

**FRANCIELY PAULA TONIOLO DE PAIVA**

***Quorum sensing em Escherichia coli***  
**enteropatogênica atípica**

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

**São Paulo**  
**2011**

**FRANCIELY PAULA TONIOLO DE PAIVA**

***Quorum sensing em *Escherichia coli****  
**enteropatogênica atípica**

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

**Área de Concentração: Biotecnologia**

**Orientador: Dr. Marcelo Palma Sircili**

**São Paulo  
2011**

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

reprodução não autorizada pelo autor

Paiva, Franciely Paula Toniolo de.

*Quorum sensing* em *Escherichia coli* enteropatogênica atípica /  
Franciely Paula Toniolo de Paiva. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Marcelo Palma Sircili.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: *Quorum sensing* em *Escherichia coli* enteropatogênica.

Versão do título para o inglês: Quorum sensing in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*.

Descritores: 1. *Escherichia coli* 2. *Quorum sensing* 3. AI-3  
4. EPEC atípica 5. Adesão 6. *E. coli* comensal I. Sircili, Marcelo Palma II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Butantan III. Título.

ICB/SBIB020/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia**

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

---

Candidato(a): Franciely Paula Toniolo de Paiva.

Título da Dissertação: Quorum sensing em *Escherichia coli* enteropatogênica atípica.

Orientador(a): Marcelo Palma Sircili.

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

( ) **Aprovado(a)**

( ) **Reprovado(a)**

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

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

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



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

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

*Comissão de Ética em Pesquisa*

## CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 435/10 referente ao projeto intitulado: “*Quorum sensing em Eschericia coli enteropatogênica atípica*” sob a responsabilidade de **Franciely Paula Toniolo de Paiva**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 23 de novembro de 2010.

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

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

**Aos meus amados pais e “paidrinhos”, Paulo, Silvana, Jorge e Nelcy, pelo exemplo de vida, incentivo e amor! Amo vocês!**

**Ao Thiago, meu amado noivo, pelo companheirismo, paciência e amor! Te Amo Príncipe!**

***DEDICO.***

## **AGRADECIMENTOS**

**À Deus, por sempre estar presente na minha vida, me iluminando, me mostrando os caminhos nas horas incertas, me amparando nos momentos difíceis e enchendo meus dias de luz.**

**Aos meus amados pais e “paidrinhos”, exemplos de vida e dedicação, pelo amor, incentivo, ensinamentos, paciência, sabedoria e por estarem sempre na arquibancada da minha vida.**

**Ao meu amado irmão Guilherme, pela amizade, carinho e amor.**

**Ao meu futuro marido Thiago, pelo companheirismo, paciência, amor, paciência, imensa ajuda, muita paciência (risos), dedicação e por sempre tornar os meus dias melhores.**

**Ao meu orientador Dr. Marcelo Palma Sircili pela oportunidade, conhecimentos adquiridos, amizade, confiança, por sempre aceitar meus “bicos” sem fazer cara feia e pelas tantas horas dedicadas a mim na realização deste trabalho.**

**Ao Dr. Osvaldo Sant’Anna por ter me acolhido com carinho no Instituto Butantan.**

**Aos pesquisadores do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, em especial a Dra. Marcia Regina Franzolin, Dra. Marta Domingos e Dra. Cecília Mari Abe, pela amizade, solicitude e conhecimentos.**

**Aos amigos e vizinhos de bancada, Tatiane Porangaba, Maurílio dos Santos, Fernanda Franzin e Juliana Higa, pelas palavras amigas, apoio, companhia e risadas.**

**Aos casais amigos Cris e Culler, Tati e Jardiel, Alê e Marcelo, Naty e Felipe pela amizade, apoio, risadas e momentos de descontração.**

**Aos funcionários do Laboratório de Bacteriologia: Regina, Demétria, Maria, Sebastiana, Juscelino, Reginaldo, Nadja e Maria Luiza por serem sempre solícitos.**

**A todos os pesquisadores, funcionários, estagiários, mestrandos, doutorandos e pós-doutorandos do Laboratório de Bacteriologia, inclusive os já citados, pela amizade e colaboração.**

**A todos aqueles que de forma direta ou indireta colaboraram para a realização deste trabalho.**

**À FAPESP pelo apoio financeiro.**

**Muito Obrigada!**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo: 2006/05906-4).



“Bom mesmo é ir à luta com determinação. Abraçar a vida e viver com paixão. Perder com classe e vencer com ousadia. Pois o triunfo pertence a quem mais se atreve... e a vida é muito para ser insignificante.”

*Charles Chaplin*

## RESUMO

PAIVA, F. P. T. **Quorum sensing em *Escherichia coli* enteropatogênica atípica.** 2011. 69 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

*Escherichia coli* enteropatogênica atípica (aEPEC) faz parte de um grupo de patógenos capazes de formar um tipo de lesão característica em cultura de tecidos epiteliais, denominada *attaching and effacing* (A/E). Os genes que são necessários para produção da lesão A/E estão localizados em uma ilha de patogenicidade denominada região LEE (*locus of enterocyte effacement*). A transcrição de genes da região LEE está sujeita a regulação por vários fatores, entre eles *quorum sensing*, termo utilizado para designar um mecanismo de regulação gênica dependente da concentração celular. Esse mecanismo é usado por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e em ambos os casos envolve a produção e detecção de moléculas sinalizadoras extracelulares, denominadas autoindutores. Até o momento, pelo menos quatro sistemas de *quorum sensing* foram descritos, entre eles o sistema de autoindutor AI-3 encontrado em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Diversos mecanismos celulares, entre eles a expressão de fatores de virulência em amostras de EPEC e EHEC, são regulados por esse fenômeno. O principal objetivo deste estudo foi verificar se existe uma possível regulação por *quorum sensing* na interação *in vitro* de uma amostra de *E. coli* da microbiota intestinal com amostras de aEPEC. Após a confirmação da produção de AI-3 por amostras de *E. coli* da microbiota intestinal foram realizados ensaios de adesão e quantificação utilizando meio pré-condicionado com esta amostra, epinefrina e bloqueadores que confirmaram que os padrões de adesão de aEPEC obtidos em menor tempo são devidos a presença de AI-3 no meio pré-condicionado, indicando a participação de *quorum sensing* nessa interação. Além disso, foi observado um fenômeno citotóxico nas células que não é produzido pelo AI-3.

