

SÉRGIO PAULO DEJATO DA ROCHA

Análise estrutural e funcional da região LEE de
Escherichia coli enteropatogênica atípica

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto
Butantan/IPT, para obtenção do título de Doutor
em Biotecnologia.

São Paulo
2010

SÉRGIO PAULO DEJATO DA ROCHA

Análise estrutural e funcional da região LEE de
Escherichia coli enteropatogênica atípica

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto
Butantan/IPT, para obtenção do título de Doutor
em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Dr. Waldir Pereira Elias Júnior

São Paulo
2010

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

© reprodução total

Rocha, Sérgio Paulo Dejato da.

Análise estrutural e funcional da região LEE do *Escherichia coli* enteropatogênica atípica / Sérgio Paulo Dejato da Rocha. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Waldir Pereira Elias Júnior.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Fatores de virulência bacteriana.

Versão do título para o inglês: Structural and functional analysis of LEE region of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*.

Descritores: 1. *Escherichia coli* 2. Diarreia 3. Interação celular I. Elias Júnior, Waldir Pereira II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia III. Título.

ICB/SBIB085/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato (a): Sérgio Paulo Dejato da Rocha.

Título da Tese: Análise estrutural e funcional da região LEE de
Escherichia coli enteropatogênica atípica.

Orientador (a): Waldir Pereira Elias Júnior.

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

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

Examinador (a): Assinatura:.....
Nome:
Instituição:

Examinador (a): Assinatura:.....
Nome:
Instituição:

Examinador (a): Assinatura:.....
Nome:
Instituição:

Examinador (a): Assinatura:.....
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:.....
Nome:
Instituição:



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

São Paulo, 13 de dezembro de 2006.


Dr. Waldir Pereira Elias Júnior
Laboratório de Bacteriologia
Instituto Butantan

Referente Projeto: "Análise estrutural e funcional da região LEE de *Escherichia coli* enteropatogênica atípica".

Prezado Pesquisador

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) informa que o projeto acima referido é isento de análise por parte desta Comissão, pois não faz uso de animais vertebrados para sua execução.

Sem mais para o momento,


Dra. Denise V. Tambourgi
Laboratório de Imunoquímica
Presidente da CEUAIB

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida:

À minha noiva e futura esposa, Cristiani, que sempre meu deu apoio, força, paciência, carinho e amor. Linda, PS: I LOVE YOU.

Aos meus pais, Wilson e Maria Célia, exemplos de dignidade e coragem. Obrigado pela força, amor e zelo. Amo vocês!

Aos meus queridos irmãos Wilson e Mirella, pela amizade apoio e torcida. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Waldir Pereira Elias Júnior, pela orientação, confiança, incentivo e amizade, essenciais para o desenvolvimento desta tese e para minha formação.

À Dra. Vanessa Sperandio, por ter me recebido de braços abertos em Dallas e pela ajuda nos experimentos de análise funcional.

À Dra. Cecília M. Abe, pela inestimável ajuda nos experimentos de cultura de células.

À Dra. Sílvia Yumi Bando, pela amizade, incentivo e ajuda nos experimentos de análise estrutural.

À Dra. Roxane Fontes Piazza, pela amizade e fornecimento dos anticorpos.

Ao Dr. Marcelo Palma Sircili, pela amizade e dicas de sobrevivência em Dallas.

À Dra. Márcia Regina Franzolin, pela conversa e imensa boa vontade em sempre ajudar.

Aos amigos e vizinhos de bancada, Vanessa Bueris, Renato Ruiz, Bianca Tomé, Francielli Vasconcellos e Luciano Bevilacqua, pelo apoio, palavras amigas, companhia e risadas.

Ao Dr. Cristiano Moreira, pela amizade e ajuda inestimável.

Aos amigos do Instituto Butantan e de balada, Luciana Carvalho, Sarita Scheneider e Márcio Menezes.

Aos amigos de república Éder Corbanezzi e Gustavo Nomyiama, pela amizade, baladas e pelos anos de convivência.

Aos funcionários do Instituto Butantan, Nadja, Maria Luisa, Sebastiana, Regina, Reginaldo e Maria, pelas palavras sábias e auxílio no preparo de materiais.

Aos amigos da University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas, Cristiano, Fernanda, Aline, Benjamin, David, Jackeline, Darya e Charlie. Thank you for everything !!!!!

A todos os meus colegas de laboratório e pesquisadores do Instituto Butantan, inclusive os já citados, e aqueles que direta ou indiretamente contribuíram neste trabalho.

À agência FAPESP, pela bolsa de doutorado e apoio financeiro.

MUITO OBRIGADO!!!

“O segredo é não correr atrás das borboletas... É cuidar do jardim para que elas venham até você.”

Mário Quintana

Este projeto foi realizado no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan e no Laboratório de Microbiologia da University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP.

RESUMO

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

Escherichia coli enteropatogênica é capaz de causar uma lesão histopatológica no epitélio intestinal conhecida como *attaching-effacing* (A/E), induzida por proteínas codificadas pelo *locus of enterocyte effacement* (LEE). EPEC é atualmente classificada em típica e atípica (aEPEC), baseado na presença ou ausência do *EPEC adherence plasmid*, respectivamente. Amostras de aEPEC aderem em células epiteliais cultivadas no padrão de adesão denominado localizado-*like* (ALL), mas algumas amostras podem aderir nos padrões agregativo (AA) ou difuso (AD). Neste estudo foi realizada a análise estrutural e funcional da região LEE de três amostras de aEPEC que expressam os padrões ALL (BA320), AA (Ec292/84) e AD (9100/83), e de uma amostra não aderente (BA4013). Os padrões de adesão, bem como a capacidade de causar a lesão A/E, foram investigados em células epiteliais intestinais (Caco-2, T84 e HT29) e não intestinais (HEp-2 e HeLa). Os padrões de adesão de todas as amostras foram reprodutíveis, independente da origem das células epiteliais. Quanto à capacidade de causar a lesão A/E *in vitro*, detectada através do teste *fluorescent actin-staining* (FAS), houve variação dependente da linhagem celular e a positividade só foi detectada em algumas linhagens celulares após a adesão das amostras ALL (HEp-2, HeLa e HT29) e AD (HeLa). Não foi detectada a fosforilação do receptor Tir expresso pelas amostras FAS positivas (ALL e DA) após a adesão em células HEp-2 e HeLa, demonstrando que nenhuma das amostras utiliza a via Nck de formação da lesão A/E *in vitro*. A presença de *espFu* foi pesquisada através da PCR com auxílio dos iniciadores *tccP* e *tccP2*. Somente o gene *tccP* foi detectado na amostra ALL, indicando que essa amostra utiliza a via EspFu na formação da lesão A/E *in vitro*. Os 31 genes da região LEE foram detectados através de experimentos de PCR ou *slot-blot*, confirmando que a estrutura de LEE estava intacta em todas as amostras. Ensaios de PCR em tempo real, na presença e ausência de células HeLa, *microarray* e imunodeteção mostraram a expressão dos cinco operons de LEE em todas as amostras. Estes resultados indicaram um papel suplementar de fatores não codificados em LEE no estabelecimento da lesão A/E pelas amostras FAS negativas (AA e não aderente), uma vez que a região LEE dessas amostras foi detectada e estava sendo expressa. Um plasmídeo que expressa a proteína EspFu foi então introduzido em todas as amostras, mostrando que essa proteína não influencia no estabelecimento dos padrões de adesão e na capacidade de causar a lesão A/E das amostras ALL, AA e AD. A amostra AA, embora tenha a sua região LEE funcional, não foi capaz de causar A/E *in vitro*, o que pode ocorrer *in vivo* através de uma via não mediada por Nck ou EspFu. Por outro lado, a amostra não aderente passou a expressar o padrão ALL e foi capaz de causar a lesão A/E. Desta forma, além do envolvimento no estabelecimento da lesão A/E, EspFu desempenhou um papel indireto na adesão celular de uma amostra de aEPEC.

Palavras-chave: *Escherichia coli*. Diarreia. Interação celular.

ABSTRACT

ROCHA, S. P. D. **Structural and functional analysis of LEE region of atypical enteropathogenic *Escherichia coli***. 141 p. PhD thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Enteropathogenic *Escherichia coli* is capable to cause a histopathological lesion on the intestinal epithelium called attaching-effacing (A/E), triggered by proteins encoded by the locus of enterocyte effacement (LEE). EPEC is currently classified as typical and atypical (aEPEC), based on the presence or absence of the EPEC adherence plasmid, respectively. aEPEC strains express the adherence pattern on cultured epithelial cells known as localized adherence-like (LAL), but aggregative (AA) or diffuse (DA) adherence patterns may be expressed by some strains. In this study, we analyzed structurally and functionally the LEE region of three aEPEC strains displaying LAL (BA320), AA (Ec292/84) and DA (9100/83), and one nonadherent strain (BA4013). The adherence characteristics as well as the ability to cause A/E were investigated in intestinal (Caco-2, T84 and HT29) and non-intestinal (HEp-2 and HeLa) epithelial cells. The adherence patterns of all strains were reproducible, independent of the epithelial cell line. Regarding the capacity to cause the A/E lesion *in vitro*, detected by the fluorescent actin-staining (FAS) assay, there was variation depending on the cell line origin, and positive results were detected only in some cell lines after the contact of the LAL (HEp-2, HeLa and HT29 cells) and DA (HeLa cells) strains. The phosphorylation of Tir, expressed by the FAS-positive strains (LAL and DA), was not detected after adherence to HEp-2 and HeLa cells, demonstrating that none of the strains uses the Nck pathway in the establishment of the A/E lesion *in vitro*. The presence of *espFu* was searched by PCR using the primers *tccP* and *tccP2*. Only *tccp* was detected in the LAL strain, indicating that this strain uses the EspFu pathway in the establishment of the A/E lesion *in vitro*. The 31 genes of LEE were detected by PCR or slot-blot assays, suggesting that the LEE structure was intact in all strains. Real time PCR, in the presence and absence of HeLa cells, microarray and immunodetection assays showed the expression of the five LEE operons in all strains. These results indicated a supplemental role of non LEE-encoded factors in the establishment of the A/E lesion *in vitro* by the FAS-negative strains (AA and non adherent), since the LEE region of these strains was detected and functional. An EspFu-expressing plasmid was then introduced in all strains, demonstrating no influence of this protein neither in the adherence patterns nor in the capacity to cause A/E of the LAL, AA and DA strains. The AA strain, although harboring a functional LEE region, was incapable to cause A/E *in vitro*, which may occur *in vivo* by a pathway not mediated by Nck or EspFu. On the other hand, the previously nonadherent strain expressed the LAL pattern and was able to cause A/E *in vitro*. Therefore, in addition to the establishment of the A/E lesion, EspFu was shown to play a role in cell adhesion of one aEPEC strain.

Key words: *Escherichia coli*. Diarrhea. Cellular interaction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1- Representação esquemática dos estágios da patogênese de EPEC..... | 24 |
| Figura 2- Representação esquemática da organização genética da região LEE de EPEC..... | 26 |
| Figura 3- Representação esquemática do SST3 de EPEC..... | 30 |
| Figura 4- Representação esquemática das vias de indução da polimerização da actina em EPEC..... | 32 |
| Figura 5- Representação esquemática dos reguladores da região LEE de EPEC..... | 34 |
| Figura 6- Padrões de interação das amostras de aEPEC deste estudo com células epiteliais cultivadas HeLa, HEp-2, Caco-2, T84 e HT29, após 6h de incubação | 61 |
| Figura 7- Teste de FAS com células HeLa, HEp-2, Caco-2, T84 e HT29 após 6h de interação das amostras de aEPEC deste estudo..... | 62 |
| Figura 8- Eletroforese em gel de agarose (0,8%), após coloração com brometo de etídio, dos produtos amplificados referentes ao gene <i>tccP</i> empregando os iniciadores <i>tccP(F)</i> e <i>tccP(R)</i> | 64 |
| Figura 9- Teste de fosforilação da proteína Tir, após 6h de interação das amostras de aEPEC deste estudo com células HeLa e HEp-2..... | 65 |
| Figura 10- Análise em eletroforese em gel de agarose (1%), após coloração com brometo de etídio, dos produtos amplificados através de PCR referentes à detecção dos genes da região LEE da EPEC E2348/69, utilizando os iniciadores apresentados na tabela 2 e o DNA da amostra E2348/69 como molde..... | 67 |
| Figura 11- Filmes de Raio-X expostos à membrana de <i>nylon</i> contendo DNA genômico após hibridização com as sondas marcadas por quimioluminescência..... | 70 |
| Figura 12- Alinhamento das sequências de nucleotídeos, total ou parcial, de 7 genes da região LEE..... | 71 |
| Figura 13- Esquema do supergene construído através da união da sequência dos genes <i>ler</i> , <i>sepZ</i> , <i>escV</i> , <i>map</i> , <i>cest</i> , <i>eae</i> e <i>espA</i> | 82 |
| Figura 14- Árvore filogenética das quatro amostras de aEPEC, tEPEC (E2348/69) e EHEC (Sakai) baseada nos genes <i>ler</i> , <i>sepZ</i> , <i>escV</i> , <i>map</i> , <i>cest</i> , <i>eae</i> , e <i>espA</i> | 83 |

| | |
|---|-----|
| Figura 15- Análises da transcrição do operon LEE1 das amostras de aEPEC deste estudo, detectadas através da transcrição do gene <i>ler</i> em ensaios da PCR em tempo real..... | 86 |
| Figura 16- Análises da transcrição do operon LEE2 das amostras de aEPEC deste estudo, detectadas através da transcrição do gene <i>escC</i> em ensaios da PCR em tempo real..... | 88 |
| Figura 17- Análises da transcrição do operon LEE3 das amostras de aEPEC deste estudo, detectadas através da transcrição do gene <i>escV</i> em ensaios da PCR em tempo real..... | 90 |
| Figura 18- Análises da transcrição do operon LEE4 das amostras de aEPEC deste estudo, detectadas através da transcrição do gene <i>espA</i> em ensaios da PCR em tempo real..... | 92 |
| Figura 19- Análises da transcrição do operon LEE5 das amostras de aEPEC deste estudo, detectadas através da transcrição do gene <i>eae</i> em ensaios da PCR em tempo real..... | 94 |
| Figura 20- <i>Immunoblotting</i> para detecção das proteínas intimina, Tir, EspA, EspB e EspD, das amostras: Ec292/84, 9100/83, BA320, BA4013 e E2348/69 (controle positivo). CVD206, Δtir , UMD872, UMD864 e UMD870 (controles negativos)..... | 95 |
| Figura 21- Padrões de interação das amostras de aEPEC deste estudo transformadas com o plasmídeo pKC471, em ensaios de 6h com células HeLa..... | 96 |
| Figura 22- Teste de FAS com células HeLa (6h de interação) das amostras de aEPEC deste estudo transformadas com o plasmídeo pKC471..... | 97 |
| Figura 23- Teste de fosforilação da proteína Tir das amostras de aEPEC deste estudo com células HeLa e HEp-2, após 6h de interação..... | 99 |
| Figura 24- Análises das transcrições dos operons LEE1, 2, 3, 4 e 5 das amostras aEPEC BA4013 (após cultivo em DMEM) e BA4013(pkC471) (após cultivo em cultura de células HeLa), detectadas através da transcrição dos genes <i>ler</i> , <i>escC</i> , <i>escV</i> , <i>espA</i> e <i>eae</i> em ensaios da PCR em tempo real..... | 103 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| Tabela 1- Sequência de iniciadores, fragmentos amplificados e ciclos de amplificação das reações de PCR para a detecção dos genes de virulência de EPEC e EHEC..... | 44 |
| Tabela 2- Sequência de iniciadores, fragmentos amplificados e ciclos de amplificação das reações de PCR para detecção dos genes da região LEE, do seu sítio de inserção e dos genes <i>tccP</i> e <i>tccP2</i> | 44 |
| Tabela 3- Iniciadores empregados nos ensaios da PCR em tempo real..... | 54 |
| Tabela 4- Pesquisa de sequências genéticas associadas aos patótipos EPEC e EHEC | 59 |
| Tabela 5- Resultados dos ensaios de adesão, FAS e de detecção da fosforilação de Tir das amostras de aEPEC deste estudo em diferentes linhagens celulares <i>in vitro</i> , após 6h de contato células-bactérias..... | 63 |
| Tabela 6- Determinação do sítio de inserção da região LEE das amostras deste estudo..... | 66 |
| Tabela 7- Pesquisa da presença de 31 genes da região LEE nas amostras deste estudo..... | 68 |
| Tabela 8- Similaridade em porcentagem das sequências dos genes das amostras deste estudo, em comparação com as sequências dos respectivos genes das amostras de tEPEC E2348/69 e de EHEC Sakai..... | 82 |
| Tabela 9- Níveis de transcrição dos genes da região LEE das aEPEC Ec292/84, 9100/83 e BA4013 em comparação com a expressão dos mesmos genes da aEPEC BA320..... | 84 |
| Tabela 10- Resultados dos ensaios de adesão, FAS e de detecção da fosforilação de Tir das amostras de aEPEC deste estudo (selvagens e transferidas com o plasmídeo pKC471) em diferentes linhagens celulares <i>in vitro</i> , após 6h de contato células-bactérias..... | 100 |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA | 17 |
| 1.1 Doença diarreica..... | 17 |
| 1.2 <i>Escherichia coli</i> | 17 |
| 1.2.1 EPEC..... | 18 |
| 1.3 Lesão <i>attaching and effacing</i> | 23 |
| 1.4 Região LEE..... | 25 |
| 1.4.1 Regulação de LEE..... | 32 |
| 1.5 Proteínas efetoras não codificadas por LEE..... | 34 |
| 1.6 Formas de interação com células epiteliais <i>in vitro</i> | 35 |
| 2 OBJETIVOS | 38 |
| 2.1 Objetivo geral..... | 38 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 38 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 39 |
| 3.1 Meios de cultura e soluções..... | 39 |
| 3.2 Amostras bacterianas..... | 39 |
| 3.3 Testes de interação em cultura de células epiteliais humanas..... | 40 |
| 3.3.1 Testes de adesão..... | 40 |
| 3.3.2 Teste de FAS (<i>fluorescent actin staining</i>)..... | 42 |
| 3.3.3 Microscopia de imunofluorescência..... | 42 |
| 3.4 Detecção das sequências de DNA através de reações em cadeia da polimerase (PCR)..... | 43 |
| 3.5 Sequenciamento dos genes <i>ler</i> , <i>sepZ</i> , <i>escV</i> , <i>espA</i> , <i>eae</i> , <i>map</i> e <i>cest</i> | 47 |
| 3.6 Alinhamento múltiplo e construção da árvore filogenética..... | 47 |
| 3.7 Detecção dos genes de LEE através de <i>slot-blot</i> | 48 |
| 3.7.1 Extração do DNA genômico..... | 48 |
| 3.7.2 Preparo e marcação das sondas de DNA..... | 49 |
| 3.7.3 Transferência do DNA para membranas de <i>nylon</i> , hibridação com sondas genéticas e detecção do sinal de quimioluminescência..... | 50 |
| 3.8 Extração de RNA..... | 50 |
| 3.8.1 Extrações das amostras bacterianas cultivadas na presença de células HeLa..... | 50 |
| 3.8.2 Amostras bacterianas cultivadas em DMEM..... | 51 |
| 3.9 Análise da transcrição dos genes da região LEE através de DNA <i>microarray</i> | 52 |
| 3.10 Quantificação da transcrição dos operons de LEE através da PCR em tempo real..... | 53 |
| 3.11 Análise da expressão de genes localizados em LEE por <i>Immunoblotting</i> | 55 |
| 3.11.1 Extração de proteínas totais e secretadas..... | 55 |
| 3.11.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e imunodetecção..... | 56 |
| 3.12 Transformação de EPEC atípica com o plasmídeo pKC471..... | 57 |
| 3.12.1 Preparo das células competentes..... | 57 |
| 3.12.2 Transformação bacteriana e seleção dos clones..... | 58 |

| | |
|--|-----|
| 4 RESULTADOS | 59 |
| 4.1 Confirmação do genótipo de aEPEC | 59 |
| 4.2 Confirmação da expressão dos padrões de adesão | 60 |
| 4.3 Verificação da capacidade de formação da lesão A/E <i>in vitro</i> | 60 |
| 4.4 Pesquisa dos genes <i>tccP/tccP2</i> | 64 |
| 4.5 Detecção da fosforilação de Tir | 64 |
| 4.6 Análise estrutural dos genes da região LEE | 66 |
| 4.7 Detecção da transcrição dos genes da região LEE através de <i>microarray</i> de cDNA | 83 |
| 4.8 Quantificação da transcrição dos <i>operons</i> de LEE através da PCR em tempo real | 85 |
| 4.9 Expressão das proteínas EspA, EspB, EspD, intimina e Tir através de <i>immunoblotting</i> | 95 |
| 4.10 Análise fenotípica das amostras de aEPEC, contendo <i>espFu/tccP in trans</i> | 96 |
| 5 DISCUSSÃO | 104 |
| 6 CONCLUSÕES | 120 |
| REFERÊNCIAS | 121 |

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Doença diarreica

A diarreia infecciosa é considerada um dos grandes problemas de saúde pública mundial, sendo responsável por mais de dois milhões de mortes a cada ano, particularmente entre crianças abaixo de cinco anos de idade (BRYCE et al., 2005). De acordo com dados do Ministério da Saúde, foram registrados 17.763.546 casos de doenças diarreicas agudas no Brasil, no período de 2000 a 2007 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), *Escherichia coli* é o agente infeccioso bacteriano mais frequente nas formas endêmicas da diarreia infantil em todo o mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002). Vários estudos epidemiológicos também mostram a *E. coli* como o principal agente causal da doença diarreica infecciosa no Brasil (NATARO; KAPER, 1998; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; HERNANDES et al., 2009).

1.2 *Escherichia coli*

E. coli é, provavelmente, a espécie bacteriana mais diversificada em seus aspectos bacteriológicos, ecológicos e de patogenicidade. Indivíduos dessa espécie são encontrados na microbiota normal dos intestinos do homem e de outras espécies animais. Estão também presentes numa vasta gama de ambientes terrestres e aquáticos (MARTINEZ; TRABULSI, 2008). Algumas variedades de *E. coli* estão associadas a estados patológicos no homem e em animais domésticos. No homem as infecções causadas por *E. coli* podem ser intestinais e extra-intestinais, dentre as quais destacam-se as infecções urinárias, as sepses e as meningites de recém-nascido (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Quanto às infecções intestinais, as *E. coli* são usualmente classificadas em seis categorias ou patótipos, de acordo com suas características de virulência, interações com células epiteliais cultivadas e manifestações clínicas que causam. Esses patótipos são: *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 a células epiteliais (DAEC) (NATARO; KAPER; MOBLEY, 2004). Embora essa classificação continue sendo usada, é evidente que alguns patótipos incluem grupos bastante distintos. Assim, as EPEC e as EAEC foram subdivididas em típicas e atípicas (KAPER, 1996; HARRINGTON et al., 2006). Além disso, as *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) constituem um grupo das STEC (NATARO; KAPER; MOBLEY, 2004).

1.2.1 EPEC

O termo EPEC foi criado para designar os sorogrupos de *E. coli* associados à diarreia, distinguindo-os assim dos sorogrupos encontrados em indivíduos normais ou em pacientes com processo de infecção extra-intestinal (NETER et al., 1955).

Com base na tipagem do antígeno somático O, que corresponde à porção polissacarídica do lipopolissacarídeo da membrana externa, e do antígeno H, que corresponde às proteínas flagelares, foi proposto um esquema de classificação onde foram definidos sorogrupos (O) e sorotipos (O:H) de *E. coli* (KAUFMAN, 1947), os quais são de grande importância no diagnóstico e em estudos epidemiológicos (NATARO; KAPER, 1998).

Devido à associação epidemiológica de certos sorogrupos de *E. coli* com diarreia, a OMS definiu EPEC como pertencente a um dos seguintes sorogrupos: O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 e O158 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1987). Esses sorogrupos também são conhecidos como sorogrupos clássicos de EPEC (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002).

As amostras de EPEC podem ser tipadas, de forma complementar, com relação ao antígeno H, determinando então os sorotipos. Vários estudos sobre as características fenotípicas e genotípicas dos diversos sorotipos que compõem os sorogrupos O clássicos de EPEC mostraram que cada sorogrupo é composto por diferentes patótipos de *E. coli* diarreio gênicas (tEPEC, aEPEC, EHEC e EAEC), e que

essas características são clonais e associadas aos antígenos flagelares (CAMPOS; FRANZOLIN; TRABULSI, 2004).

Conforme mencionado anteriormente, as EPEC podem ser subclassificadas em típicas (tEPEC) e atípicas (aEPEC). Essa classificação baseia-se na presença ou ausência do plasmídeo EPEC *adherence factor* (pEAF), respectivamente, e ausência dos genes *stx*, que codificam as toxinas Shiga de STEC (KAPER, 1996). O plasmídeo pEAF contém os 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 dos genes de virulência de EPEC (TOBE et al., 1999). O fragmento sonda EAF é crítico, sendo utilizado de forma complementar na identificação de EPEC (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002). Porém, a melhor definição para diferenciar aEPEC de tEPEC é a de Trabulsi; Keller; 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; ABE et al., 2009).

EPEC foi até a década de 1990 o patógeno bacteriano mais prevalente em casos de diarreia em crianças até 2 anos de idade de países em desenvolvimento (NATARO; KAPER, 1998). Uma vez que o diagnóstico de EPEC baseava-se na aglutinação da cepa de *E. coli* isolada de fezes com antissoros contra os 12 sorogrupos O clássicos e/ou na detecção do fragmento sonda EAF (CHEN; FRANKEL, 2005), dados epidemiológicos precisos sobre a prevalência de aEPEC em relação à tEPEC são escassos anteriormente a proposição desses grupos por Kaper (1996).

Desde a década de 1990 tem ocorrido uma significativa diminuição da prevalência de tEPEC em países em desenvolvimento, incluindo o Brasil, da mesma forma que ocorreu em países desenvolvidos a partir da década de 1960 (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002; CHEN; FRANKEL, 2005; OCHOA et al., 2008). Atualmente tEPEC é raramente isolada em nosso meio, enquanto aEPEC está entre os enteropatógenos bacterianos mais prevalentes (SCALETSKY et al., 1999; GOMES et

al., 2003; ORLANDI et al., 2006; ARAUJO et al., 2007; BUERIS et al., 2007; SCALETISKY et al., 2009; MORENO et al., 2010). aEPEC é considerada um patógeno emergente, associado à diarreia aguda e persistente, afetando crianças e adultos em várias regiões do mundo (NATARO; KAPER, 1998; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002; HERNANDES et al., 2009).

As tEPEC são bastantes homogêneas em suas propriedades de virulência, pois expressam basicamente os fatores de virulência codificados pela ilha de patogenicidade denominada *locus of enterocyte effacement* (região LEE) e pelo plasmídeo pEAF (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002), além de pertencerem aos sorogrupos clássicos de EPEC. Os sorotipos mais frequentes, dentre os sorogrupos clássicos, são: O111ab:H2, O111ab:HNM, O55:H6, O55:HNM, O119:H6, O127:H6, O127:H40, O142:H6, O142:H34 e O86:34 (CAMPOS; FRANZOLIN; TRABULSI, 2004; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002).

Os sorotipos de aEPEC podem pertencer ou não aos chamados sorogrupos O de EPEC, diferindo dos sorotipos de tEPEC basicamente pelos antígenos H. Os principais sorotipos de aEPEC pertencentes aos sorogrupos clássicos são: O26:H11, O55:H7, O55:H34, O86:H8, O111:H9, O111:H25, O119:H2, O125ac:H6 e O128:H2 (HERNANDES et al., 2009; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002). Entretanto, os relatos epidemiológicos nos quais as amostras de aEPEC foram sorotipadas, claramente demonstram que a maioria delas pertencem a sorotipos que não fazem parte dos sorogrupos clássicos ou não são tipáveis (HERNANDES et al., 2009). Vieira et al. (2001) identificaram 35 sorotipos entre 59 amostras de aEPEC estudadas, porém um número relativamente grande de antígenos O e H não puderam ser determinados. Essa grande diversidade de sorotipos, incluindo amostras não tipáveis, também foi encontrada por outros autores (DULGUER et al., 2003; GOMES et al., 2004; ROBINS-BROWNE et al., 2004; FRANZOLIN et al., 2005; JENKINS et al., 2006; ARAUJO et al., 2007; AFSET et al., 2008; ABE et al., 2009; SCALETISKY et al., 2009).

Estudos epidemiológicos realizados no Brasil (SCALETISKY et al., 1999; ORLANDI et al., 2006; ARAUJO et al., 2007; BUERIS et al., 2007; SCALETISKY et al., 2009; MORENO et al., 2010) e em outros países (AFSET et al., 2004; ROBINS-BROWNE et al., 2004; SARANTUYA et al., 2004; COHEN et al., 2005) mostraram

associação de aEPEC com diarreia aguda da criança. Também existem alguns relatos de aEPEC como agente de diarreia persistente (AFSET et al., 2004; NGUYEN et al., 2006) e do seu isolamento de pacientes adultos e com HIV/AIDS (GASSAMA-SOW et al., 2004; GOMES et al., 2004).

Além da associação com diarreia endêmica, aEPEC também foi associada a surtos de diarreia, como os descritos na Finlândia, EUA, Japão e Reino Unido (VILJANEN et al., 1990; HEDBERG et al., 1997; YATSUYANAGI et al., 2002; JENKINS, et al., 2003; YATSUYANAGI et al., 2003).

Até o momento não foi descrito nenhum fator de virulência exclusivo das aEPEC, ao contrário, todos os fatores de virulência encontrados têm sido comuns a outros patótipos de *E. coli* diarreiogênicas. No entanto, a maioria dos relatos sobre fatores de virulência de aEPEC publicados até o presente momento avaliou apenas a presença de genes que codificam toxinas e adesinas.

Com relação às toxinas, *astA* (que codifica a toxina termo-estável EAST-1 de EAEC), *ehxA* (que codifica a enterotoxina de EHEC) e *hly* (que codifica a α -hemolisina) são os genes mais frequentemente detectados em aEPEC (PELAYO et al., 1998; VIEIRA et al., 2001; DULGUER et al., 2003; GOMES et al., 2003; ROBINS-BROWNE et al., 2004; AFSET et al., 2006; SCALETSKY et al., 2009). A expressão de enterohemolisina foi detectada em algumas dessas amostras (PELAYO et al., 1998; VIEIRA et al., 2001; NUNES et al., 2003). Genes que codificam outras toxinas de *E. coli* diarreiogênicas, tais como *pet* (que codifica a enterotoxina Pet de EAEC) e *cdt* (que codifica a toxina citoletal distensora) também foram encontrados em aEPEC, embora em baixas prevalências (GOMES et al., 2003; AFSET et al., 2006; SCALETSKY et al., 2009). O papel dessas toxinas na patogênese de aEPEC não está estabelecido, embora alguns desses marcadores tenham sido encontrados em associação estatística com diarreia (DULGUER et al., 2003; AFSET et al., 2006; SCALETSKY et al., 2009).

Diversos genes que codificam adesinas descritas em outros patótipos de *E. coli* diarreiogênicas, especialmente em EHEC, já foram detectados em aEPEC: *lpf* (*long polar fimbriae*), *iha* (*Vibrio cholerae IrgA homologue adhesin*), *efa1* (EHEC factor for adherence 1), *toxB* (proteína ToxB envolvida na adesão), *Ida* (*locus for diffuse adherence*), *paa* (*porcine A/E-associated protein*), *sfa* (fímbria S), *pap* (fímbria P) e

afa (adesina afimbrial da família Dr). Esses genes foram encontrados em diferentes prevalências e em alguns relatos foi encontrada associação estatística com diarreia (VIEIRA et al., 2001; BADEA et al., 2003; DULGUER et al., 2003; GOMES et al., 2003; ROBINS-BROWNE et al., 2004; AFSET et al., 2006; SCALETSKY et al., 2009; TORRES et al., 2009; VIEIRA et al., 2010). O papel das adesinas codificadas por esses genes na adesão de aEPEC ainda não está estabelecido, nem mesmo foi determinado se essas adesinas são expressas nessas amostras.

A fímbria *E. coli common pilus* (ECP) está presente em muitos isolados de *E. coli* diarreiogênicas e parece agir em conjunto com a fímbria BFP durante a interação de tEPEC com a célula hospedeira (RENDÓN et al., 2007; 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 (SCALETISKY et al., 2010).

Duas novas adesinas responsáveis pelo estabelecimento da adesão difusa *in vitro* foram caracterizadas em amostras de aEPEC dos sorotipos O26:H11 (adesina codificada pelo *locus for diffuse adherence*) e O55:H7 (adesina AfaE1) (KELLER et al., 2002; SCALETISKY et al., 2005). Essas duas adesinas são afimbriais e o envolvimento de ambas na adesão *in vitro* foi evidenciado através de experimentos de mutagênese.

A capacidade de invadir linhagens celulares *in vitro*, apresentada por algumas amostras de aEPEC, foi descrita por vários autores (SCALETISKY et al., 1996; ROSA et al., 2001; HERNANDES et al., 2008; SAMPAIO et al., 2009; YAMAMOTO et al., 2009). No entanto, essa característica parece ser amostra dependente (PELAYO et al., 1998; ROBINS-BROWNE et al., 2004) e o papel desse mecanismo de virulência na patogênese de aEPEC ainda não foi estabelecido (HERNANDES et al., 2009).

Recentemente foi descrita a hipersecreção de muco em alça ligada de íleo de coelho e em cultura de células intestinais humanas HT29-MTX, induzida por amostras de aEPEC (VIEIRA et al., 2010). Essa produção de muco aumentada aparentemente favorece a multiplicação bacteriana e pode ser um mecanismo complementar de virulência usado por aEPEC para infectar o hospedeiro.

1.3 Lesão *attaching and effacing*

A adesão íntima de EPEC ao epitélio intestinal desencadeia uma cascata de sinais transmembrânicos e intracelulares, culminando na formação de uma lesão específica denominada lesão *attaching and effacing* (A/E) (CROXEN; FINLAY, 2010). Essa lesão é caracterizada pelo apagamento das microvilosidades locais e acúmulo de actina polimerizada e outros componentes do citoesqueleto da célula eucariótica no local da adesão bacteriana, formando uma estrutura semelhante a um pedestal com a EPEC em sua superfície (ROTHBAUM et al., 1982; MOON et al., 1983).

Esta lesão pode ser observada *in vitro*, utilizando-se cultura de células epiteliais, em *ex vivo*, utilizando-se *in vitro organ culture* (IVOC) de intestino humano e *in vivo*, utilizando patógenos que produzem esta lesão em animais como a *rabbit diarrheagenic E. coli* (RDEC). É aceito que a patogênese da diarreia causada por EPEC, pelo menos em parte, é consequência direta da lesão A/E (NATARO; KAPER, 1998; CROXEN; FINLAY, 2010).

Todo processo que leva à formação da lesão A/E pode ser dividido em quatro fases (CLARKE et al., 2003). Primeiramente as interações com a célula hospedeira são mediadas por BFP, EspA e flagelo. No segundo estágio, ocorre o apagamento das microvilosidades e moléculas efetoras, cujos genes estão presentes em LEE e também fora da ilha de patogenicidade, são secretadas para o interior da célula hospedeira através do sistema de secreção do tipo três (SST3). No terceiro estágio, 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 neste local da adesão. Finalmente, estas alterações no citoesqueleto vão levar a formação de uma estrutura semelhante a um pedestal, no qual encontra-se a EPEC aderida. Um esquema dessas etapas descritas por Clarke et al. (2003) está apresentado na figura 1. Estas alterações nos enterócitos levam ao desbalanço eletrolítico que culmina na diarreia (CROXEN; FINLAY, 2010).

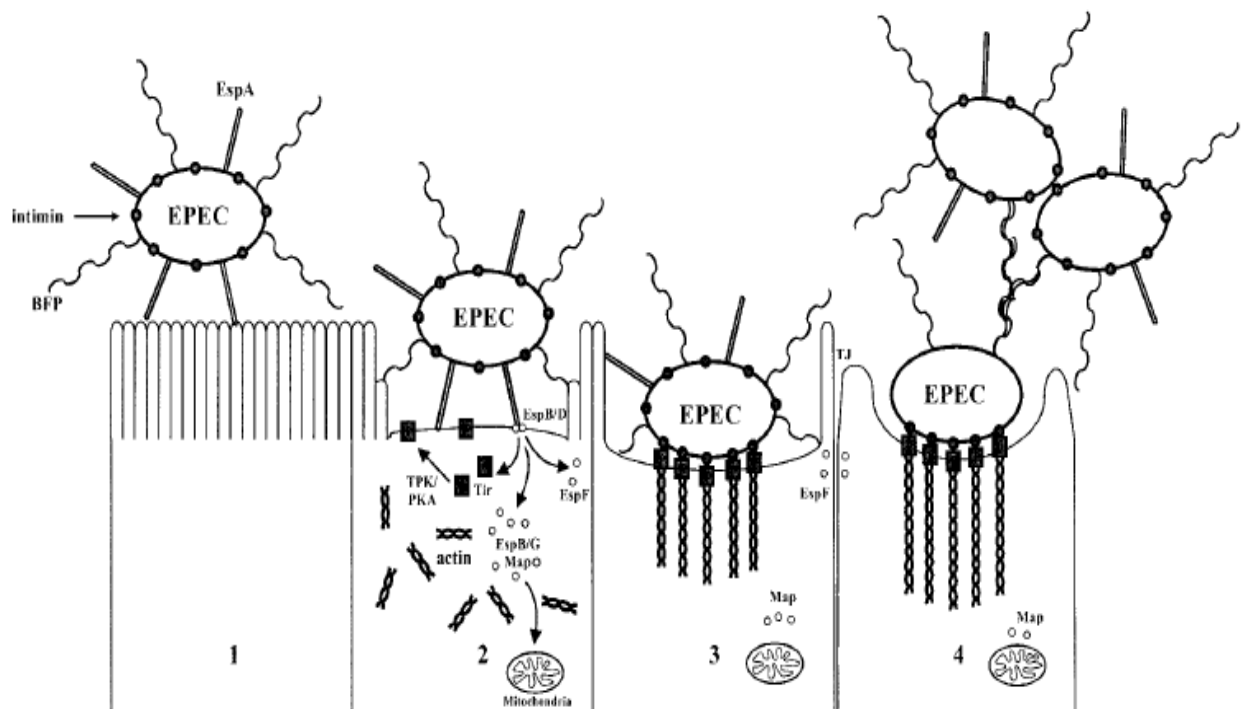


Figura 1- Representação esquemática dos estágios da patogenicidade de EPEC. **1:** adesão no enterócito; **2:** apagamento das microvilosidades e translocação das proteínas efectoras; **3:** adesão íntima e rearranjo do citoesqueleto; **4:** formação do pedestal.

FONTE: Clarke et al, 2003.

Knutton et al.(1989), observaram que os pedestais formados por patógenos que causam a lesão A/E possuíam alta concentração de filamentos de actina polimerizada. Então, desenvolveram um teste denominado *fluorescent-actin staining* (FAS), onde a faloidina marcada com isotiocianato de fluoresceína liga-se à actina filamentosa em cultura de células epiteliais, abaixo de cada bactéria aderida. O teste de FAS constitui-se em um recurso importante no diagnóstico de EPEC e de outras bactérias capazes de produzir esta lesão histopatológica, tais como EHEC, RDEC, *Escherichia albertii* e *Citrobacter rodentium* (CROXEN; FINLAY, 2010).

Como aEPEC não expressa a fímbria BFP, a interação com as células hospedeiras e a formação da lesão A/E é tardia (após 3h de interação) em comparação com tEPEC (antes de 3h de interação) (BUERIS, 2008). Sendo assim, a adesão de aEPEC é inicialmente mediada por EspA, seguida pela interação intimina-Tir quando a adesão se torna íntima. A participação de outras adesinas encontradas em aEPEC, bem como do flagelo, não podem ser descartadas nessa etapa da

patogênese (GIRÓN et al., 2002; KELLER et al., 2002; SCALETISKY et al., 2005; SALDAÑA et al., 2009; SAMPAIO et al., 2010).

