCAATCCGGTACGTGGCGGACAATAGGTGGAAAAC TCAAAGTTACT	1020
pNaV_558	ACAATACTTTCGTGCCAATCCGGTACGTGGCGGACAATAGGTGGAAAAC TCAAAGTTACT	1020

<i>pilV</i>	CAGCTTTCCTCCACAGGTTATCTGGGGCAATTCGACTTCTGTGCCATTGCCAGAATGGGC	1080
pNaV_558	CAGCTTTCCTCCACAGGTTATCTGGGGCAATTCGACTTCTGTGCCATTGCCAGAATGGGC	1080

<i>pilV</i>	AACGCAGAGGATGCCCCACTACTGCCAGGTAGTTGAGAGCCCAGCAGGTTACGCAAATGG	1140
pNaV_558	AACGCAGAGGATGCCCCACTACTGCCAGGTAGTTGAGAGCCCAGCAGGTTACGCAAATGG	1140

<i>pilV</i>	TACAAATACGAGCATAAGACAGGTTGTATTGCGTCGTGTGTAACGCTCAATTAA	1194
pNaV_558	TACAAATACGAGCATAAGACAGGTTGTATTGCGTCGTGTGTAACGCTCAATTAA	1194

 FONTE: Freitas (2012).

4.4 Clonagem dos fragmentos *pilS* e *pilV* em vetor de expressão pET28a

Após análise do sequenciamento dos genes *pilS* e *pilV* em vetor de clonagem pGEM-T, foi selecionado apenas um isolado para dar continuidade às etapas de clonagem de ambos os genes em vetor de expressão. O critério de seleção baseou-se no perfil genético fimbrial e no padrão de adesão de cada amostra, sendo, portanto o isolado BA 558 escolhido como modelo.

A ligação dos insertos *pilS* e *pilV* do isolado BA 558 em vetor de expressão pET28a, originou os plasmídeos p558S e p558V, respectivamente. Uma vez que essas reações resultaram em um grande número de clones, alguns foram selecionados aleatoriamente para confirmação dos resultados da clonagem por PCR e, submetidos à eletroforese em gel de agarose a 0,8%. Dos clones analisados para o gene *pilS*, todos eles apresentaram um fragmento de aproximadamente 537 pb (Figura 20). Já para o gene *pilV*, a maioria dos clones analisados apresentaram um fragmento de aproximadamente 1194 pb (Figura 21).

Figura 20 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% dos fragmentos amplificados em reação de PCR do gene *pilS* para confirmação dos clones p558S.

Gel corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador com luz ultravioleta. Canaletas: **PM** – Padrão molecular 1 Kb DNA Ladder; **1.** Isolado C1096 (controle positivo); **2.** Clone 1; **3.** Clone 2; **4.** Clone 3; **5.** Clone 4; **6.** Clone 5; **7.** Clone 6; **8.** Clone 7; **9.** Clone 8; **10.** Clone 9. A seta indica o fragmento de interesse amplificado de aproximadamente 537 pb.

FONTE: Freitas (2012).

Figura 21 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% dos fragmentos amplificados em reação de PCR do gene *pilV* para confirmação dos clones p558V.

Gel corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador com luz ultravioleta. Canaletas: **PM** – Padrão molecular 1 Kb DNA Ladder; **1.** Isolado C1096 (controle positivo); **2.** Clone 1; **3.** Clone 2; **4.** Clone 3; **5.** Clone 4; **6.** Clone 5; **7.** Clone 6. A seta indica o fragmento de interesse amplificado de aproximadamente 1094 pb.

FONTE: Freitas (2012).

Após esse resultado, foram selecionados aleatoriamente dois clones para serem submetidos à extração plasmidial e análise de restrição dos plasmídeos p558S e p558V. As enzimas BamHI e HindIII foram utilizadas para digestão e liberação dos fragmentos correspondentes aos genes *pilS* e *pilV*, confirmando o sucesso da clonagem dos insertos em vetor de expressão pET28a. Observa-se a presença de um fragmento de aproximadamente 5369 pb referente ao vetor pET28a, um fragmento de aproximadamente 537 pb referente ao gene *pilS* (Figura 22), e um fragmento de aproximadamente 1194 pb referente ao gene *pilV* (Figura 23).

Figura 22 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% da digestão dos clones p558S com as enzimas BamHI e HindIII.

Gel corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador com luz ultravioleta. Canaletas: **PM** – Padrão molecular 1 Kb DNA Ladder; **1.** Clone 1; **2.** Clone 2. As setas indicam os fragmentos de interesse liberados.

FONTE: Freitas (2012).

Figura 23 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% da digestão dos clones p558V com as enzimas BamHI e HindIII.

Gel corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador com luz ultravioleta. Canaletas: **PM** – Padrão molecular 1 Kb DNA Ladder; **1.** Clone 2; **2.** Clone 5. As setas indicam os fragmentos de interesse liberados.

FONTE: Freitas (2012).

Novamente, para confirmar a identidade entre as sequências dos genes *pilS* e *pilV* clonados no vetor pET28a foram realizadas reações de sequenciamento dos clones selecionados. Igualmente, os resultados indicaram que as sequências analisadas também apresentaram 100% de identidade entre os genes *pilS* e *pilV* clonados e os genes contidos no plasmídeo pSERB1.

As sequências de DNA dos genes *pilS* e *pilV* foram traduzidas por meio do programa *Gene Runner*® para conhecimento das sequências de aminoácidos. Com base nessas sequências, foram realizadas análises utilizando-se a ferramenta *ProtParam*, disponível no servidor *ExPasy*, para cálculos das massas moleculares e dos pontos isolelétricos. De acordo com os dados obtidos, as proteínas recombinantes PilS e PilV quando expressas em vetor de expressão pET28a, apresentam massa molecular de aproximadamente, 23 kDa e 43 kDa, respectivamente.

4.5 Expressão e purificação das proteínas PilS e PilV

Após análise do sequenciamento dos genes *pilS* e *pilV* clonados em vetor pET28a, os plasmídeos p558S e p558V foram transformados em células BL21 (DE3) competentes. Os transformantes resultantes foram escolhidos aleatoriamente para serem submetidos à indução da expressão das proteínas recombinantes, seguido da análise por SDS-PAGE a 12%. Ao compararmos as frações não-induzida (canaletas 1 e 2) e induzida (canaleta 3 e 4) notamos que houve um aumento na massa dos polipeptídeos na fração induzida (Figuras 24 e 25), confirmando o sucesso da indução por IPTG. Para determinar a localização celular da expressão das proteínas recombinantes, ao término da indução, os cultivos das células BL21 foram submetidos à lise por pressão. Observando-se as frações solúvel (canaleta 5) e insolúvel (canaleta 6), notamos que a expressão das proteínas recombinantes foi direcionada para corpúsculos de inclusão (fração insolúvel), podendo ser visualizado uma banda de aproximadamente 23 kDa para a proteína PilS, e uma banda de aproximadamente 43 kDa para a proteína PilV. A partir desses resultados houve a necessidade da utilização de um protocolo para a solubilização das proteínas recombinantes obtidas, para posteriormente serem submetidas à etapa de purificação.

Figura 24 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida-SDS a 12% do ensaio de indução de células *E. coli* BL21 (DE3) transformadas com o clone p558S.

Gel de acrilamida submetido a condições redutoras e corado com Coomassie Blue BioSafe. Canaletas: **PM** – Padrão de massa molecular Protein Mixture; **1 e 2**. Frações não-induzidas; **3 e 4**. Frações induzidas; **5**. Fração solúvel; **6**. Fração insolúvel. A seta indica a banda correspondente à proteína de interesse expressa.

FONTE: Freitas (2012).

Figura 25 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida-SDS a 12% do ensaio de indução de células *E. coli* BL21 (DE3) transformadas com o clone p558V.

Gel de acrilamida submetido a condições redutoras e corado com Coomassie Blue R250. Canaletas: **PM** – Padrão de massa molecular Protein Mixture; **1 e 2**. Frações não-induzidas; **3 e 4**. Frações induzidas; **5**. Fração solúvel; **6**. Fração insolúvel. A seta indica a banda correspondente à proteína de interesse expressa.
 FONTE: Freitas (2012).

As frações pré e pós-indução, assim como as frações solúvel e insolúvel dos extratos totais da *E. coli* BL21 também foram submetidos ao ensaio de imunodeteção de proteínas fusionadas a seis resíduos de histidina, utilizando o anticorpo murino anti-His. As figuras 26 e 27 evidenciam a presença das proteínas recombinantes contendo cauda de histidina, que podem ser visualizadas como uma banda com massa molecular de aproximadamente 23 kDa correspondente à proteína PilS (Figura 26), e uma banda com massa molecular de aproximadamente 43 kDa correspondente à proteína PilV (Figura 27).

Embora não foi possível visualizar a presença de bandas na fração solúvel (canaleta 5), conforme apresentado nos géis de poliacrilamida (Figuras 24 e 25), nota-se que por *immunoblotting* as bandas correspondentes à PilS e à PilV no sobrenadante do lisado ficam evidentes (Figuras 26 e 27). Esses resultados indicam que as proteínas recombinantes também foram expressas na fração solúvel, porém em menor quantidade. Além disso, os ensaios utilizando anticorpos monoclonais anti-His mostraram alta sensibilidade quanto à detecção das proteínas PilS e PilV.

Figura 26 – Imunodetecção com o anticorpo anti-His do ensaio de indução de células *E. coli* BL21 (DE3) transformadas com o clone p558S.

Membrana de nitrocelulose contendo as frações protéicas dos extratos celulares pré e pós-indução. Canaletas: **PM** – Padrão de massa molecular Kaleidoscope Prestained Standards; **1 e 2**. Frações não-induzidas; **3 e 4**. Frações induzidas; **5**. Fração solúvel; **6**. Fração insolúvel. A seta indica a banda correspondente à proteína de interesse detectada.

FONTE: Freitas (2012).

Figura 27 – Imunodetecção com o anticorpo anti-His do ensaio de indução de células *E. coli* BL21 (DE3) transformadas com o clone p558V.