**Palavras-Chave:** *Escherichia coli*. EPEC atípica. *Quorum sensing*. Adesão. AI-3.

## ABSTRACT

PAIVA, F. P. T. **Quorum sensing in atypical enteropathogenic *Escherichia coli***. 2011. 69 p. Masters thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) are part of a group of pathogens capable of forming a type of lesion characteristic of epithelial tissues in culture, called attaching and effacing (A/E). The genes that are required for production of A/E lesion are located in a pathogenicity island called LEE region (locus of enterocyte effacement). The transcription of LEE genes in the region is subject to regulation by various factors, including quorum sensing, a term used to describe a mechanism of gene regulation dependent on cell concentration. This mechanism is used by Gram-positive and Gram-negative and in both cases involves the production and detection of extracellular signaling molecules, called autoinducers. So far, four systems of quorum sensing have been described, including the system of autoinducers AI-3 found in Gram-positive and Gram-negative bacteria. Several cellular mechanisms, including expression of virulence factors in EPEC and EHEC are regulated by this phenomenon. The main objective of this study was to determine whether there is a possible regulation by quorum sensing in the in vitro interaction of *E. coli* strains of the intestinal microbiota with aEPEC strains. After the verification of production of AI-3 by *E. coli* of the intestinal microbiota, adherence and quantification assays were performed using preconditioned media obtained with this strains, epinephrine, and antagonists, confirming that the adherence patterns of aEPEC obtained in less time are due to the presence of AI-3 in the preconditioned media, indicating the involvement of quorum sensing in this interaction. Furthermore, we observed a cytotoxic effect in epithelial cells, and this damage is not produced by AI-3.

**Keywords:** *Escherichia coli*. Atypical EPEC. Quorum sensing. Adhesion. AI-3.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Padrões de adesão das ECD em células epiteliais.....	20
<b>Figura 2.</b> Padrão obtido nas ampliações de fragmentos de genes de virulência encontrados em amostras de <i>E. coli</i> diarreio gênicas.....	37
<b>Figura 3.</b> Padrão obtido na amplificação do gene <i>luxS</i> .....	38
<b>Figura 4.</b> Imagem de microscopia óptica em aumento de 1000X. Ensaio de co-cultura em células HEp-2,entre as amostras 3157 e Am9. Ensaio de 6h. DMEM foi utilizado como meio de cultivo.....	40
<b>Figura 5.</b> Imagem de microscopia óptica em aumento de 1000X. Ensaio de co-cultura em células HEp-2,entre as amostras 3157 e Am9. Ensaio de 6h. DMEM com 0,4% de glicose foi utilizado como meio de cultivo.....	41
<b>Figura 6.</b> Imagem de microscopia óptica em aumento de 1000X. Ensaio de co-cultura em células HEp-2,entre as amostras VS104 e Am9. Ensaio de 3h. DMEM foi utilizado como meio de cultivo.....	43
<b>Figura 7.</b> Ensaio de atividade de $\beta$ galactosidase em amostras de <i>E. coli</i> da microbiota intestinal.....	44
<b>Figura 8.</b> Imagem de microscopia óptica em aumento de 1000X. Ensaio de adesão em células HEp-2. Ensaio de 3h. DMEM e MPC da Am9 utilizados como meio de cultivo.....	46
<b>Figura 9.</b> Cinética da adesão em células HEp-2 da amostra 3157 (aEPEC) em meio DMEM com glicose acrescido de 100 $\mu$ M de epinefrina. Incubação de 30 minutos, 1h, 1h30, 2 h, 2h30 e 3h.....	47
<b>Figura 10.</b> Comparação da adesão em HEp-2 da amostra 3157 (aEPEC) em DMEM, MPC da Am9 e DMEM acrescido de epinefrina.....	48
<b>Figura 11.</b> Imagem de microscopia óptica em aumento de 1000X. Ensaio de adesão em células HEp-2 da amostra 3157 em diferentes meios de cultivo. Ensaio de 2h.....	49
<b>Figura 12.</b> Quantificação da adesão da amostra 3157 em DMEM, MPC da Am9, DMEM com epinefrina e MPC da Am9 com bloqueadores (fentolamina e propanolol).....	50
<b>Figura 13.</b> Quantificação da adesão da amostra 2145 em DMEM, MPC da Am9, DMEM com epinefrina e MPC da Am9 com bloqueadores (fentolamina e propanolol).....	50
<b>Figura 14.</b> Imagem de microscopia óptica em aumento de 1000X. Ensaio de adesão em células HEp-2 da amostra 3157 em diferentes meios de cultivo. Ensaio de 2h.....	51
<b>Figura 15.</b> Imagem de microscopia óptica em aumento de 1000X. Ensaio de adesão em células HEp-2 da amostra 2145 em diferentes meios de cultivo. Ensaio de 2h.....	52

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Amostras utilizadas neste estudo.....	25
<b>Tabela 2</b> - Genes utilizados neste estudo, sequência dos iniciadores, concentrações, tamanho dos fragmentos, controles positivos e referências.....	28
<b>Tabela 3</b> - Tratamentos dos ensaios de co-cultura em células HEp-2.....	31
<b>Tabela 4</b> - Tratamentos dos ensaios de adesão utilizando MPC.....	33
<b>Tabela 5</b> - Ensaios de adesão para a comparação da adesão em DMEM, DMEM acrescido de glicose e MPC.....	35
<b>Tabela 6</b> - Ensaios de adesão e quantificação com MPC, epinefrina e bloqueadores.....	36
<b>Tabela 7</b> - Padrão de sensibilidade e resistência a antimicrobianos.....	38

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
1.1 Microbiota intestinal.....	16
1.2 <i>Escherichia coli</i> .....	16
1.3 <i>Escherichia coli</i> diarreiogênica.....	17
1.4 <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica.....	17
1.5 Interação de EPEC com células epiteliais.....	20
1.6 <i>Quorum sensing</i> .....	21
<b>2 OBJETIVO.....</b>	<b>24</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
3.1 Amostras bacterianas.....	25
3.2 Meios de cultura e soluções.....	25
3.3 Pesquisa de genes de virulência em amostras de <i>E.coli</i> da microbiota intestinal.....	26
3.3.1 <i>Obtenção do DNA molde para reações em Cadeia da Polimerase (PCR)</i> .....	26
3.3.2 <i>Reação de Multiplex PCR</i> .....	26
3.3.3 <i>Eletroforese de DNA em gel de agarose</i> .....	26
3.4 Pesquisa do gene <i>luxS</i> em amostras de <i>E. coli</i> da microbiota intestinal.....	27
3.4.1 <i>Obtenção do DNA molde para PCR</i> .....	27
3.4.2 <i>Reação de PCR</i> .....	27
3.4.3 <i>Eletroforese de DNA em gel de agarose</i> .....	29
3.5 Antibiograma.....	29
3.5.1 <i>Antibióticos</i> .....	29