1.4 Região LEE

Ilha de patogenicidade (PAI) é um conjunto de genes adquiridos por transferência horizontal, os quais codificam produtos que contribuem para virulência. As PAIs possuem algumas características: estão presente em algumas amostras ou espécies relatadas mas não em outras; os genes constituintes são adquiridos por transferência horizontal; a sua inserção é adjacente ao *locus* de RNAt; o seu conteúdo de guanina/citosina (G+C) é diferente do core do genoma da bactéria hospedeira; conferem ao hospedeiro bacteriano um distinto fenótipo de virulência (PALLEN; WREN, 2007).

A formação da lesão A/E requer o produto de vários genes, os quais estão localizados em uma PAI de 35,5 kb, denominada região LEE (McDANIEL et al., 1995). Essa região foi primeiramente descrita na amostra de tEPEC E2348/69 (sorotipo O127:H6), mas também está presente em EHEC, RDEC, *E. albertii*, e *C. rodentium* (CROXEN; FINLAY, 2010). O conteúdo de G+C da região LEE (38,3%) da amostra protótipo de tEPEC E2348/69 é menor do que o do cromossomo de *E. coli* (50,8%), indicando que a presença dessa ilha é resultado de uma transferência horizontal de genes (FRANKEL et al., 1998). Nessa amostra, LEE está inserida na região equivalente ao minuto 82 do cromossomo de *E. coli* K12, adjacente ao *locus* *sefC* (McDANIEL et al., 1995), o qual corresponde ao mesmo sítio de inserção de uma das PAI em amostras de *E. coli* uropatogênicas (UPEC) (HACKER et al., 1997). Em algumas amostras de EPEC, LEE está localizada no minuto 94 do cromossomo, adjacente ao *locus* *pheU* e ainda há evidências de um terceiro sítio de inserção, com localização ainda não conhecida (SPERANDIO et al., 1998). Este terceiro sítio provavelmente seja em *pheV*, encontrado primeiramente em amostras de EHEC de origem bovina (RUMER, et al., 2003).

Conforme mostrado na figura 2, os genes que fazem parte da região LEE estão organizados em cinco operons principais de funções conhecidas: LEE1, LEE2, LEE3, LEE4 e LEE5 (MELLIES et al., 1999; SANCHES-SANMARTIN et al., 2001).

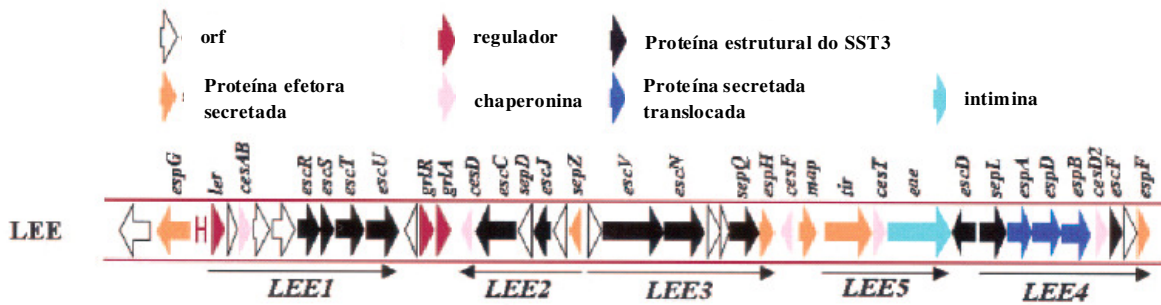


Figura 2- Representação esquemática da organização genética da região LEE de EPEC.
 FONTE: Garmendia, Frankel e Crepin, 2005.

O operon LEE5 contém os genes *eae* (EPEC *attaching and effacement*), *tir* (*translocated intimin receptor*) e *cesT*, os quais codificam, respectivamente, a intimina, uma adesina de membrana externa responsável pela adesão íntima à célula epitelial; o seu receptor Tir, o qual é translocado para a célula epitelial; e CesT, a chaperonina das proteínas Tir e Map (*Mitochondrial-associated protein*) (SANCHES-SANMARTIN et al., 2001; CREASEY et al., 2003a).

A intimina é uma proteína de membrana externa de 94 kDa, necessária para a indução da lesão A/E. Essa proteína, como anteriormente referido, é codificada pelo gene *eae* e atua tanto mediando a adesão íntima da bactéria à célula epitelial (JERSE et al., 1990), como na indução da fosforilação de proteínas e na organização dos filamentos de actina polimerizada, culminando na formação da lesão A/E (FINLAY et al., 1996). Estudos das proteínas da família das intiminas demonstram que, do mesmo modo que as invasinas, a atividade de ligação à célula hospedeira está localizada nos 280 resíduos de aminoácidos da porção carboxi-terminal, também conhecida por Int280 (FRANKEL et al., 1994). Com base na variação antigênica do domínio de ligação da intimina à célula hospedeira, já foram caracterizados pelo menos 29 tipos e subtipos de intimina (GARRIDO et al., 2006; MORA et al., 2009), sendo que cinco subtipos são mais comuns: α , β , γ , δ e ϵ (ADU-BOBIE et al., 1998; OSWALD et al., 2000). Hernandez et al. (2008), demonstraram que a intimina do subtipo σ (ômicron), expressa por uma amostra de aEPEC, é responsável pela capacidade dessa amostra aderir de forma localizada e de invadir células HeLa.

Entretanto, o fenótipo de invasão de aEPEC parece ser um processo complementar e característico de apenas algumas amostras (YAMAMOTO et al., 2009).

À montante do gene *eae*, localizam-se os operons LEE1, LEE2 e LEE3, que contêm os genes que codificam as proteínas que compõem o SST3, conforme apresentado na figura 3. O primeiro gene de LEE1 é *ler* (*LEE encoded regulator*), o qual codifica uma proteína reguladora que ativa todos os operons de LEE (MELLIES et al., 2007). Além de *ler*, em LEE1 também estão localizados os genes *escR*, *S*, *T* e *U*, e *cesAB*. Em LEE2 localizam-se os genes *sepZ*, *escJ*, *sepD*, *escC* e *cesD*. Os genes *escV*, *sepQ* e *espH* localizam-se em LEE3 (GARMENDIA; FRANKEL; CREPIN, 2005).

Na porção à jusante do gene *eae* está localizado o operon LEE4, o qual contém os genes que codificam as seguintes proteínas secretadas pelo SST3: SepL, EspA, EspD, EspB, EscF, EspF (SEKIYA et al., 2001) e a chaperonina CesD2 (NEVES et al., 2003). Além dos genes que codificam estas proteínas, outra ORF foi sequenciada na região LEE4, denominada *orf29*, cujo produto ainda não foi caracterizado (ELLIOTT et al., 1998).

EPEC utiliza o SST3 para injetar proteínas efetoras na membrana plasmática e citoplasma das células infectadas (LEE, 1997). Pelo menos nove proteínas, cujos genes estão na região LEE, foram encontrados no sobrenadante de cultura: EspA, EspB, EspD, EspF, EspG, EspH, SepZ, Map e Tir (GARMENDIA et al., 2005). O SST3 consiste, tipicamente, das proteínas Esc que formam um poro conectando as membranas da bactéria e da célula hospedeira (Figura 3). As funções de apenas algumas destas proteínas são conhecidas em detalhes. Através da análise da sequência dessas proteínas, deduz-se por homologia que EscN está envolvida na conversão de energia para a secreção, EscD, R, S, T e U participam da formação do poro na membrana interna da bactéria, EscJ forma um canal na região periplasmática, conectando as membranas internas e externas, e EscC forma um poro na membrana externa (GAUTHIER; 2002). EscF se projeta da célula hospedeira formando uma estrutura do tipo “agulha”, na qual EspA liga-se diretamente, recobrando esta “agulha”, formando então uma organela filamentosa, ou seja, um canal através do qual as proteínas são secretadas para a célula hospedeira (DANIELL et al., 2001; GAUTHIER; 2002).

EspB e D são translocadas via SST3 para a membrana da célula hospedeira, onde formam um poro, através do qual as proteínas são translocadas para a célula eucariótica (GAUTHIER; 2002). EspB também possui atividade efetora. EspB citosólico localiza-se na região de adesão bacteriana (TAYLOR et al., 1998), altera a morfologia da célula reduzindo o número de fibras de estresse (TAYLOR et al., 1999) e se liga a componentes do citoesqueleto (KODAMA et al., 2002; KNAPPSTEIN et al., 2004.)

EspF, que é secretada para o interior da célula hospedeira, atua desestabilizando as junções oclusivas do epitélio intestinal (MCNAMARA et al., 2001), na indução da apoptose da célula hospedeira (CRANE et al., 2001) e se liga à mitocôndria, causando desestabilização do potencial de membrana mitocondrial, liberando citocromo *c*, provocando assim o início da morte da mitocôndria (NOUGAYRÈDE et al., 2004). Map atua na mitocôndria da célula hospedeira causando uma disfunção no potencial de membrana mitocondrial (KENNY; JEPSON, 2000) e também provoca transtornos nas funções da barreira intestinal e alterações nas junções oclusivas (DEAN; KENNY, 2004). EspG induz a fragmentação dos microtúbulos e a degradação da tubulina (TOMSON et al., 2005). Após a secreção, EspH localiza-se na membrana da célula hospedeira, modulando a estrutura da actina do citoesqueleto, afetando a filopodia e formação do pedestal (TU et al., 2003). SepZ é secretada e translocada para a célula hospedeira, localizando-se no sítio de adesão bacteriana na região do pedestal, entretanto sua função não foi estabelecida (KANACK et al., 2005).

Muitas proteínas secretadas pelo SST3 necessitam de chaperoninas para se estabilizarem e prevenir interações prematuras no citoplasma da bactéria. Foram descritas cinco chaperoninas codificadas na região LEE: CesD, necessária para secreção de EspB e EspD (WAINWRIGHT et al., 1998); CesT, necessária para a secreção de Tir e Map (ELLIOTT et al., 1999; CREASEY et al., 2003a); CesF, que interage especificamente com EspF (ELLIOTT et al., 2002); CesD2, que atua como uma segunda chaperonina para EspD (NEVES et al., 2003); e CesAB, que atua como chaperonina de EspA e EspB (CREASEY et al., 2003b). Todas essas chaperoninas são codificadas por genes localizados em LEE (GARMENDIA; FRANKEL; CREPIN, 2005).

Análises comparativas entre os genes que codificam as proteínas Esp indicam que EspA é a mais conservada, enquanto as proteínas EspB e EspD são mais diversas (MAIRENA et al., 2004; MOURA et al., 2009). Outros autores também detectaram variantes dos genes *espA* e *espB* em amostras de aEPEC (GARRIDO et al., 2006; AFSET et al., 2006; MOURA et al., 2009)

A proteína Tir é secretada pelo SST3 para o citoplasma da célula hospedeira e então inserida na membrana citoplasmática desta célula, onde atua como receptor da intimina (KENNY et al., 1997). Após a inserção na membrana citoplasmática da célula eucariótica, Tir apresenta uma estrutura em forma de grampo composta de três regiões: um domínio extracelular em forma de alça, que interage com a intimina, um domínio transmembrânico e um domínio citoplasmático, onde se localizam as regiões amino e carboxiterminal, que pode induzir acúmulo de actina polimerizada e de outras proteínas do citoesqueleto logo abaixo da área de adesão da bactéria (HARTLAND et al., 1999). Até o momento foram descritos os seguintes alelos do gene *tir*: $\alpha 1$, $\beta 1$, $\beta 3$, $\gamma 1$, θ , ν , ρ (MORA et al., 2009). Variantes de *tir* também foram detectados em aEPEC por outros autores (GARRIDO et al., 2006; VIEIRA et al., 2001; AFSET et al., 2006; MOURA et al., 2009).

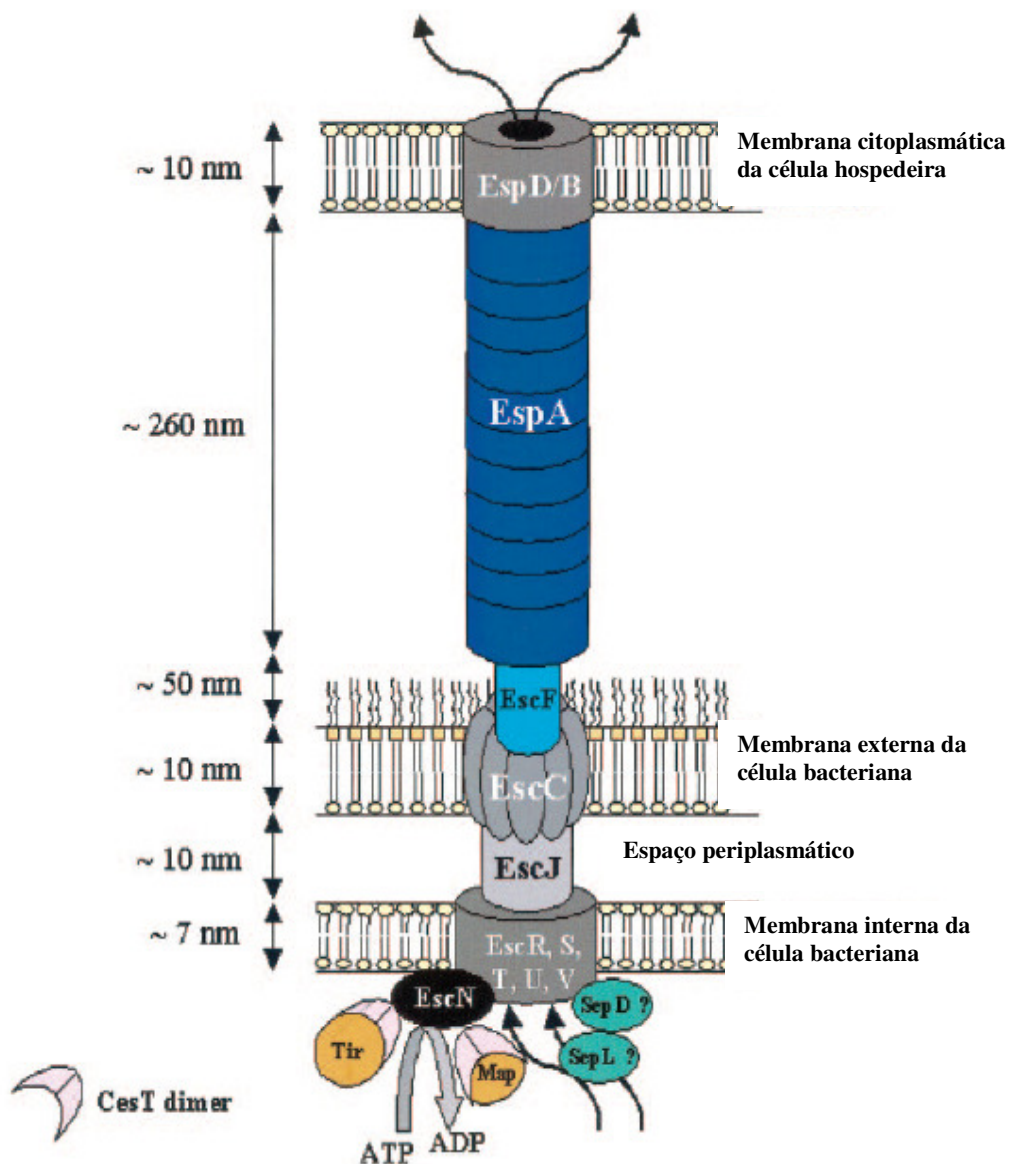


Figura 3- Representação esquemática do SST3 de EPEC.
 FONTE: Garmendia, Frankel e Crepin, 2005.

Em EPEC a formação do pedestal através da ativação da via N/WASP (*neuronal Wiskott-Aldrich syndrome protein*) e complexo Arp 2/3 (*actin-related protein 2/3*), que leva à indução do acúmulo de actina polimerizada, pode ocorrer através de três vias. A primeira caracterizada foi a via da fosforilação do aminoácido tirosina 474 de Tir (KENNY, 1999; CAMPELLONE; LEONG, 2005), conforme mostrado na figura 4. A ativação de N/WASP por esta via é realizada pela proteína

adaptadora da célula eucariótica denominada Nck (*non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein*), após interação desta proteína com a região onde se encontra a tirosina 474 de Tir fosforilada (CAMPELLONE et al., 2002).

Outra via de formação do pedestal foi descoberta na amostra de EHEC EDL933 (sorotipo O157:H7), na qual a proteína Tir não é fosforilada. Essa via é mediada pela proteína EspFu (CAMPELLONE et al., 2004), também conhecida como TccP/TccP2 (*Tir-cytoskeleton coupling protein*) (GARMENDIA et al., 2004; WHALE et al., 2007). Esta via conta com a participação das proteínas IRSp53 (*insulin receptor substrate protein of 53 kDa*) e/ou IRTKS (*insulin receptor tyrosine kinase substrate*), as quais interagem com o conservado motivo asparagina-prolina-tirosina da região C-terminal de Tir, fazendo assim a ligação Tir-EspFu (WEISS et al., 2009; VINGADASSALOM et al., 2009) (Figura 4). EspFu é secretada pela célula bacteriana via SST3, mas seu gene está localizado em um profago inserido no cromossomo bacteriano fora de LEE (CAMPELLONE et al., 2004; GARMENDIA et al., 2004; WHALE et al., 2007).

Recentemente, Bai et al. (2008) detectaram a capacidade de uma amostra de aEPEC do sorotipo O125:H6 em causar a lesão A/E em biópsias intestinais, capacidade não detectada em células HeLa. Esses autores demonstraram assim a existência de outra via, ainda não caracterizada, que leva a formação da lesão A/E *in vivo*, já que eles também verificaram que esta amostra não utiliza as vias Nck e EspFu.

Algumas amostras de EPEC podem utilizar tanto a via Nck como a via EspFu (WHALE et al., 2007).

Em outro estudo utilizando a amostra protótipo de tEPEC E2348/69, Shüller et al. (2007) demonstraram que a colonização em cultura de células HeLa é diferente da colonização em IVOC. Os mutantes E2348/69 Δ tir (mutantes na tirosina 474, tirosina 454 e tirosina 454/474) não foram capazes de provocar a lesão A/E em cultura de células HeLa, mas foram capazes de causar a lesão em modelo IVOC, recrutando N/WASP de maneira independente de Nck (SHÜLLER et al., 2007).

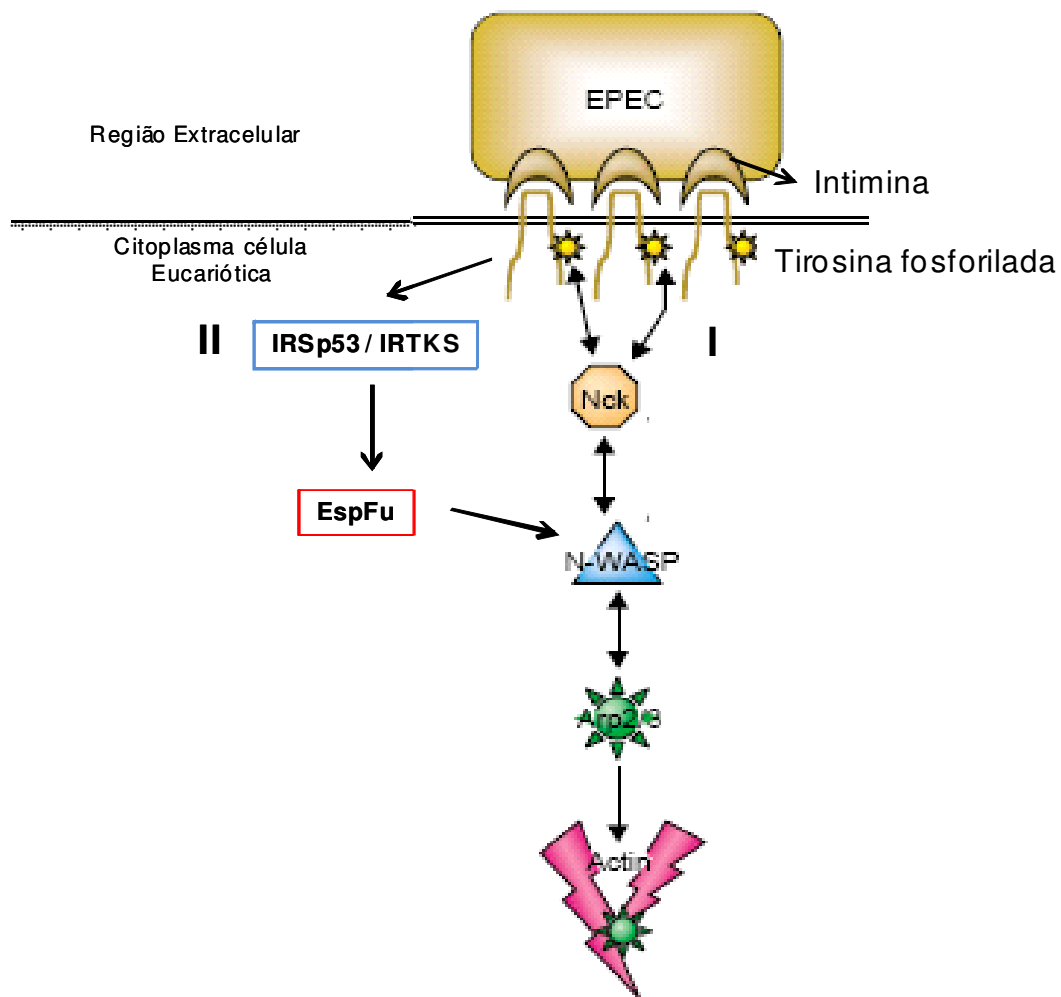


Figura 4- Representação esquemática das vias de indução da polimerização da actina em EPEC. I- Via Nck. II- Via EspFu.
 FONTE: Adaptado de Campellone e Leong, 2003.

1.4.1 Regulação de LEE

A regulação da transcrição dos genes da região LEE é multifatorial, conforme mostrado na figura 5. Entre os fatores mais importantes destaca-se Ler, que se localiza no operon LEE1 e está presente em amostras de EHEC e EPEC. A proteína Ler é extremamente importante na cascata de regulação dos genes de LEE, uma vez que este regulador global de LEE ativa todos os cinco operons desta PAI (MELLIES et al., 2007). Em um estudo realizado por Deng et al. (2004), as ORFs 10 e 11 da

região LEE, localizadas entre LEE1 e LEE2, foram descritas como genes que expressam o repressor (GrlR) e o ativador (GrlA) da região LEE, uma mutação em *grlA* resultou na diminuição da transcrição dos genes de LEE1, LEE2 e LEE5, enquanto o mutante *grlR* resultou na transcrição de LEE1 aumentada.

Per (*plasmid encoded regulator*), outro importante regulador, por estar presente no plasmídeo pEAF é encontrado somente em amostras de tEPEC (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). O operon *per* é formado pelos genes *perA*, *perB*, *perC* e *perD* (GÓMEZ-DUARTE; KAPER, 1995), mas somente o produto de *perC* ativa diretamente LEE1 através de *ler* (PORTER et al., 2005).

Estudos também sugerem que os genes da região LEE são regulados por *quorum sensing*, um sistema de comunicação entre bactérias e entre estas e seu hospedeiro, que é responsável por ativar e/ou reprimir determinados genes bacterianos (HUGHES; SPERANDIO, 2008). Sperandio et al. (1999) e Sircili et al. (2004), mostraram que a proteína *quorum sensing E. coli regulator A* (QseA), está envolvida na ativação de LEE1 em EPEC, ativando diretamente este operon.

Conforme observado na figura 5, muitos outros elementos reguladores endógenos de *E. coli* como *Factor for Inversion Stimulation* (FIS), BipA, *Integration Host Factor* (IHF), H-NS e LexA, são capazes de regular LEE de EPEC (MELLIES et al., 2007). Em aEPEC, o esquema de regulação é semelhante com exceção da participação da proteína PerC, a qual não é expressa em aEPEC.

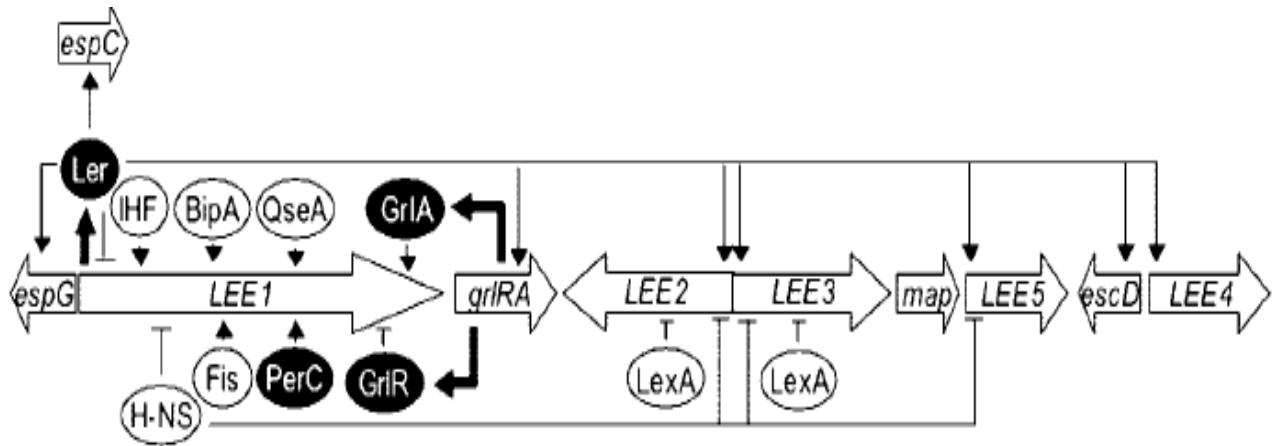


Figura 5- Representação esquemática dos reguladores da região LEE de EPEC. Setas finas com terminação triangular representam sinais regulatórios positivos. Setas finas com terminação em traço representam sinais regulatórios negativos. Setas grossas sólidas indicam expressão de proteínas regulatórias. Círculos ovais escuros indicam proteínas adquiridas horizontalmente. Círculos ovais transparentes indicam proteínas endógenas de *E. coli*.
 FONTE: Mellies et al., 2007.

A regulação pós-transcricional da secreção das proteínas de LEE parece estar a cargo de SepL e SepD (DENG et al., 2005). Estas duas proteínas, cujos genes estão em LEE, interagem entre si e controlam a hierarquia na secreção de proteínas efetoras e translocadoras no SST3; além disso, os níveis de cálcio também parecem estar envolvidos neste controle juntamente com SepL e SepD (DENG et al., 2005).

1.5 Proteínas efetoras não codificadas por LEE

O sequenciamento do genoma da amostra E2348/69 revelou a existência de seis PAIs, nas quais foram descobertos genes que podem codificar proteínas secretadas via SST3 que participam da patogenicidade de EPEC (IGUCHI et al., 2009). Dentre essas proteínas, as que têm função conhecida são: *non-LEE effectors* A, B, E e H (NLeA, NLeB, NLeE e NLeH), EspJ, EspC e EspG2. NLeA age inibindo a

secreção de proteínas da célula hospedeira (KIM et al., 2007) e também participa no processo de rompimento das junções oclusivas do epitélio intestinal (THANABALASURIAR et al., 2010); NleB está ligada à colonização de *C. rodentium* em camundongos; NleE ativa o sistema imunológico induzindo a migração de células polimorfonucleares (ZURAWSKI et al., 2008); NleH é uma proteína bloqueadora de apoptose durante a infecção de EPEC *in vitro* (HEMRAJANI, et al., 2010); e EspJ inibe a fagocitose de macrófagos *in vivo* (MARCHÈS et al., 2008).

Na ilha de patogenicidade EspC foram encontrados os genes que codificam duas proteínas efetoras: EspC, uma serina protease que possui efeito enterotóxico que resulta no rompimento da actina do citoesqueleto da célula hospedeira (VIDAL; NAVARRO-GARCIA, 2006), e EspG2, que provoca rompimento da rede de microtúbulos de células epiteliais intestinais (SHAW et al., 2005).

No cromossomo da EHEC EDL933 foi identificada uma PAI de 23 kb denominada OI-122 (*O island 122*), composta de 26 ORFs, incluindo as que apresentam homologia com os genes de virulência *pagC*, *sen*, *efa1/lifA*, *nleB* e *nleE* (PERNA et al., 2001). A presença desses genes foi encontrada em amostras de aEPEC por alguns autores (AFSET et al., 2006; SCALETSKY et al., 2009; VIEIRA et al., 2010). Afset et al. (2006) mostraram que as aEPEC são separadas em dois grupos de virulência: o grupo I, incluindo as amostras isoladas de casos de diarreia e que albergam a PAI OI-122 e o grupo II, contendo as amostras isoladas de controles saudáveis e que não albergam a PAI OI-122. Em outro estudo, realizado no Brasil, a detecção simultânea dos genes dessa PAI em aEPEC foi estatisticamente associada com diarreia, identificando amostras com maior potencial patogênico (VIEIRA et al., 2010).

1.6 Formas de interação com células epiteliais *in vitro*

As tEPEC aderem na superfície da célula hospedeira formando um grupo compacto de bactérias em uma ou mais áreas da superfície celular, o que caracteriza o padrão de adesão localizada (AL), após 3h de interação com células epiteliais cultivadas (SCALETSKY et al., 1984). A fímbria BFP é a responsável pela formação da microcolônia bacteriana compacta, promovendo e estabilizando a interconexão

entre as bactérias (GIRON et al., 1991). Também foi observada a participação da fímbria ECP na formação da compacta microcolônia bacteriana (SALDAÑA et al., 2009).

As aEPEC podem aderir ou não a células epiteliais em cultura. As aderentes expressam caracteristicamente o padrão de adesão localizada-*like* (ALL), onde as bactérias aderentes formam grupos menos compactos que o padrão AL, em uma ou mais áreas da superfície da célula hospedeira, somente após 6h de interação bactérias-células epiteliais (RODRIGUES et al., 1996). O padrão ALL é o mais comumente encontrado em aEPEC (PELAYO et al., 1998; SCALETISKY et al., 1999; VIEIRA et al., 2001; DULGUER et al., 2003; GOMES et al., 2004; ROBINS-BROWNE et al., 2004; ABE et al., 2009).

Algumas amostras de aEPEC podem expressar o padrão de adesão localizada em ensaios de 6h (AL₆), onde as bactérias aderentes formam um grupo mais compacto que o do ALL, em uma ou mais áreas da superfície da célula hospedeira, observado somente após 6h de interação com as células epiteliais (VIEIRA et al., 2001; HERNANDES, et al., 2008; ABE et al., 2009).

Além destes padrões de interação, algumas amostras de aEPEC podem expressar os padrões de adesão agregativo (AA), difuso (AD) ou indeterminado/não característico (SCALETISKY et al., 1999; VIEIRA et al., 2001; DULGUER et al., 2003; NUNES et al., 2003; GOMES et al., 2004; ROBINS-BROWNE et al., 2004; ABE et al., 2009; ABE et al., 2009, SCALETISKY et al., 2010).

O padrão AA é caracterizado por bactérias aderentes de forma semelhante a tijolos empilhados, formando agregados na lamínula e na superfície da célula eucariótica e é usado para caracterizar o patótipo EAEC (NATARO et al., 1987). No padrão AD, que caracteriza o patótipo DAEC, as bactérias aderem difusamente por toda a superfície celular (SCALETISKY et al., 1984). A princípio os padrões AA e AD definem os patótipos EAEC e DAEC, respectivamente (NATARO; KAPER, 1998). Entretanto, amostras de *E. coli* diarreiogênicas pertencentes a outros patótipos podem expressar esses padrões, tais como ETEC, EHEC e aEPEC (SILVA et al., 1996; DOS SANTOS et al., 2007; HERNANDES et al., 2009). Desta forma, atualmente a determinação do padrão de adesão de uma amostra de *E. coli*

diarreiogênica deve ser avaliado em conjunto com determinantes de virulência para a definição do patótipo a que essa amostra pertence.

A julgar pela presença do gene *eae*, as aEPEC transportam a região LEE e, conseqüentemente, deveriam ser capazes de aderir a células epiteliais cultivadas e causar a lesão A/E. Entretanto, isto nem sempre acontece, conforme verificado em alguns estudos nos quais a lesão A/E não foi detectada *in vitro* após infecção de células HeLa ou HEp-2 (RODRIGUES et al., 1996; VIEIRA et al., 2001; GHILARD et al., 2003; ABE et al., 2009). Estes achados sugerem que a região LEE de certas amostras parece não se expressar, total ou parcialmente, tornando-as incapazes de desempenhar seu papel patogênico. Desta forma, torna-se relevante analisar a região LEE, do ponto de vista estrutural e funcional, de amostras de aEPEC que expressam diferentes fenótipos de interação com células epiteliais cultivadas, capazes ou não de causar a lesão A/E *in vitro*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Análise estrutural e funcional da região LEE de três amostras de aEPEC que expressam os padrões ALL, AA e AD e de uma amostra não aderente.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar a expressão dos padrões de adesão dessas amostras em linhagens celulares epiteliais intestinais e não intestinais cultivadas.
- Verificar a capacidade de formação da lesão A/E *in vitro* dessas amostras em linhagens celulares epiteliais intestinais e não intestinais cultivadas.
- Pesquisar a presença dos genes da região LEE, analisar a expressão dos operons LEE1, 2, 3, 4 e 5 e das principais proteínas codificadas em LEE envolvidas no estabelecimento da lesão A/E dessas amostras.
- Verificar os fenótipos de adesão e formação da lesão A/E *in vitro* dessas amostras após a transformação com um plasmídeo que expressa a proteína EspFu.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Meios de cultura e soluções

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.

3.2 Amostras bacterianas

Foram selecionadas para este estudo quatro amostras de aEPEC, utilizando como critério de escolha os seus padrões de adesão em células HEp-2: BA320 (sorotipo O55:H7), que apresenta o padrão ALL (ABE et al., 2009); 9100-83 (sorotipo O55:H7), que apresenta o padrão AD (RODRIGUES et al., 1996; BANDO et al., 2009); Ec292/84 (sorotipo O125ac:H6), que apresenta o padrão AA (do VALLE et al., 1997) e BA4013 (sorotipo O88:HNM), não aderente (NA) (ABE et al., 2009).

Essas amostras foram previamente isoladas de casos de diarreia aguda e caracterizadas como pertencentes ao patótipo aEPEC por apresentarem o gene *eae* e não apresentarem o plasmídeo EAF e os genes de virulência que caracterizam os outros patótipos de *E. coli* diarreiogênicas (BUERIS et al., 2007; DO VALLE et al., 1997; RODRIGUES et al., 1996). Os padrões de adesão e os subtipos de intimina (BA320 intimina gama1; Ec292/84 intimina alfa; 9100-83 intimina alfa; BA4013 intimina beta1), também foram previamente determinados (ABE et al., 2009; BARROS et al., 2008; DO VALLE et al., 1997; RODRIGUES et al., 1996).

A amostra protótipo de tEPEC E2348/69 (LEVINE et al., 1978) foi empregada como controle positivo nos experimentos da PCR e *slot-blot* para detecção dos genes da região LEE. As amostras de EHEC C7-88 e C1520-77 (sorotipo O157:H7) foram empregadas como controles positivos nos experimentos da PCR para detecção dos

genes *stx1* e *stx2*, respectivamente (MAIRENA et al., 2004). A amostra de EHEC EDL933 (sorotipo O157:H7) foi utilizada como controle positivo na detecção do gene *espFu/tccp* e a amostra LB9 (sorotipo O111ab:H2) como controle positivo na detecção do gene *tccp2* (CAMPOS et al., 1994; WELLS et al., 1983). Como controle negativo nas reações da PCR, *slot-blot* e ensaios de adesão em células epiteliais foi empregada a amostra de *E. coli* DH5 α (SAMBROOK et al., 1989). As amostras de *E. coli* E2348/69 (LEVINE et al., 1978), 042 (VIAL et al., 1988) e C1845 (BILGE et al., 1989) foram utilizadas como controles dos padrões localizado, agregativo e difuso, respectivamente, nos ensaios de adesão em células epiteliais cultivadas. Nos experimentos de *immunoblotting* a amostra de *E. coli* E2348/69 (LEVINE et al., 1978) foi utilizada como controle positivo e as seguintes amostras como controle negativo: CVD206 (E2348/69 mutante em *eae*) (DONNENBERG; KAPER, 1991), EPEC Δ *tir* (E2348/69 mutante em *tir*) (KENNY et al., 1997), UMD872 (E2348/69 mutante em *espA*) (KENNY et al., 1996), UMD864 (E2348/69 mutante em *espB*) (DONNENBERG et al., 1993), UMD870 (E2348/69 mutante em *espD*) (LAI et al., 1997).

Todas as amostras foram mantidas a -80 °C em caldo Luria Bertani (LB) acrescidos de 15% de glicerol.

3.3 Testes de interação em cultura de células epiteliais humanas

Os ensaios de interação em cultura de células epiteliais foram realizados pela Dra. Cecília M. Abe (Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan).

3.3.1 Testes de adesão

Testes de interação com células HEp-2, HeLa, Caco-2, T84 e HT29 foram realizados segundo a metodologia descrita por Cravioto et al. (1979), após 3 e 6h de interação bactéria-célula.

As linhagens celulares HEp-2 e HeLa foram cultivadas em garrafas de 50 ml (Nunc, Dinamarca) contendo 12 ml de Meio Mínimo Essencial de Eagle, modificado por Dulbecco (DMEM; Cultilab, Brasil), contendo antibióticos (penicilina 1000 U/ml e estreptomicina 1 mg/ml; Sigma-Aldrich, EUA), acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB; Cultilab) e mantidas por 2 a 3 dias a 37 °C sob atmosfera de 5% de CO₂. Após o período de incubação, as células foram transferidas para placas de 24 orifícios (Nunc) contendo lamínulas de vidro, em uma concentração de 5 x 10⁴ células/ml, e incubadas por 48h sob as mesmas condições. As células Caco-2, T84 e HT29 foram cultivadas em Meio Mínimo Essencial de Eagle (MEM; Cultilab), MEM/F12 (Cultilab) e DMEM (Cultilab) respectivamente, acrescidos de 5 mM de galactose e de 10% de soro fetal bovino (SFB; Cultilab), e mantidas por 10 a 12 dias a 37 °C sob atmosfera de 10% de O₂ e 90% de CO₂, em placas de 24 orifícios (Nunc) contendo lamínulas de vidro.

Para a realização dos ensaios de adesão, as amostras bacterianas foram inoculadas em 3 ml de caldo de soja tripticaseína (TSB), sendo em seguida incubadas a 37 °C por 18h em condições estáticas. Uma alíquota de 40 µl da cultura bacteriana foi adicionada a cada orifício da placa contendo a monocamada de células, previamente lavadas por 5 vezes com tampão salina fosfato (PBS) 1x (cloreto de sódio 137 mM ; cloreto de potássio 2,7 mM; fosfato de sódio dibásico 4,3 mM; fosfato de potássio monobásico 1,5 mM) pH 7,4, e acrescidas de 960 µl de meio DMEM sem antibiótico, contendo 2% de SFB e 1% de D-manose. Após incubação por 3 ou 6h a 37 °C, as placas foram novamente lavadas por 5 vezes com PBS 1x. Nos ensaios de 6h, após as três primeiras horas de incubação, as placas foram lavadas por 5 vezes com PBS 1x, acrescidas de 1 ml de meio DMEM sem antibiótico (2% de SFB e 1% de D-manose), e incubadas por mais 3h a 37 °C. Em seguida, as placas foram novamente lavadas por 5 vezes com PBS 1x e fixadas com metanol absoluto, por 30 min à temperatura ambiente. Após a fixação, as células foram coradas por 5 min com corante eosina-azul de metileno em solução segundo May-Grünwald (Merck, Alemanha), diluído na razão 1:2 em tampão Sorensen (fosfato de potássio monobásico 8,6 mM; fosfato de sódio dibásico 28,6 mM). Em seguida, esse corante foi desprezado sendo então acrescentada a solução corante azul-eosina-azul de metileno segundo Giemsa (Merck) diluída na razão 1:3 em tampão Sørensen, por 20 min. Após lavagem para retirada do excesso de corante, as lamínulas foram secas à

temperatura ambiente e montadas em lâminas para microscopia com Entellan (Merck). As lâminas foram analisadas através de microscopia óptica, em aumento de 1.000 vezes.