Membrana de nitrocelulose contendo as frações protéicas dos extratos celulares pré e pós-indução. Canaletas: **PM** – Padrão de massa molecular Kaleidoscope Prestained Standards; **1 e 2**. Frações não-induzidas; **3 e 4**. Frações induzidas; **5**. Fração solúvel; **6**. Fração insolúvel. A seta indica a banda correspondente à proteína de interesse detectada.

FONTE: Freitas (2012).

Após obtenção das frações insolúveis contendo PilS e PilV, as proteínas foram submetidas à solubilização do corpúsculo de inclusão em tampão contendo ureia 8 M, e em seguida estas foram purificadas em coluna de *Níquel-Sepharose* em condições desnaturantes. Posterior à purificação, seguiu-se com a etapa de renaturação através de diálise em tampão contendo concentrações decrescentes de ureia para que as proteínas voltassem à sua conformação nativa.

A figura 28 ilustra o perfil eletroforético das etapas de purificação e renaturação da proteína PilS. Observa-se a presença de uma banda de aproximadamente 23 kDa referente à proteína de interesse tanto na fração insolúvel (canaleta 1), conforme demonstrado anteriormente, quanto nas frações eluídas com 500 mM de imidazol (canaletas 7 a 13). Nota-se que houve uma pequena perda de proteína recombinante no início da lavagem com 10 mM de imidazol (canaleta 2), ao passo que nas lavagens seguintes isso não ocorreu (canaletas 3 a 6). Também foi possível verificar a presença da proteína PilS parcialmente pura após a etapa de renaturação por diálise (canaleta 14). Apesar das diferentes concentrações de imidazol utilizada nos tampões de lavagem (10, 20, 40, 60 e 100 mM), nota-se que a purificação não resultou em uma proteína livre de contaminações, podendo ser visualizadas algumas bandas nas frações eluídas.

Figura 28 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida-SDS a 12% das etapas de purificação e renaturação da proteína PilS, a partir da fração insolúvel.

Gel de acrilamida submetido a condições redutoras e corado com Coomassie Blue R250. Canaletas: **PM** – Padrão de massa molecular Kaleidoscope Prestained Standards; **1**. Fração insolúvel; **2 a 6**. Lavagens com 10, 20, 40, 60 e 100 mM de imidazol, respectivamente; **7 a 13**. Frações 1 a 7 eluídas com 500 mM de imidazol, respectivamente; **14**. Fração purificada após renaturação por diálise. A seta indica a banda correspondente à proteína de interesse.

FONTE: Freitas (2012).

O processo de purificação de PiLS também foi analisado por ensaio de imunodetecção, utilizando o anticorpo monoclonal anti-His. Como podemos observar na figura 29, a presença da proteína recombinante, de aproximadamente 23 kDa (indicada pela seta), é evidenciada nas frações insolúvel (canaleta 1), eluídas com 500 mM de imidazol (canaletas 7 a 13), assim como na fração da proteína renaturada (canaleta 14).

Figura 29 – Imunodetecção com o anticorpo anti-His das etapas de purificação e renaturação da proteína PiLS, a partir da fração insolúvel.

Membrana de nitrocelulose contendo as frações obtidas durante as etapas de purificação e renaturação. Canaletas: **PM** – Padrão de massa molecular Kaleidoscope Prestained Standards; **1**. Fração insolúvel; **2 a 6**. Lavagens com 10, 20, 40, 60 e 100 mM de imidazol, respectivamente; **7 a 13**. Frações 1 a 7 eluídas com 500 mM de imidazol, respectivamente; **14**. Fração purificada após renaturação por diálise. A seta indica a banda correspondente à proteína de interesse.

FONTE: Freitas (2012).

A figura 30 ilustra o perfil eletroforético das etapas de purificação e renaturação da proteína PiIV. Observa-se a presença de uma banda de aproximadamente 43 kDa referente à proteína de interesse tanto na fração insolúvel (canaleta 1), conforme demonstrado anteriormente, quanto nas frações eluídas com 500 mM de imidazol (canaletas 7 a 13). Nota-se que também houve uma pequena perda da proteína recombinante no início da lavagem com 10 e 20 mM de imidazol (canaletas 2 e 3), ao passo que nas lavagens seguintes isso não ocorreu (canaletas 4 a 6). Entretanto, na etapa de renaturação houve grande perda da proteína recombinante (canaleta 14), uma vez que durante a diálise em tampão contendo 1 M de ureia acrescido de 326 mM glutatona oxidada (GSSG) ocorreu a precipitação de PiIV purificada. Com o intuito de recuperar a proteína, esta foi novamente depositada em

membrana de diálise de 14.000 Da e concentrada em polietilenoglicol (PEG). Novamente, as lavagens utilizando diferentes concentrações de imidazol (10, 20, 40, 60 e 100 mM) também não resultaram em uma proteína livre de contaminações, podendo ser visualizadas algumas bandas nas frações eluídas, porém em menores concentrações quando comparadas com as da proteína de interesse.

Figura 30 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida-SDS a 12% das etapas de purificação e renaturação da proteína PilV, a partir da fração insolúvel.

Gel de acrilamida submetido a condições redutoras e corado com Coomassie Blue R250. Canaletas: **PM** – Padrão de massa molecular Protein Mixture; **1**. Fração insolúvel; **2 a 6**. Lavagens com 10, 20, 40, 60 e 100 mM de imidazol, respectivamente; **7 a 13**. Frações 1 a 7 eluídas com 500 mM de imidazol, respectivamente; **14**. Fração purificada após renaturação por diálise. A seta indica a banda correspondente à proteína de interesse.

FONTE: Freitas (2012).

Da mesma forma, o processo de purificação de PilV também foi analisado por ensaio de imunodetecção, utilizando o anticorpo monoclonal anti-His. Como podemos observar na figura 31, a presença da proteína recombinante de aproximadamente 43 kDa (indicada pela seta) é fortemente evidenciada nas frações insolúvel (canaleta 1) e eluídas com 500 mM de imidazol (canaletas 7 a 13). Nota-se que nas frações eluídas é possível visualizar a presença de bandas inferiores a 43 kDa, indicando uma possível degradação da proteína PilV. Já na canaleta 14 é possível visualizar uma banda tênue em relação às bandas das frações eluídas (canaletas 7 a 13), indicando a perda da proteína purificada após a etapa de renaturação por diálise.

Figura 31 – Imunodetecção com o anticorpo anti-His das etapas de purificação e renaturação da proteína PilV, a partir da fração insolúvel.

Membrana de nitrocelulose contendo as frações obtidas durante as etapas de purificação e renaturação. Canaletas: **PM** – Padrão de massa molecular Kaleidoscope Prestained Standards; **1**. Fração insolúvel; **2 a 6**. Lavagens com 10, 20, 40, 60 e 100 mM de imidazol, respectivamente; **7 a 13**. Frações 1 a 7 eluídas com 500 mM de imidazol, respectivamente; **14**. Fração purificada após renaturação por diálise. A seta indica a banda correspondente à proteína de interesse.

FONTE: Freitas (2012).

4.6 Obtenção de anticorpos policlonais anti-PiLS e anti-PilV

As proteínas recombinantes obtidas após purificação e renaturação foram dosadas por espectrofotômetro e quantificadas pelo kit *Micro BCA Protein Assay* (Pierce), e suas concentrações foram estimadas em 700 µg/mL de PiLS e 200 µg/mL de PilV. Posteriormente, estas foram utilizadas como antígeno na imunização de coelhos para obtenção de anticorpos policlonais.

4.6.1 Titulação dos anticorpos anti-PiLS e anti-PilV

Para verificar o limite de detecção dos anticorpos produzidos foram realizados ensaios de ELISA indireto, a partir da diluição seriada do soro total do coelho de 1:100 até 1:12800.

Na titulação do soro anti-PiLS observou-se valores acima de 1.0 de DO até a diluição 1:6400 (Figura 32). Já a titulação do soro anti-PilV nota-se valores acima de 1.0 de DO até a

diluição 1:3200 (Figura 33). Não foi detectada a presença de anticorpos anti-PiIS e anti-PiIV nos soros pré-ímmes dos respectivos coelhos.

Figura 32 – Limite de detecção do anticorpo policlonal de coelho anti-PiIS por ensaio de ELISA indireto.

Placa de poliestireno foi sensibilizada com 15 µg/mL da proteína PiIS, e incubada com os soros pré-ímmes (**rosa**) e após a imunização (**azul**) em diferentes diluições, seguido de incubação com o soro de cabra anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase (1:5000). Como solução cromógena foi utilizada OPD com adição de H₂O₂, e a leitura foi realizada a 492 nm em leitor de ELISA.

FONTE: Freitas (2012).

Figura 33 – Limite de detecção do anticorpo policlonal de coelho anti-PiIV por ensaio de ELISA indireto.

Placa de poliestireno foi sensibilizada com 15 µg/mL da proteína PiIV, e incubada com os soros pré-imune (roxo) e após a imunização (verde) em diferentes diluições, seguido de incubação com o soro de cabra anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase (1:5000). Como solução cromógena foi utilizada OPD com adição de H₂O₂, e a leitura foi realizada a 492 nm em leitor de ELISA.

FONTE: Freitas (2012).

4.7 Detecção das proteínas recombinantes por *immunoblotting*

Sabendo-se o limite de detecção dos anticorpos policlonais anti-PiS e anti-PiIV foram avaliadas a capacidade de reatividade desses soros antes e após a adsorção por *immunoblotting*, utilizando membranas de nitrocelulose contendo 100 µg/µL das proteínas PiS e PiIV. Nas figuras 34 e 35 podemos observar que tanto o soro não adsorvido (canaleta 1), quanto o soro adsorvido cinco vezes (canaleta 2) foram capazes de reconhecer suas respectivas proteínas com alta especificidade.

Figura 34 – Imunodeteção da proteína PiIS utilizando soro de coelho anti-PiIS não-adsorvido e adsorvido.

Membrana de nitrocelulose contendo 100 µg da proteína PiIS. Canaletas: **PM** – Padrão de massa molecular Kaleidoscope Prestained Standards; **1**. Soro anti-PiIS não adsorvido; **2**. Soro anti-PiIS adsorvido 5 vezes contra BL21 (DE3). A membrana foi incubada com os respectivos soros de coelho anti-PiIS (1:100), seguido da incubação do soro de cabra anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase (1:5000), e revelado com DAB e H₂O₂. A seta indica a banda correspondente à proteína de interesse.