<b>3.5.2 Perfis de resistência aos antibióticos.....</b>	<b>29</b>
<b>3.6 Ensaios de co-cultura em células HEP-2.....</b>	<b>30</b>
<b>3.6.1 Cultivo e preparo da linhagem celular HEP-2.....</b>	<b>30</b>
<b>3.6.2 Ensaio de co-cultura.....</b>	<b>30</b>
<b>3.7 Preparação de Meio Pré-condicionado (MPC).....</b>	<b>32</b>
<b>3.8 Ensaio de Atividade de <math>\beta</math>galactosidase.....</b>	<b>32</b>
<b>3.9 Ensaio de adesão em células HEP-2 utilizando MPC.....</b>	<b>33</b>
<b>3.9.1 Cultivo e preparo da linhagem celular HEP-2.....</b>	<b>33</b>
<b>3.9.2 Ensaio de adesão.....</b>	<b>33</b>
<b>3.10 Cinética da adesão de aEPEC utilizando epinefrina.....</b>	<b>34</b>
<b>3.10.1 Cultivo e preparo da linhagem HEP-2.....</b>	<b>34</b>
<b>3.10.2 Ensaio de quantificação.....</b>	<b>34</b>
<b>3.11 Ensaios de adesão e quantificação em células HEP-2 para comparação entre DMEM, MPC e DMEM acrescido de epinefrina.....</b>	<b>34</b>
<b>3.11.1 Cultivo e preparo da linhagem HEP-2.....</b>	<b>35</b>
<b>3.11.2 Ensaio de adesão.....</b>	<b>35</b>
<b>3.11.3 Ensaio de quantificação.....</b>	<b>35</b>
<b>3.12 Ensaio de adesão e quantificação utilizando MPC, epinefrina e bloqueadores de AI-3.....</b>	<b>35</b>
<b>3.12.1 Cultivo e preparo da linhagem HEP-2.....</b>	<b>35</b>
<b>3.12.2 Ensaio de adesão.....</b>	<b>36</b>
<b>3.12.3 Ensaio de quantificação.....</b>	<b>36</b>
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
<b>4.1 Pesquisa de genes de virulência em amostras de <i>E.coli</i> da microbiota intestinal.....</b>	<b>37</b>
<b>4.2 Ocorrência do gene <i>luxS</i>.....</b>	<b>37</b>

<b>4.3</b>	<b>Antibiograma.....</b>	<b>38</b>
<b>4.4</b>	<b>Ensaio de co-cultura em células HEp-2.....</b>	<b>39</b>
<b>4.5</b>	<b>Ensaio de Atividade de <math>\beta</math>galactosidase.....</b>	<b>44</b>
<b>4.6</b>	<b>Ensaio de adesão em células HEp-2 utilizando MPC.....</b>	<b>44</b>
<b>4.7</b>	<b>Cinética da adesão de aEPEC utilizando epinefrina.....</b>	<b>47</b>
<b>4.8</b>	<b>Ensaio de adesão e quantificação em células HEp-2 para comparação entre DMEM, MPC e DMEM acrescido de epinefrina.....</b>	<b>47</b>
<b>4.9</b>	<b>Ensaio de adesão e quantificação utilizando MPC, epinefrina e bloqueadores de AI-3.....</b>	<b>49</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>60</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>61</b>



# 1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

## 1.1 Microbiota intestinal

A microbiota intestinal possui o número de bactérias dez vezes maior que o número de células que formam os nossos órgãos e tecidos. O número de bactérias intestinais é de  $10^{14}$ , enquanto que o de células humanas é de  $10^{13}$ . A composição da microbiota intestinal não é totalmente conhecida já que se calcula que pelo menos 40% das suas espécies ainda não foram cultivadas. Estima-se que a microbiota compreenda cerca de 500 espécies pertencentes a 200 gêneros, onde apenas 20 são representadas de maneira significativa. Dentre os componentes mais significativos estão: *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Fusobacterium*, *Streptococcus*, *Escherichia coli*, *Clostridium*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus* (GUARNER; MALAGELADA, 2003; TANNOCK, 1999).

## 1.2 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* é uma espécie bacteriana bastante diversificada em seus aspectos bacteriológicos, ecológicos e patogênicos. Foi descrita em 1885 pelo pediatra alemão Theodor Escherich e primeiramente denominada de *Bacterium coli commune* (ESCHERICH, 1885). Porém, em 1919, após uma revisão da literatura, a espécie foi renomeada para *Escherichia coli* em referência ao pesquisador que a descobriu (CHEN; FRANKEL, 2005).

*E. coli* pertence a família Enterobacteriaceae que compreende um grande e heterogêneo grupo de micro-organismos Gram-negativos, facultativos, que habita o trato intestinal de seres humanos e de outros animais (EWING, 1986). Representantes desta espécie são dos primeiros a colonizarem o trato gastrointestinal humano e, após a colonização, permanecem como membros da nossa microbiota intestinal (GUARNER; MALAGELADA, 2003).

Contudo, apesar de fazerem parte da microbiota intestinal do homem e de outros animais, variedades de *E. coli*, devido a aquisição de fatores de virulência por transferência horizontal, são patogênicas ao homem e aos animais domésticos. Estas amostras patogênicas podem causar infecções intestinais e extraintestinais.

As *E. coli* causadoras de infecção intestinal são denominadas *E. coli* diarreio gênicas (ECD) (NATARO; KAPER, 1998).

### 1.3 *Escherichia coli* diarreio gênica

A diarreia infecciosa é considerada, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002), um dos grandes problemas de saúde pública mundial, sendo responsável por mais de 2 milhões de mortes a cada ano em crianças abaixo de 5 anos de idade, principalmente em países em desenvolvimento. Dentre os agentes infecciosos bacterianos mais frequentes nos casos de diarreia, estão ECD, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *Yersinia enterocolitica* e *Campylobacter jejuni*.