3.3.2 Teste de FAS (*fluorescent actin staining*)

O teste de detecção do acúmulo de actina após contato bactéria-célula em ensaios de 3 e 6h, foi realizado segundo a metodologia descrita por Knutton et al. (1989). O cultivo das células HEp-2, HeLa, Caco-2, T84 e HT29, bem como os ensaios de adesão a células epiteliais *in vitro*, foram realizados como descrito no item 3.3.1. Após o período de incubação e lavagens com PBS 1x, as células foram fixadas com *p*-formaldeído 4% em PBS 1x, por 18h a 4 °C. As células foram novamente lavadas com PBS 1x e em seguida permeabilizadas pela adição de Triton X-100 0,5% em PBS 1x, por precisamente 4 min. Após novas lavagens, foram adicionados 5 µg/ml de isotiocianato de faloidina (Sigma-Aldrich, EUA) diluído em PBS 1x. As placas foram incubadas por 20 min sob abrigo de luz e novamente lavadas com PBS 1x, por três vezes de 5 min. Em seguida, as lamínulas foram removidas da placa, secas com papel de filtro e fixadas sobre lâminas de vidro com a utilização de Mowiol (Calbiochem, EUA) adicionado do agente “*anti-fading*” Dabco (Sigma-Aldrich) onde foi acrescentado iodeto de propídio (Molecular Probes, EUA) em uma concentração final de 1:1000. As lâminas foram mantidas por cerca de 20h a 4 °C, e em seguida, observadas através de microscopia confocal em aumento de 1.000 vezes, utilizando o microscópio LSM 510 Meta (Zeiss, Alemanha) e os filtros BP500-530IR (488 nm) e LP560 (543 nm).

3.3.3 Microscopia de imunofluorescência

A fosforilação de Tir foi verificada através de um ensaio de imunofluorescência, de acordo com o protocolo descrito por Hernandez et al. (2008).

O cultivo das células HEp-2 e HeLa, bem como os ensaios de adesão a células epiteliais *in vitro*, foram realizados como descrito no item 3.3.1. Após o ensaio de adesão as lamínulas foram fixadas com *p*-formaldeído 4%, permeabilizadas com Triton X-100 0,1% (Sigma-Aldrich) em PBS 1x e tratadas com anticorpo monoclonal anti-fostirosina clone PT66 (Sigma-Aldrich) na diluição de 1:50, por 18h a 4 °C. Após sucessivas lavagens, foi adicionado o anticorpo de cabra IgG anti-camundongo conjugado com isotiocianato de fluoresceína (Sigma-Aldrich) na diluição 1:25 e incubados por 2h, à temperatura ambiente. Após três lavagens com PBS 1X, as preparações foram montadas em lâminas com auxílio de Mowiol (Calbiochem) e examinadas em microscópio de epifluorescência (Zeiss), em aumento de 1.000 vezes.

3.4 Detecção das sequências de DNA através de reações em cadeia da polimerase (PCR)

Para cada ensaio da PCR foram utilizados 25 pmol de cada um dos iniciadores, 1 U de Taq DNA-Polimerase (Invitrogen, EUA), 1,5 mM de cloreto de magnésio, 200 µM da mistura de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 5 µl do tampão de reação de PCR 10x concentrado (Invitrogen) e água deionizada estéril para um volume final de 50 µl. Como DNA molde foram utilizados lisados bacterianos preparados da seguinte forma: uma alçada do crescimento bacteriano em ágar LB foi ressuspensa em 300 µl de água estéril e submetida à fervura durante 10 min e imediatamente colocada no gelo. Dois µl desse lisado foram transferidos para tubos de polipropileno de 0,5 ml contendo a mistura da reação de PCR, os quais foram transferidos para o termociclador Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems, EUA). As sequências dos iniciadores e os ciclos de amplificação utilizados neste estudo estão apresentados nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1- Sequência de iniciadores, fragmentos amplificados e ciclos de amplificação das reações de PCR para a detecção dos genes virulência de EPEC e EHEC

| Iniciador | Sequência dos iniciadores | Ciclo de amplificação | Amplicon (pb) | Referência |
|-------------|--|---|---------------|---|
| <i>Eae</i> | { <i>eae1</i>) CTGAACGGCGATTACGCGAA { <i>eae2</i>) CCAGACGATACGATCCAG | 30 x: 1 min 94°C; 1 min 50°C; 1 min 72°C | 917 | ARANDA et al., 2004 |
| <i>bfpA</i> | (F) GGTCTGTCTTTGATTGAATC (R) TTTACATGCAGTTGCCGCTT | 30 x: 1 min 94°C; 1 min 55°C; 1 min 72°C | 485 | ELIAS et al., 2002 |
| <i>stx1</i> | (F) AGCTGAAGCTTTACGTTTTTCGGG (R) TTTGCGCACTGAGAAGAAGAGA | 30 x: 1 min 94°C; 1 min 62°C; 1 min 72°C | 590 | TSEN; JIAN, 1998 |
| <i>stx2</i> | (F) TTTCCATGACAACGGACAGCAGTT (R) ATCCTCATTATACTTGGAAACTCA | 30 x: 1 min 94°C; 1 min 62°C; 1 min 72°C | 694 | TSEN; JIAN, 1998 |
| <i>perA</i> | (F) AACAAAGAGGAGAATTTAGCG (R) CTTGTGTAATAGAATAATCGC | 30 x: 1 min 94°C; 1 min 56°C; 1 min 72°C | 770 | Este estudo (N° de acesso no GenBank: AF022236) |
| EAF | (F) GGCTGCATTACCCAATATCAAG (R) GACCGAGAATGGCAGGGGAA | 30 x: 1 min 94°C; 1 min 60°C; 1 min 72°C | 1035 | FRANK E et al., 1994 |

(F) iniciador *forward*; (R), iniciador *reverse*.

Tabela 2- Sequência de iniciadores, fragmentos amplificados e ciclos de amplificação das reações de PCR para detecção dos genes da região LEE, do seu sítio de inserção e dos genes *tccP* e *tccP2*

| Iniciador | Sequência dos iniciadores | Ciclo de amplificação | Amplicon (pb) | Referência |
|---------------------------------|---|--|---------------|--------------------------|
| <i>espG</i> | (F) GTTAATAATTGTGGGTGTG (R) GTTTAAAACACCCGCTATAA | 30 x: 1 min 94°C; 1 min 58°C; 1 min e 30 seg 72°C | 1.307 | Este estudo ^a |
| <i>Ler</i> | (F) TAAGGATAAGGTCGCTAATAG (R) TTTATTATTTTCGCTTCCAGC | 30 x: 1 min 94°C; 1 min 60°C; 1 min 72°C | 478 | Este estudo |
| <i>cesAB</i> | (F) TGTGATGCGGCAATTAGGA (R) TCACCTAGCCATTCATCA | 30 x: 1 min 94°C; 1 min 56°C; 1 min 72°C | 465 | Este estudo |
| <i>escR</i> | (F) ATTATCTTAGCATTATTCAGG (R) CGTTTGACACATAATTGAA | 30 x: 1 min 94°C; 1 min 52°C; 1 min 72°C 52 | 821 | Este estudo |
| <i>escS</i> | (F) ATTCATTCTTGTGGAGGCT (R) AATGATGATACTATGACCGTC | 30 x: 1 min 94°C; 1 min 56°C; 1 min 72°C | 360 | Este estudo |
| <i>escT</i> | (F) ACTTCTCGTCGATAATATTTG (R) CTTTTTGTACATCGCCCTT | 30 x: 1 min 94°C; 1 min 56°C; 1 min 72°C | 880 | Este estudo |
| <i>escU</i> | (F) TGACATAATTGATAGATCGTT (R) ACGCAATGAAAATATATAAAAC | 30 x: 1 min 94°C; 1 min 52°C; 1 min 72°C | 1.130 | Este estudo |
| <i>cesD-interno^b</i> | (F) TTA CTCTGTATTACCTAAC (R) ATGAGCAGGAAATTTAGC | 30 x: 1 min 94°C; 1 min 50°C; 1 min 72°C | 456 | Este estudo |
| <i>escC</i> | (F) GAAATCATAAATATCCTCTAG (R) ACACCTGTTTTCTGATATAG | 30 x: 1 min 94°C; 1 min 52°C; 1 min e 30 seg 72°C | 1.626 | Este estudo |

continua

continuação

| | | | | |
|-----------------------|---|--|-------|-------------|
| <i>sepD-interno</i> | (F) TTACACAATCGTCCTATATC (R) ATGAACAATAATAATGGCATAG | 30 x: 1 min 94°C; 1 min 56°C; 1 min 72°C | 455 | Este estudo |
| <i>escJ</i> | (F) TTGCTATGCCATTATTATTTGT (R) CAACATCGGTTACAAAATTAG | 30 x: 1 min 94°C; 1 min 56°C; 1 min 72°C | 639 | Este estudo |
| <i>sepZ</i> | (F) CCATTACCTCTCTATTTTTTA (R) ACCAGGTAATGTCTAAAT | 30 x: 1 min 94°C; 1 min 50°C; 1 min 72°C | 369 | Este estudo |
| <i>escV-interno</i> | (F) CATCATGAATAAACTCTTAAATA (R) TCATGCTCTGAAATCATTAC | 30 x: 1 min 94°C; 1 min 56°C; 2 min 72°C | 2.031 | Este estudo |
| <i>escN</i> | (F) AGGTTGGGAATAATATCG (R) TCGAGTTTACCATCCACC | 30 x: 1 min 94°C; 1 min 58°C; 1 min e 30 seg 72°C | 1.488 | Este estudo |
| <i>sepQ</i> | (F) AAATGTAGTAACGGAATCAT (R) CACCTCCCTATATAACGC | 30 x: 1 min 94°C; 1 min 58°C; 1 min 72°C | 1.061 | Este estudo |
| <i>espH</i> | (F) GAATAATACCACAATCGCATA (R) ATCGTCCCAGAACAGAAAC | 30 x: 1 min 94°C; 1 min 58°C; 1 min 72°C | 676 | Este estudo |
| <i>cesF</i> | (F) CATCCAGTCCATATTATCAC (R) GTTATAAGAATGACAGGACTA | 30 x: 1 min 94°C; 1 min 56°C; 1 min 72°C | 430 | Este estudo |
| <i>Map</i> | (F) ATAGTTTTATTATTTCGTTTT (R) TATAGAGACCTTTTTGCAT | 30 x: 1 min 94°C; 1 min 52°C; 1 min 72°C | 735 | Este estudo |
| <i>Tir</i> | (F) TAGTAATATAAAGGAACGTG (R) AACCTCAACTAAATACTCAC | 30 x: 1 min 94°C; 1 min 52°C; 2 min 72°C | 1.728 | Este estudo |
| <i>tir (map-cesT)</i> | (F) GATAGAACAAGTCTCACAAG (R) TCATTAATGAATATGATCC | 30 x: 1 min 94°C; 1 min 52°C; 2 min 72°C | 2300 | Este estudo |
| <i>cesT</i> | (F) CAGCATGGGTAACCTTTGAA (R) CCACCACAATGAGTTAGAATG | 30 x: 1 min 94°C; 1 min 58°C; 1 min 72°C | 575 | Este estudo |
| <i>Eae</i> | (F) ACTCATTCTAACTCATTGTGG (R) AGATACATTTTAGCCGGAC | 30 x: 1 min 94°C; 1 min 58°C; 3 min 72°C 58 | 2.894 | Este estudo |
| <i>escD</i> | (F) CACACAATAAAAAACCCTCC (R) AGCTTCCTTTCTACTCTATTC | 30 x: 1 min 94°C; 1 min 58°C; 1 min e 30 seg 72°C | 1.351 | Este estudo |
| <i>sepL</i> | (F) GAATAGAGTAGAAAGGAAGC (R) ATACCTCTTCATAATCTTTC | 30 x: 1 min 94°C; 1 min 54°C; 1 min 72°C | 1.184 | Este estudo |
| <i>espA</i> | (F) AAGAAAGATTATGAAGAGG (R) ACCTCACAGACTGGATAT | 30 x: 1 min 94°C; 1 min 54°C; 1 min 72°C | 653 | Este estudo |
| <i>espD</i> | (F) AAACCTATTAACGAGTGC (R) TTCATAATAAACGCCTCTT | 30 x: 1 min 94°C; 1 min 52°C; 1 min e 30 seg 72°C | 1.258 | Este estudo |
| <i>espB</i> | (F) AGTGAATATCCGTATTGTC (R) TCAAGATAGTAATTAACAC | 30 x: 1 min 94°C; 1 min 52°C; 1 min 72°C | 1.069 | Este estudo |
| <i>cesD2</i> | (F) ACAGCCCGTGATCTTAC (R) GCGTTTTACCTACTTCACC | 30 x: 1 min 94°C; 1 min 60°C; 1 min 72°C | 562 | Este estudo |
| <i>escF</i> | (F) ATTTTATTAACCTTCTTGAGGG (R) GCCCACACCAAGTATCTTA | 30 x: 1 min 94°C; 1 min 52°C; 1 min 72°C | 294 | Este estudo |
| <i>espFinterno</i> | (F) TGGAATTAGTAACGCTGCTT (R) TCTTCGATTGCTCATAGGC | 30 x: 1 min 94°C; 1 min 64°C; 1 min 72°C | 604 | Este estudo |
| <i>grlR</i> | (F) TTGATATTGCTTATGGATAG (R) TTCCATTTTCCATATTCTTTT | 30 x: 1 min 94°C; 1 min 50°C; 1 min 72°C | 495 | Este estudo |
| <i>grlA</i> | (F) ACAGGAATGCCACAAGTTTA (R) ACAAACCCTTAAATATAGCT | 30 x: 1 min 94°C; 1 min 52°C; 1 min 72°C | 560 | Este estudo |
| <i>cest-interno</i> | (F) ATGTCAATCAAGATCTGAACT (R) TTATCTTCCGGCGTAATA | 30 x: 1 min 94°C; 1 min 54°C; 1 min 72°C | 471 | Este estudo |

continua

conclusão

| | | | | |
|--------------------|--|--|----------------------|------------------------|
| <i>map-interno</i> | (F) ATGTTTAGTCCAACGGCAAT (R) CCTACAGCCGAGTATCCT | 30 x: 1 min 94°C; 1 min 58°C; 1 min 72°C | 611 | Este estudo |
| <i>ler-interno</i> | (F) GCATGCGGAGATTATTTA (R) GTTAAATATTTTTTCAGCGGT | 30 x: 1 min 94°C; 1 min 52°C; 1 min 72°C | 389 | Este estudo |
| <i>eae-interno</i> | <i>eae1</i> CTGAACGGCGATTACGCGAA <i>eae2</i> CCAGACGATACGATCCAG | 30 x: 1 min 94°C; 1 min 50°C; 1 min 72°C | 917 | ARANDA et al., 2004 |
| <i>selC</i> | (F) GGTGCTGAGACCGATAACGCAT (R) TTTTGATGGAGTGGTAGCCGTT | 30 x: 1 min 94°C; 1 min 59°C; 1 min 72°C | 900 | Este estudo |
| <i>pheU</i> | (F) AATCTCGGCTCAAGGGTAAGTT (R) CACATCGGCTGGCGGAAGATAT | 30 x: 1 min 94°C; 1 min 59°C; 1 min 72°C | 1.000 | Este estudo |
| <i>pheV</i> | (F) GGCATCGCTGGGGATTGGTATT (R) AATCTGCCACAACAACGCCTGC | 30 x: 1 min 94°C; 1 min 63°C; 1 min 72°C | 1.200 | Este estudo |
| <i>tccP</i> | (F) ATGATTAACAATGTTTCTTCACTT (R) TCACGAGCGCTTAGATGTATTAATGCC | 30 x: 1 min 94°C; 1 min 60°C; 1 min e 30 seg 72°C | 1.000 | GARMENDIA et al., 2005 |
| <i>tccP2</i> | (F) ATGATAAATAGCATTAAATCTTT (R) TCACGAGCGCTTAGATGTATTAAT | 30 x: 1 min 94°C; 1 min 60°C; 1 min e 30 seg 72°C | entre 700 e 1.800 | WHALE et al., 2007 |

^a As sequências dos iniciadores descritos neste estudo foram baseadas na sequência da região LEE da tEPEC E2348/69 (Nº de acesso no GenBank: AF022236); ^b Sequência do iniciador desenhada na região interna do respectivo gene da tEPEC E2348/69; (F) iniciador *forward*; (R), iniciador *reverse*.

Após a amplificação dos fragmentos, 12 µl de cada reação foram analisados através de eletroforese em gel de agarose. Os géis de agarose foram preparados por aquecimento, dissolvendo-se a agarose (Invitrogen) em tampão TAE 1x (tris-acetato 40 mM; ácido etilenodiaminotetracético 2 mM) nas concentrações finais de 0,7% ou 1%, conforme indicado. As amostras de DNA analisadas foram misturadas a 2 µL de tampão de amostra para DNA 6x (azul de bromofenol 0,25%; xileno cianol 0,25%; glicerol 30%) e como marcador de tamanho foi utilizado o *1kb DNA ladder* (Invitrogen). A corrida eletroforética foi realizada sob voltagem de 80 V em tampão de TAE 1x. Após o encerramento da corrida, os géis foram corados em solução de brometo de etídio a 0,5 µg/ml, observados em transiluminador de luz ultravioleta UVP (Upland, EUA) e fotografadas com auxílio do sistema de imagem Alphaimager (Alpha Innotech, EUA).

3.5 Sequenciamento dos genes *ler*, *sepZ*, *escV*, *espA*, *eae*, *map* e *cest*

O sequenciamento total e/ou parcial dos genes *ler*, *sepZ*, *escV*, *espA*, *eae*, *map* e *cest*, das amostras de aEPEC deste estudo, bem como da amostra protótipo de tEPEC E2348/69, foram realizados utilizando iniciadores *forward* e *reverse* descritos na tabela 2. Após a amplificação dos respectivos fragmentos, obtidos conforme descrição no item 3.4, os mesmos foram analisados através de eletroforese em gel de agarose (item 3.4) e purificados do gel utilizando-se o *QIAquick Gel Extraction kit* (Qiagen, EUA), segundo recomendações do fabricante. As reações de sequenciamento foram realizadas no Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. As duas fitas de DNA foram sequenciadas em triplicatas para todas as amostras. Foi utilizado o sequenciador automático *MegaBACE 1000* (Amersham Pharmacia Biotech, EUA) e as reações de sequenciamento foram realizadas de acordo com o protocolo do fabricante, utilizando o *kit APBiotech DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing*, a enzima *Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase* e os iniciadores específicos (Tabela 2). As sequências obtidas para cada uma das amostras foram alinhadas através do programa *Bioedit* e foram comparadas com as sequências listadas no *EMBL/GenBank* utilizando o programa *Blastn*.

3.6 Alinhamento múltiplo e construção da árvore filogenética

As sequências resultantes dos sequenciamentos dos genes *ler*, *sepZ*, *escV*, *espA*, *eae*, *map* e *cest* foram exportadas para o programa *Bioedit* v 7.0.9.0 (HALL., 1999) e o alinhamento múltiplo foi realizado através do método *Clustal*. O refinamento do alinhamento foi realizado através do programa *GeneDoc* v. 2.7.0 (NICHOLAS; NICHOLAS, 1997). Sequências homólogas das amostras de tEPEC E2348/69 (Nº de acesso no GenBank: AF022236) e EHEC O157:H7 Sakai (Nº de acesso no GenBank: BA000007.2) foram obtidas do banco de dados do *EMBL/GenBank*.

Depois de alinhadas, as regiões conservadas das sequências foram concatenadas na seguinte ordem: *ler*, *sepZ*, *escV*, *map*, *cest*, *eae* e *espA*, de acordo com a posição destes genes na região LEE da amostra E2348/69, gerando um supergene. O alinhamento do supergene foi exportado no formato PHYLIP, formatação utilizada pelos programas de inferência filogenética do programa PHYLIP v.3.5 (FELSENSTEIN, 1993). A análise de máxima parcimônia foi utilizada para a construção da árvore baseada em 1.000 alinhamentos gerados pelo método de *bootstrap*.

3.7 Detecção dos genes de LEE através de *slot-blot*

Para verificar a presença dos genes de LEE não detectados através da técnica da PCR (item 3.4), foi empregada a técnica de *slot-blot* do DNA genômico das amostras deste estudo hibridizado com sondas genéticas amplificadas a partir da amostra protótipo de tEPEC E2348/69.

3.7.1 Extração do DNA genômico

As amostras bacterianas foram cultivadas em 3 ml de caldo LB, estático, por 18h a 37 °C. Em seguida, 1 ml de cada cultivo foi inoculado em 50 ml de caldo LB, submetido à agitação constante de 150 rpm a 37 °C por 18h. Cada cultivo de 50 ml foi centrifugado a 6.800 g, durante 20 min a 4 °C e o sedimento foi ressuspenso em 5 ml de tampão TEL (tris (hidroximetil) aminometano hidrocloreto 50 mM; ácido etilenodiaminotetracético 50 mM; lisozima 1mg/ml; pH 8,0). Após incubação a 37 °C por 30 min, foram adicionados 500 µl de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% e 14,4 µl de solução de proteinase K (Invitrogen) a 20 mg/ml, seguido de incubação por 30 min a 65 °C. Após esse período, foram adicionados 675 µl de cloreto de sódio 5 M e 423 µl de tampão CTAB (brometo de cetiltrimetil-amônio 10%; β-mercaptoetanol 0,4%; cloreto de sódio 4,1%), seguido de incubação por 20 min a 65 °C. Após duas

lavagens com 6,5 ml de clorofórmio-álcool isoamílico na proporção de 24:1, foi realizada centrifugação a 6.800 g durante 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi removido com auxílio de uma pipeta Pasteur e transferido para um tubo de 15 ml e a precipitação do DNA foi realizada com 8 ml de isopropanol a -20 °C durante 2h. O DNA precipitado foi removido para um microtubo de 2 ml e centrifugado a 16.000 g durante 5 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com 1,5 ml de etanol 70% e submetido a centrifugação de 16.000 g por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado seco à temperatura ambiente. Após a secagem, o precipitado foi ressuspensão em 300 µl de tampão TE (tris (hidroximetil) aminometano hidrocloreto 10 mM; ácido etilenodiaminotetracético 1 mM; pH 8,0) e 1,2 µl de RNase (10 mg/ml) (Invitrogen) e o material foi incubado por 1h a 37 °C. O DNA foi precipitado com 9 µl de acetato de sódio 3 M e 600 µl de etanol absoluto gelado (-20 °C), centrifugado a 16.000 g durante 5 min a 4 °C, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi lavado com 600 µl de etanol 70% e novamente centrifugado sob as mesmas condições. Após a retirada do sobrenadante, o precipitado foi seco e ressuspensão com 500 µl de tampão TE. As extrações de DNA genômico foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 0,8% (item 3.4), quantificadas por comparação com o marcador *high DNA mass ladder* (Invitrogen) e mantidas a 4 °C até o momento do uso.

3.7.2 Preparo e marcação das sondas de DNA

Os produtos amplificados dos genes *espH*, *sepQ*, *escJ*, *cesF*, *espB*, *escF*, *griA*, *cesD2*, *espG*, *espD* e *espF* foram empregados como sonda para detecção da sua presença no genoma das amostras deste estudo. Essas sequências foram amplificadas pela PCR (item 3.4) tendo como molde o DNA da amostra E2348/69 e os iniciadores listados na tabela 2. Após eletroforese em gel de agarose, os produtos amplificados foram purificados, utilizando o *illustra GFX PCR DNA and gel band purification kit* (GE Healthcare, EUA), e quantificados utilizando o marcador *low DNA mass ladder* (Invitrogen). A marcação das sondas foi realizada com o *kit ECL Nucleic*

Acid Labelling and Detection System (GE Healthcare), utilizando 600 ng de cada fragmento, conforme instruções do fabricante.

3.7.3 Transferência do DNA para membranas de *nylon*, hibridação com sondas genéticas e detecção do sinal de quimioluminescência

Foram transferidos 1.000 ng de DNA genômico de cada amostra e 400 ng da sonda controle positivo para membranas de *nylon* carregadas positivamente Hydond-N+ (GE Healthcare) por sistema à vácuo Hoefer (GE Healthcare). As reações de hibridação com as sondas foram realizadas utilizando-se o *kit ECL Nucleic Acid Labelling and Detection System* (GE Healthcare), conforme instruções do fabricante. Em seguida, as membranas foram expostas a filmes de Raio-X Amersham Hy (GE Healthcare) durante 15 min em cassetes apropriados para a exposição de filmes de Raio-X. Após esse período, os filmes foram revelados em câmara escura com auxílio do revelador e fixador (Kodak, EUA), segundo recomendações do fabricante.

3.8 Extração de RNA

3.8.1 Extrações das amostras bacterianas cultivadas na presença de células HeLa

Para este ensaio, o teste de adesão em células HeLa (descrito no item 3.3.1) foi realizado com algumas modificações. As células HeLa foram cultivadas em garrafas para cultivo celular de 75 cm² (TTP, Suíça) contendo 15 ml de DMEM acrescido de 10% de SFB e antibióticos (penicilina 1000 U/ml e estreptomicina 1 mg/ml; Sigma-Aldrich), sob atmosfera de 5% de CO₂, até que atingissem 100% de confluência. No momento do teste, o meio de cultivo celular foi substituído por 15 ml

de DMEM, acrescido de 2% de SFB, e o teste de adesão foi realizado em triplicatas para cada amostra de aEPEC nas garrafas de cultivo. Em cada garrafa foram acrescidos 0.5 ml dos inóculos bacterianos [amostras E2348/69, BA320, Ec292/84, 9100/83 e 4013(pKC471)] obtidos em TSB incubados a 37 °C durante 18h em condições estáticas. As garrafas foram então incubadas a 37 °C sob atmosfera de 5% de CO₂ durante 3h. Em seguida, o meio de cultura foi desprezado e foram acrescidos 15 ml de DMEM, acrescido de 2% de SFB, seguido de nova incubação por 3 h sob as mesmas condições. Após o total de 6h de interação bactérias-células HeLa, o meio de cultivo foi desprezado, as monocamadas celulares foram lavadas com PBS 1x por cinco vezes e incubadas com 3 ml de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) durante 5 min à temperatura ambiente. Com ajuda de um raspador celular (Becton Dickson, EUA) o volume contido nas garrafas foi homogeneizado e transferido para tubos de polipropileno de 15 ml (Falcon, Becton Dickson). Esses volumes foram então centrifugados a 4.000 g durante 30 min a 4 °C. Os sedimentos obtidos dessa centrifugação foram utilizados para a extração de RNA com auxílio do *RiboPure bacteria RNA isolation kit* (Ambion, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. A pureza e quantificação do RNA obtido para cada amostra foi realizada no aparelho NanoDrop (ThermoScientific, EUA), através de leituras de absorvâncias em comprimentos de onda de 260 e 280 nm.

3.8.2 Amostras bacterianas cultivadas em DMEM

As amostras E2348/69, BA320, Ec292/84, 9100/83 e BA4013 foram inicialmente cultivadas em 3 ml de caldo LB a 37 °C por 18h em condições estáticas. Em seguida, esses cultivos bacterianos foram diluídos em 30 ml de DMEM na proporção de 1:100, em triplicatas, e incubados aerobicamente a 37 °C e em condições estáticas, até que cada cultura atingisse a absorvância de 1.0 em comprimento de onda de 600 nm. Para isso, os cultivos foram monitorados através de leituras de absorvância no espectrofotômetro Ultrospec 2100 Pro (GE Healthcare) em intervalos de 15 min. Em seguida, os 30 ml de cada um desses cultivos foram então centrifugados a 4.000 g durante 30 min a 4 °C. Os sedimentos

obtidos da centrifugação foram utilizados para a extração de RNA com auxílio do *RiboPure bacteria RNA isolation kit* (Ambion, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. A pureza e quantificação do RNA obtido para cada amostra foi realizada no aparelho NanoDrop (ThermoScientific, EUA), através de leituras de absorbâncias em comprimentos de onda de 260 e 280 nm.

3.9 Análise da transcrição dos genes da região LEE através de DNA *microarray*

Para esses experimentos foram utilizados os RNAs das amostras BA320, BA4013, Ec292/84 e 9100-83 extraídos de acordo com o item 3.8.2. As reações descritas a seguir foram realizadas seguindo as instruções do manual *Prokaryotic Sample and Array Processing* (Affymetrix, EUA). A partir dos RNAs, os cDNAs foram sintetizados através da seguinte reação contendo 10 µl de RNA total (0,33 µg/µl), 10 µl (75 ng/µL) *random primers* (Invitrogen), 2 µl *poly-A RNA control* (Affymetrix) e 8 µl de água *DNase RNase free* (Ambion). A reação foi submetida ao ciclo de 10 min a 70 °C e 10 min a 25 °C em termociclador PTC-200 Thermo Cycler (MJ Research, EUA). Foram adicionados a esta reação 12 µl de 5X *first strand buffer* (Affymetrix), 6 µl *Dithiothreitol* (DTT) (100 mM) (Invitrogen), 3 µL dNTP (10 mM) (Invitrogen), 1,5 µl (20 U/µl) *SUPERase* (Affymetrix), 7,5 µl (200 U/µl) *SuperScript II* (Affymetrix). A reação foi submetida ao ciclo de 25 °C 10 min, 37 °C 60 min, 42 °C 60 min, 70 °C 10 min em termociclador PTC-200 Thermo Cycler (MJ Research). Para a remoção do RNA foram adicionados à reação 20 µl de hidróxido de sódio 1N e a reação foi incubada a 65 °C por 30 min, adicionando-se então 20 µl de cloreto de sódio 1N para a neutralização. A reação foi purificada utilizando-se o *kit MinElute PCR Purification Columns* (Qiagen, EUA) e a pureza e quantificação foi realizada com auxílio do aparelho NanoDrop (ThermoScientific). Para a fragmentação do cDNA foi preparada a seguinte reação: 2 µl 10x *DNase I Buffer* (Invitrogen), 8 µl cDNA (4 µg), 8 µl *DNase I* (0,6 U/µg) (Invitrogen EUA) e 2 µL de água *DNase RNase free* (Anbion), esta reação foi incubada em termociclador PTC-200 Thermo Cycler (MJ Research) a 37 °C por 10 min e 98 °C por 10 min. Nessa fragmentação, 200 ng de cDNA digerido apresentaram mobilidade eletroforética na faixa entre 50 pb e 200 pb

em gel de agarose de gradiente entre 4% e 20% de concentração (Biorad, EUA). Para a marcação 3' terminal do cDNA fragmentado, foi preparada a seguinte reação: 10 µl 5x *reaction buffer* (Affymetrix), 2 µl (7,5 mM) *GeneChip DNA Labeling Reagent* (Affymetrix), 10 µl (2 µg) cDNA fragmentado e 26 µl de água *DNase RNase free* (Anbiom), a reação foi incubada a 37 °C por 60 min e então interrompida com 2 µl de ácido etilenodiaminotetracético 0,5 M. Para verificar a eficiência da marcação, a seguinte reação foi realizada: 5 µl (200 ng) cDNA fragmentado e marcado e 5 µl (2 mg/ml em PBS1x) de *NeutrAvidin* (Sigma-Aldrich), foram incubados por 5 min a 25 °C e essa mistura foi submetida à eletroforese em gel de agarose de gradiente entre 4% e 20% de concentração (BioRad), durante 1h em voltagem constante de 150 V em cuba vertical BioRad (BioRad), utilizando o tampão TAE 1x. Após a eletroforese, para a verificação correta da marcação, o gel foi corado com *SYBR Gold* 1x (Invitrogen). As amostras marcadas foram então enviadas ao Core Affymetrix University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas, para as reações de hibridização no *E. coli chips Affymetrix* (Affymetrix), o qual contém os genomas de três *E. coli* patogênicas e de uma *E. coli* K12: *E. coli* EDL933 (No. de acesso no GenBank: NC002655), *E. coli* Sakai (No. de acesso no GenBank: NC002695), *E. coli* CFT073 (No. de acesso no GenBank: NC004431) e *E. coli* MG1655 (No. de acesso no GenBank: NC000913). As amostras EDL933 e Sakai são *E. coli* enterohemorrágicas, a CFT073 é uma *E. coli* uropatogênica e a MG1655 é uma *E. coli* K12.

Os resultados de cada amostra foram comparados com a amostra BA320, cultivada em DMEM, através do programa *GeneChip Operating Software* (Affymetrix) e lidos no programa *Array Sorter 2*.

3.10 Quantificação da transcrição dos operons de LEE através da PCR em tempo real

Os iniciadores *ler*, *escC*, *escV*, *eae*, *espA* e *rpoA*, usados nas reações da PCR em tempo real, foram descritos por Walters e Sperandio (2006) e encontram-se listados na tabela 3.

Tabela 3- Iniciadores empregados nos ensaios da PCR em tempo real

| Iniciadores | Sequências |
|-----------------|-------------------------|
| <i>ler</i> (F) | CGACCAGGTCTGCCCTTCT |
| <i>ler</i> (R) | GGGCGGAACTCATCGAAA |
| <i>escC</i> (F) | GCGTAAACTGGTCCGGTAGGT |
| <i>escC</i> (R) | TGCGGTAGAGCTATTAAGGCAAT |
| <i>escV</i> (F) | TCGCCCCGGTCCATTGA |
| <i>escV</i> (R) | CGCTCCCGAGTGCAAAA |
| <i>espA</i> (F) | TCAGAATCGCAGCCTGAAAA |
| <i>espA</i> (R) | CGAAGGATGAGGTGGTTAAGCT |
| <i>eae</i> (F) | GCTGGCCTTGTTTGATCA |
| <i>eae</i> (R) | GCGGAGGAGTGACTTCAGCACTT |
| <i>rpoA</i> (F) | GCGCTCATCTTCTCCGAAT |
| <i>rpoA</i> (R) | CGCGGTCGTGGTTATGTG |

As reações da PCR em tempo real foram realizadas utilizando a reação de único passo no sistema de detecção ABI 7500 (Applied Biosystems). Para cada 20 µl de reação foram adicionados: 10 µl de 2x *SYBR master mix* (Applied Biosystems); 0,1 µl de *MultiScribe reverse transcriptase* (Applied Biosystems); 0,1 µl de *Rnase inhibitor* (Applied Biosystems); 6 µl de água *DNase RNase free* (Ambion); 2 µl do mix de iniciadores (*forward* e *reverse*) na concentração final de 50 nM e 2 µl de RNA (item 3.8) na concentração final de 100 ng. As condições da reação foram: um ciclo de 48 °C por 30 min, um ciclo a 95 °C por 10 min, 40 ciclos a 95 °C por 15 seg e 60 °C por 1 min. O gene *rpoA* (maior subunidade da RNA polimerase) foi utilizado como controle endógeno.

A coleção de dados foi analisada utilizando-se o programa *ABI Sequence Detection 1.3* (Applied Biosystems). Os dados foram normalizados aos níveis do gene *rpoA* e analisados usando um comparativo crítico *threshold* (C_T) como descrito no manual *Applied Biosystems Bulletin number 2*. Os dados obtidos foram

apresentados como as diferenças (*n-fold*) dos níveis de expressão quando comparados com os níveis da amostra BA320 ou E2348/69 e as barras de erro representam os valores dos desvios padrões do valor $\Delta\Delta C_T$. A significância estatística foi determinada pelo teste *t* de *Student* e o valor de *p* menor que 0.05 foi considerado significativo.

3.11 Análise da expressão de genes localizados em LEE por *immunoblotting*

3.11.1 Extração de proteínas totais e secretadas

As proteínas totais das amostras E2348/69, CVD206, EPEC Δtir , Ec292/84, 9100-83, BA320 e BA4013 foram obtidas a partir do cultivo aeróbico em DMEM a 37° C na absorbância de 1.0 em 600 nm de comprimento de onda. Em seguida, 3 ml das culturas foram centrifugados em microtubos a 10.000 g por 5 min a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi congelado a -20°C.

As proteínas secretadas das amostras E2348/69, UMD872, UMD864, UMD870, Ec292/84, 9100-83, BA320 e BA4013 foram obtidas de acordo com o protocolo descrito por Jarvis et al (1995), com algumas modificações. As amostras foram cultivadas estaticamente durante 18h em caldo LB e então diluídas 1:100 em 50 ml de DMEM, em seguida foram aerobicamente cultivadas a 37 °C até atingirem a absorbância de 1.0 em 600 nm de comprimento de onda. Em seguida, as culturas foram centrifugadas a 10.000 g por 5 min a 4 °C e 15 ml do sobrenadante foram filtrados em filtros de 0,20 μ m (Millipore, EUA) e aos filtrados foi adicionado 1 mM do inibidor de protease fluoreto de α -toluenosulfonila (PMSF) (Sigma-Aldrich). Em seguida, 10 ml dos filtrados foram concentrados até 200 μ l com auxílio do sistema de filtração Amicon Ultra (Millipore) e congelados a -20 °C.

3.11.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e imunodeteccção

Todas as proteínas foram analisadas através de SDS-PAGE em condições desnaturantes, segundo o protocolo descrito por Laemmli et al. (1970). Os extratos de proteínas totais (item 3.11.1) e 15 µl das proteínas secretadas (item 3.11.1) foram homogeneizados no tampão de corrida (tris (hidroximetil) aminometano hidrocloreto 0,25 M; dodecil sulfato de sódio 8%; glicerol 80%; azul de bromofenol 0,04%; pH 6,8) acrescido de β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) na proporção de 1:20. Em seguida, foram aquecidas a temperatura de 100 °C por 5 min e submetidas a SDS-PAGE na concentração de 12% para as proteínas totais e 10% para as proteínas secretadas. Como padrão de massa molecular foi utilizado o *Protein Mixture* (GE Helthcare). A corrida eletroforética ocorreu em corrente constante de 60 V por aproximadamente 3h em tampão Tris-Glicina (tris (hidroximetil) aminometano hidrocloreto 3%; dodecil sulfato de sódio 1%; glicina 14%).

Após a corrida, as proteínas secretadas separadas nos géis foram transferidas para membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (Millipore) e as proteínas totais separadas nos géis foram transferidas para membrana de nitrocelulose *Hybond-C Extra* (GE Helthcare), segundo Towbin et al. (1970), durante 1h a 60 V, utilizando o aparato de transferência (BioRad) e tampão de transferência (tris (hidroximetil) aminometano hidrocloreto 250 mM pH 8,3; glicina 192 mM; metanol 20% v/v). As membranas foram bloqueadas por 2h com solução de bloqueio (solução de leite em pó desnatado Molico (Nestlé, Brasil) 5% em PBS 1x). Após este período, as membranas contendo as proteínas totais foram incubadas com soro de coelho anti-intimina e anti-Tir. As membranas com proteínas secretadas foram incubadas com soro de coelho anti-EspA, anti-EspB e anti-EspD durante 2h; os respectivos soros foram diluídos 1:100 em solução de leite em pó desnatado Molico (Nestlé) diluído em PBS 1x. As membranas foram lavadas 3 vezes com PBS/Tween a 0,05% e mantidas sob agitação por 1h com o soro anti-imunoglobulina de coelho produzido em cabra e conjugado à peroxidase (Zymed), diluída 1:5000 em solução de leite em pó Molico-PBS 1x. Após mais 3 lavagens com PBS/Tween a 0,05%, as membranas foram lavadas com solução reveladora (3,3-diaminobenzidina, 5 µg;

peróxido de hidrogênio, 150 µl; PBS/Tween 20 – q.s.p. 30 ml). Os soros anti-intimina e anti-EspA foram gentilmente cedidos pela Dra. Roxane Fontes Piazza (Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan). Os soros anti-tir, anti-EspB e anti-EspD pelo Dr. Gad Frankel (Imperial College of London, Londres, Reino Unido).