FONTE: Freitas (2012).

Figura 35 – Imunodeteção da proteína PiIV utilizando soro de coelho anti-PiIV não-adsorvido e adsorvido.

Membrana de nitrocelulose contendo 100 µg da proteína PiIV. Canaletas: **PM** – Padrão de massa molecular Kaleidoscope Prestained Standards; **1**. Soro anti-PiIV não adsorvido; **2**. Soro anti-PiIV adsorvido 5 vezes contra BL21 (DE3). A membrana foi incubada com os respectivos soros de coelho anti-PiIV (1:100), seguido da incubação do soro de cabra anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase (1:5000), e revelado com DAB e H₂O₂. A seta indica a banda correspondente à proteína de interesse.

FONTE: Freitas (2012).

4.8 Interação bacteriana com células HEp-2

Os isolados bacterianos BA 558 e BA 956 submetidos aos ensaios de interação com células epiteliais HEp-2 foram selecionados de acordo com os resultados apresentados na primeira etapa experimental deste trabalho, que constituiu na pesquisa dos genes fimbriais *pilS* e *pilV*, como também na análise da transcrição desses genes.

Com o intuito de inferir se as estruturas fimbriais PilS e PilV estão envolvidas no mecanismo de adesão de aEPEC às células epiteliais HEp-2, os anticorpos policlonais obtidos contra as respectivas proteínas foram testados em ensaios de inibição da adesão.

Primeiramente, foram realizados ensaios de adesão para confirmação dos fenótipos apresentados pelos isolados deste estudo. Em um segundo momento, as amostras bacterianas foram submetidas ao ensaio de inibição da adesão utilizando os soros de coelho anti-PilS, anti-PilV e anti-PilS + anti-PilV.

Após 6 horas de teste, o isolado BA 558 apresentou o fenótipo de adesão localizada (Figura 36-A), corroborando com os dados obtidos por Abe et al. (2009). Ao incubar os soros anti-PilS e anti-PilV previamente com este isolado, nota-se que não houve mudanças no padrão de adesão, podendo ser visualizado *clusters* bacterianos sobre a superfície celular (Figuras 36-B e 36-C, respectivamente). Entretanto, ao pré-incubar os soros anti-PilS e anti-PilV juntos nota-se que houve uma mudança sutil no padrão de adesão antes apresentado pelo isolado BA 558. Conforme podemos observar na figura 36-D, aparentemente as bactérias deixaram de aderir no padrão AL, formando *clusters* bacterianos mais frouxos, semelhante ao padrão ALL. Em resumo, esses resultados sugerem que a fímbria Pil auxilia na adesão bacteriana, podendo ser considerada uma fímbria acessória. Além disso, esses dados reforçam a idéia de que o fenótipo é dependente da proteína estrutural fimbrial PilS juntamente com a adesina PilV.

Figura 36 – Comparação entre os padrões de adesão e inibição da adesão da amostra BA 558 após 6 horas de incubação com células HEp-2.

Adesão e inibição da adesão da amostra BA 558 em células epiteliais HEp-2, com período de incubação de 6 horas (3 h + 3 h). Em A o padrão localizado (AL); em B a inibição da adesão com o soro de coelho anti-PiLS; em C a inibição da adesão com o soro de coelho anti-PiIV; em D a inibição da adesão com os soros de coelho anti-PiLS + anti-PiIV. Após o período de incubação as células foram lavadas, fixadas e coradas com May e Giemsa. Visualização através de microscopia de luz (objetiva 1000X).

FONTE: Freitas (2012).

O isolado BA 956 manteve o padrão não aderente (NA) quando incubado com os soros anti-PilS (Figura 37-B), anti-PilV (Figura 37-C) ou anti-PilS + anti-PilV (Figura 37-D). Esses resultados indicam que *in vitro* não é possível atribuir o papel de adesão da fímbria Pil nessa amostra, embora tenha sido comprovado que esse isolado possui os genes que codificam a fímbria e eles estão sendo transcritos.

Figura 37 – Comparação entre os padrões de adesão e inibição da adesão da amostra BA 956 após 6 horas de incubação com células HEp-2.

Adesão e inibição da adesão da amostra BA 956 em células epiteliais HEp-2, com período de incubação de 6 horas (3 h + 3 h). Em A o padrão não aderente (NA); em B a inibição da adesão com o soro de coelho anti-PilS; em C a inibição da adesão com o soro de coelho anti-PilV; em D a inibição da adesão com os soros de coelho anti-PilS + anti-PilV. Após o período de incubação as células foram lavadas, fixadas e coradas com May e Giemsa. Visualização através de microscopia de luz (objetiva 1000X).
FONTE: Freitas (2012).

Em relação ao isolado controle C1096, resultados semelhantes também foram obtidos quando comparados com os dados encontrados por Dudley et al. (2006), confirmando o padrão de adesão agregativo característico desta amostra (Figura 38-A). Ao utilizar os soros anti-PiIS (Figura 38-B), anti-PiIV (Figura 38-C) ou anti-PiIS + anti-PiIV (Figura 38-D), nota-se que houve uma pequena redução na adesão bacteriana, porém sem mudanças no padrão. Esse dado é importante do ponto de vista do reconhecimento dos soros produzidos a partir de uma amostra de aEPEC, o qual foi possível ver sua ação em uma amostra de aEAEC.

Figura 38 – Comparação entre os padrões de adesão e inibição da adesão da amostra C1096 após 6 horas de incubação com células HEp-2.

Adesão e inibição da adesão da amostra C1096 em células epiteliais HEp-2, com período de incubação de 6 horas (3 h + 3 h). Em A o padrão agregativo (AA); em B a inibição da adesão com o soro de coelho anti-PiIS; em C a inibição da adesão com o soro de coelho anti-PiIV; em D a inibição da adesão com os soros de coelho anti-PiIS + anti-PiIV. Após o período de incubação as células foram lavadas, fixadas e coradas com May e Giemsa. Visualização através de microscopia de luz (objetiva 1000X).

FONTE: Freitas (2012).

4.9 Formação de biofilme à superfície abiótica

Conforme demonstrado por Dudley et al. (2006), a fímbria Pil também está relacionada à capacidade da bactéria em aderir à superfície abiótica formando biofilme. Para verificar se os isolados BA 558 e BA 956 compartilham essa capacidade, estes foram submetidos ao teste de formação de biofilme em superfície de poliestireno através de ensaio colorimétrico com cristal violeta.

Ao analisarmos as absorbâncias podemos verificar que os isolados BA 558 e BA 956 são baixos formadores de biofilme quando comparados à amostra controle EAEC 042. Já a amostra C1096 foi capaz de produzir biofilme, porém em quantidade inferior quando comparada com a amostra 042, a qual apresenta um potencial bem superior em relação aos demais isolados (acima de 1,5 de DO a 595 nm).

Além de verificar a capacidade de formação de biofilme, estes isolados também foram avaliados quanto à capacidade de inibição ao serem pré-incubados com os soros de coelho anti-PilS e anti-PilV. Ao compararmos as absorbâncias obtidas observa-se que houve uma redução na formação de biofilme da amostra C1096 quando pré-incubada, respectivamente, com os soros anti-PilS ($p = 0,0375$) e anti-PilV ($p = 0,0069$), segundo o teste t de Student. A análise estatística utilizando o teste ANOVA também revelou diferença significativa quando comparadas as absorbâncias de formação e inibição do biofilme da amostra C1096 ($p = 0,0152$). Nota-se ainda que a inibição da formação do biofilme não revelou diferença significativa quando analisadas as absorbâncias das amostras BA 558 e BA 956, uma vez que ambas formaram pouco biofilme.

Esses resultados indicam que, embora as amostras de aEPEC não são boas formadoras de biofilme, os anticorpos produzidos contra as proteínas PilS e PilV à partir da amostra BA 558, mostraram-se específicos quando testados quanto à sua capacidade de inibição em relação à amostra de EAEC C1096.

Figura 39 – Capacidade de formação e inibição de biofilme em poliestireno apresentada pelas amostras de aEPEC.

Gráfico das absorbâncias em comprimento de onda de 595 nm das suspensões de cristal violeta em etanol 95%, correspondente às colorações dos biofilmes formados em placa de poliestireno após 24 horas de incubação a 37 °C em condições estáticas. As amostras 042 e C600 foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente. As barras representam o erro padrão da média de dois experimentos independentes realizados em quadruplicata. Os valores foram significativos para $p < 0,05$, onde * $p = 0,0375$ e ** $p = 0,0069$.

FONTE: Freitas (2012).

4.10 Interação bacteriana por mecanismo de autoagregação

Para verificar se o fenômeno de autoagregação também é compartilhado por amostras de aEPEC, foi realizada uma cinética das amostras em cultura líquida afim de verificar se este processo é dependente de densidade celular. Dessa maneira, o perfil de sedimentação de cada amostra foi analisado através da absorbância em comprimento de onda de 600 nm. Para isso os isolados de aEPEC BA 558 e BA 956, assim como as amostras de EAEC C1096 e 042, e o isolado C600 foram cultivados em meio líquido e, submetidos ao teste.

Ao analisar as absorvâncias obtidas, podemos observar que apenas a amostra 042 de EAEC foi capaz de formar agregados bacterianos em cultura líquida, sendo considerada autoagregativa. Nota-se que a densidade celular deste isolado diminuiu pela metade logo após a primeira hora do teste, e nos períodos subsequentes a densidade celular também diminuiu gradativamente. Por outro lado, os demais isolados testados não se mostraram autoagregativos, conforme podemos observar no gráfico, já que as densidades ópticas obtidas aumentaram com o passar do tempo.

Figura 40 – Capacidade de autoagregação das amostras de aEPEC.

Gráfico das absorvâncias obtidas após diferentes intervalos de tempo das amostras de aEPEC. As amostras 042 e C600 foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

FONTE: Freitas (2012).