Atualmente, as ECD são classificadas em seis categorias ou patótipos: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* de aderência difusa (DAEC). Esta classificação tem como base mecanismos de patogenicidade, sintomas da infecção, sorotipos O:H, características epidemiológicas e padrão de adesão às células epiteliais em cultura de tecido (NATARO; KAPER, 1998). Apesar da maioria dos autores considerarem as seis categorias ou patótipos de *E. coli* diarreio gênica, existem estudos que apresentam amostras com características próprias que não se encaixam em nenhuma das categorias descritas. Sendo assim, EPEC e EAEC foram subdivididas em típicas e atípicas e EHEC passou a constituir uma subcategoria de STEC (*E. coli* produtora de toxina de Shiga – stx) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

### 1.4 *Escherichia coli* enteropatógena

EPEC, denominação dada por Neter et al. (1955), são importantes causadoras de diarreia em crianças de 0 a 1 ano de idade em países em desenvolvimento (ALBERT et al., 1995; ALBERT, 1996; TORRES et al., 2001). No Brasil, estudos epidemiológicos demonstraram que EPEC é o enteropatógeno mais encontrado em casos de diarreia em crianças de 0 a 1 ano de idade, ocorrendo em cerca de 30% dos casos (TRABULSI et al., 1961; TOLEDO et al., 1983 ; GOMES et al., 1991).

Em 1995, as EPEC foram divididas em dois grupos, EPEC típica (tEPEC) e EPEC atípica (aEPEC). As tEPEC são capazes de formar uma lesão histopatológica característica no epitélio intestinal, denominada *attaching and effacing* (A/E), possuem o gene *eae* (*EPEC attaching and effacing*), não expressam a toxina de Shiga (Stx) e possuem o plasmídeo EAF (*EPEC adherence factor*), que contém os genes que codificam a fímbria BFP (*Bundle-Forming Pilus*). Já as aEPEC, são capazes de formar a lesão A/E, não expressam a toxina Stx, possuem o gene *eae*, mas não são portadoras do plasmídeo EAF (KAPER, 1996). Além disso, alguns sorotipos de aEPEC podem apresentar fatores de virulência adicionais como EAST-1 (*enteroaggregative E. coli heat-stable toxin*) e E-hly (*EHEC hemolysin*). Até o momento não foi descrito nenhum fator de virulência exclusivo de aEPEC (CAMPOS et al. 1994; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002).

As aEPEC estão entre os principais agentes de diarreia no Brasil e em outros países (SMITH et al., 1996; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002; AFSET; BERGH; BEVANGER, 2003; FRANZOLIN et al., 2005; BUERIS et al., 2007; OCHOA et al., 2008). Estudos epidemiológicos recentes têm demonstrado um aumento do número de aEPEC em relação às tEPEC em números de casos (AFSET; BERGH; BEVANGER, 2003; AFSET et al., 2004; FRANZOLIN et al., 2005; BUERIS et al., 2007) indicando as aEPEC como patógenos emergentes.

Recentemente, Moura et al. (2009) estudaram a relação entre amostras de tEPEC e aEPEC isoladas de humanos e várias espécies de animais. Esses autores sugeriram que animais podem ser reservatórios de aEPEC e podem ser fontes de infecção por aEPEC em humanos.

Como revisado anteriormente, tanto aEPEC quanto tEPEC fazem parte de um grupo de patógenos capazes de formar um tipo de lesão característica em cultura de tecidos epiteliais, denominada A/E. A lesão A/E é caracterizada pela destruição das microvilosidades intestinais, aderência íntima da bactéria à célula epitelial, polimerização dos filamentos de actina e reorganização das proteínas do citoesqueleto dos enterócitos, culminando na formação de um pedestal no qual a bactéria se adere intimamente (ROTHBAUM et al., 1982; MOON et al., 1983). O modelo proposto para patogenicidade de amostras de EPEC possui três estágios: aderência localizada, transdução de sinal e aderência íntima (NATARO; KAPER, 1998).

Os genes necessários para formação da lesão A/E estão localizados em uma ilha de patogenicidade denominada região LEE (*locus of enterocyte effacement*) (MCDANIEL et al., 1995). LEE está ausente em amostras de *E. coli* comensais, em ETEC, EAEC e DEAC, mas está presente em amostras de EPEC, EHEC, *Citrobacter rodentium*, amostras diarreiogênicas de *Hafnia alvei* e em várias amostras de *E. coli* associadas a diarreia e outras infecções entéricas em coelhos, porcos, bezerros e cachorros (NATARO; KAPER, 1998).

A região LEE é composta por 41 genes e dividida funcionalmente em cinco regiões, denominadas LEE1, LEE2, LEE3, LEE4, LEE5 (MELLIES et al., 1999). Nos operons LEE1, LEE2 e LEE3, encontram-se os genes *esp* e *sep* (“EPEC secreted proteins” e “Secretion of Extracellular proteins”) que codificam o sistema de secreção do tipo III, e o gene *ler* (“LEE-encoded regulator”), que regula positivamente os genes localizados em LEE (ELLIOTT et al., 2000), no operon LEE4 encontram-se os genes que codificam as proteínas Esp e no operon LEE5, os genes da intimina (*eae*) e de seu receptor, *translocated intimin receptor (tir)* (ELLIOTT et al., 1998).

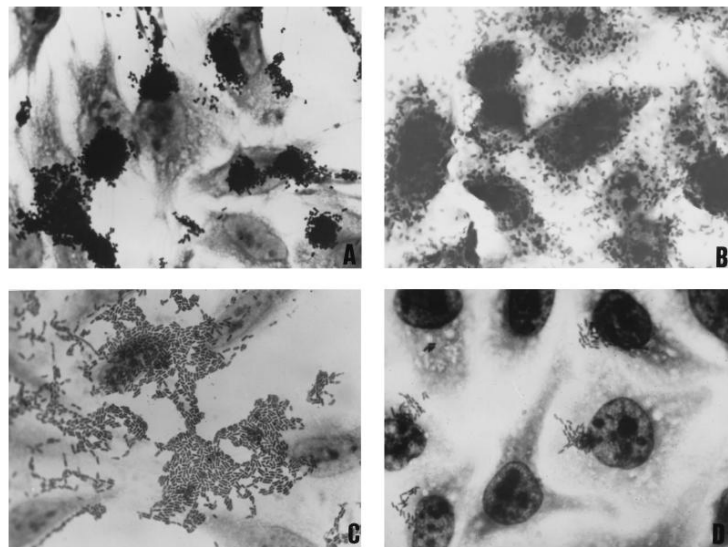
Durante a lesão A/E, a proteína de membrana externa intimina, codificada pelo gene *eae*, é responsável pela íntima aderência da bactéria à membrana da célula. A proteína Tir, produzida e translocada pela própria EPEC, se liga à membrana celular e atua como um receptor para intimina. Proteínas secretadas da família Esp (EspA, EspB, EspD e EspF) também são essenciais à patogênese de EPEC (TRABULSI; KELLER; GOMES; 2002).