3.12 Transformação de EPEC atípica com o plasmídeo pKC471

3.12.1 Preparo das células competentes

Para a eletroporação do plasmídeo pKC471 (CAMPELLONE et al., 2004), as amostras Ec292/84, 9100-83, BA320 e BA4013 eletrocompetentes foram preparadas conforme descrição a seguir. As células foram cultivadas durante 18h a 37 °C de forma estática em 3 ml de caldo LB, diluídas 1:100 num volume final de 100 ml de caldo LB e submetidas a cultivo a 37 °C, sob agitação constante de 300 rpm até atingirem a absorbância de 0.6 em comprimento de onda de 600 nm. As células bacterianas foram colocadas em banho de gelo durante 30 min, transferidas para um tubo de centrifugação pré-resfriado e centrifugadas a 4.000 g por 15 min sob refrigeração de 4 °C. Os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos foram lavados duas vezes com 25 ml de água MilliQ estéril resfriada a 4 °C. As células foram gentilmente ressuspensas em 30 ml de glicerol 10% resfriado a 4 °C e centrifugadas a 5.000 g por 10 min sob refrigeração a 4 °C. Aos sedimentos bacterianos foram adicionados 300 µl de glicerol resfriado a 4 °C para ressuspender gentilmente as células bacterianas. As suspensões foram aliquotadas em microtubos pré-resfriados em volumes de 50 µl e imediatamente congeladas a -80 °C.

3.12.2 Transformação bacteriana e seleção dos clones

O plasmídeo pKC471, que expressa a proteína EspFu foi extraído da amostra hospedeira *E. coli* DH5 α com auxílio do *Qiagen Plasmid Midi Kit* (Qiagen), a partir de 200 ml de cultura de caldo LB contendo canamicina (50 μ g/ml). Após a extração, o plasmídeo foi quantificado utilizando-se aparelho NanoDrop (ThermoScientific), através da leitura de absorbância em comprimento de onda de 260 nm.

Para a eletroporação, 100 ng do plasmídeo pKC471 foram adicionados a 50 μ l das aEPEC eletrocompetentes (item 3.12.1) descongeladas em banho de gelo. O eletroporador *GenePulser* (BioRad) foi ajustado para 2,5 kV, 25 μ F e pulso de 200 Ω . Após o pulso, foram adicionados 950 μ l de meio de cultivo SOC (cloreto de sódio 10 mM; cloreto de potássio 2,5 mM; cloreto de magnésio 10 mM; sulfato de magnésio 20 mM; glicose 20 mM; triptona 20%; extrato de levedura 0,5%) e essa suspensão foi incubada a 37 °C sob agitação de 250 rpm durante 1h. A suspensão foi semeada em volumes de 50 μ l, 100 μ l e 200 μ l em ágar LB acrescido de canamicina (50 μ g/ml) e cultivadas por 18h a 37 °C. Duas colônias de cada placa foram selecionadas, cultivadas em 3 ml de caldo LB acrescido de canamicina (50 μ g/ml), durante 18h a 37 °C sob agitação de 250 rpm. Em seguida, a presença do plasmídeo pKC471 foi confirmada nos transformantes através da extração de DNA plasmidial, com auxílio do *Qiagen Plasmid Midi Kit* (Qiagen), usando como controle a amostra hospedeira do plasmídeo pKC471 *E. coli* DH5 α . Em seguida, os transformantes foram armazenados em tubos de congelamento com glicerol 50% e mantidos a -80 °C. Como controle negativo, as amostras de aEPEC selvagens foram semeadas em ágar LB acrescido de canamicina (50 μ g/ml) e cultivadas por 18h a 37 °C. As amostras de aEPEC que receberam o plasmídeo pKC471 foram denominadas de Ec292/84(pKC471), 9100-83(pKC471), BA320(pKC471) e BA4013(pKC471).

4 RESULTADOS

4.1 Confirmação do genótipo de aEPEC

Inicialmente foi realizada a confirmação do genótipo *eae+*/*bfpA*-/*stx1*-/*stx2*-/*perA*-, sonda EAF-, das quatro amostras de aEPEC deste estudo (Ec292/84, 9100/83, BA320 e BA4013). Os resultados das reações da PCR (Tabela 4) confirmaram que todas as amostras apresentavam o perfil genético de aEPEC, uma vez que foi detectada a presença do gene *eae* e a ausência dos genes *bfpA*, *stx1*, *stx2* e *perA*, bem como do fragmento sonda EAF.

Além dessa caracterização do perfil genotípico de aEPEC, foi verificada a presença ou ausência da fímbria BFP nessas amostras, através de ensaios de imunofluorescência. Com o emprego de um soro policlonal anti-BFP a ausência da expressão de BFP foi confirmada nas quatro amostras selecionadas (Dra. Cecília M. Abe, Laboratório de Bacteriologia - comunicação pessoal).

Desta forma, a coleção de amostras de *E. coli* deste estudo, foi confirmada como aEPEC.

Tabela 4- Pesquisa de sequências genéticas associadas aos patótipos EPEC e EHEC

| Amostras | Amplificação por PCR | | | | | |
|----------|----------------------|-------------|-------------|-----|-------------|-------------|
| | <i>eae</i> | <i>perA</i> | <i>bfpA</i> | EAF | <i>stx1</i> | <i>stx2</i> |
| BA320 | + | - | - | - | - | - |
| Ec292/84 | + | - | - | - | - | - |
| 9100/83 | + | - | - | - | - | - |
| BA4013 | + | - | - | - | - | - |

4.2 Confirmação da expressão dos padrões de adesão

Ainda com relação à caracterização inicial das amostras de aEPEC selecionadas, os padrões de adesão descritos anteriormente foram novamente confirmados em células HEp-2 e HeLa, e verificado se os mesmos se mantinham em linhagens intestinais Caco-2, T84 e HT29.

Os resultados obtidos estão apresentados na figura 6 e tabela 5. Os padrões previamente descritos das quatro amostras foram confirmados em ensaios de adesão de 6h em células HEp-2, HeLa, Caco-2, T84 e HT29, ou seja, padrão ALL da amostra BA320 (Figura 6A), padrão AA da amostra Ec292/84 (Figura 6B), padrão AD da amostra 9100/83 (Figura 6C) e padrão NA da amostra BA4013 (Figura 6D). O padrão AL está exemplificado pela amostra protótipo de tEPEC E2348/69 (Figura 6E).

4.3 Verificação da capacidade de formação da lesão A/E *in vitro*

Um teste *in vitro* indicativo da formação da lesão A/E foi desenvolvido com base na detecção do acúmulo de actina polimerizada que ocorre na área de adesão da bactéria (KNUTTON *et al.*, 1989). Neste teste, denominado *fluorescent-actin staining* (FAS), a faloidina marcada com isotiocianato de fluoresceína liga-se à actina filamentosa em cultura de células epiteliais, abaixo de cada bactéria aderida.

As quatro amostras de aEPEC deste estudo foram submetidas ao teste de FAS em ensaios de interação de 6h com as células HEp-2, HeLa, Caco-2, T84 e HT29. Esses resultados estão apresentados na figura 7 e tabela 5. A amostra BA320 foi positiva para o teste de FAS nas linhagens celulares HeLa, HEp-2 e HT29 (Figura 7A), no qual se observa o acúmulo de actina logo abaixo da adesão bacteriana, e negativa para as linhagens T84 e Caco-2 (Figura 7A). A cepa 9100/83 foi FAS positiva somente na linhagem celular HeLa (Figura 7C) e negativa nas demais linhagens (Figura 7C). As outras amostras Ec292/84 (Figura 7B) e BA4013 (Figura 7D) não causaram acúmulo de actina polimerizada na superfície celular. A amostra protótipo de tEPEC E2348/69 foi utilizada como controle positivo (Figura 7E).

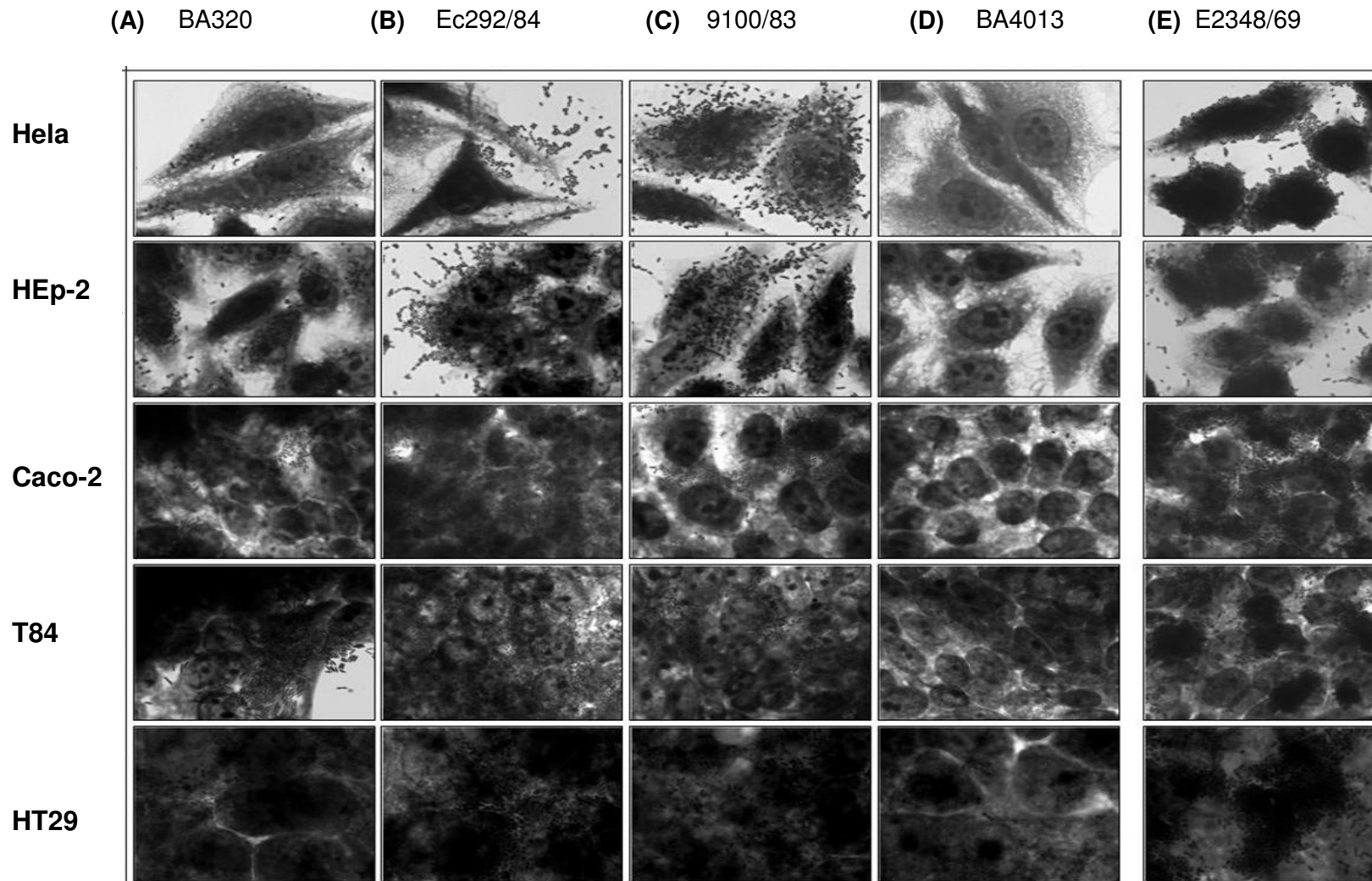


Figura 6- Padrões de interação das amostras de aEPEC deste estudo com células epiteliais cultivadas HeLa, HEp-2, Caco-2, T84 e HT29, após 6h de incubação. As células foram fixadas com metanol, coradas com solução de MayGrünwald/Giemsa e visualizadas através de microscopia óptica sob aumento de 1000x. **(A):** amostra BA320 (padrão localizado-*like*); **(B):** amostra Ec292/84 (padrão agregativo); **(C):** amostra 9100/83 (padrão difuso), **(D):** amostra BA4013 (não aderente) e **(E):** controle de adesão, amostra protótipo de tEPEC E2348/69 (padrão localizado).

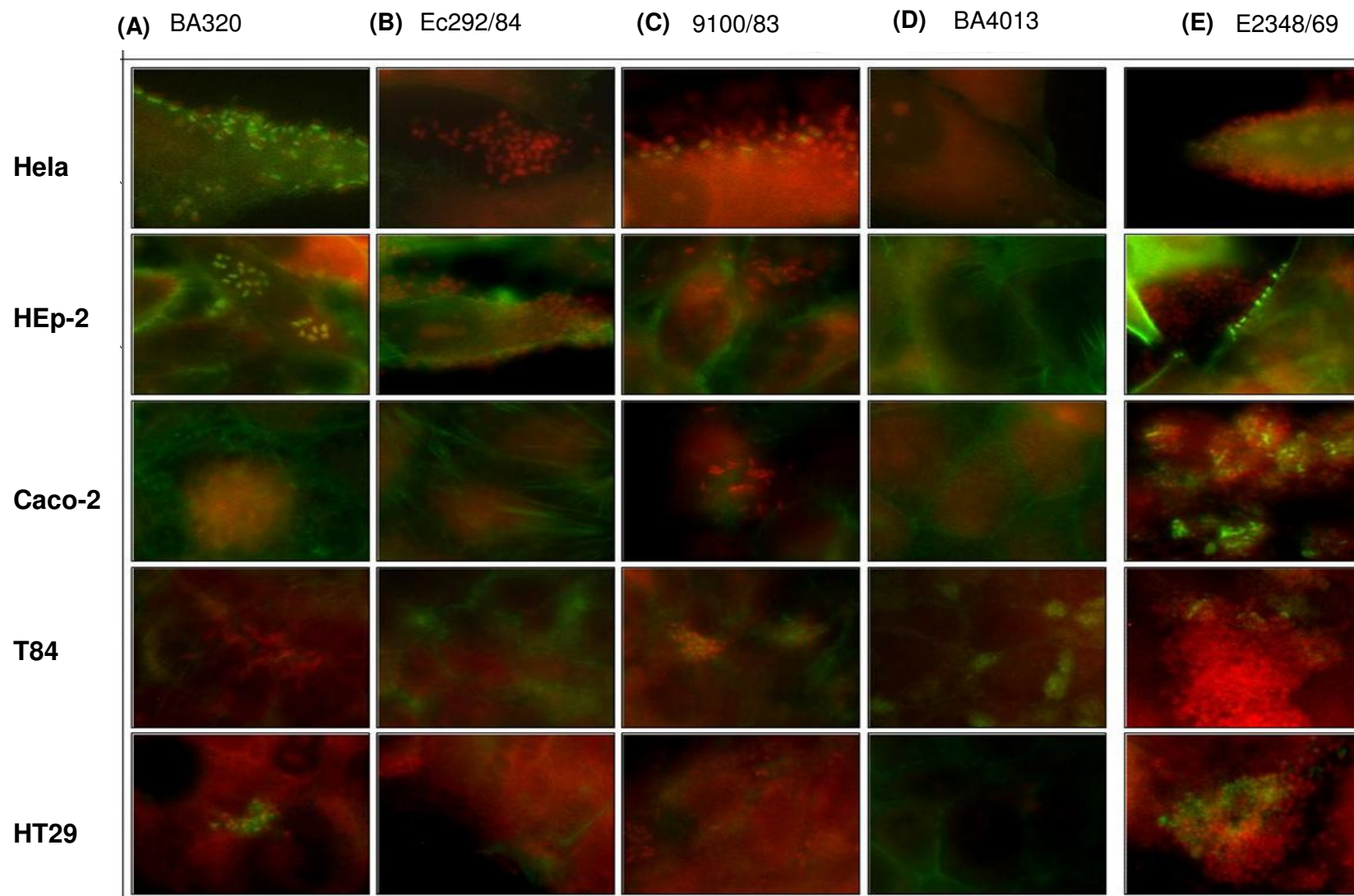


Figura 7- Teste de FAS com células HeLa, HEp-2, Caco-2, T84 e HT29 após 6h de interação das amostras de aEPEC deste estudo. As células foram coradas com isotiocianato de faloidina e iodeto de propídio e visualizadas através de microscopia de fluorescência sob aumento de 1000x. **(A):** amostra BA320; **(B):** amostra Ec292/84; **(C):** amostra 9100/83, **(D):** amostra BA4013 e **(E):** amostra protótipo de tEPEC E2348/69 (controle positivo).

Tabela 5- Resultados dos ensaios de adesão, FAS e de detecção da fosforilação de Tir das amostras de aEPEC deste estudo em diferentes linhagens celulares *in vitro*, após 6h de contato células-bactérias

| Amostras | Linhagens celulares | | | | | | | | | | | |
|---------------------------|---------------------|--------------|------------------|------------------|--------------|------------------|------------------|--------------|------------------|--------------|------------------|--------------|
| | HeLa | | | HEp-2 | | | Caco-2 | | T84 | | HT29 | |
| | Padrão Adesão | Teste FAS | Tir ^a | Padrão Adesão | Teste FAS | Tir ^a | Padrão Adesão | Teste FAS | Padrão Adesão | Teste FAS | Padrão Adesão | Teste FAS |
| <i>Amostras aEPEC</i> | | | | | | | | | | | | |
| BA320 | ALL | + | - | ALL | + | - | ALL | - | ALL | - | ALL | + |
| Ec292/84 | AA | - | - | AA | - | - | AA | - | AA | - | AA | - |
| 9100/83 | AD | + | - | AD | - | - | AD | - | AD | - | AD | - |
| BA4013 | NA | - | - | NA | - | - | NA | - | NA | - | NA | - |
| <i>Amostras Controles</i> | | | | | | | | | | | | |
| E2348/69 | AL | + | + | AL | + | + | AL | + | AL | + | AL | + |
| DH5 α | NA | - | - | NA | - | - | NA | - | NA | - | NA | - |

AA, adesão agregativa; AD, adesão difusa; AL, adesão localizada; ALL, adesão localizada-like; NA, não aderente; NT, não testada.

^aEnsaio de detecção da fosforilação de tirosina da proteína Tir, através de imunofluorescência.

4.4 Pesquisa dos genes *tccP/tccP2*

A presença dos genes *tccP* e *tccP2* foi verificada nas amostras de aEPEC deste estudo. A amostra BA320 apresentou amplificação somente para o gene *tccP* (Figura 8). As demais amostras não apresentaram amplificação para *tccP* ou *tccP2* (Figura 8).

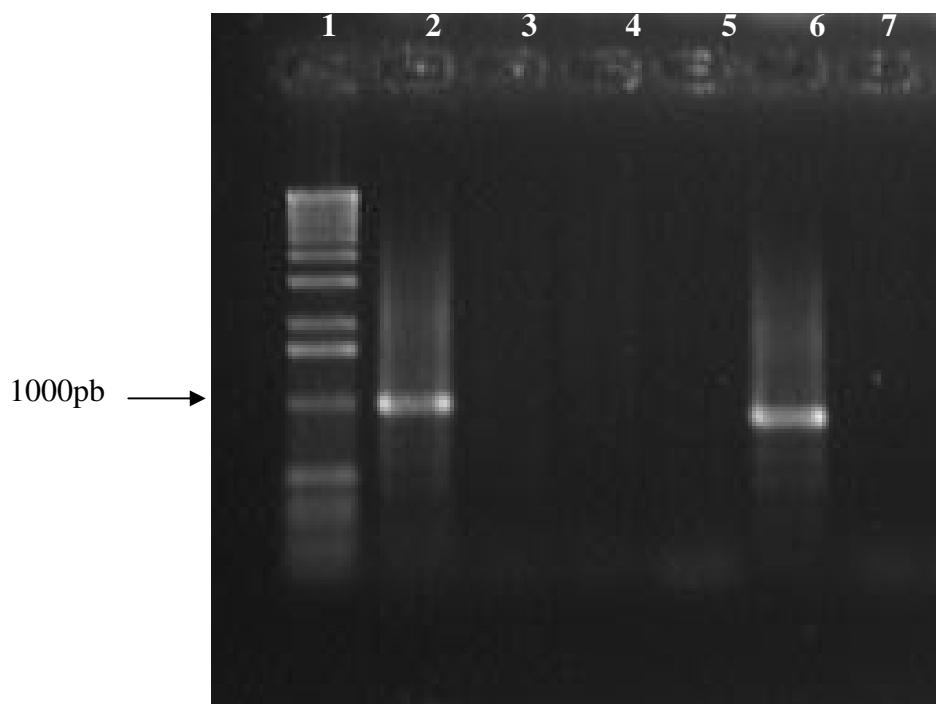


Figura 8- Eletroforese em gel de agarose (0,8%), após coloração com brometo de etídio, dos produtos amplificados referentes ao gene *tccP* empregando os iniciadores *tccP*(F) e *tccP*(R). Linha 1: 1 Kb DNA ladder (Invitrogen). Linha 2: EHEC EDL933 (controle positivo). Linha 3: *E. coli* DH5 α (controle negativo). Linha 4: amostra Ec292/84. Linha 5: amostra 9100/83. Linha 6: amostra BA320. Linha 7: amostra BA4013

4.5 Detecção da fosforilação de Tir

Todas as amostras de aEPEC deste estudo foram negativas para o teste de fosforilação da proteína Tir, em contato bactérias-células HeLa e HEp-2, conforme mostrado na figura 9.

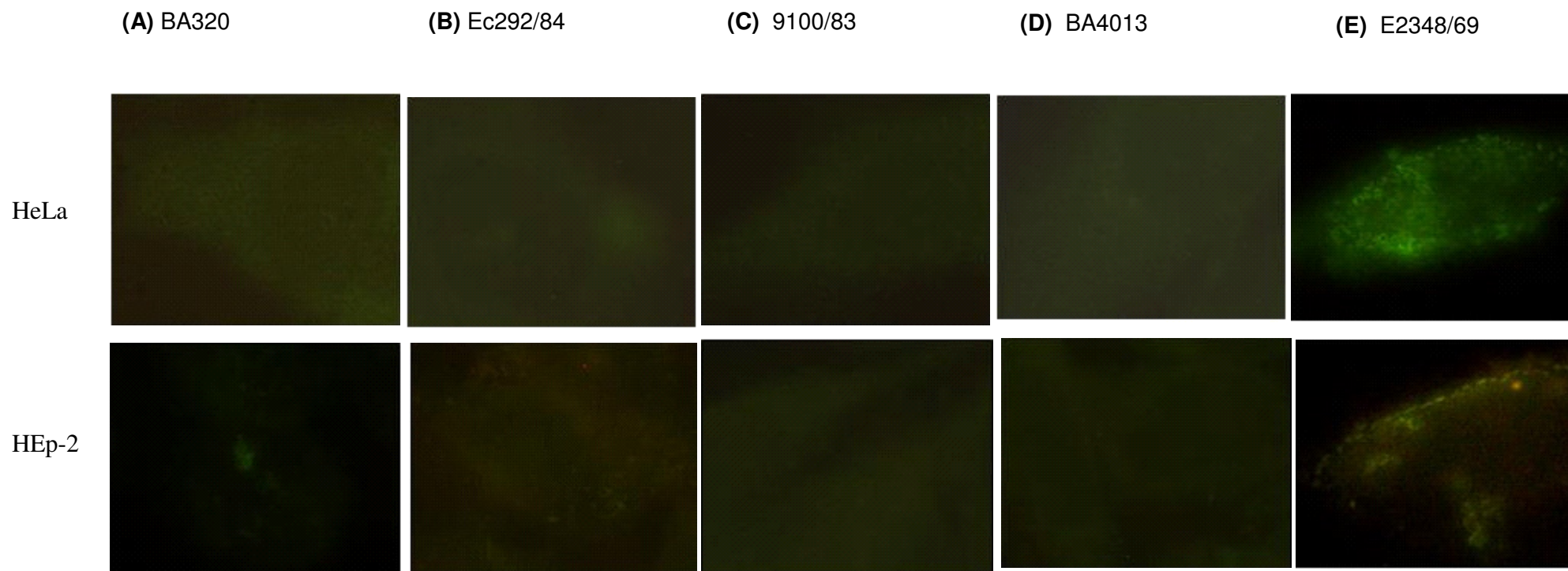


Figura 9- Teste de fosforilação da proteína Tir, após 6h de interação das amostras de aEPEC deste estudo com células HeLa e HEp-2. As células foram coradas com isotiocianato de fluoresceína e visualizadas através de microscopia de fluorescência sob aumento de 1000x. **(A):** amostra BA320; **(B):** amostra Ec292/84; **(C):** amostra 9100/83, **(D):** amostra BA4013 e **(E):** amostra protótipo de tEPEC E2348/69 (controle positivo).

4.6 Análise estrutural dos genes da região LEE

Após a confirmação da classificação das amostras como aEPEC e dos seus padrões de adesão em células epiteliais cultivadas, iniciou-se a segunda etapa deste estudo, que consistiu-se na análise estrutural da região LEE.

Inicialmente foi verificada a localização da inserção da região LEE no cromossomo dessas amostras. Conforme verificado por Sperandio et al. (1998) e Rumer et al. (2003), a região LEE pode estar inserida em EPEC em três sítios adjacentes aos genes de RNAt *selC*, *pheV* e *pheU*.

Conforme apresentado na tabela 6, foi verificado através da PCR que as amostras EC292/84, 9100/83 e BA320 apresentaram provável inserção de LEE em *selC* e a amostra BA4013 em *pheV*, uma vez que não apresentaram amplificação para os respectivos genes de RNAt.

Tabela 6- Determinação do sítio de inserção da região LEE das amostras deste estudo

| Amostras | Amplificação do gene | | |
|----------|----------------------|-------------|-------------|
| | <i>pheU</i> | <i>pheV</i> | <i>selC</i> |
| BA320 | + | + | - |
| EC292/84 | + | + | - |
| 9110-83 | + | + | - |
| BA4013 | + | - | + |

Em seguida, a integridade da região LEE dessas amostras foi verificada através da pesquisa da presença de 31 genes dessa ilha de patogenicidade. A padronização das reações da PCR para esses genes foi realizada com a amostra de

tEPEC E2348/69, conforme apresentado na figura 10, uma vez que todas as seqüências dos iniciadores foram baseadas na seqüência de LEE dessa amostra.

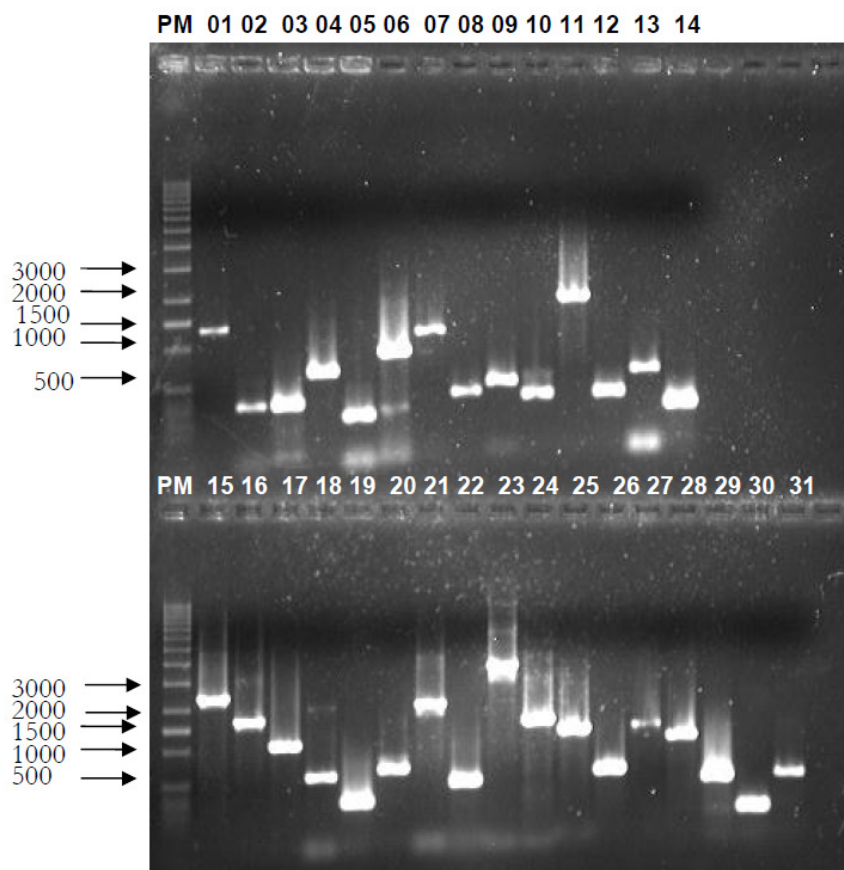


Figura 10- Análise em eletroforese em gel de agarose (1%), após coloração com brometo de etídio, dos produtos amplificados através de PCR referentes à detecção dos genes da região LEE da EPEC E2348/69, utilizando os iniciadores apresentados na Tabela 2 e o DNA da amostra E2348/69 como molde. PM, 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen, EUA); Amplicons dos genes: 1, *espG*; 2, *ler*; 3, *cesAB*; 4, *escR*; 5, *escS*; 6, *escT*; 7, *escU*; 8, *grlR*; 9, *grlA*; 10, *cesD*; 11, *escC*; 12, *sepD*; 13, *escJ*; 14, *sepZ*; 15, *escV*; 16, *escN*; 17, *sepQ*; 18, *espH*; 19, *cesF*; 20, *map*; 21, *tir*; 22, *cesT*; 23, *eae*; 24, *escD*; 25, *sepL*; 26, *espA*; 27, *espD*; 28, *espB*; 29, *cesD2*; 30, *escF*; 31, *espF*.

Os iniciadores designados pela terminação “interno”, descritos na tabela 2, foram desenhados na região interna do gene, pois seus respectivos iniciadores das regiões intergênicas não resultaram em ampliações nos ensaios de padronização com a amostra E2348/69 (*cesD*, *sepD*, *escV* e *espF*), ou não amplificaram todas as amostras para os sequenciamentos (*ler*, *map*, *cest* e *eae*). Já o iniciadores *tir*(*map*-

cest) foram desenhados na região final do gene *map* (*forward*) e na região inicial do gene *cest* (*reverse*), para serem utilizados na amplificação do gene *tir*. Os demais iniciadores foram desenhados na região intergênica do respectivo gene da região LEE da tEPEC E2348/69, com o objetivo inicial de utilizar alguns destes iniciadores também nas reações de sequenciamento.

Os resultados da detecção desses genes estão apresentados na tabela 7.

Tabela 7- Pesquisa da presença de 31 genes da região LEE nas amostras deste estudo

| Iniciador | Amostras | | | |
|----------------------|----------|---------|-------|--------|
| | Ec292/84 | 9100/83 | BA320 | BA4013 |
| <i>espG</i> | + | - | - | - |
| <i>ler</i> | + | + | + | - |
| <i>ler-interno</i> | + | + | + | + |
| <i>cesAB</i> | + | + | + | + |
| <i>escR</i> | + | + | + | + |
| <i>escS</i> | + | + | + | + |
| <i>escT</i> | + | + | + | + |
| <i>escU</i> | + | + | + | + |
| <i>grlR</i> | + | + | + | + |
| <i>grlA</i> | + | + | + | - |
| <i>cesD-interno</i> | + | + | + | + |
| <i>escC</i> | + | + | + | + |
| <i>sepD-interno</i> | + | + | + | + |
| <i>escJ</i> | + | + | + | - |
| <i>sepZ</i> | + | + | + | + |
| <i>escV-interno</i> | + | + | + | + |
| <i>escN</i> | + | + | + | + |
| <i>sepQ</i> | + | + | + | - |
| <i>espH</i> | + | - | - | - |
| <i>cesF</i> | + | + | + | - |
| <i>map</i> | - | - | - | - |
| <i>map-interno</i> | + | + | + | + |
| <i>tir(map-cesT)</i> | + | + | + | + |
| <i>tir</i> | - | - | - | - |
| <i>cesT</i> | - | - | + | + |
| <i>cesT-interno</i> | + | + | + | + |
| <i>eae</i> | + | + | - | - |
| <i>eae-interno</i> | + | + | + | + |
| <i>escD</i> | + | + | + | + |
| <i>sepL</i> | + | + | + | + |
| <i>espA</i> | + | + | + | + |
| <i>espD</i> | + | + | - | - |
| <i>espB</i> | + | + | - | - |
| <i>cesD2</i> | + | - | + | - |
| <i>escF</i> | + | + | + | - |
| <i>espF-interno</i> | + | + | + | - |

O genes que não apresentaram amplificação nas reações da PCR (*escJ*, *cesF*, *espB*, *escF*, *gria*, *espH*, *sepQ*, *espD*, *cesD2*, *espG* e *espF*), em pelo menos uma das amostras de aEPEC, tiveram suas presenças confirmadas através de *slot blot*. Conforme se observa na figura 11, todas as quatro amostras de aEPEC foram positivas nos ensaios de hibridização para a detecção dos 11 genes de LEE testados.

Para verificar a similaridade da sequência dos genes *ler*, *sepZ*, *escV*, *map*, *cesT*, *eae* e *espA* entre as quatro amostras e com os respectivos genes da tEPEC E2348/69, foram realizadas reações de sequenciamento destes genes. A amplificação dos genes *espA* e *sepZ* foi realizada com os iniciadores na região intergênica e a amplificação dos genes *ler*, *escV*, *map*, *cesT* e *eae* através dos iniciadores denominados “interno”.

A análise dos resultados dos alinhamentos dos sequenciamentos obtidos, mostrados na figura 11, indica que os genes avaliados das quatro aEPEC deste estudo são similares aos respectivos genes da amostra E2348/69 na maior parte da sequência, porém há uma maior similaridade dos genes das amostras de aEPEC entre si.

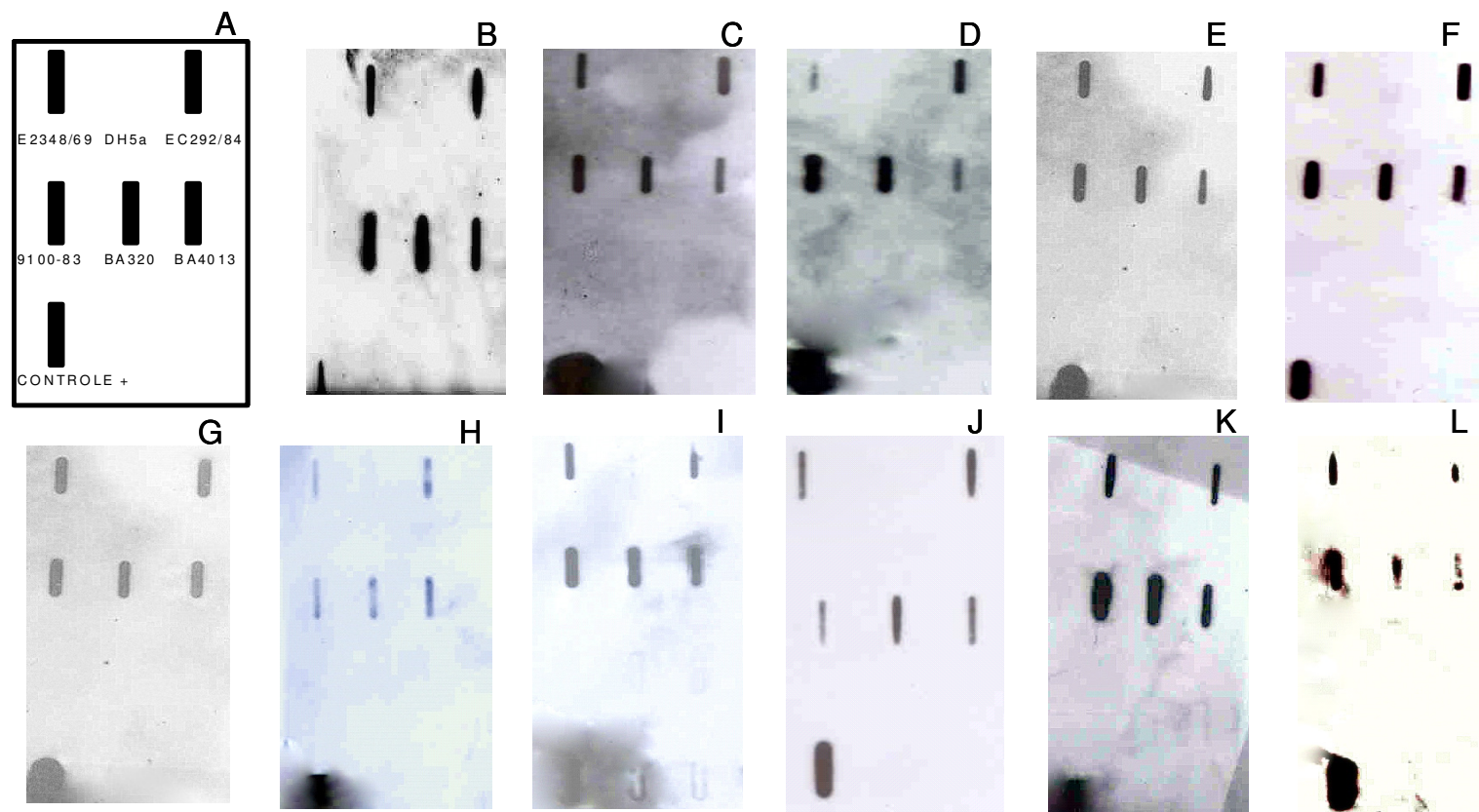


Figura 11- Filmes de Raio-X expostos à membrana de *nylon* contendo DNA genômico após hibridização com as sondas marcadas por quimioluminescência. Após as exposições, os filmes foram revelados e as suas imagens foram captadas em *scanner*. **A:** esquema da localização do DNA genômico das amostras aplicadas nas diferentes membranas hibridizadas com diferentes sondas. DNA genômico da amostra E2348/69 (controle positivo); DNA genômico da amostra *E. coli* DH5 α (controle negativo); DNA genômico da amostra EC292/84; DNA genômico da amostra 9100/83; DNA genômico da amostra BA320; DNA genômico da amostra BA4013; Controle positivo da reação (produto amplificado usado como sonda na reação). **B:** membrana hibridizada com a sonda *espG*. **C:** membrana hibridizada com a sonda *escF*. **D:** membrana hibridizada com a sonda *espJ*. **E:** membrana hibridizada com a sonda *cesF*. **F:** membrana hibridizada com a sonda *espH*. **G:** membrana hibridizada com a sonda *cesD2*. **H:** membrana hibridizada com a sonda *espD*. **I:** membrana hibridizada com a sonda *espF*. **J:** membrana hibridizada com a sonda *grlA*. **K:** membrana hibridizada com a sonda *sepQ*. **L:** membrana hibridizada com a sonda *espB*.