5 DISCUSSÃO

Escherichia coli é sem dúvida uma das espécies bacterianas mais bem estudadas, devido a sua incrível capacidade de se adaptar a diferentes ambientes. Em termos de diversidade, as *E. coli* diarreiogênicas apresentam características singulares quanto aos mecanismos de virulência e patogenicidade (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Cada patotipo de DEC alberga diferentes determinantes de virulência, os quais podem ter sido adquiridos por elementos genéticos móveis como plasmídeos, transposons, bacteriófagos e ilhas de patogenicidade. Além desse compartilhamento de genes, os patotipos de DEC diferem quanto aos aspectos epidemiológicos, síndromes clínicas, sorotipos, mecanismos de adesão e produção de toxinas (NATARO; KAPER, 1998; ROBINS-BROWNE, 1994).

Dentre as *E. coli* que causam diarreia, as EPEC se destacam pela diversidade de fatores de virulência. Nas últimas décadas, vários estudos vêm sendo conduzidos com o intuito de contribuir para a elucidação das características moleculares das EPEC, e assim compreender melhor os mecanismos de patogênese desenvolvidos por este patotipo tão heterogêneo. Dados epidemiológicos apontam que as aEPEC têm sido frequentemente isoladas em surtos de diarreia, os quais vêm aumentando significativamente nos últimos anos em países desenvolvidos e em desenvolvimento. (HERNANDES et al., 2009; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002).

Na patogênese bacteriana, a adesão é fundamental para o estabelecimento do patógeno e o desenvolvimento da doença. Após atravessar a barreira gástrica, as EPEC aderem à mucosa intestinal, e esta ação desencadeia alterações no epitélio que levam o indivíduo à diarreia (NATARO; KAPER, 1996). Essa interação é mediada por estruturas protéicas bacterianas, denominadas adesinas, as quais reconhecem e se ligam a receptores específicos presentes na superfície da célula hospedeira. As adesinas podem ser classificadas em não fimbriais, que são proteínas de membrana externa, ou fimbriais (BRINTON, 1965). Vários estudos vêm demonstrando a participação dessas estruturas adesivas durante o processo de infecção bacteriana. Dessa maneira, a pesquisa e a caracterização de adesinas fimbriais contribuem de forma positiva para o conhecimento do processo de interação bactéria-célula hospedeira.

Os diversos tipos de fímbrias são classificados em famílias ou tipos, numerados de I a IV (TORRES; ZHOU; KAPER, 2005). A família de fímbrias do tipo IV é dividida em dois grupos: tipo IV A e tipo IV B, entretanto as fímbrias do tipo IV B são expressas exclusivamente por patógenos gram-negativos que colonizam o trato gastrointestinal humano, provocando a diarreia. Contudo, essa classe de fímbrias também pode ser encontrada em outras categorias de *E. coli* diarreiogênicas. Por exemplo, em tEPEC a fímbria BFP é responsável pelo padrão de adesão localizado dessas bactérias às células epiteliais, além de promover e estabilizar a aderência bacteriana dentro das microcolônias (GIRÓN; HO; SCHOOLNIK, 1991).

Em geral, amostras de aEPEC carregam vários operons que codificam diferentes adesinas fimbriais, as quais podem ser expressas individualmente ou em combinação com outros fatores de virulência, potencializando assim o processo de infecção bacteriana (HERNANDES et al., 2011). Porém até o presente momento não foi descrito nenhum fator de virulência exclusivo desta categoria.

Nesse contexto, a busca por genes que codificam adesinas fimbriais em aEPEC determinaram os objetivos iniciais de um estudo conduzido no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan. Neste projeto, intitulado “Pesquisa de adesinas fimbriais em isolados de *Escherichia coli* enteropatogênica atípica”, foi avaliada a presença de 31 genes fimbriais em 72 amostras de aEPEC, onde parte dos resultados foram obtidos por Freitas (2008). Em continuidade a este estudo, resolvemos investigar melhor o papel da fímbria Pil encontrada em algumas amostras, e dessa maneira, surgiram os objetivos do presente estudo.

Inicialmente, foi realizada uma nova pesquisa dos genes *pilS* e *pilV* para confirmar sua presença nos 72 isolados de aEPEC. A nova síntese de iniciadores dos genes fimbriais baseou-se na sequência completa de *pil*, permitindo assim que estes genes fossem amplificados na íntegra, uma vez que posteriormente seriam utilizados para clonagem e expressão das respectivas proteínas. Estes resultados demonstraram que *pilS* está presente em 5 isolados (3,6%), e *pilV* em 3 isolados (2,1%). A ausência de amplificação do gene *pilV* em alguns isolados de EPECa que possuem o gene *pilS* sugere a ocorrência de uma deleção neste operon. Outra possibilidade é a existência de subtipos de *pilV* que codifiquem adesinas com variações na região C-terminal da proteína (CROSSMAN et al., 2010). Essas ocorrências com *pilV* podem interferir no processo de adesão da fímbria, além de impossibilitar a amplificação deste gene por PCR. A porcentagem dos genes *pil* encontrados em aEPEC foi menor do que a detectada por Dudley et al. (2006), onde foi relatado que os genes que

codificam a fímbria do tipo IV são encontrados em, aproximadamente, 10% das amostras de EAEC (DUDLEY et al., 2006).

Entretanto, o objetivo inicial deste trabalho foi investigar o papel da fímbria Pil em amostras que contém ambos os genes fimbriais. Por isso, foram selecionados os isolados BA 558, BA 956 e BA 1244 como objetos de estudo. Outro critério de seleção baseou-se no perfil genético fimbrial que cada amostra apresenta, e o tipo de interação com células epiteliais *in vitro*.

Dados na literatura também relatam a presença dos genes *pil* em uma amostra de EAEC atípica, denominada C1096 (sorogrupo O4:HNT), a qual não apresenta nenhum dos membros do *Regulon AggR* que classificam as EAEC típicas (COBELJIC et al., 1996; CZECHULIN et al., 1999). Além disso, esse isolado carrega um grande plasmídeo (pSERB1), o qual codifica uma fímbria do tipo IV, que desempenha funções de conjugação, formação de biofilme e adesão às superfícies biótica e abiótica (DUDLEY et al., 2006). Portanto, a amostra C1096 foi utilizada como controle positivo em todos os ensaios realizados neste estudo.

Uma vez selecionadas as amostras de aEPEC, foi realizada a pesquisa dos demais genes que compõem o operon Pil. Os resultados de amplificação por PCR demonstraram que os três isolados continham os nove genes do operon, sendo eles *pilL*, *pilM*, *pilN*, *pilQ*, *pilR*, *pilS*, *pilT*, *pilU* e *pilV*. Entretanto, somente a amplificação desses genes por PCR não indica a funcionalidade dos mesmos.

Vários métodos podem ser utilizados para a detecção e a caracterização de moléculas de RNA específicas, dentre eles o ensaio de RT-PCR é capaz de detectar quantidades diminutas de RNA, convertendo cadeia simples de RNA em cDNA (WANG; DOYLE; MARK, 1989). Um importante controle endógeno utilizado nas reações de RT-PCR é o gene *rpoA*. Expresso constitutivamente por todas as células, os genes *housekeeping*, assim denominados, são responsáveis pela manutenção do metabolismo celular presente em todas as células eucarióticas e procarióticas. Ao amplificar o gene *rpoA* nos isolados bacterianos, utilizando como molde o DNA e o cDNA de cada amostra, foi demonstrada a ocorrência da expressão gênica na presença da enzima TR, comprovando assim que as funções metabólicas celulares se mantêm ativas. Por outro lado, na ausência da enzima TR ficou evidente que durante o processo de obtenção do RNA bacteriano não houve qualquer tipo de contaminação com possíveis fragmentos de DNA genômico.

Ensaio de RT-PCR foram realizados e os resultados indicaram que os nove genes *pil* estão sendo transcritos nos isolados BA 558 e BA 956, além da amostra controle C1096, como já era esperado, uma vez que esta alberga todos os genes (DUDLEY et al., 2006). Ao contrário do que se observa nos resultados de PCR, onde a amostra BA 1244 foi positiva para os nove genes *pil*, quando realizado ensaio de RT-PCR não foi demonstrada a transcrição destes genes na presença da enzima transcriptase reversa (TR) mostrando que o operon Pil não é funcional neste isolado.

Após essa caracterização molecular, as amostras BA 558 e BA 956 foram eleitas para dar continuidade ao estudo. Dessa forma, os genes *pilS* e *pilV* amplificados nestas amostras foram clonados em vetor pGEM-T Easy, seguido de seu sequenciamento. Este passo foi essencial para verificar a identidade entre as sequências dos genes clonados com as respectivas sequências presentes no plasmídeo pSERB1, assim como a fase de leitura correta. Uma vez confirmada a ausência de possíveis mutações, selecionamos apenas uma das duas amostras de aEPEC para que fosse realizada a clonagem dos genes *pil* em vetor de expressão. Para isso, foram selecionados os genes *pilS* e *pilV* clonados à partir do isolado BA 558 para serem sub-clonados em vetor de expressão pET28a.

O sistema de expressão pET é composto por mais de 40 tipos de plasmídeos, dentre eles o vetor pET28a, que tem a finalidade de produzir proteínas heterólogas fusionadas à seis resíduos de histidina, facilitando assim sua purificação e detecção (NOVAGEN, 2003). A combinação entre vetores pET e cepas de *E. coli* geneticamente modificadas possibilitam a expressão de proteínas com maior eficiência, facilitando a sua obtenção. Por essas vantagens, o vetor pET28a foi escolhido no presente estudo para a expressão das proteínas PilS e PilV.

Células BL21 (DE3) transformadas com os respectivos plasmídeos, p558S e p558V, foram submetidas à indução da expressão por IPTG, e posteriormente à análise por SDS-PAGE. Esses resultados revelaram que o sistema pET28a direcionou a expressão das proteínas PilS e PilV para corpúsculos de inclusão (forma insolúvel), sendo necessária a utilização de um tratamento para sua solubilização.

Na literatura existem diferentes metodologias para solubilização e renaturação de proteínas heterólogas, no entanto, optamos pelo protocolo que mantém a proteína solúvel durante todo o processo de purificação por afinidade metálica, utilizando ureia a 8 M como

agente desnaturante. A alta concentração dessa molécula permite que as pontes de dissulfeto das proteínas fiquem dissociadas, fazendo com que a proteína assuma a conformação linear. Porém, a etapa de desnaturação da proteína torna o processo de purificação muito trabalhoso. Outro aspecto importante que deve ser levado em consideração é que, após o processo de purificação é imprescindível que a renaturação das pontes de dissulfeto da proteína ocorra de forma eficiente, possibilitando assim o retorno à sua estrutura conformacional original. A ineficiência desse processo pode resultar em uma proteína com a conformação alterada e que não seja funcional.