O plasmídio EAF contém o operon *bfp*, que codifica a fímbria do tipo IV, denominada BFP, que é responsável pela interação inter-bacteriana e adesão localizada (AL) das EPEC à célula hospedeira, levando à formação de microcolônias (GIRÓN et al., 1991). O plasmídio EAF apresenta também o operon *per* que codifica um ativador transcricional denominado *plasmid encoded regulator* (Per) (GÓMEZ-DUARTE; KAPER, 1995). Per ativa a expressão de intimina e do gene *bfpA* (MELLIES et al., 1999) e ativa a expressão do gene cromossômico *ler*, disparando uma cascata de expressão e ativando os operons LEE2, LEE3, LEE4 e LEE5. A transcrição de genes da região LEE também está sujeita a regulação por *quorum sensing* (SPERANDIO et al., 1999).

### 1.5 Interação de EPEC com células epiteliais

Amostras de tEPEC, após 3h de interação bactéria-célula epitelial, apresentam um padrão de adesão característico em células epiteliais, caracterizado pela formação de microcolônias aderidas a determinadas regiões da superfície celular. Este padrão de adesão denomina-se adesão localizada (AL) (SCALETSKY et al., 1984). A fímbria BFP promove ligações de uma bactéria à outra, o que resulta na formação das microcolônias que caracterizam o padrão AL (GIRÓN et al., 1991). Amostras de aEPEC apresentam um padrão semelhante ao AL, denominado adesão localizada-like (ALL). Este padrão de adesão caracteriza-se pela formação de microcolônias frouxas das bactérias sobre determinadas regiões da superfície celular, observado após 6 h de interação bactéria-célula epitelial (RODRIGUES et al., 1996; PELAYO et al., 1999; SCALETSKY et al., 1999; VIEIRA et al., 2001; DULGUER et al., 2003; GOMES et al., 2004; ABE et al., 2009).

As aEPEC, além do padrão ALL, apresentam ainda outros padrões de adesão: adesão difusa (AD), adesão agregativa (AA), algumas amostras são incapazes de se aderir às células epiteliais, não aderentes (NA), e amostras cujo padrão de adesão é considerado indeterminado (IND) (VIEIRA et al., 2001; DULGUER et al., 2003; NUNES et al., 2003; ROBINS-BROWNE et al., 2004; ABE et al., 2009).



**Figura 1.** Padrões de adesão das ECD em células epiteliais. (A) Padrão AL; (B) Padrão AD; (C) Padrão AA; (D) Padrão ALL.  
Fonte: Scaletsky et al. (1999).

## 1.6 Quorum sensing

*Quorum sensing* ou controle da expressão gênica através da densidade celular, é usado tanto por bactérias Gram-negativas, quanto por Gram-positivas para a regulação de diversas funções fisiológicas. Em ambos os casos, esse mecanismo envolve a produção e detecção de moléculas sinalizadoras extracelulares denominadas autoindutores (BASSLER, 1999).

Este mecanismo foi descrito inicialmente nos anos 70 em estudo da expressão de bioluminescência dependente da densidade celular com amostras de um simbiote marinho *Vibrio fischeri* e uma espécie próxima de vida livre *Vibrio harveyi*, que apresentam o fenômeno da bioluminescência. Demonstrou-se que a bioluminescência só começa a ficar evidenciada a partir de uma determinada fase do crescimento (NEALSON; PLATT; HASTINGS, 1970). Ambas as espécies são capazes de produzir e apresentar resposta para os autoindutores que se acumulam no meio em que as células estão crescendo e quando a concentração deste autoindutor atinge um determinado valor, inicia-se uma transdução de sinal em cascata que resulta na produção de luciferase (HASTINGS; GREENBERG, 1999; BASSLER, 1999).

Desde sua descrição inicial em *V. fischeri*, *quorum sensing* tem sido reconhecido como regulador de uma larga escala das atividades de diversas bactérias, incluindo a produção de biofilme e a expressão dos genes de virulência em *Pseudomonas aeruginosa*, produção de antibiótico por *Erwinia carotovora* e a expressão dos genes de virulência de inúmeros patógenos, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* e *E. coli* diarreogênicas (TAGA; BASSLER, 2003; MILLER; BASSLER, 2001; KIEVIT; IGLEWSKI, 2000).

Muitos patógenos detectam sinais originários de outras bactérias presentes, por exemplo, na microbiota intestinal do hospedeiro. Esses sinais indicam ao patógeno que ele se encontra em um local apropriado para a colonização e então a expressão de fatores de virulência é iniciada (PARKER; SPERANDIO, 2009).

Até o momento, pelo menos quatro sistemas de *quorum sensing* foram descritos: dois destes sistemas, os quais utilizam autoindutor-1 (AI-1) e autoindutor-3 (AI-3), são encontrados em bactérias Gram-negativas, enquanto bactérias Gram-positivas utilizam um sistema de autoindução polipeptídico (AIP). O quarto sistema utiliza autoindutor-2 (AI-2), é encontrado em bactérias Gram-positivas e Gram-

negativas. Todos estes sistemas iniciam-se com a produção e liberação dos autoindutores no ambiente, seja pelo patógeno ou pela microbiota residente. A detecção destes autoindutores, quimicamente distintos, e as consequentes alterações na expressão gênica, são específicas para cada sistema (PARKER; SPERANDIO, 2009).

O sistema que tem a participação do autoindutor AI-1 já foi bem descrito; tem a participação de genes que possuem homologia com LuxI e LuxR. LuxI sintetiza uma molécula de Homoserinalactona (AHL) chamada AI-1, e LuxR é um fator de transcrição, responsável por controlar expressão gênica na presença do autoindutor (FUQUA; WINANS; GREENBERG, 1994).