A) ler

E2348/69 : CAGCTTATTGAGCAAATTGAAGTGTACAACAGGAAGCAAAGCGACTGCG : 50
 EC292/84 :A.....-...C...TC...G..... : 49
 9100-83 :A.....-...C...TC...G..... : 49
 BA320 :A.....C...C...G..... : 50
 BA4013 : : 50

60 * 80 * 100
 E2348/69 : AGAGCAGGAAATTCAAAGTGTAAATTGAGTCGATTCAAAAGCAGATTACTT : 100
 EC292/84 :G.....G..... : 99
 9100-83 :G.....G..... : 99
 BA320 :N.....N..... : 100
 BA4013 : : 100

* 120 * 140 *
 E2348/69 : ATTACAATATAACCCTACAAGAGCTGGGATATACTAATGTGCCTGATGAT : 150
 EC292/84 :T..... : 149
 9100-83 :T..... : 149
 BA320 : : 150
 BA4013 : : 150

160 * 180 * 200
 E2348/69 : GGCCTTGCTCGCCGGAACCTCATCGAAAGGAGTTTATTATCGCAATGAAGA : 200
 EC292/84 : ..A..C.....T....C..C..... : 199
 9100-83 : ..A..C.....T....C..C..... : 199
 BA320 : ..A..C.....T....C..... : 200
 BA4013 : : 200

* 220 * 240 *
 E2348/69 : AGGGCAGACCTGGTCGGGAGTTGGCCGACAGCCACGCTGGCTTAAAGAAG : 250
 EC292/84 :C..A..... : 249
 9100-83 :C..A..... : 249
 BA320 :A..... : 250
 BA4013 : : 250

260 * 280 * 300
 E2348/69 : CACTGTTGAATGGAATGAAGAAAGAAGATTTCTTGTGAAGGACACCGAA : 300
 EC292/84 :T... : 299
 9100-83 :T... : 299
 BA320 :T... : 300
 BA4013 : : 300

*
 E2348/69 : GACGAAATAATACCG : 315
 EC292/84 : ..A..... : 314
 9100-83 : ..A..... : 314
 BA320 : : 315
 BA4013 : : 315

continua

continuação

B) sepZ

```
          *      20      *      40      *
E2348/69 : CAACAGTAGTTACGCCACCTAATACACCGGCTGCGATTCTAAGCCTAAT : 50
EC292/84 : ..... : 50
9100-83  : ..... : 50
BA320    : ..... : 50
BA4013   : ..... : 50
```

```
          60      *      80      *      100
E2348/69 : CTTTGTGAAGGGTCGTCAACACACATTGCTGCGATAACCAGTACCGATAGC : 100
EC292/84 : .....T..... : 100
9100-83  : .....T..... : 100
BA320    : ..... : 100
BA4013   : ..... : 100
```

```
          *      120      *      140      *
E2348/69 : GGCTAGAACACCTGCACCTATTAATAACTCCACCCAGGATTCTAACGCTGC : 150
EC292/84 : ..... : 150
9100-83  : ..... : 150
BA320    : ..... : 150
BA4013   : ..... : 150
```

```
          160      *      180      *      200
E2348/69 : GACTTGTTCACCTTCTGACTGCATCACCCCTGTCTTCTCATCCACTGGA : 200
EC292/84 : .....G.....T.....A..... : 200
9100-83  : .....G.....T.....A..... : 200
BA320    : .....G.....T..... : 200
BA4013   : ..... : 200
```

```
          *      220      *      240      *
E2348/69 : TTATTTCCATTGATTGTGGCTGCCAGTGGTAATACIGCACCAGAAGGGCT : 250
EC292/84 : .....A.. : 250
9100-83  : .....A.. : 250
BA320    : ..... : 250
BA4013   : ..... : 250
```

```
          260
E2348/69 : TAAATTTGCTGCTTCCAT : 268
EC292/84 : ..... : 268
9100-83  : ..... : 268
BA320    : ..... : 268
BA4013   : ..... : 268
```

continua

continuação

C) escV

```

                *           20           *           40           *
E2348/69 : AAGCAGAGTCATATCACGATCTTATTCTGGCTCTCTTCTTTATGGCT : 50
EC292/84 : ..... : 50
9100-83 : ..... : 50
BA320 : ..... : 50
BA4013 : ..... : 50

```

```

                60           *           80           *           100
E2348/69 : GTAATGATGATGATTATTCCACTACCAACAGTTGTGGTGGATATCATTAT : 100
EC292/84 : ..... : 100
9100-83 : ..... T.G. .... : 100
BA320 : ..... : 100
BA4013 : ..... : 100

```

```

                *           120           *           140           *
E2348/69 : CGCGATTAATATTTTCGACAGCTTTACTTTTTATTAATGCTCTCAATCTATA : 150
EC292/84 : ..... : 150
9100-83 : ..... A.....G..G..... : 150
BA320 : ..... A.....N..... : 150
BA4013 : ..... : 150

```

```

                160           *           180           *           200
E2348/69 : TAAAAATCCTCTTGAACAACTTCTTTCCCCACAATCCTGTTGATTACG : 200
EC292/84 : ..... : 200
9100-83 : ..... G.....T..T..... : 200
BA320 : ..... : 200
BA4013 : ..... : 200

```

```

                *           220           *           240           *
E2348/69 : ACGTTGATGCGCCTGTGCTCAGTGTAGTACAACCAGACTTATTCTGCT : 250
EC292/84 : ..... : 250
9100-83 : ..... : 250
BA320 : ..... : 250
BA4013 : ..... C.T..GT..... : 250

```

```

                260           *           280           *           300
E2348/69 : GCATCACGATGCGGGTGACATTATTTACTCCTTCGGTAACTTTGTTGTTG : 300
EC292/84 : ..... : 300
9100-83 : ..... : 300
BA320 : ..... : 300
BA4013 : ..... : 300

```

```

                *           320           *           340           *
E2348/69 : GCGGTAATATTGTTGTTGGCCTGGTTATTTTTACTATTATCACCATTGTT : 350
EC292/84 : ..... : 350
9100-83 : ..... C.....A : 350
BA320 : ..... N.....A : 350
BA4013 : ..... : 350

```

```

                360           *           380           *           400
E2348/69 : CAATTTATGGTTATTACAAAAGGGCCGAGCGTGTGCTGAAGTGAGTGC : 400
EC292/84 : ..... : 400
9100-83 : ..... T..... : 400
BA320 : ..... : 400
BA4013 : ..... : 400

```

continua

continuação

```

                *         420         *         440         *
E2348/69 : TCGTTTTTCCCTTGATGGTATGCCAGGAAAAGCAAATGAGTATTGATGGTG : 450
EC292/84 : ..... : 450
9100-83  : .....A..... : 450
BA320    : ..... : 450
BA4013   : ..... : 450

```

```

                460         *         480         *         500
E2348/69 : ATATGCGCGCAGGCGTTATTGACCCGCTTGAGGCAAAAGTTCTTCGCTCC : 500
EC292/84 : ..... : 500
9100-83  : .....T..... : 500
BA320    : .....T..... : 500
BA4013   : ..... : 500

```

```

                *         520         *         540         *
E2348/69 : CGAGTGCAAAAGGAAAGCCAGTTTATGGTTCAATGGACGGGGCGATGAA : 550
EC292/84 : ..... : 550
9100-83  : ..... : 550
BA320    : ..... : 550
BA4013   : ..... : 550

```

```

                560         *         580         *         600
E2348/69 : GTTTGTA AAAAGGGGACGCTATTGCTGGTATCATTATTGTTTTAGTTAACC : 600
EC292/84 : ..... : 600
9100-83  : .....N.....C.....C..... : 600
BA320    : .....C.....C..... : 600
BA4013   : ..... : 600

```

```

                *         620         *         640         *
E2348/69 : TTTTGGTGGCGTGCTCATTGGTATGTGGCAATTTGACATGCCATTTAGT : 650
EC292/84 : ..... : 650
9100-83  : .G.....A..... : 650
BA320    : .G.....N..... : 650
BA4013   : ..... : 650

```

continua

continuação

D) eae

| | | |
|----------|---|-------|
| E2348/69 | : TTGATCAGGATTTTTCTGGTGATAAATACCCGTTTAGGTATTGGTGG-CGA | : 49 |
| EC292/84 | :C.....N.....G...TAT...T...-... | : 49 |
| 9100-83 | :-..... | : 49 |
| BA320 | : .G.GCGGA..AN..GAGTT..TCCNC.-----,AA.G..TA.-.T.TT | : 42 |
| BA4013 | : ..-.....-..... | : 48 |
| | | |
| E2348/69 | : ATACTGG-CGAGACTATTTCAAAGTAGTGTTAACGGCTATTTCCGCATG | : 98 |
| EC292/84 | :T.....A.G..G.....GT | : 99 |
| 9100-83 | :-..... | : 98 |
| BA320 | : TA..G.TG.CTT.T.T.CC.GC.TT.-.AAGG.CGT...C..GG.ATTGA | : 91 |
| BA4013 | :-.....C..... | : 97 |
| | | |
| E2348/69 | : AGCGGCTGGCATGAGTCATACAATAAGAAAGACTATGATGAGCGCCCAGC | : 148 |
| EC292/84 | : GT..T.....T..... | : 149 |
| 9100-83 | : TA..... | : 148 |
| BA320 | : ---.TTCA.T.CAG---.AG.....T---.....T | : 132 |
| BA4013 | :-.....G.. | : 147 |
| | | |
| E2348/69 | : AAATGGCTT-CGATATCCGT-TTTAATGGCTATCTGCCATCATACCCGGC | : 196 |
| EC292/84 | :-.....G..... | : 198 |
| 9100-83 | :T.....-..... | : 197 |
| BA320 | :-.....-..... | : 180 |
| BA4013 | :T...-T.....C-.....T.A.....T..... | : 195 |
| | | |
| E2348/69 | : ATTAGGTGCCAAGCTGATGTATGAGCAGTATTATGGTGATAATGTTGCTT | : 246 |
| EC292/84 | :G..... | : 248 |
| 9100-83 | :G.....C..... | : 247 |
| BA320 | :-..... | : 230 |
| BA4013 | :C.....A.....C..A..... | : 245 |
| | | |
| E2348/69 | : TGTTTAATCTGATAAGCTGCAGTCGAATCCTGGTGCGGCGACCGTTGGT | : 296 |
| EC292/84 | :T..-..... | : 297 |
| 9100-83 | :-..... | : 297 |
| BA320 | :T.GT..... | : 280 |
| BA4013 | :C.....T.....C..... | : 295 |
| | | |
| E2348/69 | : GTAAACTATACTCCGATTCCTCTGGTGACGATGGGGATCGATTACCGTCA | : 346 |
| EC292/84 | :-..... | : 347 |
| 9100-83 | :-..... | : 347 |
| BA320 | : ...T..... | : 330 |
| BA4013 | :C..... | : 345 |
| | | |
| E2348/69 | : TGGTACGGGTAATGAAAATGATCTCCTTTACTCAATGCAGTCCGTTATC | : 396 |
| EC292/84 | :-..... | : 397 |
| 9100-83 | :-..... | : 397 |
| BA320 | :-..... | : 380 |
| BA4013 | :-..... | : 395 |

continua

continuação

| | | | | | | |
|----------|---|--|---|-----|---|-----|
| | * | 420 | * | 440 | * | |
| E2348/69 | : | AGTTTGATAAACCGTGGTCTCAGCAAATTGAGCCACAATATGTTAACGAG | : | | : | 446 |
| EC292/84 | : |G..... | : | | : | 447 |
| 9100-83 | : |G..... | : | | : | 447 |
| BA320 | : | | : | | : | 430 |
| BA4013 | : |C.....G..... | : | | : | 445 |

| | | | | | | |
|----------|-----|--|-----|---|-----|-----|
| | 460 | * | 480 | * | 500 | |
| E2348/69 | : | TTAAGAACATTATCAGGCAGCCGTTACGAT-CTGGTTCAGCGTAATAACA | : | | : | 495 |
| EC292/84 | : |- | : | | : | 496 |
| 9100-83 | : |- | : | | : | 496 |
| BA320 | : |- | : | | : | 479 |
| BA4013 | : |G.....- | : | | : | 494 |

| | | | | | | |
|----------|---|---|---|-----|---|-----|
| | * | 520 | * | 540 | * | |
| E2348/69 | : | ATATTATTCTGGAGTACAAAAAGCAGGATATTCTTCTCTGAATATTCCG | : | | : | 545 |
| EC292/84 | : | | : | | : | 546 |
| 9100-83 | : | | : | | : | 546 |
| BA320 | : | | : | | : | 529 |
| BA4013 | : | | : | | : | 544 |

| | | | |
|----------|-----|----------------------------|-------|
| | 560 | * | |
| E2348/69 | : | CATGATATTAATGGTACTGAACGCAG | : 571 |
| EC292/84 | : | | : 572 |
| 9100-83 | : |- | : 571 |
| BA320 | : |- | : 554 |
| BA4013 | : |-.....-A... | : 568 |

continua

continuação

E) map

```

*           20           *           40           *
E2348/69   : AGCTCAGGCGGTTACACAAACTCTTAGACCCGCTGTAACAAGGCTGCGAC : 50
EC292/84   : .....G.....GA..... : 50
9100-83    : .....C.....G..C...GA..... : 50
BA320      : .....GA..... : 50
BA4013     : .....C.....T..G..C...GA..... : 50

           60           *           80           *           100
E2348/69   : GCAAGCGGGCATGGCAGCCAGTGGTATGAGGTTACACCTATGCAGTCGA : 100
EC292/84   : .....GG.....C....A...GTG..C..... : 100
9100-83    : .....GG...G.....A...GTG..C..... : 100
BA320      : .....GG.....A...GTG..C..... : 100
BA4013     : A.....GG...A.....A...GTG..C..... : 100

*           120          *           140          *
E2348/69   : ACCTTATGATTAATCATGGCAAAGTACTACCCAGCTACTACAGGCCGTA : 150
EC292/84   : ..T.....T.....G : 150
9100-83    : ..T.....T.....G : 150
BA320      : ..T.....T.....G : 150
BA4013     : ..T.....A.....T.....G : 150

           160          *           180          *           200
E2348/69   : GCCAAACAAACTGGTAGTAGTGATACCCAGCAATGGTTCAAGCAAGAGCA : 200
EC292/84   : .....CC...CG.....T.....A..G..... : 200
9100-83    : .....C-...CG.....T.....A..G..... : 200
BA320      : .....CC...CG.....T.....A..G..... : 200
BA4013     : .....C-...CG.....T.....A..G..... : 200

*           220          *           240          *
E2348/69   : GATTACTTTTCTATCCAGAGCAGTAAACAAAAGTGGATGACTATTGCA : 250
EC292/84   : A.....A.A.....A.....G.G..A.T..... : 250
9100-83    : A.....A.A.....A.....G.G..A.T..... : 250
BA320      : A.....A.A.....A.....G.G..A.T..... : 250
BA4013     : A.....A.A.....A.....G.G..A.T..... : 250

           260          *           280          *           300
E2348/69   : TGAGTAATAATTTCGGCAATTAGTAAGGAGACTAAATGTCGCATTTTTTAAA : 300
EC292/84   : .....T...G.....A..C...A.C.A.....C..G : 300
9100-83    : .....T...G.....A.....A.C.A.....C..G : 300
BA320      : .....T...G.....A.C.A.....C..G : 300
BA4013     : .....T...G.....A..C...A.C.A.....C..G : 300

*           320          *           340          *
E2348/69   : GAGGTTGAAAGCGCGATACAACAGCCTCTCGATATGAACTGTGCACAATC : 350
EC292/84   : .CT.....A.G.....T.....A. : 350
9100-83    : .CT.....A.G.....T.....A. : 350
BA320      : .CT.....A.G.....T.....A. : 350
BA4013     : .CT.....A.G.....T.....A. : 350

           360          *           380          *           400
E2348/69   : ATCAATTAGTCACTTTTTGCAATCCAATAAATACTTTAATCAGAAAGTTG : 400
EC292/84   : G.....G.C..T..C..A..G.....A.A..... : 400
9100-83    : G.....G...T..C..A..G.....A.A..... : 400
BA320      : G.....G...T..C..A..G.....A.A..... : 400
BA4013     : G.....G.C..T..C..A..G.....C.....A.A..... : 400
```

continua

continuação

```

                *           420           *           440           *
E2348/69 : ATGAGCAGTGTGGTAAAGGAGTGGATCCCATTACACGTTTAACTCAA : 450
EC292/84 : .....C.....G.....A.....C.....C..G : 450
9100-83  : .....C.....G.....A.....C.....C..G : 450
BA320    : .....C.....G.....A.....C.....C..G : 450
BA4013   : .....C.....G.....A.....C.....C..G : 450

```

```

                460           *           480           *           500
E2348/69 : ACCAAATTGATAGAACAAGTCTCACGCGAAATCTTTGAACAGAATTTTAG : 500
EC292/84 : ....GGA.....AA.....A...G. : 500
9100-83  : ....GGA.....AA.....A...G. : 500
BA320    : ....GGA.....AA.....A...G. : 500
BA4013   : ....GGA.....AA.....A...G. : 500

```

```

                *           520           *
E2348/69 : CACCGCGAAAATCAGTGATATCAAGGCTCTAACT : 534
EC292/84 : TGGT.....G.T.....A..... : 534
9100-83  : T..TTT....G.T.....A..... : 534
BA320    : T....T....G.T.....A..... : 534
BA4013   : TGGTTT....G.T.....A..... : 534

```

continua

continuação

F) cest

```

                *           20           *           40           *
E2348/69 : GCGGAAAAAATTGGTGTGGATCTATTTCCCTTTAATGAAAATAGATTGTG : 50
EC292/84 : ..A.....-...A.....A.....C..... : 49
9100-83 : ..A.....A.....A.....C..... : 50
BA320 : ..A.....-...A.....A.....C..... : 49
BA4013 : ..A.....CA.....A..... : 50

```

```

                60           *           80           *           100
E2348/69 : TTCTTTTGCTATTGATGAAATTTATTATATTTTCGTTATCTGATGCCAATG : 100
EC292/84 : ..... : 99
9100-83 : ..... : 100
BA320 : ..... : 99
BA4013 : -. ....G.....T.... : 99

```

```

                *           120           *           140           *
E2348/69 : ACGAATATATGATGATTTATGGCGTCTGTGGAAAATTCGGACAGATAAC : 150
EC292/84 : .....T.....G..... : 149
9100-83 : .....T.....G..... : 150
BA320 : .....C.....T.....G..... : 149
BA4013 : .....C.....G.....T : 149

```

```

                160           *           180           *           200
E2348/69 : CTAACTTCGCTCTTGAGATTTTGAATGCAAACCTTATGGTTTGAGAGAAT : 200
EC292/84 : ..... : 199
9100-83 : ..... : 200
BA320 : ..... : 199
BA4013 : ..... : 199

```

```

                *           220           *           240           *
E2348/69 : GGTGGGCCATACCTGTGTATGAGTCAGGAGCACAATCGCTGTTGTTAGCG : 250
EC292/84 : .....T.....C.....G.T..... : 249
9100-83 : .....T.....C.....G.T..... : 250
BA320 : .....T.....C.....G.T..... : 249
BA4013 : .....A.....A..... : 249

```

```

                260           *           280           *           300
E2348/69 : TTACGTTTCCCGCTCGATGATGCTACCCCTGAAAAACTTGAGAATGAAAT : 300
EC292/84 : .....T..... : 299
9100-83 : .....T..... : 300
BA320 : .....C..... : 299
BA4013 : .....T.....A..... : 299

```

```

                *           320           *           340           *
E2348/69 : AGAAGTCGTCGTTAAGTCGATGGAAAATCTGTATTTGGTATTACATAATC : 350
EC292/84 : .....T.....A..... : 349
9100-83 : .....T.....A..... : 350
BA320 : .....T.....A.....C..... : 349
BA4013 : .....A.....C..... : 349

```

```

                360           *           380           *           400
E2348/69 : AGGG-AATAACATTAGAAAACGAACATATGAAAATAGAGGAAATTAGCTC : 399
EC292/84 : ...G.....C..T.. : 399
9100-83 : .....C..T.. : 399
BA320 : ...G.....C..T.. : 399
BA4013 : ...G.....T.. : 399

```

```

                *           420
E2348/69 : AAGCGATAATAAACATTATTA : 420
EC292/84 : .....C..... : 420
9100-83 : .....C..... : 420
BA320 : .....C..... : 420
BA4013 : ..... : 420

```

continua

continuação

G) espA

| | | | | | | | |
|----------|---|--|----|----|----|---|--|
| | | * | 20 | * | 40 | * | |
| E2348/69 | : | ATGGATCATCACTACACATCAGTTGCTAGTGCGAATGCGAGTACTTCGAC | : | 50 | | | |
| EC292/84 | : | | : | 50 | | | |
| 9100-83 | : | C.....AC..... | : | 50 | | | |
| BA320 | : | C.....AC.....G..... | : | 50 | | | |
| BA4013 | : | C.....G.....C..... | : | 50 | | | |

| | | | | | | | |
|----------|---|--|---|-----|---|-----|--|
| | | 60 | * | 80 | * | 100 | |
| E2348/69 | : | ATCAATGCCTATGATTTAGGGAGCATGTCGAAAGATGACGTTATTGATCT | : | 100 | | | |
| EC292/84 | : | | : | 100 | | | |
| 9100-83 | : | | : | 100 | | | |
| BA320 | : | ...G...T.....C...T.....A..A..... | : | 100 | | | |
| BA4013 | : | ...G.A.T.....C.....C..T.....C..A..AG..C.G.. | : | 100 | | | |

| | | | | | | | |
|----------|---|--|-----|-----|-----|---|--|
| | | * | 120 | * | 140 | * | |
| E2348/69 | : | ATTTAATAAACTCGGTGTTTTTCAGGCTGCAATTCTCATGTTTGCCTATA | : | 150 | | | |
| EC292/84 | : | | : | 150 | | | |
| 9100-83 | : | | : | 150 | | | |
| BA320 | : |GC..... | : | 150 | | | |
| BA4013 | : |G.....GC..... | : | 150 | | | |

| | | | | | | | |
|----------|---|--|---|-----|---|-----|--|
| | | 160 | * | 180 | * | 200 | |
| E2348/69 | : | TGTATCAGGCACAAAGCGATCTGTCGATTGCAAAGTTTGCTGATATGAAT | : | 200 | | | |
| EC292/84 | : | | : | 200 | | | |
| 9100-83 | : | | : | 200 | | | |
| BA320 | : | | : | 200 | | | |
| BA4013 | : | | : | 200 | | | |

| | | | | | | | |
|----------|---|--|-----|-----|-----|---|--|
| | | * | 220 | * | 240 | * | |
| E2348/69 | : | GAGGCATCTAAGGAGTCAACCACTGCCCAAAAAATGGCTAATCTTGTAGA | : | 250 | | | |
| EC292/84 | : | | : | 250 | | | |
| 9100-83 | : | | : | 250 | | | |
| BA320 | : |A.....G.. | : | 250 | | | |
| BA4013 | : |A.....G.. | : | 250 | | | |

| | | | | | | | |
|----------|---|--|---|-----|---|-----|--|
| | | 260 | * | 280 | * | 300 | |
| E2348/69 | : | TGCTAAAAATTGCTGACGTTTCAGAGTAGCTCTGACAAGAATGCGAAAGCTC | : | 300 | | | |
| EC292/84 | : | | : | 300 | | | |
| 9100-83 | : | | : | 300 | | | |
| BA320 | : |T.....T.....AA.....CA | : | 300 | | | |
| BA4013 | : |T.....AA..... | : | 300 | | | |

| | | | | | | | |
|----------|---|---|-----|-----|-----|---|--|
| | | * | 320 | * | 340 | * | |
| E2348/69 | : | AACTTCCTGATGAAGTGATTTTCATATATAAATGATCCTCGCAATGACATT | : | 350 | | | |
| EC292/84 | : | | : | 350 | | | |
| 9100-83 | : | | : | 350 | | | |
| BA320 | : |AC..... | : | 350 | | | |
| BA4013 | : |C.A.....GAC..... | : | 350 | | | |

| | | | | | | | |
|----------|---|--|---|-----|---|-----|--|
| | | 360 | * | 380 | * | 400 | |
| E2348/69 | : | ACAATAAGTGGTATTGACAATATAAATGCTCAATTAGGCGCTGGTGATTT | : | 400 | | | |
| EC292/84 | : | | : | 400 | | | |
| 9100-83 | : | | : | 400 | | | |
| BA320 | : | ...G.....AG.....G..... | : | 400 | | | |
| BA4013 | : | ...G.....AG.G..C.....G..... | : | 400 | | | |

continua

conclusão

| | | | | | | |
|----------|---|---|-----|-----|-----|-----|
| | * | 420 | * | 440 | * | |
| E2348/69 | : | GCAAACGGTGAAAGCAGCTATTTTCAGCTAAAGCGAATAATTTGACAACGA | : | 450 | | |
| EC292/84 | : | | : | 450 | | |
| 9100-83 | : | | : | 450 | | |
| BA320 | : |G..C.....G.....C.....C.... | : | 450 | | |
| BA4013 | : |G..C.....G..C...T.....C.....C...G | : | 450 | | |
| | | | | | | |
| | | 460 | * | 480 | * | 500 |
| E2348/69 | : | CGGTCAATAATAGCCAGCTTGAAATACAGCAAATGTCAAATACGTTAAAC | : | 500 | | |
| EC292/84 | : | | : | 500 | | |
| 9100-83 | : | | : | 500 | | |
| BA320 | : | TA.. | : | 500 | | |
| BA4013 | : | TA..G..... | : | 500 | | |
| | | | | | | |
| | | * | 520 | * | 540 | * |
| E2348/69 | : | CTATTAACGAGTGCACGTTCTGATATGCAGTCACTGCAATATAGAACTAT | : | 550 | | |
| EC292/84 | : | | : | 550 | | |
| 9100-83 | : | | : | 550 | | |
| BA320 | : |T.....C..... | : | 550 | | |
| BA4013 | : | | : | 550 | | |
| | | | | | | |
| | | 560 | * | | | |
| E2348/69 | : | TTCAGGAATATCCCTTGGTAAATAA | : | 575 | | |
| EC292/84 | : | | : | 575 | | |
| 9100-83 | : | | : | 575 | | |
| BA320 | : |C..... | : | 575 | | |
| BA4013 | : |C..... | : | 575 | | |

Figura 12- Alinhamento das sequências de nucleotídeos, total ou parcial, de 7 genes da região LEE. **A:** *ler*; **B:** *sepZ*; **C:** *escV*; **D:** *eae*; **E:** *map*; **F:** *cest* e **G:** *espA* das amostras EC292/64, 9100/83, BA320 e BA4013 com a sequências dos respectivos genes da amostra de tEPEC E2348/69.

Todas as sequências obtidas foram comparadas com as sequências listadas no *EMBL/GenBank* utilizando o programa *Blastn*. A similaridade entre as sequências e os respectivos genes das amostras de tEPEC E2348/69 (O127:H6) e de EHEC Sakai (O157:H7) foi verificada e está apresentada na tabela 8. Todos os genes apresentaram alta similaridade com as amostras E2348/69 e Sakai.

Tabela 8- Similaridade em porcentagem das sequências dos genes das amostras deste estudo, em comparação com as sequências dos respectivos genes das amostras de tEPEC E2348/69 e de EHEC Sakai

| Amostras | Genes (N° de pares de bases depositadas no <i>Blastn</i>) | | | | | | |
|----------|--|-------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|
| | <i>ler</i> (315) | <i>sepZ</i> (271) | <i>escV</i> (691) | <i>eae</i> (441) | <i>espA</i> (575) | <i>map</i> (535) | <i>cest</i> (422) |
| E2348/69 | 94-99% | 98-100% | 96-100% | 96-98% | 90-99% | 84% | 94-95% |
| Sakai | 94-99% | 84% | 96-99% | 94-97% | 84-87% | 83% | 94-99% |

A porção conservada das sequências de nucleotídeos dos sete genes da região LEE sequenciados, foram utilizadas para a análise da relação genética das amostras deste estudo. A figura 13 mostra o esquema do supergene construído para cada amostra, onde houve uma variação de tamanho entre 3.241 e 3.251 nucleotídeos. O alinhamento múltiplo dos supergenes foi utilizado para a construção de uma árvore filogenética.



Figura 13- Esquema do supergene construído através da união da sequência dos genes *ler*, *sepZ*, *escV*, *map*, *cest*, *eae* e *espA*.

A árvore filogenética apresentada na figura 14 mostra três grupos divergentes: o grupo I contém a EHEC (amostra Sakai), o grupo II contém a tEPEC (amostra E2348/69) e o grupo III somente as quatro aEPEC deste estudo. Todos os grupos apresentam valores de *bootstrap* acima de 80%.

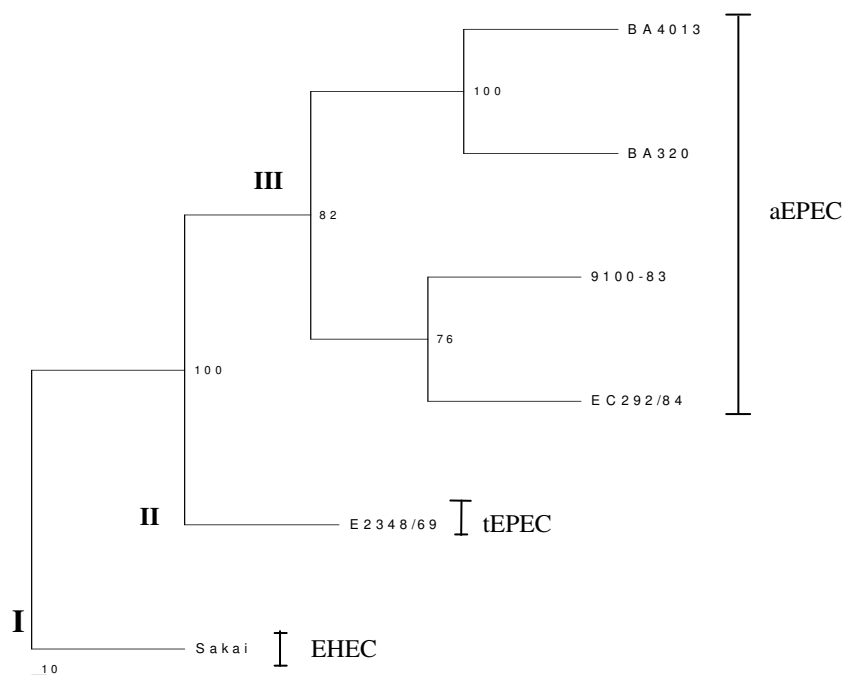


Figura 14- Árvore filogenética das quatro amostras de aEPEC, tEPEC (E2348/69) e EHEC (Sakai) baseada nos genes *ler*, *sepZ*, *escV*, *map*, *cest*, *eae*, e *espA*. Filograma construído utilizando o método de máxima parcimônia baseado em 1000 réplicas de *bootstrap*.

4.7 Detecção da transcrição dos genes da região LEE através de *microarray* de cDNA

Com intuito de analisar a transcrição dos genes de LEE, os cDNAs das aEPEC deste estudo, obtidos após crescimento das amostras em DMEM, foram hibridizados em *chips* de *microarray* contendo o genoma completo de quatro amostras de *E. coli*.

Os resultados da transcrição dos genes da região LEE, quando comparados com a amostra BA320, estão apresentados na tabela 9. Embora os *chips* utilizados apresentassem o genoma completo de 4 *E. coli* (item 3.6), somente os 31 genes da região LEE foram analisados neste estudo. Após a hibridização dos *chips*, verificou-se que os melhores sinais de fluorescência ocorreram com os genes de LEE do

patovar EHEC EDL933. Desta forma, os resultados apresentados na tabela 9 referem-se aos dados da hibridização com esse patovar.

Conforme se observa na tabela 9, as amostras Ec292/84 e BA4013 apresentaram todos os 31 genes da região LEE com transcrição reduzida em relação aos mesmos genes da amostra BA320. Já a amostra 9100/83 apresentou a transcrição da maioria dos genes de LEE reduzidos; os genes *sepZ*, *cesF*, *map*, *tir*, *cest*, *eae*, *espA*, *espD*, *espB*, apresentaram transcrição não modificada e a transcrição do gene *espF* foi aumentada em relação a BA320.

Tabela 9- Níveis de transcrição dos genes da região LEE das aEPEC Ec292/84, 9100/83 e BA4013 em comparação com a expressão dos mesmos genes da aEPEC BA320

| Gene | Amostra | | | Patovar ^a |
|--------------|----------|---------|--------|----------------------|
| | Ec292/84 | 9100/83 | BA4013 | |
| <i>espG</i> | R | R | R | EDL933 |
| <i>ler</i> | R | R | R | EDL933 |
| <i>cesAB</i> | R | R | R | EDL933 |
| <i>escR</i> | R | R | R | EDL933 |
| <i>escS</i> | R | R | R | EDL933 |
| <i>escT</i> | R | R | R | EDL933 |
| <i>escU</i> | R | R | R | EDL933 |
| <i>grlR</i> | R | R | R | EDL933 |
| <i>grlA</i> | R | R | R | EDL933 |
| <i>cesD</i> | R | R | R | EDL933 |
| <i>escC</i> | R | R | R | EDL933 |
| <i>sepD</i> | R | R | R | EDL933 |
| <i>escJ</i> | R | R | R | EDL933 |
| <i>sepZ</i> | R | NM | R | EDL933 |
| <i>escV</i> | R | R | R | EDL933 |
| <i>escN</i> | R | R | R | EDL933 |
| <i>sepQ</i> | R | R | R | EDL933 |
| <i>espH</i> | R | R | R | EDL933 |
| <i>cesF</i> | R | NM | R | EDL933 |
| <i>map</i> | R | NM | R | EDL933 |
| <i>tir</i> | R | NM | R | EDL933 |
| <i>cesT</i> | R | NM | R | EDL933 |
| <i>eae</i> | R | NM | R | EDL933 |

continua

conclusão

| | | | | |
|--------------|---|----|---|--------|
| <i>escD</i> | R | R | R | EDL933 |
| <i>sepL</i> | R | R | R | EDL933 |
| <i>espA</i> | R | NM | R | EDL933 |
| <i>espD</i> | R | NM | R | EDL933 |
| <i>espB</i> | R | NM | R | EDL933 |
| <i>cesD2</i> | R | R | R | EDL933 |
| <i>escF</i> | R | R | R | EDL933 |
| <i>espF</i> | R | A | R | EDL933 |

^a Patovar: *E. coli* EHEC EDL933.

R: transcrição reduzida; A: transcrição aumentada; NM: transcrição não modificada.

4.8 Quantificação da transcrição dos *operons* de LEE através da PCR em tempo real

Através da PCR em tempo real foi realizada a quantificação da transcrição dos cinco *operons* da região LEE. Foram utilizadas duas condições de cultivo bacteriano: na presença e ausência das células HeLa. Em ambas as situações foram utilizadas duas amostras de EPEC como referência na comparação, a BA320 (aEPEC) e a E2348/69 (tEPEC), em experimentos independentes.

Conforme mostrado na figura 15, os níveis de transcrição de LEE1 foram medidos através da quantificação da transcrição do gene *ler*. Tanto comparando com a BA320 como com a E2348/69, as amostras apresentaram níveis de transcrição de *ler* muito baixos em DMEM (Figura 15A e 15C) e na presença de células HeLa (Figuras 15B e 15D), exceto a BA320 comparada com E2348/69. Os resultados demonstram aumento significativo na transcrição de LEE1 na presença das células HeLa quando comparado com DMEM, sendo esse aumento de em torno de 1×10^2 vezes para a EC292/84 (em ambas as situações de comparação); 10 vezes para a 9100/83 (em ambas as situações de comparação). Por outro lado, houve diminuição em torno de 1×10^4 vezes para a BA320 em comparação com a E2348/69.

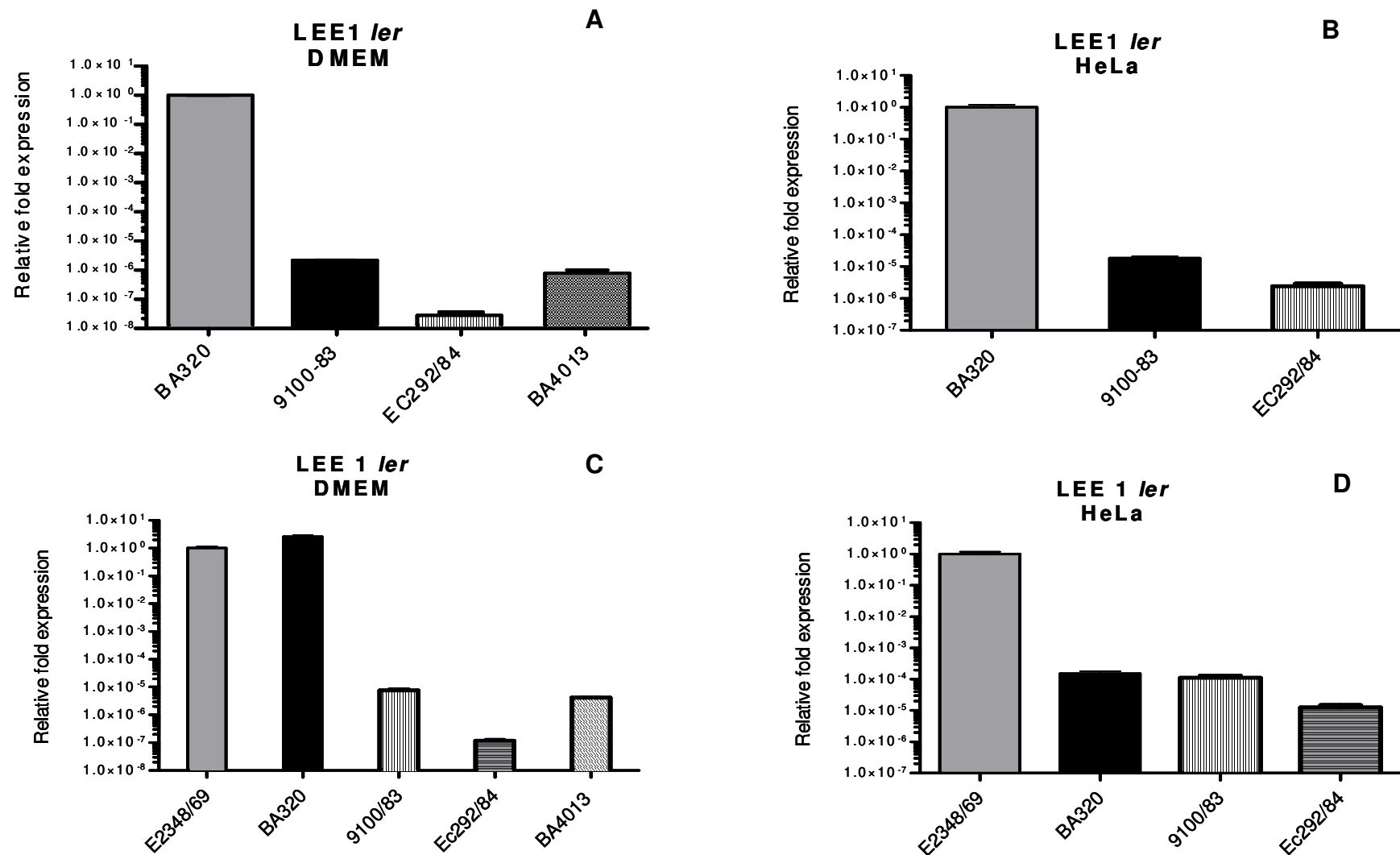


Figura 15- Análises da transcrição do operon LEE1 das amostras de aEPEC deste estudo, detectadas através da transcrição do gene *ler* em ensaios da PCR em tempo real. Os níveis de expressão correspondem a valores arbitrários em relação aos níveis de transcrição do gene *ler* da amostra de aEPEC BA320 (A e B) e tEPEC E2348/69 (C e D) **A:** Amostras cultivadas em DMEM. **B:** Amostras cultivadas na presença de células HeLa. **C:** Amostras cultivadas em DMEM. **D:** Amostras cultivadas na presença de células HeLa. Os valores foram significativos para $p < 0.05$.

Na figura 16 observa-se o nível de transcrição de LEE2, através da quantificação da transcrição do gene *escC*. Em comparação com a BA320, observa-se que os níveis transcripcionais de *escC* das amostras Ec292/84, 9100/83 e BA4013 foram muito baixos tanto na ausência (Figura 16A) quanto na presença das células HeLa (Figura 16B), sendo que no segundo caso o nível de transcrição foi maior que no primeiro, cerca de 1×10^2 vezes para a Ec292/84, e cerca de 5 vezes menor para a 9100/83. Já na comparação com a E2348/69, observa-se que os níveis de transcrição de *escC* das amostras Ec292/84 e BA4013 foram muito baixos, tanto na ausência (Figura 16C) quanto na presença das células HeLa (Figura 16D), sendo que na presença das células eucarióticas os níveis de transcrições foram maiores (1×10^2 vezes Ec292/84). Já as outras duas amostras, BA320 e 9100/83, apresentaram altos níveis de transcrições em ambas as situações.