Dessa maneira, para a renaturação das proteínas PilS e PilV, estas foram submetidas à diálise utilizando concentrações decrescentes de ureia. Essa metodologia se mostrou mais eficaz para renaturação da proteína PilS do que para PilV, já que seu rendimento final foi maior, mesmo utilizando glutatona oxidada para auxiliar na renaturação das pontes de dissulfeto. Contudo, o processo de obtenção de PilS e PilV purificadas foi alcançado com sucesso, e as proteínas Pil foram empregadas na imunização de coelhos para a obtenção de anticorpos policlonais.

A resposta imune induzida em coelhos após imunização com as respectivas proteínas foi avaliada por ELISA e por *immunoblotting*. Através do método de ELISA a titulação dos soros de coelho foram avaliados, e a média dos valores de absorbância superiores a 1.0 de DO foram obtidos nas diluições 1:6400 para PilS, e de 1:3200 para PilV.

Para verificar se os soros produzidos eram capazes de reconhecer as respectivas proteínas purificadas, estes foram submetidos ao ensaio de *immunoblotting*. Entretanto, uma reatividade cruzada foi detectada confirmando a presença de outros componentes protéicos além das proteínas PilS e PilV. Por esse motivo utilizamos a linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) para adsorção dos soros imunes. Ao adsorver o soro produzido esperávamos encontrar apenas anticorpos contra as proteínas de interesse, e assim minimizar possíveis reconhecimentos inespecíficos. Dessa maneira, após cinco adsorções de cada soro foi possível detectar a presença apenas da banda correspondente às proteínas PilS e PilV, não sendo visualizada outras bandas inespecíficas.

Após a obtenção dos anticorpos policlonais, surgiu a hipótese de testar se os soros produzidos também eram capazes de reconhecer as proteínas Pil em um extrato de fímbrias bacterianas. A partir dessa suposição, diferentes protocolos de extração de fímbrias foram

testados. A primeira metodologia utilizada baseou-se na extração fimbrial após o cultivo bacteriano em meio sólido, uma vez que dados na literatura sugerem que este tipo de meio favorece a expressão de fímbrias do tipo IV (GISMERO-ORDOÑEZ et al., 2002). As amostras bacterianas cultivadas em placas de LBA, TSA e MacConkey foram ressuspensas em água ultrapura e submetidas à agitação mecânica para extração das estruturas fimbriais, sendo posteriormente submetidas ao tratamento utilizando água em pH ácido. Ao analisar os produtos obtidos por SDS-PAGE concluímos que através dessa metodologia não foi possível detectar a presença de bandas protéicas, e consequentemente por *immunoblotting* os soros também não foram capazes de detectar as proteínas de interesse (dados não mostrados).

Outras metodologias também foram abordadas na tentativa de buscar respostas para a hipótese levantada. Uma delas foi obter o extrato de fímbrias através do cultivo bacteriano em meio líquido. Yoshida et al. (1998) demonstraram que amostras de *E. coli* expressando as fímbrias Pil do tipo IV foram submetidas à extração fimbrial por ultracentrifugação, e o sedimento obtido foi ressuspensão e observado por microscopia eletrônica sendo possível visualizar a presença das estruturas fimbriais (YOSHIDA et al., 1998). No entanto, ao utilizarmos essa metodologia não foi possível detectar a presença das estruturas protéicas nos isolados bacterianos deste estudo (dados não mostrados). Mesmo utilizando diferentes metodologias para obtenção de um extrato de fímbrias, não foi possível detectar a presença das estruturas fimbriais utilizando os anticorpos policlonais produzidos contra as proteínas PilS e PilV.

Muitos estudos baseiam-se na pesquisa de determinantes de virulência utilizando apenas a técnica de PCR para detectar a presença de tais genes. Entretanto a caracterização fenotípica destas cepas é de suma importância, uma vez que a expressão de genes relacionados à virulência, especialmente os genes fimbriais, é que determinam o potencial patogênico desses isolados (HERNANDES et al., 2011). Dados na literatura demonstram que os genes *pil* expressam uma fímbria do tipo IV que aparentemente contribui para conjugação plasmidial e adesão bacteriana, além de promover a formação de biofilme através da interação bactéria-bactéria, entre outras funções (SHIMODA et al., 2008). Com base nesses dados, algumas das funções desempenhadas por essa fímbria foram estudadas no presente trabalho.

Visto que na patogênese bacteriana a adesão é um dos pré-requisitos para que as *E. coli* colonizem com sucesso a mucosa do hospedeiro, primeiramente buscamos avaliar o tipo de interação que as amostras de aEPEC apresentam quando colocadas em contato com células epiteliais *in vitro*. Inicialmente decidimos testar se os padrões de adesão, anteriormente caracterizados por Abe et al. (2009), se mantinham em linhagens de células epiteliais intestinais e não intestinais.

Para isso, procedemos ao ensaio de adesão incubando os isolados bacterianos com células de linhagem intestinal Caco-2, T84 e HT29 e, com células de linhagem não intestinal HEP-2, por um período de seis horas a 37 °C na ausência e na presença de manose, um açúcar que atua como um ligante bloqueando os receptores da fímbria do tipo I.

Ao analisarmos as lâminas por microscopia de luz, observamos que alguns fenótipos se mantiveram, como o da cepa controle C1096 a qual não apresentou qualquer modificação no tipo de adesão, mantendo-se o padrão agregativo (AA) nas quatro linhagens de células utilizadas tanto na presença quanto na ausência de manose (dados não mostrados).

O isolado BA 558 apresentou o padrão de adesão localizada (AL) nas quatro linhagens de células utilizadas, na presença e na ausência de manose. Essa informação é relevante do ponto de vista que este isolado não possui os genes *fimA* e *fimH* responsáveis por codificar a fímbria do tipo I, sugerindo a participação de outra (s) fímbria (s) neste padrão de adesão. De acordo com esses resultados concluímos que não houve alteração no padrão de adesão deste isolado quando testado em diferentes linhagens de células epiteliais. Além disso, Abe et al. (2009) demonstraram que, embora o isolado BA 558 alberga o gene *bfpA*, este não expressa a fímbria BFP responsável padrão AL característico das EPEC típicas, reforçando a idéia da presença de outras fímbrias que podem estar relacionadas ao fenótipo detectado. Também foi verificado neste isolado a ausência da expressão de fímbrias do tipo I, através de ensaios de aglutinação com levedura (dados não mostrados).

Entretanto, pequenas mudanças ocorreram no padrão de adesão do isolado BA 956 quando comparamos as diferentes linhagens de células utilizadas. Ao analisarmos os resultados obtidos, verificamos que em células HEP-2 e HT29 as bactérias mantiveram o padrão não aderente (NA), conforme estabelecido anteriormente por Abe et al. (2009). Porém em células Caco-2 e T84 não foi possível determinar um padrão de adesão para esta amostra, uma vez que foram encontradas pequenas quantidades de bactérias aderidas

sobre a superfície celular em um padrão indefinido (dados não mostrados). Como essa amostra foi isolada de um caso diarreico, ela provavelmente apresentou aderência *in vivo* para poder colonizar o intestino e provocar a diarreia. A incapacidade de aderir em células epiteliais cultivadas pode ser explicada por algumas hipóteses. Provavelmente, essas amostras só são capazes de expressar seus fatores de adesão após a sinalização com o epitélio intestinal, tornando-as aderentes somente *in vivo*. Esta hipótese poderia ser avaliada através de ensaios de interação com mucosa intestinal preservada (ROCHA, 2010).

Em geral, os ensaios de adesão são necessários para caracterização fenotípica dos isolados bacterianos. Porém, ao utilizarmos as linhagens de células epiteliais intestinais notamos que alguns resultados não ficaram tão claros e evidentes, pois esses tipos de células crescem de forma polarizada e isso impede a visualização das bactérias aderidas sobre a superfície celular. Por esse motivo, resolvemos utilizar apenas as células HEp-2 para a caracterização fenotípica dos isolados bacterianos, e posteriormente para os ensaios de inibição da adesão.

A análise qualitativa dos resultados de adesão e inibição da cepa BA 558 demonstraram que os soros anti-Pil aparentemente interferiram no tipo de adesão apresentado por essa amostra. Ao compararmos os resultados obtidos com os soros anti-PilS e anti-PilV incubados separadamente em relação aos soros anti-PilS e anti-PilV incubados concomitantemente, nota-se que houve uma diferença considerável no padrão de adesão apresentado pelo mesmo isolado. Esses resultados indicam que o fenótipo AL apresentado pela amostra BA 558 parece estar associado à presença da fímbria Pil, uma vez que o padrão de adesão sofreu alterações. Em resumo, demonstramos que PilS e PilV juntos desempenham um papel acessório na interação bactéria-célula. Entretanto, o fato dos soros anti-Pil não inibirem completamente a adesão já era esperado, uma vez que essa amostra possui outros genes que codificam adesinas fimbriais distintas, as quais provavelmente estão sendo constantemente expressas.

Alguns trabalhos publicados na literatura relatam o uso de soros anti-fímbrias para caracterizar fenotipicamente amostras de EPEC. Girón et al. (1993) observaram uma redução de 75% na adesão da amostra B171 ao ser incubada com o soro anti-fímbrias FB171 (soro produzido contra as fímbrias P e F1845). Curiosamente, ao adicionar o soro anti-FB171 com o soro anti-BFP e incubá-los com a EPEC B171, verificaram que houve uma redução de 100%

na adesão da amostra estudada. Esses resultados demonstram que a ação conjunta de vários soros anti-fímbrias são capazes de inibir completamente a adesão bacteriana (GIRÓN; HO; SCHOOLNIK, 1993). Dessa maneira, diversas estruturas estão envolvidas na adesão de EPEC, sendo considerado um processo multifatorial.