O sistema que tem a participação do autoindutor AI-2 já foi identificado em 285 espécies de bactérias, entre elas *Salmonella enterica*, *E. coli*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia* sp., entre outras (WALTERS; SIRCILI; SPERANDIO, 2006; NCBI, 2010). O gene responsável pela sua produção foi identificado como *luxS* (SURETTE; BASSLER, 1999) e a molécula produzida como autoindutor identificada como um furanosil diéster borato (CHEN et al., 2002). A molécula de AI-2 é produzida a partir de S-adenosilmetionina (SAM). A enzima LuxS participa da clivagem de S-ribosil homocisteína, formando dois produtos, uma homocisteína e AI-2. SAM é um precursor comum tanto para Homoserinalactona (AI-1) como para AI-2 (SCHAUDER et al., 2001).

Em amostras de *Vibrio harveyi*, o receptor para AI-2 é uma proteína de membrana denominada LuxP, que reconhece AI-2 e forma um complexo desencadeando uma reação em cascata que causa a ativação do operon da luciferase (BASSLER et al., 1993).

Dos três sistemas de *quorum sensing* presentes em Gram-negativos, o sistema AI-3 é o menos estudado. AI-3 foi descrito, inicialmente, como um composto encontrado em meios pré-condicionados que controla a expressão dos genes de virulência em EHEC. A estrutura e a síntese deste sinalizador não são totalmente conhecidas, sabe-se apenas que o AI-3 é um composto aromático cuja estrutura final ainda não é conhecida. Estudos demonstraram que AI-3 é semelhante aos hormônios epinefrina e noroepinefrina; isso porque o mesmo receptor de EHEC reconhece os três sinais que ativam seus fatores de virulência. Estudos demonstram ainda que os efeitos da ativação dos fatores de virulência causados por estes três sinais podem ser bloqueados com o uso de propanolol e fentolamina (SPERANDIO

et al., 2003). AI-3, epinefrina e noroepinefrina são reconhecidos pelo receptor QseC (CLARKE et al., 2006).

Inicialmente foi sugerido que *luxS* estava envolvido na síntese de AI-3 porque amostras mutantes para o gene *luxS* tiveram a produção de AI-3 alterada. Estudos posteriores demonstraram que a produção de AI-3 em *E. coli* é independente de *luxS*. Este estudo constatou também que AI-3 é produzido tanto por bactérias comensais, como *E. coli* não patogênica, quanto por patogênicas, como *Shigella* e *Salmonella* (WALTERS; SIRCILI; SPERANDIO, 2006). O papel do AI-3 nas bactérias comensais ainda não foi determinado.

A detecção de AI-3 é realizada através de um sistema de dois componentes composto por um sensor quinase, QseC, e um regulador da resposta, QseB. Na presença de AI-3, QseC se autofosforila e, em seguida, transfere seu fosfato para QseB ativando uma cascata de sinais que culmina na transcrição de genes, como por exemplo, genes de virulência em EHEC (CLARKE et al., 2006).

Homólogos de QseC estão presentes em pelo menos 25 importantes patógenos humanos e vegetais. (RASKO et al., 2008).

Com a possibilidade de comunicação entre as bactérias, uma nova maneira de analisar a expressão gênica deve ser utilizada, já que amostras com genes que normalmente não seriam expressos podem ter sua expressão possível através da presença de substâncias produzidas por outras bactérias e até mesmo pelos hospedeiros. Por exemplo, uma amostra que normalmente não expressa patogenicidade pode ter sua patogenicidade sendo expressa com a utilização de substâncias produzidas por amostras presentes na microbiota intestinal. Em contraponto, o inverso também pode ocorrer, ou seja, com a participação de amostras presentes na microbiota intestinal, algum mecanismo de patogenicidade pode ser anulado.

A necessidade de se pesquisar novas alternativas no tratamento de infecções que não gerem resistência a antimicrobianos nos leva a buscar o entendimento dos mecanismos de *quorum sensing* para utilizar a regulação da expressão gênica para finalidades terapêuticas.

Recentemente, um estudo realizado por Rasko et al. (2008) identificou uma molécula capaz de se ligar ao receptor de AI-3, bloqueando assim a expressão de fatores de virulência de EHEC, *Salmonella* e *Francisella*.



## 2 OBJETIVO

O principal objetivo deste estudo foi verificar se existe uma possível regulação por *quorum sensing* na interação *in vitro* de uma amostra de *E. coli* da microbiota intestinal com amostras de aEPEC.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Amostras bacterianas

As amostras bacterianas de aEPEC, bem como os controles positivos e negativos para as reações de multiplex PCR e PCR utilizadas neste estudo, fazem parte da coleção do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan (São Paulo, SP, Brasil). As amostras de *E. coli* da microbiota intestinal, gentilmente cedidas pela Dra Antônia Maria de O. Machado, são provenientes de pacientes do Hospital São Paulo (HSP). E além das amostras já citadas foram utilizadas as amostras TEVS232 e VS104 gentilmente cedidas pela Dra Vanessa Sperandio (UTSouthWestern Medical Center, Dallas). Todas as amostras referidas estão descritas na tabela 1.

**Tabela 1-** Amostras utilizadas neste estudo.

Amostra	Característica	Origem ou referência
E2348/69	Protótipo de tEPEC, sorotipo O127:H6	LEVINE et al. 1978
EDL933	Protótipo de EHEC, sorotipo O157:H7	WELLS et al. 1983
042	EAEC, sorotipo O44:H18	NATARO et al. 1985
H10407	Protótipo de ETEC, sorotipo O78:H11	EVANS et al. 1978
C275/15	Protótipo de ETEC	MOSELEY et al. 1983
DH5 $\alpha$	<i>E. coli</i> K12	HANAHAN, 1983
TEVS232	Amostra repórter contendo fusão <i>LEE1::lacZ</i>	Dra. Vanessa Sperandio
Am9	<i>E. coli</i> comensal	HSP
Am36	<i>E. coli</i> comensal	HSP
EC2	<i>E. coli</i> comensal	HSP
EC17	<i>E. coli</i> comensal	HSP
3157	aEPEC, sorotipo O119:H2, adesão ALL	BUERIS et al., 2007
714	aPEC, sorotipo O111:H-, adesão ALL	BUERIS et al., 2007
2145	a-EPEC, sorotipo O105:H7, adesão AA	BUERIS et al., 2007
VS104	Amostra VS102(t-EPEC <i>luxS</i> ) com plasmídio contendo gene <i>luxS</i>	Dra. Vanessa Sperandio

#### 3.2 Meios de cultura e soluções

Todos os meios de cultura utilizados para o cultivo e manutenção das amostras bacterianas e celulares, assim como as soluções utilizadas nas diversas técnicas a seguir, foram preparadas de acordo com Sambrook et al. (1989), conforme as recomendações do fabricante ou conforme a literatura.