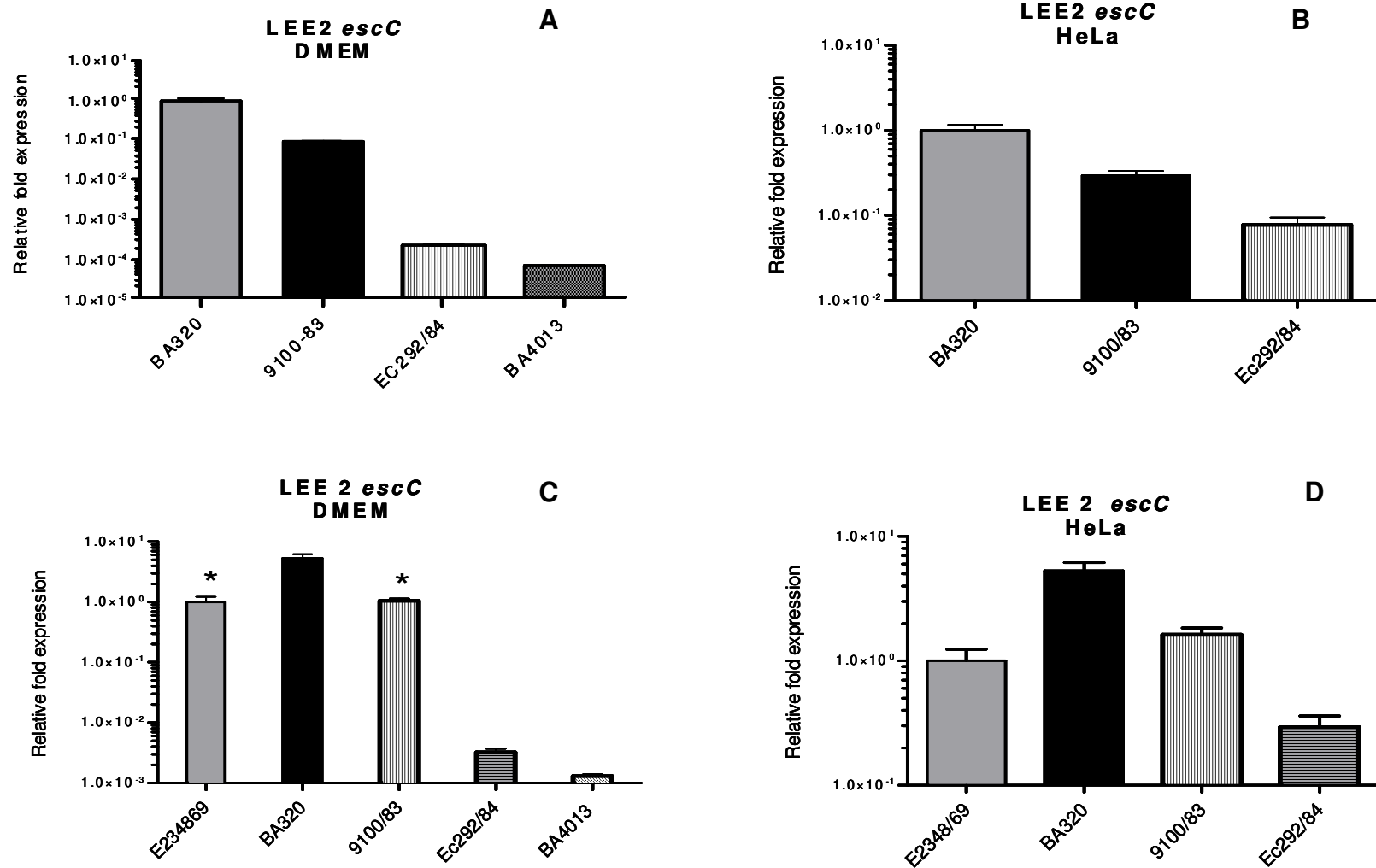


Figura 16- Análises da transcrição do operon LEE2 das amostras de aEPEC deste estudo, detectadas através da transcrição do gene *escC* em ensaios da PCR em tempo real. Os níveis de expressão correspondem a valores arbitrários em relação aos níveis de transcrição do gene *ler* da amostra de aEPEC BA320 (A e B) e tEPEC E2348/69 (C e D) **A:** Amostras cultivadas em DMEM. **B:** Amostras cultivadas na presença de células HeLa. **C:** Amostras cultivadas em DMEM. **D:** Amostras cultivadas na presença de células HeLa. Os valores foram significativos para $p < 0.05$ e não significativo para $*p: 0,9924$.

Conforme mostrado na figura 17, os níveis de transcrição de LEE3 foram medidos através da quantificação da transcrição do gene *escV*. Na comparação com a BA320, tanto na ausência (Figura 17A) quanto na presença das células HeLa (Figura 17B), os níveis de transcrições das amostras 9100/83, Ec292/84 e BA4013 foram muito baixos. Na comparação com a E2348/69, no cultivo somente em DMEM (Figura 17C) os níveis de transcrições das amostras 9100/83, Ec292/84 e BA4013 foram muito baixos, sendo a BA320 a única a apresentar nível alto de transcrição. Já na presença das células HeLa (Figura 17D), todas as três amostras aderentes apresentaram altos níveis de transcrições de *escV*, sendo que a amostra Ec292/84 apresentou níveis similares ao da E2348/69 ($p= 0,2354$). Em ambas as situações, na comparação com a BA320 e E2348/69, a amostra Ec292/84 apresentou nível de transcrição maior na presença de células HeLa em relação à ausência destas, aumento de em torno de 10 vezes (comparação BA320) e 1×10^2 vezes (comparação com E2348/69); já a amostra 9100/83 apresentou níveis semelhantes (comparação com BA320) e aumento de 10 vezes (comparação com E2348/69); a BA320 aumento em torno de 10 vezes (comparação com E2348/69).

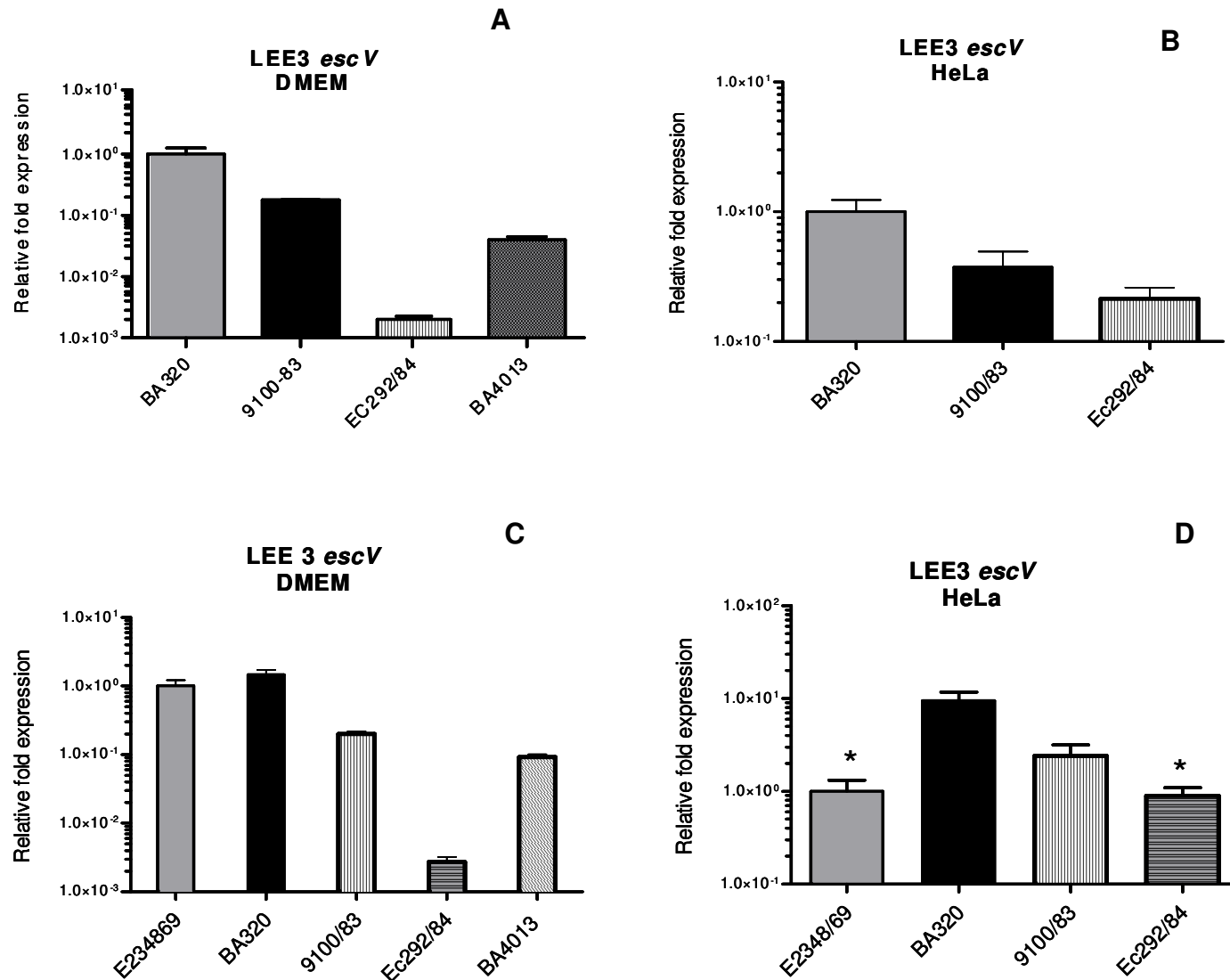


Figura 17- Análises da transcrição do operon LEE3 das amostras de aEPEC deste estudo, detectadas através da transcrição do gene *escV* em ensaios da PCR em tempo real. Os níveis de expressão correspondem a valores arbitrários em relação aos níveis de transcrição do gene *ler* da amostra de aEPEC BA320 (A e B) e tEPEC E2348/69 (C e D) **A:** Amostras cultivadas em DMEM. **B:** Amostras cultivadas na presença de células HeLa. **C:** Amostras cultivadas em DMEM. **D:** Amostras cultivadas na presença de células HeLa. Os valores foram significativos para $p < 0.05$ e não significativo para $*p: 0,2354$.

Observa-se na figura 18, os níveis de transcrições de LEE4 através da quantificação da transcrição do gene *espA*. Na comparação com a BA320, a amostra Ec292/84 apresentou níveis baixos de transcrição, tanto na ausência (Figura 18A) quanto na presença das células HeLa (Figura 18B), sendo o valor do nível de transcrição 10 vezes menor na presença das células HeLa em relação a ausência destas. A BA4013 também apresentou nível baixo de transcrição na ausência de células. Já a amostra 9100/83 apresentou nível de transcrição de *espA* maior que a BA320 na ausência de células HeLa (Figura 18A) e nível de transcrição menor na presença das células (Figura 18B), tendo uma redução de 1×10^2 vezes na presença das células eucarióticas quando comparado com a ausência destas. Na comparação com a E2348/69, as amostras Ec292/84 e BA4013 apresentaram níveis próximos aos da E2348/69 no cultivo em DMEM (Figura 18C), já na presença das células HeLa a amostra Ec292/84 apresentou baixo nível de transcrição, tendo uma redução de 10 vezes na presença das células eucarióticas quando comparado com a ausência destas. As amostras BA320 e 9100/83 apresentaram altíssimos níveis de transcrição, tanto na ausência (Figura 18C) quanto na presença (Figura 18D) das células eucarióticas, tendo a 9100/83 uma redução de 1×10^2 vezes na presença das células eucarióticas quando comparado com a ausência destas, já a amostra BA320 apresentou níveis semelhantes de transcrição em ambas situações.

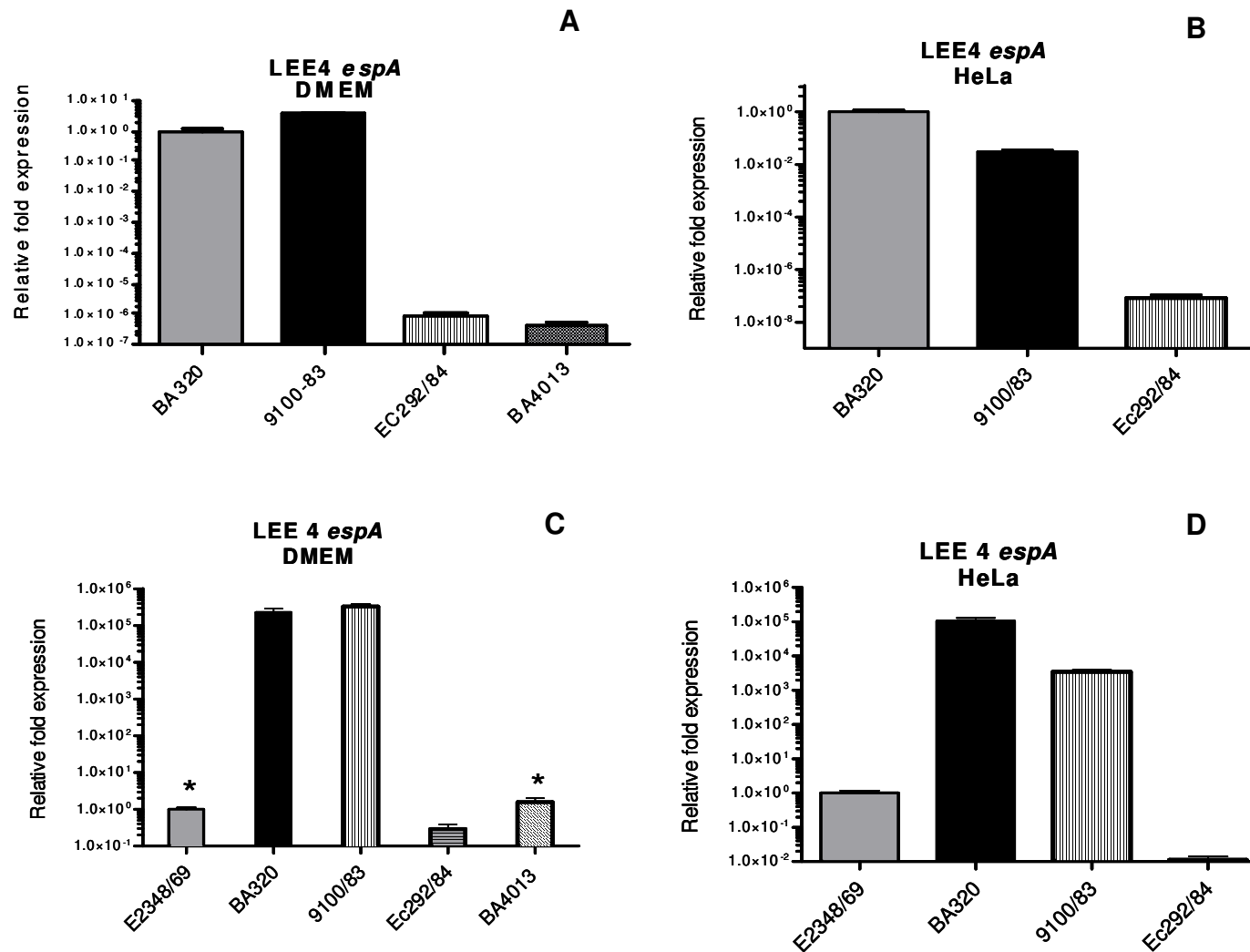


Figura 18- Análises da transcrição do operon LEE4 das amostras de aEPEC deste estudo, detectadas através da transcrição do gene *espA* em ensaios da PCR em tempo real. Os níveis de expressão correspondem a valores arbitrários em relação aos níveis de transcrição do gene *ler* da amostra de aEPEC BA320 (A e B) e tEPEC E2348/69 (C e D) **A:** Amostras cultivadas em DMEM. **B:** Amostras cultivadas na presença de células HeLa. **C:** Amostras cultivadas em DMEM. **D:** Amostras cultivadas na presença de células HeLa. Os valores foram significativos para $p < 0.05$ e não significativo para * $p: 0,0730$.

Na figura 19 observam-se os níveis de transcrição de LEE5 através da quantificação da transcrição do gene *eae*. Tanto na ausência quanto na presença das células HeLa (Figura 19A e 19B) todas as amostras apresentaram níveis de transcrição menores que a BA320. Na presença das células eucarióticas a EC292/84 apresentou transcrição maior em relação à ausência destas células (cerca de 1×10^2 vezes), já a cepa 9100/83 apresentou níveis semelhantes. Em comparação com a E2348/69 na ausência das células HeLa (Figura 19C), somente a amostra Ec292/84 apresentou nível muito baixo de transcrição. Já na presença das células (Figura 19D) apresentou nível de transcrição superior ao da E2348/69. Na presença das células HeLa a amostra Ec292/84 apresentou elevados níveis de transcrição de *eae*, em relação à ausência destas células (cerca de 1×10^2 vezes), já a cepa 9100/83 apresentou aumento de 5 vezes e a BA320 níveis semelhantes.

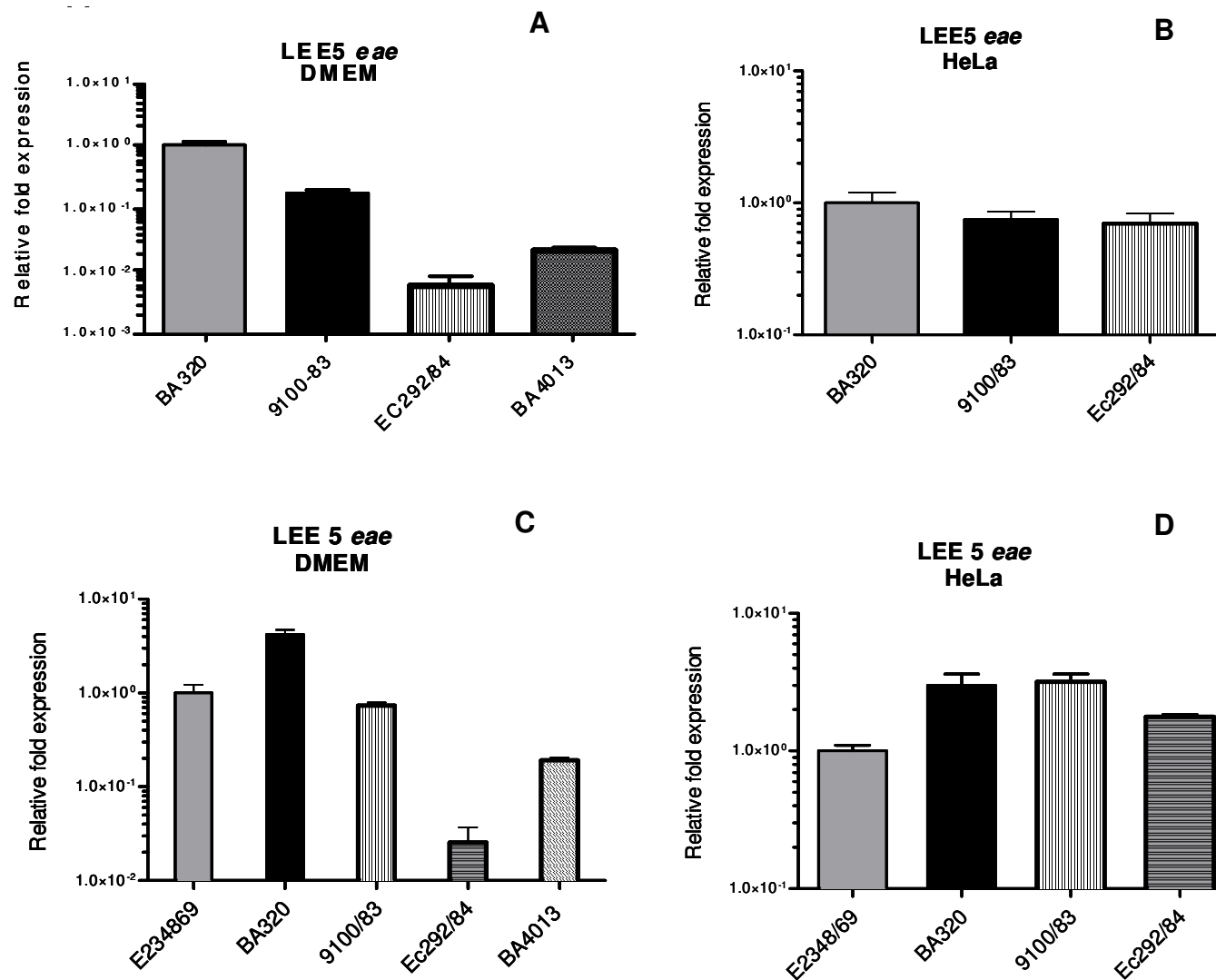


Figura 19- Análises da transcrição do operon LEE5 das amostras de aEPEC deste estudo, detectadas através da transcrição do gene *eae* em ensaios da PCR em tempo real. Os níveis de expressão correspondem a valores arbitrários em relação aos níveis de transcrição do gene *ler* da amostra de aEPEC BA320 (A e B) e tEPEC E2348/69 (C e D) **A:** Amostras cultivadas em DMEM. **B:** Amostras cultivadas na presença de células HeLa. **C:** Amostras cultivadas em DMEM. **D:** Amostras cultivadas na presença de células HeLa. Os valores foram significativos para $p < 0.05$.

4.9 Expressão das proteínas EspA, EspB, EspD, intimina e Tir através de *immunoblotting*

Na figura 20 pode-se observar a expressão das proteínas EspA, EspB, EspD, Intimina e Tir. Todas as aEPEC expressaram as proteínas pesquisadas em diferentes níveis, destacando-se a baixa intensidade da banda de Tir e EspA da amostra Ec292/84.

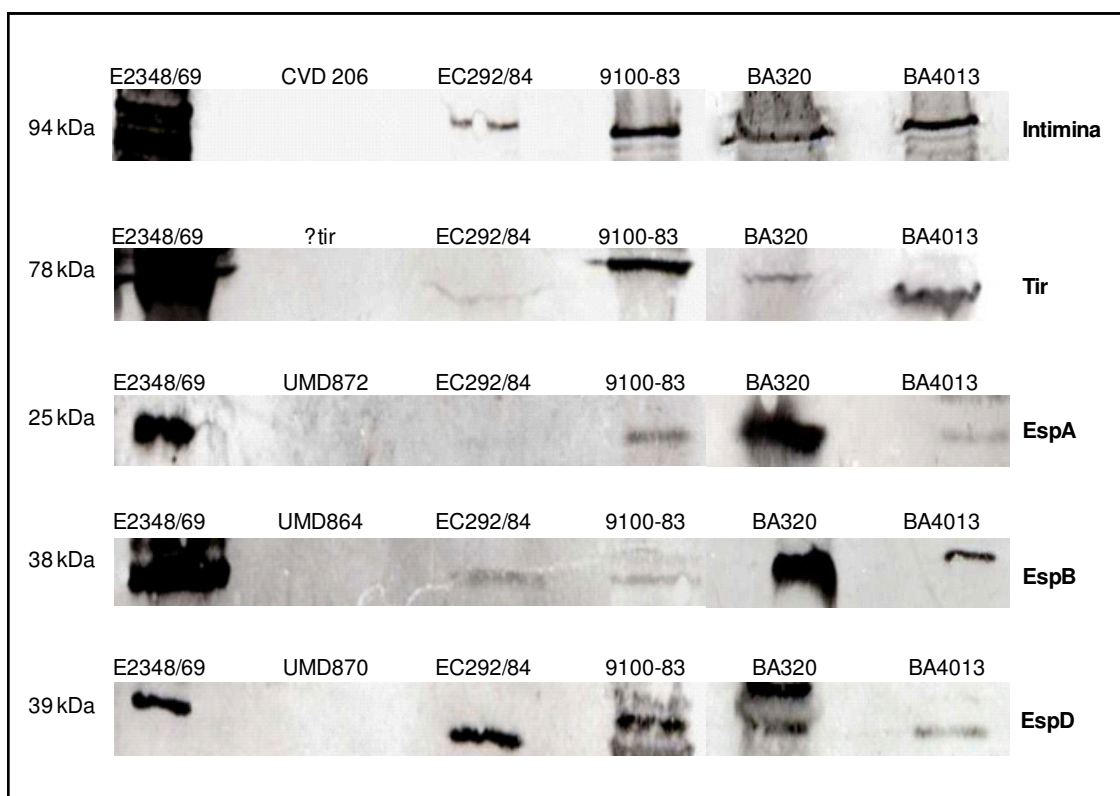


Figura 20- *Immunoblotting* para detecção das proteínas intimina, Tir, EspA, EspB e EspD, das amostras: EC292/84, 9100/83, BA320, BA4013 e E2348/69 (controle positivo). CVD206, Δtir , UMD872, UMD864 e UMD870 (controles negativos). Os extratos protéicos foram separados em gel de poliacrilamida na concentração de 12% (EspA, EspB e EspD) ou 10% (Intimina e Tir) e transferidos para membrana de PVDF (EspA, EspB e EspD) ou de nitrocelulose (Intimina e Tir). A imunodeteção foi realizada com os respectivos antissoros na concentração de 1:100. O anticorpo secundário anti-imunoglobulina de coelho produzida em cabra conjugada à peroxidase foi usado na concentração de 1:5000. A revelação foi realizada com 3,3-diaminobenzidina e peróxido de hidrogênio.

4.10 Análise fenotípica das amostras de aEPEC, contendo *espFu/tccP* in trans

As amostras Ec292/84(pKC471), 9100/83(pKC471), BA320(pKC471) e BA4013(pKC471) foram submetidas aos testes de adesão (Figura 21) e FAS (Figura 22), em contato com as células HeLa durante 6h.

Nos testes de adesão as amostras BA320(pKC471), EC292/84(pKC471) e 9100/83(pKC471) mantiveram os mesmos padrões de adesão das amostras selvagens, ou seja, ALL (Figura 21A), AA (Figura 21B) e AD (Figura 21C), respectivamente. Já a amostra BA4013(pKC471) apresentou a capacidade de aderir, expressando o padrão ALL (Figura 21D).

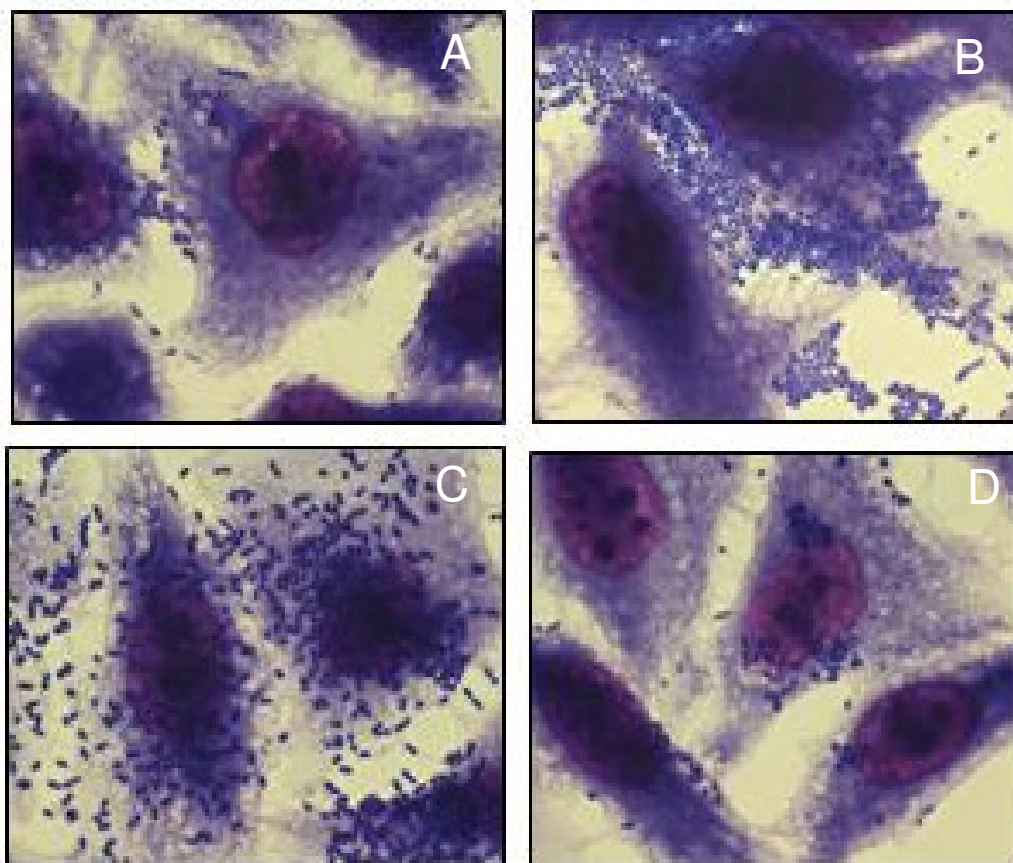


Figura 21- Padrões de interação das amostras de aEPEC deste estudo transformadas com o plasmídeo pKC471, em ensaios de 6h com células HeLa. As células foram fixadas com metanol, coradas com solução de MayGrünwald/Giemsa e visualizadas através de microscopia óptica sob aumento 1000x. **A:** amostra BA320(pKC471)-padrão Localizado-like; **B:** amostra Ec292/84(pKC471)-padrão agregativo; **C:** amostra 9100/83(pKC471)-padrão difuso, **D:** amostra BA4013(pKC471)-padrão localizado-like.

Observa-se na figura 22 os resultados dos testes de FAS dessas mesmas amostras de aEPEC contendo o plasmídeo que expressa EspFu. As amostras BA320(pKC471) (Figura 22A), 9100/83(pKC471) (Figura 22C), e BA4013(pKC471) (Figura 22D) foram positivas para o acúmulo de actina no local da adesão. A amostra Ec292/84(pKC471), foi negativa no teste de FAS (Figura 22B).

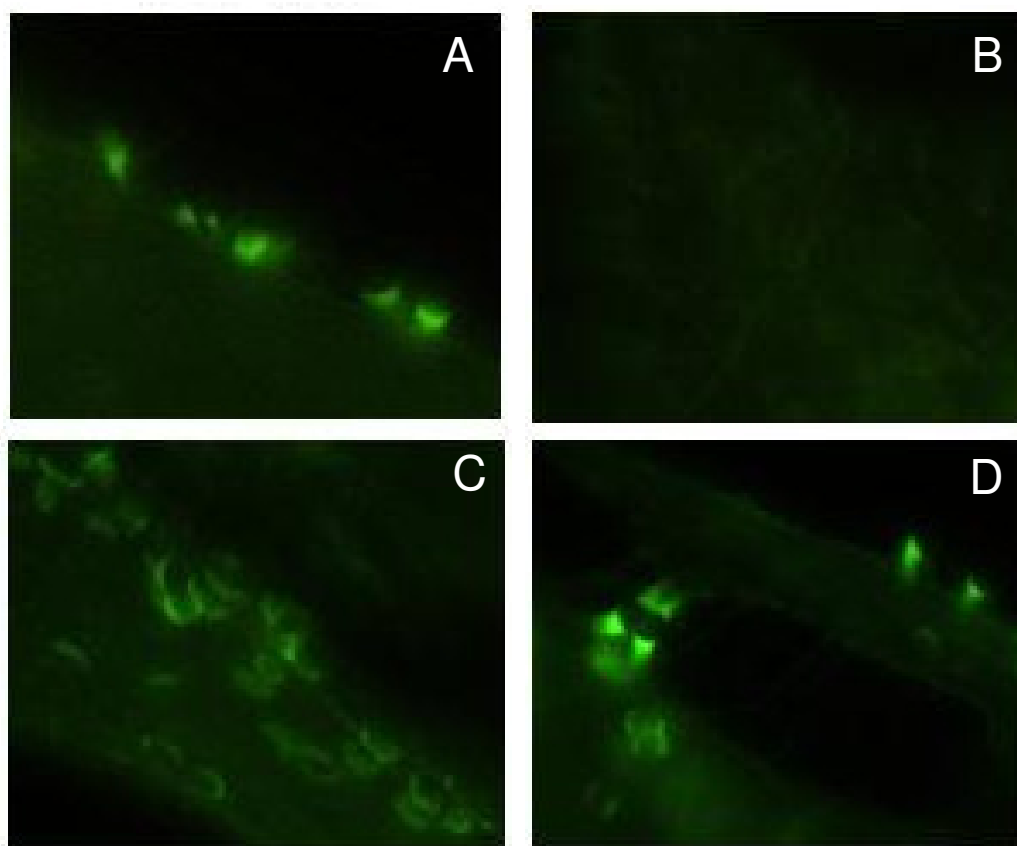


Figura 22- Teste de FAS com células HeLa (6h de interação) das amostras de aEPEC deste estudo transformadas com o plasmídeo pKC471. As células foram coradas com isotiocianato de faloidina e iodeto de propídio e visualizadas através de microscopia de fluorescência sob aumento de 1000x. **A:** amostra BA320; **B:** amostra EC292/84; **C:** amostra 9100/83, **D:** amostra BA4013. Aumento 1000 vezes.

Conforme mostrado na figura 23, todas as quatro amostras transformadas com o plasmídeo pKC471 foram negativas no teste de fosforilação de Tir em cultura de células HeLa.

Na tabela 10 estão mostrados os resultados dos testes de adesão e FAS das amostras de aEPEC transformadas com o plasmídeo pKC471, bem como as respectivas amostras selvagens para fins comparativos.

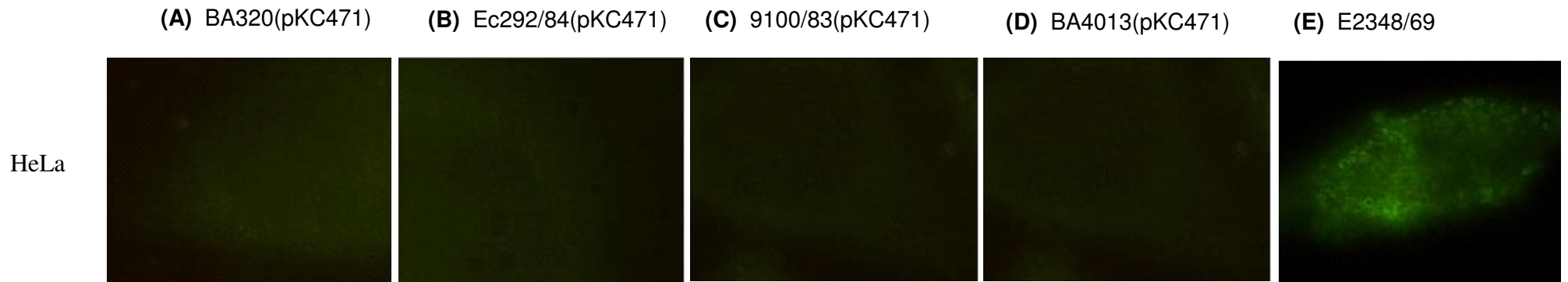


Figura 23- Teste de fosforilação da proteína Tir das amostras de aEPEC deste estudo com células HeLa e HEp-2, após 6h de interação. As células foram coradas com isotiocianato de fluoresceína e visualizadas através de microscopia de fluorescência sob aumento de 1000x. **(A)**: amostra BA320(pKC471); **(B)**: amostra EC292/84(pKC471); **(C)**: amostra 9100/83(pKC471); **(D)**: amostra BA4013(pKC471) e **(E)**: amostra protótipo de tEPEC E2348/69 (controle positivo).

Tabela 10- Resultados dos ensaios de adesão, FAS e de detecção da fosforilação de Tir das amostras de aEPEC deste estudo (selvagens e transferidas com o plasmídeo pKC471) em diferentes linhagens celulares *in vitro*, após 6h de contato células-bactérias

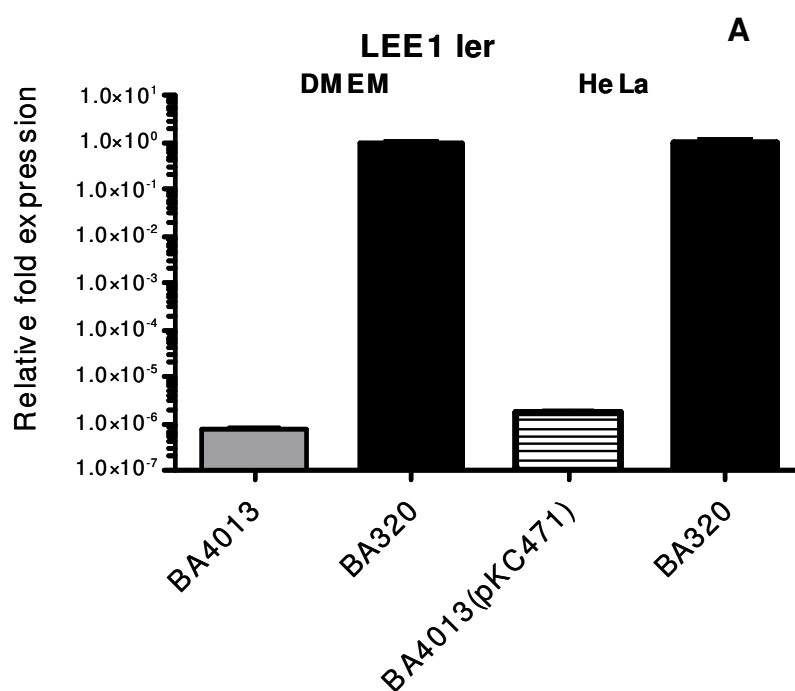
| Amostras | Linhagens celulares | | | | | | | | | | | |
|---------------------------|---------------------|-----------|------------------|---------------|-----------|------------------|---------------|-----------|---------------|-----------|---------------|-----------|
| | HeLa | | | HEp-2 | | | Caco-2 | | T84 | | HT29 | |
| | Padrão Adesão | Teste FAS | Tir ^a | Padrão Adesão | Teste FAS | Tir ^a | Padrão Adesão | Teste FAS | Padrão Adesão | Teste FAS | Padrão Adesão | Teste FAS |
| <i>Amostras aEPEC</i> | | | | | | | | | | | | |
| BA320 | ALL | + | - | ALL | + | - | ALL | - | ALL | - | ALL | + |
| BA320(pKC471) | ALL | + | - | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| Ec292/84 | AA | - | - | AA | - | - | AA | - | AA | - | AA | - |
| Ec292/84(pKC471) | AA | - | - | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| 9100/83 | AD | + | - | AD | - | - | AD | - | AD | - | AD | - |
| 9100/83(pKC471) | AD | + | - | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| BA4013 | NA | - | - | NA | - | - | NA | - | NA | - | NA | - |
| BA4013(pKC471) | ALL | + | - | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| <i>Amostras Controles</i> | | | | | | | | | | | | |
| E2348/69 | AL | + | + | AL | + | + | AL | + | AL | + | AL | + |
| DH5α | NA | - | - | NA | - | - | NA | - | NA | - | NA | - |

AA, adesão agregativa; AD, adesão difusa; AL, adesão localizada; ALL, adesão localizada-like; NA, não aderente; NT, não testada.

^aEnsaio de detecção da fosforilação de tirosina da proteína Tir, através de imunofluorescência.