Por outro lado, nos ensaios realizados com o isolado C1096, demonstramos qualitativamente que o padrão de adesão não sofreu alterações significativas. O padrão agregativo caracterizado por Dudley et al. (2006) manteve-se durante os experimentos realizados. No entanto, nota-se que após a incubação com os respectivos soros anti-Pil houve apenas uma redução na adesão dessa amostra, embora esses resultados não tenham sido avaliados do ponto de vista quantitativo.

A nosso ver seria extremamente importante analisarmos quantitativamente os resultados de adesão e inibição da adesão, para que pudéssemos inferir se há diferença estatística em relação a um dado e outro. Embora não tenha sido mostrado nos resultados apresentados, foram realizadas repetidas vezes os ensaios de contagem por unidade formadora de colônia (UFC) para quantificar a adesão e a inibição. Devido a problemas técnicos, não foi possível estabelecer um resultado que melhor representasse o que estava sendo visualizado por microscopia de luz. Apesar da metodologia de contagem por UFC ser amplamente utilizada, não conseguimos padronizar a melhor diluição para que fosse realizada a contagem bacteriana, além dos resultados não serem reprodutíveis. Por esses motivos essa abordagem não foi apresentada.

A maioria dos estudos de caracterização fenotípica utilizam ensaios de adesão em células epiteliais cultivadas *in vitro*. Entretanto, mesmo que esses experimentos forneçam informações sobre o papel desempenhado por fatores na adesão *in vitro*, a relevância destes achados na infecção *in vivo* são limitados e ainda precisam ser validados em estudos *in vitro* com células intestinais, ou ainda, *in vivo* com um modelo animal apropriado (TORRES; ZHOU; KAPER, 2005).

Outra função atribuída à fímbria do tipo IV também pode estar relacionada à formação de biofilme através da interação bactéria-bactéria. Diversos relatos na literatura apontam a cepa 042 de EAEC como uma excelente formadora de biofilme, e por isso ela foi utilizada como controle positivo nesses ensaios (FUJIYAMA et al., 2008; SHEIKH et al., 2001). Nesta amostra a capacidade de formar biofilme está relacionada à presença do gene *shf*, o qual

codifica uma proteína que participa da modificação da molécula de EPS envolvida na formação de biofilme e adesão intercelular (FUJIYAMA et al., 2008; HEILMANN et al., 1996).

A habilidade de formar biofilme em superfície de poliestireno foi testada nas amostras de aEPEC, e em seguida os cultivos bacterianos foram avaliados por ensaio colorimétrico com cristal violeta, que indiretamente mede o número de células bacterianas baseado na coloração da camada de peptideoglicano (WATNICK; KOLTER, 1999).

Ao analisarmos as absorbâncias obtidas após 24 horas de incubação em superfície de poliestireno, nota-se que a cepa controle 042 foi capaz de formar biofilmes mais densos em relação aos isolados de aEPEC. Em 2010, Culler também avaliou a capacidade de formação de biofilme de 92 amostras de aEPEC utilizando diferentes abordagens. Os resultados obtidos no presente estudo corroboram os dados de Culler (2010), demonstrando que as amostras BA 558 e BA 956 formam pouco/nenhum biofilme em superfície de poliestireno, após 24 horas de incubação a 37 °C. Embora tenha sido pesquisada e confirmada a presença do gene *shf* no isolado BA 558, Culler demonstrou que esta amostra não é capaz de formar biofilme tanto em superfície abiótica (poliestireno e vidro) quanto em superfície biótica (células HEp-2), mesmo em períodos prolongados (24 horas, 6 dias, 12 dias e 18 dias) (CULLER, 2010). Em conjunto, esses dados indicam que a fímbria Pil em aEPEC não está relacionada à ocorrência de formação de biofilme.

Por outro lado, a amostra de EAEC C1096 utilizada como controle nos demais ensaios foi capaz de formar biofilme confirmando os resultados descritos por Dudley et al. (2006). Além disso, essa amostra também foi avaliada quanto à capacidade de inibição da formação de biofilme, demonstrando que os soros de coelho anti-PilS e anti-PilV foram capazes de inibir o biofilme produzido por esta cepa.

As fímbrias do tipo IV também estão relacionadas à capacidade de formar agregados bacterianos. Dados na literatura relatam que em tEPEC esse fenótipo está relacionado à expressão da fímbria BFP (BIEBER et al., 1998; GIRÓN; HO; SCHOOLNIK, 1991; TOBE; SASAKAWA, 2001). Dessa maneira, nós também pesquisamos se a capacidade de autoagregação era compartilhada pelas amostras de aEPEC, e assim tentar relacionar esse fenótipo à presença de Pil. Porém os resultados obtidos demonstraram que somente a cepa 042 é capaz de se autoagregar, uma vez que a fímbria AAF expressa por este isolado lhe confere o fenótipo agregativo.

Neste estudo diferentes abordagens foram utilizadas no sentido de caracterizar fenotipicamente a fímbria Pil em EPEC atípica. No entanto, outras funções como twitching-motility, captação de DNA, adsorção de bacteriófago e conjugação em meio líquido também podem ser desempenhadas pelas fímbrias do tipo IV, embora essas funções não tenham sido analisadas no presente trabalho. Vale a pena ressaltar que é a primeira vez que está sendo descrita a presença dos genes do operon Pil em isolados de aEPEC, e utilizando diferentes abordagens na busca de uma associação da expressão dessa fímbria no processo de interação bactéria-célula hospedeira. Cabe salientar que ainda não foi confirmada a ocorrência da expressão da fímbria Pil nos isolados deste estudo, embora ensaios preliminares de imunofluorescência e imunomarcação estão sendo realizados (dados não mostrados).

Recentemente, Hernandez et al. (2011) também investigaram a prevalência de diferentes adesinas fimbriais em amostras de aEPEC. Além da pesquisa dos genes fimbriais por PCR, também foi verificada a expressão dessas fímbrias utilizando diferentes abordagens. Interessantemente, algumas das metodologias utilizadas pelo grupo para caracterizar fenotipicamente as amostras estudadas, como *Western blotting* e imunofluorescência, também não foram obtidas com sucesso. Uma explicação provável atribuída por esses autores, com a qual também concordamos, é que a expressão de algumas fímbrias é controlada por mecanismos reguladores específicos ainda desconhecidos, os quais podem envolver sinais ambientais e nutricionais. Também é possível que, em algumas amostras, os genes envolvidos na biogênese fimbrial podem estar truncados ou simplesmente não serem funcionais (HERNANDES et al., 2011).

Um avanço nas técnicas para caracterização desses fatores de aderência irá proporcionar não só uma melhor compreensão da patogênese das diferentes cepas de *E. coli* diarrreiogênicas, mas também poderá fornecer alvos atraentes para novas pesquisas terapêuticas ou até para o desenvolvimento de vacinas. Além disso, a busca pela descoberta de novos fatores de virulência não deve ser cessada, para que consigamos compreender melhor os mecanismos patogênicos que tornam as cepas de EPEC atípica um dos grupos bacterianos mais heterogêneos.

Nesse sentido, diferentes projetos estão sendo conduzidos no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, com a finalidade de elucidar alguns aspectos da relação patógeno-hospedeiro. Os resultados aqui apresentados contribuem de forma definitiva e permitem inferir que:

- a) os genes *pilL*, *pilM*, *pilN*, *pilQ*, *pilR*, *pilS*, *pilT*, *pilU* e *pilV* descritos na amostra C1096 de EAEC também estão presentes nos isolados de EPEC atípica BA 558, BA 956 e BA 1244;
- b) a funcionalidade dos genes do operon Pil foi demonstrada somente nos isolados BA 558 e BA 956;
- c) a fímbria Pil não está relacionada à função de formação de biofilme e auto-agregação nos isolados BA 558 e BA 956;
- d) a mudança no padrão de adesão observada na presença dos anticorpos policlonais anti-PilS e anti-PilV sugerem que a proteína estrutural fimbrial PilS juntamente com a adesina PilV desempenham um papel acessório na adesão do isolado BA 558 às células HEp-2.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que o operon Pil é funcional somente nos isolados BA 558 e BA 956, e a expressão da fímbria Pil nessas amostras não está relacionada à ocorrência de formação de biofilme e autoagregação, porém a proteína estrutural fimbrial PilS juntamente com a adesina PilV parecem exercer uma função acessória importante na interação do isolado BA 558 às células epiteliais cultivadas *in vitro*, conferindo-lhe o fenótipo de adesão localizada em 6 horas.

REFERÊNCIAS*

- ABE, C. M. et al. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*. **FEMS Immunology Medical Microbiology**, v. 52, p. 397-406, 2008.
- ABE, C. M. et al. Virulence features of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* identified by the eae+ EAF-negative stx-genetic profile. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 64, n. 4, p. 357-365, 2009.
- AFSET, J. E. et al. Identification of virulence genes linked with diarrhea due to atypical enteropathogenic *Escherichia coli* by DNA microarray analysis and PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 3703-3711, 2006.
- ARAUJO, J. M. et al. Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 10, p. 3396-3399, 2007.
- BENZ, I.; SCHMIDT, M. A. AIDA-I, the adhesin involved in diffuse adherence of the diarrhoeagenic *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27), is synthesized via a precursor molecule. **Molecular Microbiology**, v. 6, n. 11, p. 1539-1546, 1992.
- BIEBER, D. et al. Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Science**, v. 280, n. 5372, p. 2114-2118, 1998.
- BILGE, S. S. et al. Molecular characterization of a fimbrial adhesin, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **Journal of Bacteriology**, v. 171, n. 8, p. 4281-4289, 1989.
- BORTOLINI, M. R. et al. Lack of expression of *bundle-forming pili* in some clinical isolates of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is due to a conserved large deletion in the *bfp* operon. **FEMS Microbiology Letters**, v. 179, n. 1, p. 169-174, 1999.
- BRINTON, C. C. The structure, function, synthesis and genetic control of bacterial pili and a model for DNA and RNA transport in gram negative bacteria. **Transactions of the New York Academy of Sciences**, v. 27, p. 1003-1054, 1965.
- BUERIS, V. et al. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 7, p. 839-844, 2007.