### **3.3 Pesquisa de genes de virulência em amostras de *E.coli* da microbiota intestinal**

Com a utilização de reação de multiplex PCR foi realizado o estudo da presença de genes de virulência pertencentes aos principais patótipos de *E. coli* diarreio gênica em amostras de *E. coli* da microbiota intestinal para confirmar que estas amostras são comensais.

#### **3.3.1 Obtenção do DNA molde para reações em Cadeia da Polimerase (PCR)**

O DNA molde foi obtido da seguinte maneira: uma alçada do crescimento bacteriano obtida a partir do cultivo em ágar Luria-Bertani (LBA) foi transferida para um tubo “ependorf” contendo 400µL de água MilliQ estéril, submetida à incubação a 100 °C por 10 minutos, seguida de incubação a 0 °C por mais 10 minutos.

#### **3.3.2 Reação de Multiplex PCR**

Nesta reação de multiplex PCR foram analisados os seguintes genes: *eae*, *aa*, *stx*, *lt* e *st*. A reação foi preparada em um volume final de 50µL, da seguinte maneira: tampão de PCR 1X Tris-HCL, (pH 8,2), 0,2mM de cada dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 2,5U de *Taq DNA polimerase* (Invitrogen, EUA), 2µL de DNA molde, água MilliQ estéril qsp 50µL e iniciadores nas concentrações indicadas na tabela 2. A reação foi realizada nas seguintes condições: denaturação inicial a 94 °C por 9 minutos; 35 ciclos de denaturação a 94 °C por 45 segundos, anelamento a 50 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 2 minutos e 15 segundos; extensão final a 72 °C por 9 minutos. Após a amplificação em termociclador (GeneAmp® PCR System 9700), 10µL de cada reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose conforme o próximo item.

#### **3.3.3 Eletroforese de DNA em gel de agarose**

Os géis de agarose foram preparados por aquecimento, dissolvendo-se a agarose (Invitrogen, EUA) em tampão TAE 1X (40mM Tris-acetato, 2mM ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA)) na concentração final de 2%. Aplicou-se no gel

10µL da reação de PCR de cada amostra acrescido de 2 µL do tampão de corrida 6x (0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xileno cianol, 30% de glicerol). Foi utilizado como marcador de peso molecular o *1kb DNA ladder* (Invitrogen, EUA). A corrida eletroforética foi realizada sob corrente constante de 80V em tampão TAE 1X. Após a corrida, os géis foram corados em solução de brometo de etídio 0,5µg/mL, observados em transiluminador de luz ultravioleta e as imagens foram registradas através do sistema de captação de imagem Alphamager™ 2200 (Alpha Innotech, EUA).

### **3.4 Pesquisa do gene *luxS* em amostras de *E. coli* da microbiota intestinal**

Através de reação de PCR foi realizado o estudo da presença do gene *luxS* em amostras de *E. coli* da microbiota intestinal.

#### **3.4.1 Obtenção do DNA molde para PCR**

Conforme descrito no item 3.3.1.

#### **3.4.2 Reação de PCR**

A reação foi preparada conforme o item 3.3.2, porém nas seguintes condições: denaturação inicial a 94 °C por 9 minutos; 30 ciclos de denaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 60 °C por 45 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto e 30 segundos; extensão final a 72 °C por 7 minutos. As sequências dos iniciadores e concentrações, assim como o tamanho do fragmento obtido, encontram-se descritos na tabela 2. Para confirmação do genótipo *luxS* a amostra DH5α foi utilizada como controle negativo

**Tabela 2** - Genes utilizados neste estudo, sequência dos iniciadores, concentrações, tamanho dos fragmentos, controles positivos e referências.

<b>Gene</b>	<b>Sequência 5' – 3'</b>	<b>Concentrações (<math>\mu</math>mol)</b>	<b>Tamanho do fragmento (pb)</b>	<b>Controle positivo</b>	<b>Referência</b>
<b>eae</b>	CCGGAATTCGGGATCGATTACCGTCAT	60	820	E2348/69	BATCHELOR et al., 1999
<b>aa</b>	CCAAGCTTTTATTTATCAGCCTTAATCTC CTGGCGAAAGACTGTATCAT	20	630	042	SCHMIDT et al., 1995
<b>stx</b>	CAATGTATAGAAATCCGCTGTT GAACGAAATAATTTATATGT	55	500	EDL933	YAMASAKI et al.,1996
<b>lt</b>	TTTGATTGTTACAGTCAT GGCGACAGATTATACCGTGC	20	696	H10407	SCHULTSZ et al., 1994
<b>st</b>	CCGAATTCTGTTATATATGTC TCCCTCAGGATGCTAAAC	20	240	C275/15	MOSELEY et al., 1983
<b>luxS</b>	GCAACAGGTACATACGTT GTCGACGCCGCTGATACCGAACCG GTCGACGCHHTGCGCACTAAGTACAA	40	800	EDL933	SPERANDIO et al., 1999

### **3.4.3 Eletroforese de DNA em gel de agarose**

Os géis de agarose foram preparados conforme item 3.3.3, porém na concentração final de 0,8%.

## **3.5 Antibiograma**

Com a utilização de antibiograma foi realizado o estudo do padrão de sensibilidade e resistência a antimicrobianos de duas amostras de *E. coli* da microbiota intestinal e de amostra de aEPEC com o objetivo de encontrar um antimicrobiano que possibilitasse a diferenciação entre amostra de aEPEC e das amostras de *E. coli* da microbiota intestinal, ou seja, encontrar um antimicrobiano que a amostra de aEPEC apresentasse resistência e que a amostra de *E. coli* da microbiota intestinal não apresentasse, isso para uma possível quantificação de ensaios de co-cultura.

### **3.5.1 Antibióticos**

Foram utilizados discos comerciais (Cefar, Brasil) dos seguintes antimicrobianos nas concentrações correspondentes: Ácido Nalidixico, 30µg (Nal); Amoxicilina-Ácido Clavulânico, 30µg (Amc); Ampicilina, 10µg (Amp); Cefalotina, 30µg (Cfl); Ceftazidima, 30µg (Caz); Ceftriaxona, 30µg (Cro); Ciprofloxacina, 5µg (Cip); Cloranfenicol, 30µg (Clo); Estreptomicina, 10µg (Est); Gentamicina, 10µg (Gen); Cotrimoxazol (Sulfametoxazol e Trimetoprima), 25µg (Sut); Tetraciclina, 30µg (Tet).