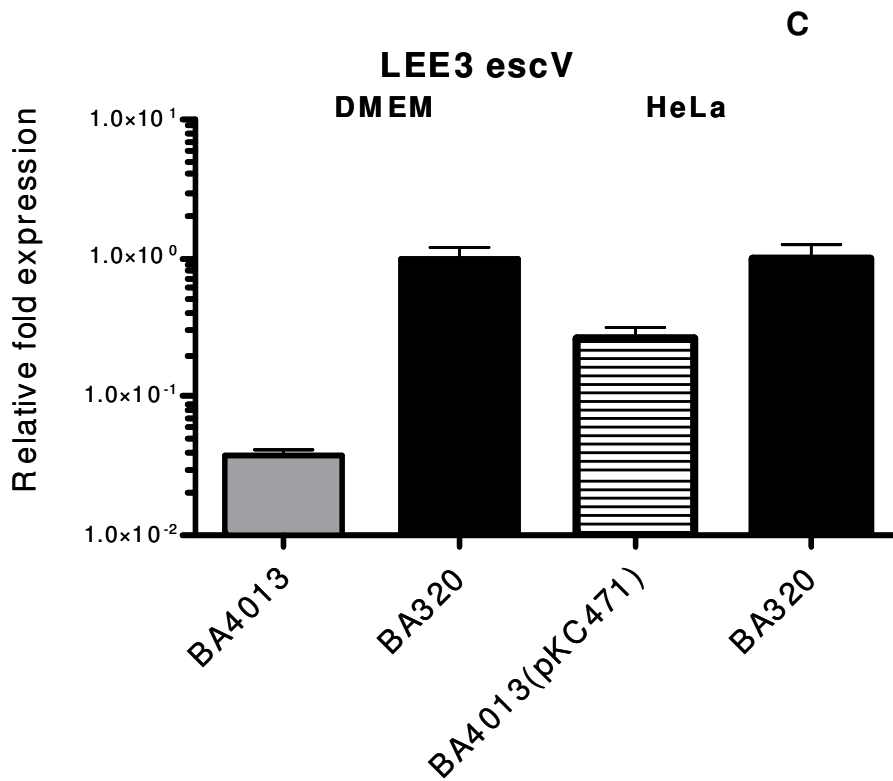
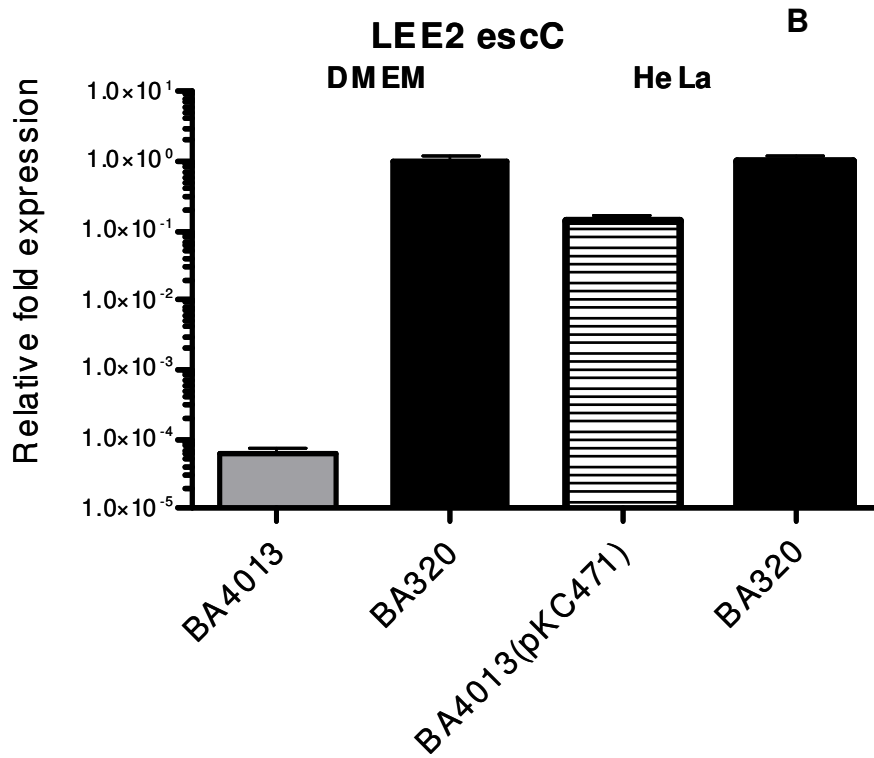
Na figura 24 observa-se os níveis de transcrição dos operons de LEE das amostras BA4013 e BA4013(pKC471), comparados com os mesmos níveis de transcrição da amostra BA320.

Ambas as cepas apresentaram níveis semelhantes de transcrição, cerca de 1×10^{-6} , de LEE1 (*ler*) (Figura 24A). Já na comparação com a BA320, os níveis foram cerca de 1×10^6 vezes menores em ambas as cepas (Figura 24A). Na figura 24B, podemos observar os níveis de transcrição de LEE2 (*escC*). Os níveis de transcrição da amostra BA4013(pKC471) foram cerca de 1×10^3 vezes maiores que da amostra BA4013 e cerca de 10 vezes menores que da cepa BA320, já a BA4013 apresentou cerca de 1×10^4 vezes menores níveis de transcrição que da amostra BA320. Os níveis de transcrição de LEE3 (*escV*) estão apresentados na figura 24C. A cepa BA4013(pKC471) apresentou níveis transcricionais cerca de 10 vezes maiores que da amostra BA4013 e cerca de 5 vezes menores que da cepa BA320, sendo que a BA4013 apresentou cerca de $0,5 \times 10^2$ vezes menores níveis de transcrição que da cepa BA320. Conforme mostrado na figura 24D, os níveis de transcrição de LEE4 (*espA*) da cepa BA4013(pKC471) foram semelhantes aos níveis da cepa BA320 e cerca de 1×10^6 vezes maiores que o da cepa BA4013. Observa-se na figura 24E os níveis de transcrição de LEE5 (*eae*) da amostra BA4013(pKC471) foram semelhantes aos níveis da cepa BA320 e cerca de $0,5 \times 10^2$ vezes maiores que o da cepa BA4013.



continua

continuação



continua

conclusão

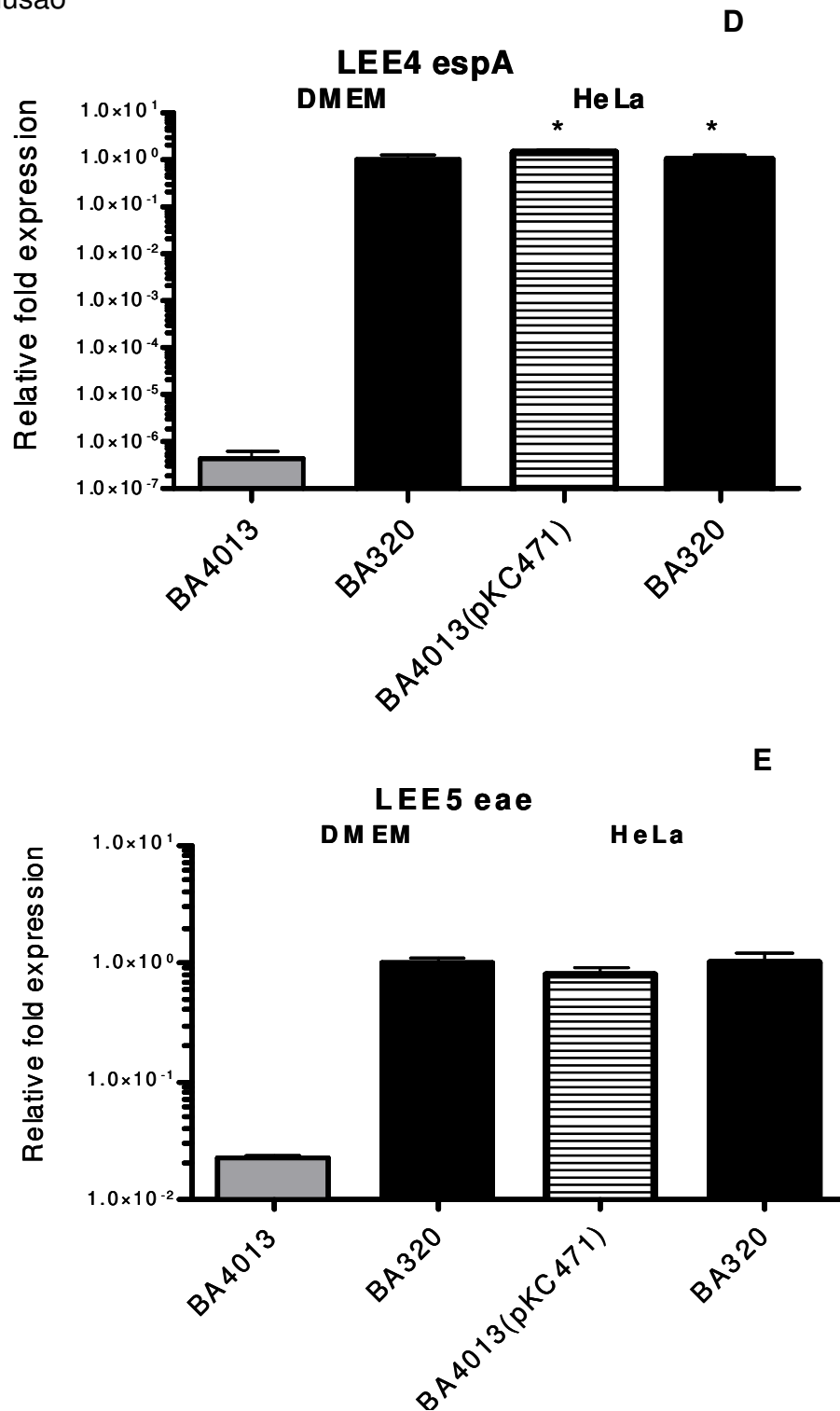


Figura 24- Análises das transcrições dos operons LEE1, 2, 3, 4 e 5 das amostras aEPEC BA4013 (após cultivo em DMEM) e BA4013(pkC471) (após cultivo em cultura de células HeLa), detectadas através da transcrição dos genes *ler*, *escC*, *escV*, *espA* e *eae* em ensaios da PCR em tempo real. Os níveis de expressão correspondem a valores arbitrários em relação aos níveis de transcrição dos respectivos genes da amostra de aEPEC BA320. **(A)**: LEE1, **(B)**: LEE2, **(C)**: LEE3, **(D)**: LEE4 e **(E)**: LEE5. Os valores foram significativos para $p < 0.05$ e não significativos para * p : 0.9873.

5 DISCUSSÃO

Alguns estudos sugerem que a região LEE de certas amostras de aEPEC não são expressas, tornando-as incapazes de desempenhar sua patogênese (RODRIGUES et al., 1996; GHILARD et al., 2003; NUNES et al., 2003; VIEIRA et al., 2001). A análise da região LEE, do ponto de vista estrutural e funcional, e a verificação das vias de sinalização que levam à formação do pedestal na célula hospedeira, são pontos essenciais no estudo de amostras de aEPEC que expressam diferentes fenótipos de interação com células epiteliais cultivadas.

O termo EPEC atípica foi primeiramente definido por Kaper (1996) para classificar amostras de *E. coli* que possuem o gene *eae*, não albergam o plasmídeo pEAF e os genes *stx*. A verificação da presença ou ausência de pEAF é realizada através da reatividade com a sonda genética EAF (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002), a qual corresponde a um fragmento críptico de aproximadamente 1 kb do pEAF, usado para o diagnóstico de EPEC (NATARO et al., 1985). Entretanto, existem trabalhos demonstrando a falta de reatividade da sonda EAF em amostras que expressam BFP e amostras que reagem com a sonda e não expressam a adesina BFP (BORTOLINI et al., 1999; GHILARDI et al., 2003). Desta forma, a melhor definição para aEPEC é a de Trabulsi; Keller, Gomes. (2002), os quais acrescentam à definição de Kaper (1996) a necessidade de se verificar a expressão de BFP. Tornando por base esse conceito, as quatro amostras de aEPEC selecionadas para este estudo, previamente descritas como aEPEC (RODRIGUES et al., 1996; DO VALLE et al., 1997; ABE et al., 2009), foram inicialmente analisadas genética e fenotipicamente para as características de aEPEC, confirmando o genótipo *eae+/bfpA-/stx1-/stx2-/perA-/sonda EAF-* e a falta da expressão de BFP.

Uma vez que a seleção das amostras de aEPEC deste estudo baseou-se no padrão de interação com células epiteliais cultivadas, os padrões de adesão descritos anteriormente (RODRIGUES et al., 1996; DO VALLE et al., 1997; ABE et al., 2009), foram novamente avaliados em células epiteliais HEP-2 e HeLa, bem como se os mesmos se mantinham nas linhagens intestinais Caco-2, T84 e HT29.

O padrão de adesão localizado-*like* foi descrito por Rodrigues et al. (1996). Estes autores estudaram amostras de EPEC isoladas de pacientes com diarreia e

que apresentavam um padrão de adesão em células HEp-2 semelhante ao localizado, mas com o aglomerado bacteriano de adesão frouxo e expresso somente após 6h de interação. Este tipo de adesão pôde ser observado na amostra BA320 do presente estudo em todas as linhagens celulares testadas, conforme previamente descrito por Abe et al. (2009) em ensaio de adesão de 6h com células HEp-2.

O padrão de adesão agregativo foi descrito por Nataro et al. (1987) como o padrão em que as bactérias aderem-se uma as outras, à superfície das células epiteliais e também à superfície da lamínula na ausência de células, numa configuração que lembra tijolos empilhados. Confirmando dados previamente descritos (ELIAS et al., 2002; BARROS et al., 2008), este tipo de adesão pôde ser observado após 6h de interação da amostra Ec292/84 deste estudo em todas as linhagens celulares testadas. Assim, este padrão também não sofreu variação em linhagens intestinais e não intestinais. Em um estudo de caracterização de *E. coli* do sorogrupo O125 isoladas de fezes mostrou que o sorotipo O125ac:H6 é constituído exclusivamente por amostras de aEPEC (DO VALLE et al., 1997). Barros et al. (2008) verificaram que em seis amostras de aEPEC do sorotipo O125ac:H6, dentre elas a amostra Ec292/84, não ocorreu alteração do padrão de adesão AA e todas foram negativas nos ensaios de FAS, ambos após 6h de cultivo em linhagens HEp-2, Caco-2, T84 e HT29. Ruiz (2009) verificou através de ensaios de mutagênese que uma proteína de membrana externa de 30 kDa está envolvida no estabelecimento do padrão AA da amostra Ec292/84, e que esta proteína é transportada via sistema de secreção do tipo 2.

O padrão de adesão difuso apresentado pela amostra 9100/83 nos testes de adesão nas linhagens celulares intestinais e não intestinais está de acordo com o descrito por trabalhos anteriores utilizando esta amostra em ensaios com células HEp-2. (RODRIGUES et al. 1996; KELLER et al., 2002). Este padrão foi descrito por Scaletsky et al. (1984) como a adesão bacteriana que cobre toda a superfície da célula HeLa de forma difusa. Segundo Kelller et al. (2002) o padrão AD da amostra 9100/83 é mediado por uma adesina de 16 kDa, com estrutura fibrilar, denominada de EPEC Afa por possuir alta similaridade com a adesina Afa de UPEC.

A amostra BA4013 não apresentou aderência nas linhagens celulares testadas, tampouco sobre a superfície da lamínula, confirmando os achados iniciais de Abe et

al. (2009) em teste de adesão após 6h contato bactérias-células HEp-2. Amostras de aEPEC não aderentes *in vitro* já foram relatadas por outros autores (DULGUER *et al.*, 2003; GOMES *et al.*, 2004; ROBINS-BROWNE *et al.*, 2004). 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 poderia ser explicada por algumas hipóteses. Essa amostra pode ter algum problema estrutural e/ou funcional da região LEE, pois EPEC adere na célula hospedeira através de EspA e intimina (CLEARY *et al.*, 2004). Além disso, esta amostra pode conter genes que codificam proteínas relacionadas à adesão e/ou que codificam proteínas reguladoras deste processo, inseridos em elementos genéticos móveis, os quais durante a passagem da bactéria pelo trato intestinal possam ter sido perdidos. Também não se pode afastar a hipótese desta amostra só expressar seus fatores de adesão após sinalização com o epitélio intestinal, tornando-se aderente somente *in vivo*, o que poderia ser avaliado através de ensaios de interação com mucosa intestinal preservada. Como o teste de adesão foi realizado durante 6h contato bactérias-células, não se pode afastar a possibilidade desta amostra ser capaz de aderir em intervalo de tempo maior que este. Culler (2010) estudou a capacidade de formação de biofilme de amostras de aEPEC que apresentavam diversos padrões de interação com células HEp-2. Dentre as amostras estudadas, as não aderentes apresentaram forte capacidade de formação de biofilme após 24h de contato bactérias-células, indicando que essas amostras aderem em superfícies bióticas e abióticas após períodos maiores de incubação. Estudos de proteômica de adesinas fimbrias e afimbriais com a amostra BA4013 estão em andamento no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan e poderão esclarecer os fatores de adesão dessa amostra.

Portanto, as quatro amostras de aEPEC deste estudo não apresentaram variações nos padrões de adesão após contato com as cinco linhagens celulares avaliadas, entretanto, o número de amostras analisadas neste estudo foi limitado para concluir que a expressão destes padrões de adesão é similar em distintas linhagens celulares. De fato, Vieira *et al.* (2001) verificaram algumas variações nos padrões de adesão de 59 amostras de aEPEC após interação com células HeLa e Caco-2. Moreira *et al.* (2008) também mostraram variações dos padrões de adesão de amostras de aEPEC do sorotipo O51:H40 após cultivo em células HeLa, Caco-2

e T84. Estes achados indicam que fatores ambientais e/ou da célula hospedeira estão estimulando a expressão destes diferentes padrões de adesão.

A capacidade de induzir o acúmulo de filamentos de actina polimerizada no sítio da adesão bacteriana pode ser detectada através do teste de FAS (KNUTTON et al., 1989) e é um indicativo da formação da lesão A/E *in vitro*. Por sua vez, a indução do acúmulo de actina no local da adesão da EPEC ou EHEC pode ocorrer através de três vias de sinalização (FRANKEL; PHILLIPS, 2008).

A via de fosforilação de Tir foi descoberta no protótipo de tEPEC E2348/69 (KENNY, 1999; CAMPELLONE et al., 2002) e consiste na fosforilação da tirosina 474 da região C-terminal de Tir, após a inserção desta proteína na membrana da célula hospedeira e a ligação desta com a adesina intimina. A fosforilação ativa Nck que ativa N/WASP e Arp2/3, provocando o acúmulo de actina polimerizada na região e, conseqüentemente, a formação do pedestal. Esta via não ocorreu nas amostras de aEPEC estudadas, indicando que há ausência da tirosina nesta região da proteína Tir, ou não ocorre fosforilação desta tirosina pelas fosforilases destas células hospedeiras, ou ainda, que este evento ocorre somente *in vivo*.

Na segunda via, descoberta na EHEC EDL933, a proteína Tir não é fosforilada após contato com a intimina (CAMPELLONE et al., 2004; GARMENDIA et al., 2004). Esta amostra contém um profago inserido em seu cromossomo, o qual possui uma sequência gênica denominada *espFu/tccP*. A proteína EspFu é secretada via SST3 para o interior da célula eucariótica e tem papel parecido com o de Nck. EspFu não interage diretamente com Tir, a interação se dá através das proteínas IRSp53/IRTKS, em conjunto ou separadamente (VINGADASSALOM et al., 2009; WEISS et al., 2009). Portanto, estas proteínas se ligam à Tir e ativam EspFu, que por sua vez ativa N/WASP e o complexo Arp2/3, provocando o acúmulo de actina polimerizada na região e formação do pedestal. Esta via foi utilizada pela amostra BA320 (ALL) quando em contato com as linhagens celulares HeLa, HEp-2 e HT29. Em duas linhagens intestinais, Caco-2 e T84, esta amostra foi incapaz de provocar acúmulo de actina polimerizada abaixo do foco da adesão bacteriana, indicando provável não interação entre Tir e IRSp53/IRTKS, ou EspFu e IRSp53/IRTKS ou entre EspFu e N/WASP. Outra hipótese é que estas duas linhagens celulares cultivadas possam estar secretando fatores que impeçam a formação do SST3

bacteriano. O gene *espFu/tccP* parece não ser prevalente em aEPEC, com exceção das amostras do sorotipo O55:H7. Garmendia et al. (2005) estudaram a prevalência deste gene em 264 amostras de aEPEC usando os iniciadores *tccP* e verificaram amplificação em 25 amostras, sendo 15 destas do sorotipo O55:H7. A amostra BA320 (ALL) do presente trabalho também pertence a esse sorotipo.

A aEPEC deste estudo que expressa o padrão AD (9100/83) foi capaz de induzir acúmulo de actina polimerizada abaixo do foco da adesão somente quando em contato com as células HeLa. Como esta amostra não apresentou amplificação de *espFu* quando utilizados os iniciadores *tccP/tccP2*, é possível que o gene *espFu* desta aEPEC seja uma nova variante e que os iniciadores não o tenha reconhecido, assim sendo, a proteína EspFu interage somente com elementos da via de formação do pedestal da célula HeLa. Esta hipótese é corroborada pelos estudos de Ooka et al. (2007) e Garmendia et al. (2005), que encontraram variações de 0,6 kb a 2 kb e 0,5 kb a 1,3 kb para este gene, utilizando os iniciadores *tccP2* e *tccP*, respectivamente, em amostras de aEPEC, tEPEC e EHEC. Também não se pode descartar a possibilidade de que fatores liberados pelas células hospedeiras estejam inibindo a formação do SST3 nas linhagens celulares cultivadas onde não houve acúmulo de actina polimerizada no local da adesão.

A terceira via de sinalização foi descoberta em aEPEC por Bai *et al.* (2008), os quais detectaram a capacidade de uma amostra de aEPEC (sorotipo O125:H6) em causar a lesão A/E somente em biópsias intestinais cultivadas, demonstrando assim a funcionalidade da região LEE dessa amostra. Entretanto, após a translocação de Tir para a célula eucariótica não ocorreu a sua fosforilação e nem ativação de N/WASP por Nck e/ou EspFu (TccP/TccP2), diferindo do comportamento de amostras de EPEC. Dessa forma, as etapas de ativação da polimerização da actina nessa amostra do sorotipo O125:H6 são mediadas por proteínas ainda não caracterizadas. Este evento, provavelmente, ocorreu com a amostra que expressou padrão AA do presente estudo (Ec292/84), uma vez que pertence ao sorotipo O125ac:H6, o que pode explicar a não observação da lesão A/E *in vitro*. Outra hipótese é que o SST3 desta amostra não esteja sendo montado por algum problema estrutural e/ou funcional da região LEE.

A amostra não aderente BA4013 foi incapaz de provocar acúmulo de actina em todas as linhagens celulares cultivadas *in vitro* testadas, justamente por não interagir com estas células epiteliais cultivadas, conforme demonstrado por Abe et al. (2009) em teste de FAS de 6h usando células HEp-2.

Em resumo, as amostras de aEPEC deste estudo, após ensaios de FAS com linhagens epiteliais intestinais e não intestinais, foram classificadas como FAS positivas (amostras que expressam os padrões ALL e DA) e FAS negativas (amostra que expressa o padrão AA e amostra não aderente).

Como as proteínas expressas pelos genes da região LEE estão envolvidas na formação da lesão A/E (HERNANDES et al., 2009), a região LEE das aEPEC FAS negativas poderia apresentar alguma mutação e/ou problemas na expressão gênica e não induzir a polimerização da actina. Para isso foram realizadas análises estruturais e funcionais de cada região LEE das aEPEC deste estudo.

Primeiramente, na análise estrutural, foi verificada a provável inserção de LEE no cromossomo bacteriano das quatro aEPEC em estudo. Dos três sítios de inserção descritos até o momento (MCDANIEL et al., 1995; SPERANDIO et al., 1998; RUMER, et al., 2003), as amostras BA320 (ALL), Ec292/84 (AA) e 9100/83 (AD) apresentaram provável inserção em *selC* e a BA4013 (NA) em *pheV*. Essa determinação do local de inserção é provável, devido ao fato de que os iniciadores utilizados permitirem a pesquisa da integridade desses genes, ou seja, indicam se o gene está ou não interrompido pela inserção de algum elemento genético. Para confirmação da inserção dessas ilhas nos genes de RNAt pesquisados seria necessário utilizar uma PCR com um iniciador *forward* que anelasse na sequência do gene de RNAt e um *reverse* que anelasse na sequência do início da região LEE. Uma vez que as extremidades da região LEE dessas quatro amostras não estão sequenciadas, não foi possível adotar esta estratégia. Mesmo assim, estes resultados indicaram a presença da região LEE nestas amostras.

Gartner e Schmidt (2004) realizaram o sequenciamento total da região LEE de duas amostras de aEPEC que aderem no padrão AD. Eles mostraram que LEE está inserida em *selC* em uma amostra e em *pheU* na outra. Também verificaram que a PAI é altamente conservada em relação ao tamanho e organização dos genes em

comparação com outros patógenos que causam lesão A/E, sendo que cada PAI possui 41 ORFs e destas 31 são genes.

As quatro amostras de aEPEC deste estudo foram analisadas quanto à presença dos 31 genes de LEE, sendo que deste total, 11 genes não foram amplificados em pelo menos uma das cepas estudadas. Este fato poderia explicar a ausência da lesão A/E nas amostras Ec292/84 (AA) e BA4013 (NA). Por outro lado, esses resultados negativos podem indicar a falta de homologia dos oligonucleotídeos iniciadores com a região onde não ocorreu a amplificação, pois estes foram desenhados tendo como molde a região LEE da amostra tEPEC E2348/69. Este fato também explicaria porque não houve amplificação para alguns genes das amostras que induziram a lesão A/E. Em seguida, a presença dos genes não amplificados foi pesquisada através da hibridização com sondas genéticas, confirmando a presença de todos os 11 genes nas quatro amostras estudadas e indicando problemas no anelamento dos iniciadores por divergências nas sequências de LEE dessas amostras com relação a tEPEC E2348/69.

Dentro da análise estrutural, também foi realizado o sequenciamento parcial ou total dos seguintes genes de LEE: *ler*, *sepZ*, *escV*, *map*, *cest*, *eae* e *espA*. A alta similaridade entre os genes sequenciados das amostras avaliadas e os respectivos genes das amostras tEPEC E2348/69 e EHEC Sakai também confirmam a presença da região LEE nas amostras de aEPEC deste estudo. A geração de uma árvore filogenética utilizando estas sequências mostrou que a região LEE possui uma diversidade genética distinta entre os patótipos, entretanto a região LEE de aEPEC apresentou maior proximidade com a PAI de tEPEC do que EHEC, pelo menos com relação a esses genes sequenciados. Em estudos realizados por Reid et al. (2000) e Bando et al. (2009), a análise das sequências dos genes *housekeeping* demonstrou que aEPEC do sorotipo O55:H7 e EHEC O157:H7 possuem uma origem clonal comum. Entretanto, no presente estudo as amostras do sorotipo O55:H7 (BA320 e 9100/83) e EHEC O157:H7 (Sakai) não apresentaram a mesma origem clonal, mostrando que a região LEE não possui a mesma história evolutiva reconstruída com base nas sequências dos setes genes considerados.

A amostra 9100/83 (AD) deste trabalho foi primeiramente descrita por Rodrigues et al. (1996) como pertencente ao sorotipo O55:H7, através da

determinação sorológica dos antígenos O e H. Porém, Bando et al. (2009) mostraram que esta amostra não apresenta a origem clonal comum dos sorotipos de aEPEC O55:H7 e EHEC O157:H7, tendo como base análises de genes *housekeeping* pela técnica de *multilocus sequence typing*. Isso foi explicado por esses autores através da análise do perfil de restrição do gene da flagelina (*fliC*), a qual mostrou que essa sequência codifica o antígeno flagelar H6. Novas análises de determinação sorológica do antígeno H dessa amostra estão sendo realizadas em centros de referência e a novo sorotipo dessa amostra deve ser descrito posteriormente como O55:H6. É interessante o fato de uma amostra de aEPEC pertencer a um dos sorotipos mais prevalentes de tEPEC em nosso meio (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002; CAMPOS; FRANZOLIN; TRABULSI, 2004).

Como a região LEE estava estruturalmente conservada nas amostras de aEPEC em estudo, foi então verificado se a falta da indução da formação do pedestal pelas amostras FAS negativas estaria relacionada a problemas de expressão dos genes que compõem a ilha de patogenicidade.

Para se ter uma visão geral da transcrição de todos os genes de LEE, a primeira abordagem utilizada foi a de verificar os níveis de transcrição das aEPEC, hibridizando os cDNA destas amostras em *chips* de *microarray* contendo o genoma de três *E. coli* patogênicas e uma não patogênica. Após a hibridização, os níveis de transcrição das aEPEC Ec292/84 (AA), 9100/83 (AD) e BA4013 (NA) foram comparados com os níveis da amostra BA320 (ALL). Foi escolhida a aEPEC BA320 para essas comparações ao invés da tEPEC E2348/69, pois a primeira não possui o plasmídeo pEAF, é positiva no ensaio de FAS, apresenta a região LEE íntegra e o padrão de adesão ALL. Já a tEPEC carrega o plasmídeo pEAF, que contém os genes que codificam o regulador Per e a fímbria BFP, e apresenta o padrão de adesão AL após 3h de interação (HERNANDES et al., 2009). Bueris (2008) demonstrou que há um atraso na formação da lesão A/E em amostras de aEPEC que expressam o padrão ALL, quando comparadas com amostras de tEPEC, e que a expressão de Tir, intimina e EspA ocorre após 3 a 4h de contato da bactéria com células HEp-2. Portanto, tEPEC não seria o controle ideal nos experimentos de expressão das aEPEC deste estudo.

A amostra 9100/83 (AD), que induziu a formação do pedestal somente quando em contato com células HeLa, apresentou a maioria de seus genes de LEE com transcrição reduzida, nove genes com transcrição não modificada e um com transcrição aumentada. Estes dados poderiam explicar por que esta amostra não induziu a formação do pedestal no local da adesão em quatro das cinco linhagens celulares. Porém, como estes resultados de *microarray* foram obtidos após o cultivo bacteriano na ausência de células hospedeiras, eles são somente um indicativo do que pode estar ocorrendo com a região LEE desta amostra, tornando-se necessário outro teste com o cultivo bacteriano em contato com as células hospedeiras para conclusões mais concretas.

Já as duas cepas que não induziram a formação da lesão A/E em todas as linhagens celulares (Ec292/84 e BA4013) apresentaram todos os genes de LEE com transcrição reduzida em relação à amostra BA320 (ALL), corroborando os achados dos ensaios de FAS. Porém, estes resultados de *microarray* também precisariam ser validados com outros testes de análise de expressão na presença e ausência das células hospedeiras.

A segunda abordagem para a análise funcional foi a determinação dos níveis de transcrição dos operons de LEE, utilizando a técnica da PCR em tempo real. Esta metodologia quantitativa foi utilizada em duas situações: após crescimento bacteriano em DMEM, resultados que validam ou não os de *microarray*, e após 6h de contato bactérias-células epiteliais cultivadas. Em ambas as situações as cepas BA320 (ALL) e E2348/69 (tEPEC) foram utilizadas como referência na comparação, em experimentos independentes, com intuito de verificarmos as diferenças de transcrição dos operons de LEE de aEPEC e tEPEC.

Como representante de LEE1 nas reações da PCR em tempo real foi escolhido *ler*, o primeiro gene deste operon. Em geral, as amostras apresentaram níveis de transcrições de *ler* muito baixos em todas as situações testadas, excetuando-se a BA320 (ALL) em comparação com a E2348/69 (tEPEC) em DMEM, onde a expressão de *ler* foi maior. Isso se deve ao fato de que a transcrição do gene *ler*, que é o regulador global de LEE (MELLIES *et al.*, 1999), ocorre nas primeiras horas de multiplicação celular (LEVERTON; KAPER, 2005). Após a proteína Ler se ligar ao promotor dos operons de LEE ela não se desliga rapidamente e uma pequena

quantidade de proteína é necessária para a ativação dos operons (YERUSHALMI *et al.*, 2008). Como a extração do RNA foi realizada após 6h de cultivo bacteriano na presença de células HeLa e entre 5 e 6h em DMEM, era de se esperar níveis de transcrição baixos de *ler*. Em um trabalho sobre a expressão temporal dos genes de virulência de tEPEC *in vitro*, Leverton; Kaper (2005) também verificaram que há uma significativa diminuição da transcrição de *ler* da amostra E2348/69 após 5h na presença ou ausência de células HEP-2, quando comparado com 10 minutos iniciais da infecção. Conforme descrito anteriormente, a amostra BA320 (ALL) apresentou níveis maiores de expressão de *ler*, quando comparada a E2348/69 somente após o cultivo em DMEM. A hipótese para esse fato é de que existem fatores secretados pela célula eucariótica que ativam proteínas regulatórias da BA320 que inibem a transcrição de *ler* e/ou estimulam a degradação do RNAm nesta amostra.

Para as análises de LEE2 foi escolhido como representante o quarto gene desse operon: *escC*. Durante a formação do SST3, a proteína EscC forma um poro na membrana externa bacteriana, no qual se liga EscF na superfície e EscJ na parte inferior do poro (GARMENDIA; FRANKEL; CREPIN, 2005). Os níveis de transcrição de LEE2 foram maiores que os de LEE1, em todas as situações estudadas. Quando comparada a ausência e presença das células HeLa, os níveis de transcrição na presença das células hospedeiras foram significativamente maiores para todas as amostras em todas as situações, levando a crer que existem fatores secretados pelas células HeLa influenciando na ativação deste operon. Leverton; Kaper (2005) tentaram analisar a transcrição de LEE2 da amostra de tEPEC E2348/69, na presença e ausência das células HEP-2, porém não obtiveram resultados consistentes e reprodutíveis para este operon analisando *escJ*. Esses autores justificaram essa deficiência através da possibilidade de que proteínas regulatórias pudessem estar agindo no promotor deste operon, dificultando a sua transcrição, fato que não foi observado por este trabalho usando os iniciadores para o gene *escC*.

Os níveis de transcrição de LEE3 foram analisados através de *escV*, o primeiro gene deste operon, e os resultados foram semelhantes aos de LEE2. A proteína EscV, juntamente com EscR, S, T e U, formam um poro na membrana interna bacteriana, no qual se liga EscJ na parte superior do poro, durante a formação do SST3 (GARMENDIA; FRANKEL; CREPIN, 2005). Como ambos os operons LEE2 e

LEE3 codificam a maioria das proteínas que formam o SST3, os níveis de transcrição deles têm que ser semelhantes para que haja a formação correta do sistema, como de fato observado com as amostras do presente trabalho.

A análise da transcrição do operon LEE4, representado por *espA*, o segundo gene deste operon, apresentou os maiores níveis de transcrição de todos os operons em todas as condições, destacando-se as amostras BA320 (ALL) e 9100/83 (AD) com altíssimos níveis de transcrição. EspA forma uma estrutura semelhante a uma agulha, formada pela sua polimerização na superfície da bactéria (GARMENDIA; FRANKEL; CREPIN, 2005). Portanto, durante a infecção de EPEC há um alto nível de expressão desta proteína para a formação do polímero durante a formação do SST3. Leverton; Kaper (2005), também verificaram que ocorreu aumento significativo da transcrição de *espA* da tEPEC E2348/69, após 5h de infecção em relação a 10 minutos, tanto na presença quanto na ausência de células HEp-2, porém em níveis menores que os observados nas aEPEC deste estudo. Como aEPEC não possui o plasmídeo pEAF e, conseqüentemente, não expressa as proteínas reguladoras Per e a fímbria BFP (KAPER, 1996), provavelmente o primeiro contato destas aEPEC com as células hospedeiras seja através de EspA, necessitando-se assim níveis maiores de expressão desta proteína em relação a tEPEC. Já a amostra que expressa o padrão AA apresentou níveis muito baixos de transcrição de LEE4. Como esta amostra não induziu a formação do pedestal, o SST3 dela pode não estar sendo corretamente montado, ou o intervalo de 6h é insuficiente para que haja transcrição ideal deste operon, ou ainda, esta amostra não induz formação da lesão A/E *in vitro* conforme demonstrado por Bai et al.(2008) em uma amostra de aEPEC do sorotipo O125:H6.

Quanto a LEE5, os níveis de transcrição foram medidos através de *eae*, o terceiro gene deste operon. No geral, as amostras tiveram níveis de transcrição com valores próximos aos das amostras BA320 (ALL) e E2348/69 (tEPEC), exceto a amostra Ec292/84 (AA) quando cultivada em DMEM, que apresentou níveis menores de transcrição. O gene *eae* codifica a adesina intimina que permite o contato íntimo da bactéria com a célula do hospedeiro (GARMENDIA; FRANKEL; CREPIN, 2005). Knutton et al. (1997) estudando a tEPEC E2348/69 através de microscopia de imunofluorescência e de transmissão eletrônica, verificaram que o nível de expressão da intimina é quase nulo após 6h de infecção quando comparado

com 3h de contato com células HEp-2. Através da PCR em tempo real, Leverton; Kaper (2005) verificaram que a mesma tEPEC em contato com as células HEp-2 apresentou uma diminuição da transcrição de *eae* após 5h em relação a 3h de interação bactéria-célula hospedeira, mas o nível de transcrição não foi nulo. Como as aEPEC começam a expressar o padrão de adesão característico e a lesão A/E somente após 3 a 4h de interação com as células hospedeiras (BUERIS, 2008), era de se esperar que a transcrição de *eae* das amostras deste estudo fosse maior que a da tEPEC em 6h de interação, cujo padrão de adesão e lesão A/E ocorre após 3h de interação. Já a amostra que expressa o padrão AA apresentou comportamento distinto, com níveis de transcrição de *eae* mais altos na presença das células HeLa, indicando que fatores secretados pela célula hospedeira podem estar ativando proteínas reguladoras do operon LEE5 nesta amostra.

A maioria dos achados da PCR em tempo real mostrou maiores níveis de transcrição após cultivo bacteriano em contato com as células HeLa, o que indica a participação de fatores ambientais e/ou elementos secretados por estas células na ativação e/ou repressão de elementos reguladores da região LEE. É possível que LEE das aEPEC deste estudo esteja sendo ativada por QseA, uma proteína do sistema *quorum sensing*, de maneira dependente ou independente de *ler*. Além disso, várias outras proteínas, tais como IHF, FIS, BipA, LexA, H-NS, GrIA e GrIR podem direta ou indiretamente regular LEE em EPEC (MELLIES; BARRON; CARMONA, 2007). IHF é uma proteína histona-*like* que se liga ao DNA e está envolvida na regulação da transcrição de vários genes de *E. coli*, dentre eles a ativação da transcrição de *ler* (GOOSEN; VAN DE PUTTE, 1995; LI et al., 2004). FIS também é uma proteína histona-*like* que tem a capacidade de alterar a topologia do DNA e está envolvida na ativação da transcrição de LEE1 e LEE4 (GILLE et al., 1991; GOLDBERG et al., 2001). BipA, uma proteína que se liga ao ribossomo e tem atividade de GTPase, ativa indiretamente a transcrição de *ler* (GRANT et al., 2003). A proteína LexA, do sistema de reparo SOS de *E. coli*, está envolvida na ativação de LEE2 e LEE3 (MELLIES; HAACK; GALLIGAN, 2007). H-NS, uma proteína da célula bacteriana que se liga a sequências de DNA próximas de promotores, reprime a transcrição dos operons LEE1, 2, 3 e 5 (BUSTAMANTE et al., 2001; DORMAN, 2004). As proteínas GrIA e GrIR, presentes na região LEE entre os operons LEE1 e LEE2, ativa e reprime LEE1, respectivamente (DENG et al., 2005). Desta forma, a

regulação dos genes de LEE é bastante complexa e constituída por uma ampla rede de ativadores e repressores. No presente estudo estes aspectos não foram abordados e na literatura não há relatos de análise desses sistemas regulatórios em aEPEC.

No que diz respeito à comparação entre aEPEC e tEPEC, as amostras BA320 (ALL) e 9100/83 (AD) tiveram, na maioria dos resultados da PCR em tempo real, níveis de transcrições iguais ou superiores aos da tEPEC E2348/69, tanto na ausência quanto na presença das células HeLa. Como já foi discutido, aEPEC apresenta um atraso na adesão e formação da lesão A/E em relação à tEPEC, tendo assim, um retardo na transcrição de seus genes envolvidos nesta patogênese (BUERIS, 2008).

Foram também realizados ensaios de *immunoblotting* com intuito de averiguar a expressão de algumas proteínas de LEE4 (EspABD) e LEE5 (intimina e Tir). Todas as aEPEC avaliadas expressaram as referidas proteínas, corroborando assim os achados de *microarray* e PCR em tempo real. Barros et al. (2008) constataram que a amostra Ec292/84 (AA) apresenta forte expressão de EspA em ensaios de *immunoblotting*, com a extração desta proteína após 18h de cultivo em DMEM. No presente estudo foi verificado que esta mesma amostra apresentou fraca expressão de EspA, pois a extração desta proteína foi realizada após 6h de cultivo bacteriano em DMEM, indicando que esta amostra necessita de um tempo maior que as 6h para expressão ideal dos genes de LEE4.

Portanto, os achados deste estudo através dos experimentos de *microarray*, PCR em tempo real e *immunoblotting* mostraram que as regiões LEE das aEPEC deste estudo são funcionais. Contudo, a amostra Ec292/84 (AA) é negativa no ensaio de FAS e a BA4013 não adere *in vitro*. A negatividade desses fenótipos poderia estar relacionada à sinalização com a célula hospedeira durante a formação da lesão A/E. Para isso, as quatro amostras de aEPEC deste estudo foram transformadas com um plasmídeo que expressa o gene *espFu*. As amostras que foram positivas nos ensaios de FAS (BA320 e 9100/83) também foram transformadas com o intuito de usá-las como controles e também para verificar se uma expressão maior de EspFu alteraria o fenótipo de adesão dessas amostras.