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

CAMPOS, L. C.; FRANZOLIN, M. R.; TRABULSI, L. R. Diarrheagenic *Escherichia coli* categories among the traditional enteropathogenic *E. coli* O serogroups. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 6, p. 545-552, 2004.

CHAUDHURI, R. R. et al. Complete genome sequence and comparative metabolic profiling of the prototypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain 042. **PLoS One**, v. 5, n. 1, p. 8801, 2010.

CLARKE, S. C. et al. Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 365-378, 2003.

CLEARY, J. et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of *bundle-forming pili* (BFP), EspA filaments and intimin. **Microbiology**, v. 150, n. 3, p. 527-538, 2004.

COBELJIĆ, M. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with an outbreak of diarrhoea in a neonatal nursery ward. **Epidemiology and Infection**, v. 117, n. 1, p. 11-16, 1996.

COSTERTON, J. W. et al. Microbial biofilms. **Annual Reviews Microbiology**, v. 49, p. 711-745, 1995

CRAIG, L.; PIQUE, M. E.; TAINER, J. A. Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 5, p. 363-378, 2004.

CRAVIOTO, A. et al. An adhesive factor in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. **Current Microbiology**, v. 3, p. 95-99, 1979.

CRAVIOTO, A.; VÁSQUEZ, V. *Escherichia coli*: pathogenic mechanisms and enterohemorrhagic strains. **Boletín Médico del Hospital Infantil de México**, v. 45, n. 3, p. 196-197, 1988.

CROSSMAN, L. C. et al. A commensal gone bad: complete genome sequence of the prototypical enterotoxigenic *Escherichia coli* strain H10407. **Journal of Bacteriology**, v. 192, p. 5822-5831, 2010.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 26-38, 2010.

CULLER, H. F. **Formação de biofilme em *Escherichia coli* enteropatogênica atípica**. 2010. 120 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

CZECZULIN, J. R. et al. Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 6, p. 2692-2699, 1999.

DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G. A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 4, p. 847-867, 2000.

DEAN, P.; MARESCA, M.; KENNY, B. EPEC's weapons of mass subversion. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 28-34, 2005.

DE GRADO, M. et al. Identification of the intimin-binding domain of Tir of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Cellular Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 7-17, 1999.

DONLAN, R. M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p. 881-890, 2002.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

DONNENBERG, M. S. et al. A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localized adherence. **Molecular Microbiology**, v. 6, n. 22, p. 3427-3437, 1992.

DONNENBERG, M. S. Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infections of the Gastrointestinal Tract**, New York, v. 3; p. 709-726, 1995.

DOUGHTY, S. et al. Identification of a novel fimbrial gene cluster related to *long polar fimbriae* in *locus* of enterocyte effacement negative strains of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 6761-6769, 2002.

DRASAR, B. S.; HILL M. J. **Human intestinal flora**. Academic Press, p. 36-43, 1974.

DUDLEY, E. G. et al. An Incl1 plasmid contributes to the adherence of the atypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain C1096 to cultured cells and abiotic surfaces. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 4, p. 2102-2114, 2006.

DULGUER, M. V. et al. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains: phenotypic and genetic profiling reveals a strong association between enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin and diarrhea. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 188, n. 11, p. 1685-1694, 2003.

ELLIOTT, S. J. et al. The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 11, p. 6115-6126, 2000.

FAAST, R. et al. Nucleotide sequence of the structural gene, *tcpA*, for a major pilin subunit of *Vibrio cholerae*. **Gene**, v. 85, n. 1, p. 227-231, 1989.

FAGUNDES-NETO, U. Enteropathogenic *Escherichia coli* infection in infants: clinical aspects in small bowel morphological alterations. **Reviews Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 117-119, 1996.

FRANZOLIN, M. R. et al. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 359-363, 2005.

FREITAS, N. C. **Pesquisa de adesinas fimbriais em isolados de *Escherichia coli* enteropatogênica atípica**. 2008. 120 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Centro Universitário Fundação Santo André, Santo André, 2008.

FUJIYAMA, R. et al. The *shf* gene of a *Shigella flexneri* homologue on the virulent plasmid pAA2 of Enteroaggregative *Escherichia coli* 042 is required for firm biofilm formation. **Current Microbiology**, v. 56, p. 474-480, 2008.

GARMENDIA, J.; FRANKEL, G.; CREPIN, V. F. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 5, p. 2573-2585, 2005.

GERLACH, R. G.; HENSEL, M. Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 297, n. 6, p. 401-415, 2007.

GHILARDI, A. C. et al. Virulence factors of *Escherichia coli* strains belonging to serogroups O127 and O142. **Epidemiology and Infection**, v. 131, n. 2, p. 815-821, 2003.

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.

GIRÓN, J. A.; HO, A. S. Y.; SCHOOLNIK, G. K. Characterization of fimbriae produced by enteropathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 175, p. 7391-7403, 1993.

GIRÓN, J. A. et al. The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. **Molecular Microbiology**, v. 44, p. 361-379, 2002.

GISMERO-ORDOÑEZ, J. et al. Expression of the *bundle-forming pilus* by enteropathogenic *Escherichia coli* strains of heterologous serotypes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 6, p. 2291-2296, 2002.

GOMES, T. A.; BLAKE, P. A.; TRABULSI, L. R. Prevalence of *Escherichia coli* strains with localized, diffuse, and aggregative adherence to HeLa cells in infants with diarrhea and matched controls. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, p. 266-269, 1989.

GOMES, T. A. et al. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in São Paulo, Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 64, p. 331-337, 1991.

GOMES, T. A. et al. Emerging enteropathogenic *Escherichia coli* strains? **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 10, p. 1851-1855, 2004.

GOMES, T. A. et al. Adhesin-encoding genes from shiga toxin-producing *Escherichia coli* are more prevalent in atypical than in typical enteropathogenic *E. coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 9, p. 3334-3337, 2011.

GUERRANT, R. L. et al. Prospective study of diarrheal illnesses in northeastern Brazil: patterns of disease, nutritional impact, etiologies, and risk factors. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 148, n. 6, p. 986-997, 1983.

HARRINGTON, S. M.; DUDLEY, E. G.; NATARO, J. P. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **FEMS Microbiology Letters**, v. 254, n. 1, p.12-18, 2006.

HARTLAND, E. L. et al. Binding of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* to Tir and to host cells. **Molecular Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 151-158, 1999.

HASMAN, H.; CHAKRABORTY, T.; KLEMM, P. Antigen-43-mediated autoaggregation of *Escherichia coli* is blocked by fimbriation. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 16, p. 4834-4841, 1999.

HEILMANN, C. et al. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. **Molecular Microbiology**, v. 20, p. 1083-1091, 1996.

HERNANDES, R. T. et al. The localized adherence pattern of an atypical enteropathogenic *Escherichia coli* is mediated by intimin omicron and unexpectedly promotes HeLa cell invasion. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 415-425, 2008.

HERNANDES, R. T. et al. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 297, n. 2, p. 137-149, 2009.

HERNANDES, R. T. et al. Fimbrial adhesins produced by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 23, p. 8391-8399, 2011.

HULTGREN, S. J.; JONES, C. H.; NORMARK, S. Bacterial adhesins and their assembly. In: NEIDHARDT, F. C. et al. *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. **ASM Press**, p. 2730-2756, 1996.

ISHIWA, A.; KOMANO, T. PilV adhesins of plasmid R64 thin pili specifically bind to the lipopolysaccharides of recipient cells. **Journal of Molecular Microbiology**, v. 343, p. 615-625, 2004.

JERSE, A. E. et al. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 20, p. 7839-7843, 1990.

JONES, C. H. et al. FimH adhesin of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the *Enterobacteriaceae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 6, p. 2081–2085, 1995.

KAPER, J. B. Defining EPEC. **Reviews Microbiology**, v. 27, p. 130-133, 1996.

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

KAUFFMANN, F. The serology of the coli group. **Journal of Immunology**, v. 57, n. 1, p. 71-100, 1947.

KENNY, B. et al. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. **Cell**, v. 91, n. 4, p. 511-520, 1997.

KENNY, B. Phosphorylation of tyrosine 474 of the enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule is essential for actin nucleating activity and is preceded by additional host modifications. **Molecular Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 1229-1241, 1999.

KIM, S.; KOMANO, T. The plasmid R64 thin pilus identified as a type IV pilus. **Journal of Bacteriology**, v. 179, p. 3594–3603, 1997.

KNUTTON, S. et al. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 4, p. 1290-1298, 1989.

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

KNUTTON, S. et al. The type IV *bundle-forming pilus* of enteropathogenic *Escherichia coli* undergoes dramatic alterations in structure associated with bacterial adherence, aggregation and dispersal. **Molecular Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 499-509, 1999.

KOMANO, T. Shufflons: multiple inversion systems and integrons. **Annual Reviews Genetics**, v. 33, p. 171–191, 1999.

KOMANO, T. et al. The transfer region of IncI1 plasmid R64: similarities between R64 *tra* and *Legionella icm/dot* genes. **Molecular Microbiology**, v. 35, p. 1348–1359, 2000.

KROGFELT, K. A. et al. Direct evidence that the FimH protein is the mannose specific adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 6, p. 1995–1998, 1990.

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

LEVINE, M. M. et al. *Escherichia coli* strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. **Lancet**, v. 27, n. 1, p. 1119-1122, 1978.

LEVINE, M. M. et al. New knowledge on pathogenesis of bacterial enteric infections as applied to vaccine development. **Microbiological Reviews**, v. 47, n. 4, p. 510-550, 1983.

LEVINE, M. M.; EDELMAN, R. Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. **Epidemiology Reviews**, v. 6, p. 31-51, 1984.

LEVINE, M. M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 155, p. 377-398, 1987.

LEYTON, D. L. et al. Transfer region of pO113 from enterohemorrhagic *Escherichia coli*: similarity with R64 and identification of a novel plasmid-encoded autotransporter, EpeA. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 6307-6319, 2003.

LUO, Y. et al. Crystal structure of enteropathogenic *Escherichia coli* intimin-receptor complex. **Nature**, v. 405, n. 6790, p. 1073-1077, 2000.

MATTICK, J. S. Type IV pili and twitching motility. *Annual Review of Microbiology*, v. 56, p. 289-314, 2002.

MCDANIEL, T. K. et al. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 5, p. 1664-1668, 1995.