Primeiramente, as quatro amostras de aEPEC transformantes foram submetidas aos ensaios de interação com células HeLa, a mesma linhagem epitelial dos ensaios da PCR em tempo real. As amostras aderentes continuaram aderindo nos seus respectivos padrões, indicando que não houve influência de EspFu no estabelecimento dos padrões de adesão destas amostras, após 6h de cultivo com as células HeLa. Já o transformante BA4013(pKC471) da amostra não aderente apresentou capacidade de aderir, expressando o padrão ALL. Bielaszewska et al. (2007) relataram a perda do gene *stx* durante a passagem de uma amostra de EHEC do sorotipo O26:H11 pelo intestino de pacientes. É possível que a mesma situação tenha ocorrido com a amostra BA4013 (NA), já que *espFu* está localizado em um profago, da mesma forma que o gene *stx* em EHEC (BIELASZEWSKA et al., 2007; CAMPELLONE et al., 2004; OGURA et al., 2007).

Os transformantes BA320(pKC471), 9100/83(pKC471) e BA4013(pKC471), provocaram acúmulo de actina polimerizada no local da adesão em células HeLa, confirmando dados da literatura da participação de EspFu no processo de formação do pedestal de actina polimerizada (CAMPELLONE et al., 2004; GARMENDIA et al., 2004). Já o transformante da amostra Ec292/84 (O125ac:H6) não induziu acúmulo de actina polimerizada no local da adesão *in vitro*, confirmando que EspFu não participa do processo de formação do pedestal, conforme observado por Bai et al. (2008) em uma outra amostra desse mesmo sorotipo.

EspFu não influenciou na fosforilação de sítios de tirosina da proteína Tir dos transformantes das aEPEC estudadas, conforme indicado pelos ensaios de imunofluorescência para detecção da fosforilação de Tir. EspFu não se liga diretamente a Tir durante o processo de sinalização que leva à formação do pedestal, tendo como intermediários no processo as proteínas IRTKS e IRSp53 (VINGADASSALOM et al., 2009; WEISS et al., 2009).

O fato do transformante BA4013(pKC471) ter aderido em células HeLa foi inusitado e cabe salientar que esses resultados foram reprodutíveis em vários ensaios independentes e realizados em diferentes laboratórios. Por esse motivo foi realizado um ensaio da PCR em tempo real, após 6h de contato bactérias-células HeLa, para verificar se EspFu estaria influenciando na expressão dos genes de LEE. De modo geral, com exceção de LEE1, o transformante BA4013(pKC471)

apresentou níveis de transcrição muito maiores que a amostra selvagem não aderente BA4013, indicando influência direta e/ou indireta de EspFu na ativação da transcrição de LEE2, 3, 4 e 5. Portanto, provavelmente, a amostra tornou-se aderente através de EspA (LEE4) e intimina (LEE5), conforme demonstrado pelos níveis de transcrição destes operons, próximos aos da BA320 (ALL). Porém, como os testes envolvendo a amostra transformante foram realizados somente na presença das células hospedeiras, não se pode descartar a hipótese de que elementos secretados por estas células estejam induzindo a ativação de proteínas regulatórias de LEE. Esta hipótese e outras, como interação de EspFu em outros sítios da célula bacteriana serão pesquisados pelo nosso grupo. A amostra BA4013 (sorotipo O88:HNM) é imóvel e após a introdução do pKC471 a mesma passou a apresentar motilidade no teste clássico para determinação deste fenótipo (dados não apresentados). As vias de regulação da expressão dos operons *flgA-L*, *flhA-D* e *fliA-R*, responsáveis pela expressão do flagelo bacteriano (IINO et al., 1988) no transformante BA4013(pKC471) não foram investigadas neste estudo. A participação do flagelo no processo de adesão de EPEC foi relatada em alguns estudos (GIRON et al., 2002; SAMPAIO et al., 2009) e esta também pode ser uma via de adesão ativada no transformante BA4013(pKC471).

O gene *espFu* possui 1140 pb, localiza-se no profago CP-933U e foi inicialmente caracterizado como ORF Z3072 no sequenciamento do genoma da amostra EHEC EDL933 (PERNA et al., 2001). A proteína EspFu tem massa molecular de 42 kDa e é secretada pelo SST3, provavelmente com ajuda de uma chaperonina desconhecida. Sequências repetidas de 47 aminoácidos, com domínios ricos de prolina, aparecem seis vezes na sequência de EspFu e é local da ligação e ativação de N-WASP (CAMPELLONE et al., 2004; GARMENDIA et al., 2004). O domínio SH3, das proteínas IRSp53 e IRTKS, se liga à região C-terminal de EspFu (VINGADASSALOM, et al., 2009). Portanto, só há relatos na literatura da participação de EspFu na formação do pedestal e interação com proteínas da célula hospedeira (N/WASP, IRSp53 e IRTKS). As proteínas IRSp53 e IRTKS são homólogas e membros da uma família de proteínas, que assim como N/WASP, participam da transdução de sinais durante a polimerização da actina em células de mamíferos (VINGADASSALOM, et al., 2009). Portanto, a comprovação da ativação

indireta da transcrição de *eae*, *tir* e/ou do operon *fli* por EspFu necessita de estudos complementares.

Em recente revisão, Frankel; Phillips (2008) discutiram as possíveis vias de formação do pedestal da lesão A/E *in vivo*, *in vitro* e *ex vivo*, induzidos por EHEC, tEPEC, aEPEC e *C. rodentium*. Esses autores deixam claro que em termos de pressão seletiva e sobrevivência é muito mais vantajoso para essas bactérias somente aderir à mucosa intestinal, ao invés de também induzir o acúmulo de actina e formação do pedestal, sugerindo que estes eventos são independentes *in vivo*. Como todos os ensaios do presente trabalho foram realizados *in vitro*, não se pode chegar a esta mesma conclusão, sendo necessário para isto a realização de ensaios em modelos utilizando fragmentos de intestino humano (IVOC) ou em alça ligada de íleo de coelho.

6 CONCLUSÕES

1. A expressão dos padrões de adesão das aEPEC deste estudo foi reprodutível em todas as linhagens celulares epiteliais avaliadas, independentemente da origem intestinal ou não intestinal.
2. A capacidade de causar a lesão A/E *in vitro* foi dependente da linhagem celular empregada para as amostras que expressaram os padrões ALL e AD; indicando que a indução deste fenótipo *in vitro* pode ser dependente da sinalização com a célula hospedeira.
3. As amostras de aEPEC que foram capazes ou não de formar lesão A/E *in vitro*, apresentaram a região LEE estruturalmente conservada e funcional.
4. A expressão da proteína EspFu não alterou os padrões de adesão das amostras de aEPEC em células HeLa.
5. A amostra que expressou o padrão AA foi incapaz de formar a lesão A/E *in vitro*, mesmo expressando EspFu *in trans*.
6. A expressão de EspFu *in trans*, na amostra não aderente, promoveu a adesão desta amostra, provavelmente, através da ativação indireta da expressão de EspA e intimina.

REFERÊNCIAS¹

ABE, C. M.; BLANCO, M.; DHABI, G.; BLANCO, J. E.; BLANCO, J.; FRANZOLIN, M. R.; TADDEI, C. R.; PIAZZA, R. M. F.; MARTINEZ, M. B.; ELIAS, W. P. Virulence features of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* identified by the eae(+) EAF-negative stx(-) genetic profile **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 64, n.4, p. 357-365, 2009.

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

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

AFSET, J. E.; BRUANT, G.; BROUSSEAU, R.; HAREL, J.; ANDERSSSEN, E.; BEVANGER, L.; BERGH, K. Identification of virulence genes linked with diarrhea due to atypical enteropathogenic *Escherichia coli* by DNA microarray analysis and PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, n. 10, p. 3703-3711, 2006.

AFSET, J. E.; ANDERSSSEN, E.; BRUANT, G.; HAREL, J.; WIELER, L.; BERGH, K. Phylogenetic backgrounds and virulence profiles of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains from a case-control study using multilocus sequence typing and DNA microarray analysis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, n. 7, p. 2280-2290, 2008.

ARANDA, K. R.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I. C. Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 5849-53. 2004.

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

De acordo com:

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

BADEA, L.; DOUGHTY, S.; NICHOLLS, L.; SLOAN, J.; ROBINS-BROWNE, R. M.; HARTLAND, E. L. Contribution of Efa1/LifA to the adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells. **Microb. Pathog.**, v. 34, p. 205-215, 2003.

BAI, L.; SCHÜLLER, S.; WHALE, N. A.; MOUSNIER, A.; MARCHES, O.; WANG, L.; OOKA, T.; HEUSCHKEL, R.; TORRENTE, F.; KAPER, J. B.; GOMES, T. A. T.; XU, J.; PHILLIPS, A. D.; FRANKEL, G. Enteropathogenic *Escherichia coli* O125:H6 triggers attaching and effacing lesions on human intestinal biopsy specimens independently of Nck and TccP/TccP2. **Infect. Immun.**, v. 76, p. 361-368, 2008.

BANDO, S. Y.; ANDRADE, F. B.; GUTH, B. E.; ELIAS, W. P.; MOREIRA-FILHO, C. A.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* genomic background allows the acquisition of non-EPEC virulence factors. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 299, p. 22-30, 2009.

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

BIELASZEWSKA, M.; PRAGER, R.; KÖCK, R.; MELLMANN, A.; ZHANG, W.; TSCHÄPE, H.; TARR, P. I.; KARCH, H. Shiga toxin gene loss and transfer in vitro and in vivo during enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 infection in humans. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 73, p. 3144-3150, 2007.

BILGE, S. S.; CLAUSEN, C. R.; LAU, W.; MOSELEY, S. L. Molecular characterization of a fimbrial adhesin, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to HEP-2 cells. **J. Bacteriol.**, v. 171, n.8, p. 4281-4289, 1989.

BORTOLINI, M. R.; TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; FRANKEL, G.; SPERANDIO, V. 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 Microbiol. Lett.**, v. 179, p. 169-174, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1549>. Acesso em: 09 fev. 2010.

BRYCE, J.; BOSCHI-PINTO, C.; SHIBUYA, K.; BLACK, R. E. WHO estimates of the causes of death in children. **Lancet.**, v. 365, p. 1147-52, 2005.

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

BUERIS, V. **Interação de *Escherichia coli* Enteropatogêncica (EPEC) atípica que apresenta o padrão de adesão localizada-like com a célula epitelial *in vitro*.** Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

BUSTAMANTE, V. H.; SANTANA, F. J.; CALVA, E.; PUENTE, J. L. Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic *Escherichia coli*: Ler antagonizes H-NS-dependent repression. **Mol. Microbiol.**, v. 39, p. 664–678, 2001.

CAMPELLONE, K. G.; GIESE, A.; TIPPER, D. J.; LEONG, J. M. A tyrosine-phosphorylated 12-amino-acid sequence of enteropathogenic *Escherichia coli* Tir binds the host adaptor protein Nck and is required for Nck localization to actin pedestals. **Mol. Microbiol.**, v. 43, p.1227-41, 2002

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

CAMPELLONE, K. G.; LEONG, J. M. Nck-independent actin assembly is mediated by two phosphorylated tyrosines within enteropathogenic *Escherichia coli* Tir. **Mol. Microbiol.**, v. 56, n. 2, p. 416-432, 2005.

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

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

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

CLARKE, S. C.; HAIGH, R. D.; FREESTONE, P. P.; WILLIAMS, P. H. Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 16, n. 3, p. 365-378, 2003.

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

COHEN, M. B.; NATARO, J. P.; BERNSTEIN, D. I.; HAWKINS, J.; ROBERTS, N.; STAAT, M. A. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in acute childhood enteritis: a prospective controlled study. **J. Pediatr.**, v. 146, n. 1, p. 54-61, 2005.

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

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

CREASEY, E. A.; DELAHAY, R. M.; BISHOP, A. A.; SHAW, R. K.; KENNY, B.; KNUTTON, S.; FRANKEL, G. CesT is a bivalent enteropathogenic *Escherichia coli* chaperone required for translocation of both Tir and Map. **Mol. Microbiol.**, v. 47, p. 209-221, 2003a.

CREASEY, E. A.; FRIEDBERG, D.; SHAW, R. K.; UMANSKI, T.; KNUTTON, S.; ROSENSHINE, I.; FRANKEL, G. CesAB is enteropathogenic *Escherichia coli* chaperone for the type III translocator proteins EspA and EspB. **Microbiology**, v. 149, p. 3639-3647, 2003b.

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

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

DANIELL, S. J.; TAKAHASHI, N.; WILSON, R.; FRIEDBERG, D.; ROSENSHINE, I.; BOOY, F. P.; SHAW, R. K.; KNUTTON, S.; FRANKEL, G.; AIZAWA, S. The filamentous type III secretion translocon of Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Cell. Microbiol.**, v. 3, p. 665-675, 2001.

DEAN, P.; KENNY, B. Intestinal barrier dysfunction by enteropathogenic *Escherichia coli* is mediated by two effector molecules and a bacterial surface protein. **Mol. Microbiol.**, v. 54, p. 209-221, 2004.

DENG, W.; LI, Y.; HARDWIDGE, P. R.; FREY, E. A.; PFUETZNER, R. A.; LEE, S.; GRUENHEID, S.; STRYNAKDA, N. C.; PUENTE, J. L.; FINLAY, B. B. Regulation of type III secretion hierarchy of translocators and effectors in attaching and effacing bacterial pathogens. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 2135-46, 2005.

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

DO VALLE, G. M. F. GOMES, T. A. T.; IRINO, K.; TRABULSI, L. R. The traditional enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) serogroup O125 comprises serotypes which are mainly associated with the category of enteroaggregative *E. coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 152, p. 95-100, 1997.

DOS SANTOS, L. F.; GONÇALVES, E. M.; VAZ, T. M.; IRINO, K.; GUTH, B. E. Distinct pathotypes of O113 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals in Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, n. 6, p. 2028-2030, 2007.

DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B. Construction of an eae deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. **Infect. Immun.**, v. 59, p. 4310-4317, 1991.

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

DORMAN, C. J. H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. **Nat Rev Microbiol.**, v. 2, n. 5, p. 391-400, 2004.

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

ELIAS, W. P.; BARROS, S. F.; MOREIRA, C. G.; TRABULSI, L. R.; GOMES, T. A. T. Enteroaggregative *Escherichia coli* strains among classical enteropathogenic *Escherichia coli* O serogroups. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 3540-3541, 2002.
ELLIOTT, S. J.; WAINWRIGHT, L. A.; MCDANIEL, T. K.; JARVIS, K. G.; DENG, Y. K.; LAI, L. C.; MCNAMARA, B. P.; DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B. The

complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. **Mol. Microbiol.**, v. 28, n. 1, p. 1-4, 1998.

ELLIOTT, S. J.; HUTCHESON, S. W.; DUBOIS, M. S.; MELLIES, J. L.; WAINWRIGHT, L. A.; BATCHELOR, M.; FRANKEL, G.; KNUTTON, S.; KAPER, J. B. Identification of CesT, a chaperone for the type III secretion of Tir in enteropathogenic *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 33, p. 1176-1189, 1999.

ELLIOTT, S. J.; O'CONNELL, C. B.; KOUTSOURIS, A.; BRINKLEY, C.; DONNENBERG, M. S.; HECHT G.; KAPER, J. B. A gene from the locus of enterocyte effacement that is required for enteropathogenic *Escherichia coli* to increase tight-junction permeability encodes a chaperone for EspF. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 2271-2277, 2002.

FELSENSTEIN, J. **PHYLIP** v.3.5, 1993. Disponível em <<http://cmgm.stanford.edu/phylic/>>. Acesso em: 21/02/2007

FINLAY, B. B., KENNY, B., STEIN, M., REINSCHIED, D., RUSCHKOWSKI, S., ROSENSHINE, I. Molecular mechanism of enteropathogenic *E. coli* : Signal transduction, pedestal formation, intimate contact, and diarrhea. **Rev. Microbiol.**, v. 27, p. 7-16, 1996.

FRANKE. J.; FRANKE, S.; SCHMIDT, H.; SCHWARZKOPF, A.; WIELER, L. H.; BALJER, G.; BEUTIN, L.; KARCH, H. Nucleotide sequence analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adherence factor probe and development of PCR for rapid detection of EPEC harboring virulence plasmids. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, n. 10, p. 2460-2463, 1994.

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

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

FRANKEL, G.; PHILLIPS, A. D. Attaching effacing *Escherichia coli* and paradigms of Tir-triggered actin polymerization: getting off the pedestal. **Cell. Microbiol.**, v. 10, p. 549-556, 2008.

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

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

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

GARRIDO, P.; BLANCO, M.; PAZ-MORENO, M.; BRIONES, C.; DAHBI, G.; BLANCO, J.; BLANCO, J.; PARRO, V. STEC-EPEC oligonucleotide microarray: a new tool for typing genetic variants of the LEE pathogenicity island of human and animal Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) strains. **Clin. Chemistry.**, v. 52, p. 192-201, 2006.

GASSAMA-SOW, A.; SOW, P. S.; GUÈYE, M.; GUEYE-N'DIAYE, A.; PERRET, J. L.; MBOUP, S.; AIDARA-KANE, A. Characterization of pathogenic *Escherichia coli* in human immunodeficiency virus-related diarrhea in Senegal. **J. Infect. Dis.**, v. 189, p. 75-78, 2004.

GAUTHIER, A.; FINLAY, B. B. Type III secretion system inhibitors are potential antimicrobials. **ASM News.**, v. 68, p. 383-387, 2002.

GÄRTNER J. F.; SCHMIDT, M. A. Comparative analysis of locus of enterocyte effacement pathogenicity islands of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v.72, n. 11, p.6722-6728, 2004.

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

GILLE, H.; EGAN, J. B.; ROTH, A.; MESSER, W. The Fis protein binds and bends the origin of chromosomal DNA replication, oriC, of *Escherichia coli*. **Nucleic Acids Res.**, v. 19, p. 4167-4172, 1991.

GIRÓN, J. A.; TORRES, A. G.; FREER, E.; KAPER, J. B. The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. **Mol. Microbiol.**, v. 44, n. 2, p. 361-79, 2002.

GOLDBERG, M. D.; JOHNSON, M.; HINTON, J. C.; WILLIAMS, P. H. Role of the nucleoid-associated protein Fis in the regulation of virulence properties of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Mol., Microbiol.**, v. 41, p. 549–559, 2001.

GÓMEZ-DUARTE, O. G.; KAPER, J. B. A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal *eaeA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 63, n. 5, p. 1767-1776, 1995.

GOOSEN, N.; van de PUTTE, P. The regulation of transcription initiation by integration host factor. **Mol. Microbiol.**, v. 16, p. 1-7, 1995.

GRANT, A. J.; FARRIS, M.; ALEFOUNDER, P.; WILLIAMS, P. H.; WOODWARD, M. J.; O'CONNOR, C. D. Co-ordination of pathogenicity island expression by the BipA GTPase in enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). **Mol. Microbiol.**, v. 48, p. 507-521, 2003.

HACKER, J.; BLUM-OEHLER, G.; MUHLDORFER, I.; TSCHAPE, H. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. **Mol. Microbiol.**, v. 23, p. 1089-1097, 1997.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids Symp.**, v. 41, p. 95-98, 1999.

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

HARTLAND, E. L.; BATCHELOR, M.; DELAHAY, R. M.; HALE, C.; MATTHEWS, S.; DOUGAN, G.; KNUTTON, S.; CONNERTON, I.; FRANKEL, G. Binding of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* to Tir and host cells. **Mol. Microbiol.**, v. 32, p.151-158, 1999.

HEDBERG, C.; SAVARINO, S.; BESSER, J.; PAULUS, C.; THELEN, V.; MYERS, L. An outbreak of foodborne illness caused by *Escherichia coli* O39:NM, an agent not fitting into the existing scheme for classifying diarrheogenic *E. coli*. **J. Infect. Dis.**, v. 176, p. 1625-1628, 1997.

HEMRAJANI, C.; BERGER, C. N.; ROBINSON, K. S.; MARCHÈS, O.; MOUSNIER, A.; FRANKEL, G. NleH effectors interact with Bax inhibitor-1 to block apoptosis during enteropathogenic *Escherichia coli* infection. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 16, p. 3129-3134, 2010.

HERNANDES, R. T.; SILVA, R. M.; CARNEIRO, S. M.; SALVADOR, F. A.; FERNANDES, M. C. C.; PADOVAN, A. C. B.; YAMAMOTO, D.; MORTARA, R. A.; ELIAS, W. P.; BRIONES, M. R. S.; GOMES, T. A. T. The localized adherence pattern of an atypical enteropathogenic *Escherichia coli* is mediated by intimin omicron and unexpectedly promotes HeLa cell invasion. **Cell. Microbiol.**, v. 10, p. 415-425, 2008.

HERNANDES, R. T.; ELIAS, W. P.; VIERA, M. A.; GOMES, T. A. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 297, n. 2, p. 137-149, 2009.

HUGHES, D. T.; SPERANDIO, V. Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 6, p. 111-120, 2008.

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

IINO, T.; KOMEDA, Y.; KUTSUKAKE, K.; MACNAB, R. M.; MATSUMURA, P.; PARKINSON, J. S.; SIMON, M. I.; YAMAGUCHI, S. New unified nomenclature for the flagellar genes of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. **Microbiol. Rev.**, v. 52, n. 4, p. 533-535, 1988.

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

JENKINS, C.; LAWSON, A. J.; CHEASTY, T.; WILLSHAW, G. A.; WRIGHT, P.; DOUGAN, G.; FRANKEL, G.; SMITH, H. R. Subtyping intimin genes from enteropathogenic *Escherichia coli* associated with outbreaks and sporadic cases in the United Kingdom and Eire. **Mol. Cel. Probes.**, v. 17, p. 149-156, 2003.

JENKINS, C.; SMITH, H. R.; LAWSON, A. J.; WILLSHAW, G. A.; CHEASTY, T.; WHEELER, J. G.; TOMPKINS, D. S. Serotypes, intimin subtypes, and antimicrobial

resistance patterns of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* isolated in England from 1993 to 1996. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 25, n.1, p. 19-24, 2006.

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

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

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

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

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

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

KENNY, B.; LAI, L. C.; FINLAY, B. B.; DONNENBERG, M. S. EspA, a protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli*, is required to induce signals in epithelial cells. **Mol. Microbiol.**, v. 20, p. 313-323, 1996.

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

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

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

KIM, J.; THANABALASURIAR, A.; CHAWORTH-MUSTERS, T.; FROMME, J. C.; FREY, E.A.; LARIO, P. I.; METALNIKOV, P.; RIZG, K.; THOMAS, N. A.; LEE, S. F.;

HARTLAND, E. L.; HARDWIDGE, P. R.; PAWSON, T.; STRYNADKA, N. C.; FINLAY, B. B.; SCHEKMAN, R.; GRUENHEID, S. The bacterial virulence factor NleA inhibits cellular protein secretion by disrupting mammalian COPII function. **Cell Host. Microbe.**, v. 13, p. 160-171, 2007.

KNAPPSTEIN, S.; IDE, T.; SCHMIDT, M. A.; HEUSIPP, G. Alpha 1- antitrypsin binds and interferes with functionality of EspB from atypical and typical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 4344-4350, 2004.

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

KNUTTON, S.; ADU-BOBIE, J.; BAIN, C.; PHILLIPS, A. D.; DOUGAN, G.; FRANKEL, G. Down regulation of intimin expression during attaching and effacing enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion. **Infect Immun.** v. 65, n. 5, p. 1644-1652, 1997.

KODAMA, T.; AKEDA, Y.; KONO, G.; TAKAHASHI, A.; IMURA, K.; IIDA, T.; HONDA, T. The EspB protein of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* interacts directly with alpha-catenin. **Cell. Microbiol.**, v. 4, p. 213-222, 2002.

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

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

LEE, C. A. Type III secretion systems: machines to deliver bacterial proteins into eukaryotic cells? **Trends Microbiol.**, v. 5, p. 148-160, 1997.

LEVINE, M. M.; BERGQUIST, E. J.; NALIN, D. R.; WATERMAN, D. H.; HORNICK, R. B.; YOUNG, C. R.; SOTMAN, S. *Escherichia coli* strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. **Lancet**, v. 27, p. 1119-1122, 1978

LEVERTON, L. Q.; KAPER, J.B. Temporal expression of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence genes in an in vitro model of infection. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 2, 1034-1043, 2005.

LI, M.; ROSENSHINE, I.; TUNG, S. L.; WANG, X. H.; FRIEDBERG, D.; HEW, C. L.; LEUNG, K. Y. Comparative proteomic analysis of extracellular proteins of enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* strains and their ihf and ler mutants. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, p. 5274-5282, 2004.

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

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

MARTINEZ, M. B.; TRABULSI, L. R. **Enterobacteriaceae**. Microbiologia São Paulo: Atheneu, 2008.

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

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

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

MELLIES, J. L.; BARRON, A. M.; CARMONA, A. M. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence gene regulation. **Infect. Immun.**, v. 75, p. 4199-210, 2007.

MELLIES, J. L.; HAACK, K. R.; GALLIGAN, D. C. SOS regulation of the type III secretion system of enteropathogenic *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 189, p. 2863-2872, 2007.

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

MORA, A., BLANCO, M., YAMAMOTO, D., DAHBI, G., BLANCO, J.E., LÓPEZ, C., ALONSO, M. P., VIEIRA, M. A., HERNANDES, R. T., ABE, C. M., PIAZZA, R. M., LACHER, D. W., ELIAS, W. P., GOMES, T. A., BLANCO, J. HeLa-cell adherence patterns and actin aggregation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga-toxin-producing *E. coli* (STEC) strains carrying different eae and tir alleles. **Int. Microbiol.**, v. 12, n. 4, p. 243-451, 2009.

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

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

MOURA, R. A.; SIRCILI, M. P.; LEOMIL, L.; MATTÉ, M. H.; TRABULSI, L. R.; ELIAS, W. P.; IRINO, K.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Clonal relationship among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from different animal species and humans. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, n. 23, p. 7399-7408. 2009.

NATARO, J.P.; BALDINI, M.M.; KAPER, J.B.; BLACK, R.E.; BRAVO, N.; LEVINE, M.M. Detection of an adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli* with a DNA probe. **J Infect Dis.**, v. 152, n. 3, p. 560-565, 1985.

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

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

NEVES, B. C.; MUNDY, R.; PETROVSKA, L.; DOUGAN, G.; KNUTTON, S.; FRANKEL, G. CesD2 of enteropathogenic *Escherichia coli* is a second chaperone for the type III secretion translocator protein EspD. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 2130-2141, 2003.

NETER, E.; WESTPHAL, O.; LÜDERITZ, O.; GINO, R. M.; GORZYNSKI, E. A. Demonstration of antibodies against enteropathogenic *Escherichia coli* in sera of children of various ages. **Pediatrics**, v. 16, p. 801-808, 1955.

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

NICHOLAS, K. B.; NICHOLAS, H.B. **GeneDoc**: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments 1997. Disponível <<http://www.psc.edu/biomed/genedoc>>. Acesso em: 15/02/2008.

NOUGAYRÈDE, J. P.; DONNENBERG, M. S. Enteropathogenic *Escherichia coli* EspF is targeted to mitochondria and is required to initiate the mitochondrial death pathway. **Cell. Microbiol.**, v. 6, p. 1097-1111, 2004.

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

OCHOA, T.J.; BARLETTA, F.; CONTRERAS, C.; MERCADO, E. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 102, n. 9, p. 852-856, 2008.

ORLANDI, P. P.; MAGALHÃES, C. F.; MATOS, N. B.; NOGUEIRA, P. A.; DA SILVA, L. H. P. Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho (Rondônia, western Amazon region, Brazil). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 39, p. 507-517, 2006.

OSWALD, E.; SCHMITD, H.; MORABITO, S.; KARCH, H.; MARCHES, O.; CAPRIOLI, A. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: Characterization of a new intimin variant. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 1152-1156, 2000.

PALLEN, M. J.; WREN, B. W. Bacterial pathogenomics. **Nature**, v. 18, p. 835-842, 2007.

PELAYO, J. S.; SCALETSKY, I. C.; PEDROSO, M. Z.; SPERANDIO, V.; GIRON, J. A.; FRANKEL, G.; TRABULSI, L. R. Virulence properties of atypical EPEC strains. **J. Med. Microbiol.**, v. 48, p. 41-49, 1998.

PERNA, N. T.; PLUNKETT, G. 3RD.; BURLAND, V.; MAU, B.; GLASNER, J. D.; ROSE, D. J.; MAYHEW, G. F.; EVANS, P. S.; GREGOR, J.; KIRKPATRICK, H. A.; PÓSFA, I. G.; HACKETT, J.; KLINK, S.; BOUTIN, A.; SHAO, Y.; MILLER, L.; GROTEBECK, E. J.; DAVIS, N. W.; LIM, A.; DIMALANTA, E. T.; POTAMOUSIS, K. D.; APODACA, J.; ANANTHARAMAN, T. S.; LIN, J.; YEN, G.; SCHWARTZ, D. C.; WELCH, R. A.; BLATTNER, F. R. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Nature**, v. 25-409, p. 529-533, 2001.

PORTER, M. E.; MITCHELL, P.; FREE, A.; SMITH, D. G.; GALLY, D. L. The LEE1 promoters from both enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* can be activated by PerC-like proteins from either organism. **J. Bacteriol.**, v. 187, n. 2, p. 458-472, 2005.

RENDÓN, M. A.; SALDAÑA, Z., ERDEM, A. L., MONTEIRO-NETO, V., VÁZQUEZ, A., KAPER, J. B., PUENTE, J. L., GIRÓN, J. A. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 19, p. 10637-10642, 2007.

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

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

ROSA, A. C., VIEIRA, M. A., TIBANA, A., GOMES, T. A., ANDRADE, J. R. Interactions of *Escherichia coli* strains of non-EPEC serogroups that carry eae and lack the EAF and stx gene sequences with undifferentiated and differentiated intestinal human Caco-2 cells. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 12, p. 117-122, 2001.

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

RUIZ, R. M. **Caracterização genotípica e fenotípica de mutantes não aderentes de *Escherichia coli* enteropatogênica atípica do sorotipo O125ac:H6.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

RUMER, L.; JORES, J.; KIRSCH, P.; CAVIGNAC, Y.; ZEHMKE, K.; WIELER, L. H. Dissemination of *pheU* and *pheV* located genomic islands among enteropathogenic (EPEC) and enterohemorrhagic (EHEC) *E. coli* and their possible role in the horizontal transfer of the locus of enterocyte effacement (LEE). **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 292, p. 463-475, 2003.

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

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: **A Laboratory Manual**, New York: Cold Spring Harbor, 1989.

SAMPAIO, S. C.; GOMES, T. A.; PICHON, C.; DU MERLE, L.; GUADAGNINI, S.; ABE, C. M.; SAMPAIO, J. L.; LE BOUGUÉNEC, C. 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. **Infect. Immun.**, v. 77, n.10, p. 4406-4413, 2009.

SANCHES-SANMARTÍN, C.; BUSTAMANTE, V. H.; CALVA, E.; PUENTE, J. L. Transcriptional regulation of the *orf19* gene and the *tir-ces-T-eae* operon of enteropathogenic *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 2823-2833, 2001.

SARANTUYA, J.; NISHI, J.; WAKIMOTO, N.; ERDENE, S.; NATARO, J.P.; SHEIKH, J.; IWASHITA, M.; MANAGO, K.; TOKUDA, K.; YOSHINAGA, M.; MIYATA, K.; KAWANO, Y. Typical enteroaggregative *Escherichia coli* is the most prevalent pathotype among *E. coli* strains causing diarrhea in Mongolian children. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n.1, p. 133-139, 2004.

SCALETSKY, I. C.; SILVA, M. L.; TRABULSI, L. R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infect. Immun.**, v. 45, p. 534-6, 1984.

SCALETSKY, I. C.; PEDROSO, M. Z.; FAGUNDES-NETO, U. Attaching and effacing enteropathogenic *Escherichia coli* O18ab invades epithelial cells and causes persistent diarrhea. **Infect. Immun.**, v. 64, n.11, p. 4876-4881, 1996.

SCALETSKY, I. C.; PEDROSO, M. Z.; OLIVA, C. A.; CARVALHO, R. L.; MORAIS, M. B.; FAGUNDES-NETO, U. A localized adherence-like pattern as a second pattern

of adherence of classic enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells that is associated with infantile diarrhea. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 3410-3415, 1999.

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

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

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

SCHÜLLER, S.; CHONG, Y.; LEWIN, J.; KENNY, B.; FRANKEL, G.; PHILLIPS, A. D. Tir phosphorylation and Nck/N-WASP recruitment by enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* during ex vivo colonization of human intestinal mucosa is different to cell culture models. **Cell. Microbiol.**, v. 9, n. 5, p. 1352-1364, 2007.

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

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

SILVA, R. M.; GIRALDI, R.; KELLER, R.; CAMPOS, L.C.; GUTH, B. E. Diffuse adherence, ST-I enterotoxin and CFA/IV colonization factor are encoded by the same plasmid in the *Escherichia coli* O29:H21 strain. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 29, n. 8, p. 969-976, 1996.

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

SMITH, H.; SCOTLAND, S.; CHEASTY, T.; WILLSHAW, G.; ROWE, B. Enteropathogenic *Escherichia coli* infections in the United Kingdom. **Rev. Microbiol.**, v. 27, p. 45–49, 1996.

SPERANDIO, V.; KAPER, J. B.; BORTOLINI, M. R.; NEVES, B. C.; KELLER, R.; TRABULSI, L. R. Characterization of the locus of enterocyte effacement (LEE) in different enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) serotypes. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 164, p. 133-139, 1998.

TAYLOR, K. A.; O'CONNELL, C. B.; LUTHER, P. W.; DONNENBERG, M. S. The EspB protein of enteropathogenic *Escherichia coli* is targeted to the cytoplasm of infected HeLa cells. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 5501-5507, 1998.

TAYLOR, K. A.; LUTHER, P. W.; DONNENBERG, M. S. Expression of the EspB protein of enteropathogenic *Escherichia coli* within HeLa cells affects stress fibers and cellular morphology. **Infect. Immun.**, v. 67, p.120-125, 1999.

THANABALASURIAR, A.; KOUTSOURIS, A.; WEFLEN, A.; MIMEE, M.; HECHT, G.; GRUENHEID, S. The bacterial virulence factor NleA is required for the disruption of intestinal tight junctions by enteropathogenic *Escherichia coli*. **Cell. Microbiol.**, v. 12, p. 31-41, 2010.

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

TOMSON, F. L.; VISWANATHAN, V. K.; KANACK, K. J.; KANTETI, R. P.; STRAUB, K. V.; MENET, M.; KAPER, J. B.; HECHT, G. Enteropathogenic *Escherichia coli* EspG disrupts microtubules and in conjunction with Orf3 enhances perturbation of the tight junction barrier. **Mol. Microbiol.**, v. 56, p. 447-464, 2005.

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

TOWBIN, H.; STAEGELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

TRABULSI, L. R.; CAMPOS, L.; WHITTAM, T.; GOMES, T.A.; RODRIGUES, J.; GONÇALVES, A. Traditional and non-traditional enteropathogenic *Escherichia coli* serogroups. **Rev. Microbiol.**, v. 27, p. 1-6, 1996.

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

TSEN, H. Y.; JIAN, L. Z. Development and use of a multiplex PCR system for the rapid screening of heat labile toxin I, heat stable toxin II and shiga-like toxin I and II genes of *Escherichia coli* in water. **J. Appl. Microbiol.**, v. 84, n.4, p. 585-592, 1998.

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

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

VIDAL, J. E.; NAVARRO-GARCÍA, F. Efficient translocation of EspC into epithelial cells depends on enteropathogenic *Escherichia coli* and host cell contact. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 2293-2303, 2006.

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

VIEIRA, M. A., SALVADOR, F. A., SILVA, R. M., IRINO, K., VAZ, T. M., ROCKSTROH, A. C., GUTH, B. E., GOMES, T. A. Prevalence and characteristics of the O122 pathogenicity island in typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. **J. Clin. Microbiol.**, v. 48, n. 4, p. 1452-1455, 2010.

VILJANEN, M.; PELTOLA, T.; JUNNILA, S.; OLKKONEN, L.; JARVINEN, H.; KUISTILA, M.; HUOVINEN, P. Outbreak of diarrhoea due *Escherichia coli* O111:B4 in schoolchildren and adults: association of Vi antigen-like reactivity. **Lancet.**, v. 336, p. 381-384, 1990.

VINGADASSALOM, D.; KAZLAUSKAS, A.; SKEHAN, B.; CHENG, H.C.; MAGOUN, L.; ROBBINS, D.; ROSEN, M. K.; SAKSELA, K.; LEONG, J. M. Insulin receptor tyrosine kinase substrate links the *E. coli* O157:H7 actin assembly effectors Tir and EspF(U) during pedestal formation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 21, p. 6754-6759, 2009.

YAMAMOTO, D.; HERNANDES, R. T.; BLANCO, M.; GREUNE, L.; SCHMIDT, M. A.; CARNEIRO, S. M.; DAHBI, G.; BLANCO, J. E.; MORA, A.; BLANCO, J.; GOMES, T. A. Invasiveness as a putative additional virulence mechanism of some atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* strains with different uncommon intimin types. **BMC. Microbiol.**, v. 21, p. 139:146, 2009.

YATSUYANAGI, J.; SAITO, S.; SATO, H.; MIYAJIMA, Y.; AMANO, K.; ENOMOTO, K. Characterization of enteropathogenic and enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from diarrheal outbreaks. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 1, p. 294-297, 2002.

YATSUYANAGI, J.; SAITO, S.; MIYAJIMA, Y.; AMANO, K.; ENOMOTO, K. Characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains harboring the *astA* gene that were associated with a waterborne outbreak of diarrhea in Japan. **J. Clin. Microbiol.**, v. 5, p. 2033-2039, 2003.

WAINWRIGHT, L. A.; KAPER, J. B. EspB and EspD require a specific chaperone for proper secretion from enteropathogenic *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 27, p.1247-1260, 1998.

WALTERS, M.; SPERANDIO, V. Autoinducer 3 and epinephrine signaling in the kinetics of locus of enterocyte effacement gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 10, p. 5445-5455, 2006.

WEISS, S. M.; LADWEIN, M.; SCHMIDT, D.; EHINGER, J.; LOMMEL, S.; STÄDING, K.; BEUTLING, U.; DISANZA, A.; FRANK, R.; JÄNSCH, L.; SCITA, G.; GUNZER, F.; ROTTNER, K.; STRADAL, T. E. IRSp53 links the enterohemorrhagic *E. coli* effectors Tir and EspFU for actin pedestal formation. **Cell Host Microbe.**, v. 19, p. 244-258, 2009.

WELLS, J. G.; DAVIS, B. R.; WACHSMUTH, I. K.; RILEY, L. W.; REMIS, R. S.; SOKOLOW, R.; MORRIS, G. K. Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype., **J. Clin. Microbiol.** v. 18, p. 512-520, 1983

WHALE, A. D.; HERNANDES, R. T.; OOKA, T.; BEUTIN, L.; SCHÜLLER, S.; GARMENDIA, J.; CROWTHER, L.; VIERA, M. A. M.; OGURA, Y.; KRAUSE, G.;

PHILLIPS, A. D.; GOMES, T. A. T.; HAYASHI, T.; FRANKEL, G. TccP2-mediated subversion of actin dynamics by EPEC 2- a distinct evolutionary lineage of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Microbiol.**, v. 153, p. 1743-1755, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Programme for control of diarrheal diseases (CDD/83.3 Rev 1). Manual for laboratory investigations of acute enteric infections. Geneva, 1987.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Improving diarrhoea estimates. Child and adolescent health and development. World Health Organization, Geneva, 2002.

ZURAWSKI, D. V.; MUMY, K.; BADEA, L.; PRENTICE, J. A.; HARTLAND, E. L.; MCCORMICK, B. A.; MAURELLI, A. T. The NleE/OspZ family of effector proteins is required for polymorphonuclear transepithelial migration, a characteristic shared by enteropathogenic *Escherichia coli* and *Shigella flexneri* infections. **Infect. Immun.**, v. 76, p. 369-379, 2008.