MELLIES, J. L. et al. 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). **Molecular Microbiology**, v. 32, p. 296-306, 1999.

MORABITO, S. et al. A mosaic pathogenicity island made up of the locus of enterocyte effacement and a pathogenicity island of *Escherichia coli* O157:H7 is frequently present in attaching and effacing *E. coli*. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 3343-3348, 2003.

MOON, H. W. et al. *Attaching* and *effacing* activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. **Infection and Immunity**, v. 41, n. 3, p. 1340-1351, 1983.

MOORE, A. E.; SABACHEWSKY, L.; TOOLAN, H.W. Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells. **Cancer Research**, v. 15, n. 9, p. 598-602, 1955.

MOREIRA, C. G. et al. *Bundle-forming pili* and EspA are involved in biofilm formation by enteropathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 11, p. 3952-3961, 2006.

MORENO, A. C. et al. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 66, n. 1, p. 50-57, 2010.

NARA, J. M. et al. Differentiation of typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* using colony immunoblot for detection of *bundle-forming pilus* expression. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 1, p. 35-43, 2010.

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

NATARO, J. P. et al. Detection of an adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli* with a DNA probe. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 152, n. 3, p. 560-565, 1985.

NATARO, J. P. et al. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 6, n. 9, p. 829-831, 1987.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.

NETER, E. et al. Demonstration of antibodies against enteropathogenic *Escherichia coli* in sera of children of various ages. **Pediatrics**, v. 16, n. 6, p. 801-808, 1955.

NEVES, B. C. et al. CesD2 of enteropathogenic *Escherichia coli* is a second chaperone for the type III secretion translocator protein EspD. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 4, p. 2130-2141, 2003.

NOVAGEN. **pET SYSTEM MANUAL**. 10th ed. Novagen, 2003.

NOUGAYRÈDE, J. P.; FERNANDES, P. J.; DONNENBERG, M. S. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. **Cellular Microbiology**, v. 5, n. 6, p. 359-372, 2003.

NUNES, E. B. et al. Genotypic and phenotypic characterization of attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC) isolated from children with and without diarrhoea in Londrina, Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, n. 6, p. 499-504, 2003.

NUNN, D.; BERGMAN, S.; LORY, S. Products of three accessory genes, *pilB*, *pilC*, and *pilD*, are required for biogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pili. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 6, p. 2911-2919, 1990.

ORLANDI, P. P. et al. Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho (Rondonia, Western Amazon region, Brazil). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 4, p. 507-517, 2006.

PELAYO, J. S. et al. Virulence properties of atypical EPEC strains. **Journal of Medical Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 41-49, 1999.

QADRI, F. et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: Epidemiology, Microbiology, Clinical Features, Treatment, and Prevention. **Clinical of Microbiology Reviews**, v. 18, p. 465-483, 2005.

ROBINS-BROWNE, R. M. Recent advances in microbiology. *Escherichia coli* strains that cause diarrhoea: models of bacterial pathogenesis. **Australian Society for Microbiology**, v. 2, p. 292-375, 1994.

ROBINS-BROWNE, R. M. et al. *Escherichia coli* and community-acquired gastroenteritis, Melbourne, Australia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 10, p. 1797-1805, 2004.

ROCHA, S. P. D. **Análise estrutural e funcional da região LEE de *Escherichia coli* enteropatogênica atípica**. 2010. 141 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

RODRIGUES, J. et al. Clonal structure and virulence factors in strains of *Escherichia coli* of the classic serogroup O55. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 7, p. 2680-2686, 1996.

ROSA, A. et al. Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* isolated from infants with acute diarrhea and healthy controls in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 47, p. 781-790, 1998.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 2344 p.

SAKAI, D.; HORIUCHI, T.; KOMANO, T. ATPase activity and multimer formation of PilQ protein are required for thin pilus biogenesis in plasmid R64. **The Journal of Biology Chemistry**, v. 276, p. 17968-17975, 2001.

SAKAI, D.; KOMANO T. Genes required for plasmid R64 thin pilus biogenesis: identification and localization of products of the *pilK*, *pilM*, *pilO*, *pilP*, *pilR*, and *pilT* genes. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 2, p. 444-451, 2002.

SALDAÑA, Z. et al. The *Escherichia coli* common pilus and the *bundle-forming pilus* act in concert during the formation of localized adherence by enteropathogenic *E. coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 11, p. 3451-3461, 2009.

SAMPAIO, S. C. et al. The flagella of an atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strain are required for efficient interaction with and stimulation of interleukin-8 production by enterocytes *in vitro*. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 10, p. 4406-4413, 2009.

SÁNCHEZ-SANMARTÍN, C. et al. Transcriptional regulation of the orf19 gene and the tir-cesT-eae operon of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 9, p. 2823-2833, 2001.

SCALETISKY, I. C. A. et al. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infection and Immunity**, v. 45, n. 2, p. 534-536, 1984.

SCALETISKY, I. C. A. et al. 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. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 7, p. 3410-5, 1999.

SCALETISKY, I. C. A. et al. Diffusely adherent *Escherichia coli* as a cause of acute diarrhea in young children in Northeast Brazil: a case-control study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 645-648, 2002.

SCALETISKY, I. C. A. et al. Identification and characterization of the locus for diffuse adherence, which encodes a novel afimbrial adhesion found in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 4753-4765, 2005.

SCALETISKY, I. C. A. et al. Evidence of pathogenic subgroups among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 11, p. 3756-3759, 2009.

SCALETISKY, I. C. A. et al. Adherence factors in atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains expressing the localized adherence-like pattern in HEp-2 cells. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 302-306, 2010.

SEARS, H. J.; BROWNLEE, I.; UCHIYAMA, J. K. Persistence of individual strains of *Escherichia coli* in the intestinal tract of man. **Journal of Bacteriology**, v. 59, n. 2, p. 293-301, 1950.

SEARS, C. L.; KAPER, J. B. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. **Microbiological Reviews**, v. 60, n. 1, p. 167-215, 1996.

SEKIYA, K. et al. Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 20, p. 1638-1643, 2001.

SHAW, C. E.; TAYLOR, R. K. *Vibrio cholerae* O395 *tcpA* pilin gene sequence and comparison of predicted protein structural features to those of type 4 pilins. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 9, p. 3042-3049, 1990.

SHEIKH, J. Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 983-997, 2001.

SHIMODA, E. et al. Novel class of mutations of pilS mutants, encoding plasmid R64 type IV prepilin: interface of PilS-PilV interactions. **Journal of Bacteriology**, v. 190, p. 1202-1208, 2008.

SOTO, G. E.; HULTGREN, S. J. Bacterial Adhesins: Common Themes and Variations in Architecture and Assembly. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 4, p. 1059-1071, 1999.

STONE, K. D. et al. A cluster of fourteen genes from enteropathogenic *Escherichia coli* is sufficient for the biogenesis of a type IV pilus. **Molecular Microbiology**, v. 20, p. 325-337, 1996.

STROM, M. S.; LORY, S. Structure-function and biogenesis of the type IV pili. **Annual Reviews Microbiology**, v. 47, p. 565-596, 1993.

TANIGUCHI, T. et al. Sequencing of the gene encoding the major pilin of pilus colonization factor antigen III (CFA/III) of human enterotoxigenic *Escherichia coli* and evidence that CFA/III is related to type IV pili. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 2, p. 724-728, 1995.

TATSUNO, I. et al. *tox*B gene on pO157 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for full epithelial cell adherence phenotype. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 6660-6669, 2001.

TOBE, T. et al. Complete DNA sequence and structural analysis of the enteropathogenic *Escherichia coli* adherence factor plasmid. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 10, p. 5455-5462, 1999.

TOBE, T.; SASAKAWA, C. Role of *bundle-forming pilus* of enteropathogenic *Escherichia coli* in host cell adherence and in microcolony development. **Cellular Microbiology**, v. 3, p. 579-585, 2001.

TOLEDO, M. R. F. et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* serotypes and endemic diarrhea in infants. **Infection and Immunity**, v. 39, p. 586-589, 1983.

TORRES, A. G.; ZHOU, X.; KAPER, J. B. Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 1, p. 18-29, 2005.

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Biotechnology**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

TOZZOLI, R.; CAPRIOLI, A.; MORABITO, S. Detection of *tox*B, a plasmid virulence gene of *Escherichia coli* O157, in enterohemorrhagic and enteropathogenic *E. coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 8, p. 4052-4056, 2005.

TRABULSI, L. R. et al. Infantile diarrhea caused by enteropathogenic colibacilli: preliminary studies on the occurrence of certain groups and serological types in Sao Paulo. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 3, p. 267-270, 1961.

TRABULSI, L. R. et al. Epidemiology of infantile bacterial diarrheal disease in Brazil. **Scientific Publishers**, 1985.

TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; GOMES, T. A. T. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 5, p. 508-513, 2002.

VIEIRA, M. A. M. et al. 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. **Journal of Infectious Diseases**, v. 183, n. 5, p. 762-772, 2001.

VIEIRA, M. A. M. et al. Prevalence and characteristics of the O122 pathogenicity island in typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 1452-1455, 2010.

WANG, A. M.; DOYLE, M. V.; MARK, D. F. Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 24, p. 9717-9721, 1989.

WATNICK, P. I.; KOLTER, R. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. **Molecular Microbiology**, v. 34, p. 586-595, 1999.

WEISS-MUSZKAT, M. et al. Biofilm formation by and multicellular behavior of *Escherichia coli* O55:H7, an atypical enteropathogenic strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 5, p. 1545-1554, 2010.

WENNERAS, C. et al. Intestinal responses in patients infected with enterotoxigenic *Escherichia coli* and in vaccinees. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 6234-6241, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Manual for laboratory investigations of acute enteric infections**. 1987.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO); THE UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND (UNICEF). **Diarrhoea: Why children are still dying and what can be done**. 2009.

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

YOSHIDA, T. et al. Purification and characterization of thin pili of IncI1 plasmids Collb-P9 and R64: formation of PilV-specific cell aggregates by type IV pili. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 2842-2848, 1998.

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

ZHANG, X. L. et al. *Salmonella enterica* serovar typhi uses type IVB pili to enter human intestinal epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 6, p. 3067-3073, 2000.