### **3.5.2 Perfis de resistência aos antibióticos**

As amostras bacterianas foram inoculadas em caldo Tripticaseína de Soja (TSB) a 37 °C, por aproximadamente 18h. No dia seguinte, os crescimentos bacterianos foram isolados em ágar Tripticaseína de Soja (TSA) e incubados a 37 °C, por aproximadamente 18h. Após esse período, foram selecionadas 3 colônias da amostra sob teste e suspensas em 3mL de caldo TSB. Após 15 minutos do ajuste da turbidez do caldo inóculo, foi introduzido um swab pressionando-o nas paredes do tubo para remover o excesso do caldo. O swab então foi esfregado sobre o meio

ágar Mueller-Hinton. Em seguida os discos de antibióticos foram depositados na superfície da placa com uma distância de 24mm de centro a centro. A placa foi incubada a 37 °C por 18h. Após a incubação, foi feita a leitura medindo-se o diâmetro da zona de inibição incluindo o diâmetro do disco. Foram comparados os diâmetros das zonas de inibição àqueles específicos da Tabela Padrão (BAUER et al., 1966).

### **3.6 Ensaios de co-cultura em células HEp-2**

#### **3.6.1 Cultivo e preparo da linhagem celular HEp-2**

As células HEp-2 foram cultivadas em garrafas de 25mL (TPP, suíça) contendo D-MEM (Meio mínimo essencial de Eagle, modificado por Dulbeco, Cultilab, Brasil) enriquecido com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), (Cultilab, Brasil), em estufa de CO<sub>2</sub> 5% a 37 °C (CO<sub>2</sub> Water Jacketed Incubator, Forma Scientific Inc., EUA) até a formação de uma monocamada com 100% de confluência. Esta monocamada foi lavada com PBS 1X (solução tampão salina-fosfato – cloreto de sódio 137mM; cloreto de potássio 2,7mM; fosfato de sódio dibásico 8,1mM; fosfato de potássio monobásico 1,5mM; pH 7,4) estéril e tripsinizada com 2mL de tripsina (solução tripsina / EDTA 2,5g/L). Após o deslocamento da monocamada, esta foi ressuspendida em meio D-MEM mais 10% de SFB para contagem das células em câmara de Neubauer (Glastécnica). Volumes de 1mL foram transferidos para placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro, com a concentração de 5x10<sup>4</sup> células/mL e estas foram mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> 5%, a 37 °C por 48h até que atingissem 75% de confluência de crescimento celular.

#### **3.6.2 Ensaio de co-cultura**

As placas de 24 poços, após a formação da monocamada, foram lavadas por 6 vezes com PBS 1X estéril e 1mL de meio de cultivo, conforme os tratamentos abaixo (**tabela 3**), foi adicionado a cada poço da placa. Posteriormente, 50µL de cultura bacteriana, mantida por 18h em caldo LB, foram adicionados à preparação e mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> 5% a 37 °C por 3 e/ou 6h, conforme os tratamentos. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata. Após o período de incubação,

as placas foram lavadas por 6 vezes com PBS 1X estéril para retirar as bactérias não aderidas. Foi feita então a fixação com metanol 100% por 20 minutos a temperatura ambiente e depois a coloração com solução Giemsa (Merck, Alemanha), diluída na razão 1:3 em tampão Sorensen por 20 minutos. As lamínulas foram lavadas em água corrente para retirar o excesso de corante, secas a temperatura ambiente e montadas em lâminas para microscopia com Entellan (Merck, Alemanha). As lâminas foram observadas em microscópio óptico em aumento de 1000 vezes e fotografadas.

**Tabela 3** - Tratamentos dos ensaios de co-cultura em células HEp-2.

Tratamento	Tempo de incubação	Meio de cultivo*	Amostra bacteriana	Ordem de incubação	Lavagem com PBS** na metade do tempo
A	6h	DMEM + 2% SFB	3157	-	Não
B	6h	DMEM + 2% SFB	Am9	-	Não
C	6h	DMEM + 2% SFB	3157 e Am9	3h 3157 + 3h Am9	Sim
D	6h	DMEM + 2% SFB	3157 e Am9	3h 3157 + 3h Am9	Não
E	6h	DMEM + 2% SFB	3157 e Am9	3h Am9 + 3 3157	Sim
F	6h	DMEM + 2% SFB	3157 e Am9	3h Am9 + 3h 3157	Não
G	3h	DMEM + 2% SFB	VS104	-	Não
H	3h	DMEM + 2% SFB	Am9	-	Não
I	3h	DMEM + 2% SFB	VS104 e Am9	1h30 VS104 + 1h30 Am9	Sim
J	3h	DMEM + 2% SFB	VS104 e Am9	1h30 VS104 + 1h30 Am9	Não
L	3h	DMEM + 2% SFB	VS104 e Am9	1h30 Am9 + 1h30 VS104	Sim
M	3h	DMEM + 2% SFB	VS104 e Am9	1h30 Am9 + 1h30 VS104	Não

\* Os mesmos tratamentos foram realizados com o seguinte meio de cultivo: DMEM suplementado com 0,4% de glicose + 2% de SFB.

\*\* A lavagem foi feita com PBS 1X estéril. Nos tratamentos em que houve a lavagem, foi acrescentado 1mL de meio de cultivo.



### 3.7 Preparação de Meio Pré-condicionado (MPC)

As amostras de *E. coli* da microbiota intestinal foram cultivadas a 37 °C com agitação de 250rpm em meio LB 0,4M NaCl (bacto triptona 10g/L; extrato de levedura 5g/L e NaCl 22g/L, pH 7,2) e/ou D-MEM suplementado com 0,4% de glicose, até atingir DO<sub>600</sub> entre 0,8 e 1,0. O crescimento foi centrifugado a 8000rpm por 10min e o sobrenadante filtrado com a utilização de filtros de celulose com poros de 0.22µm (TPP, Suíça) (SURETTE; BASSLER, 1999).

Os MPC produzidos a partir de LB 0,4M NaCl foram utilizados nos ensaios de atividade de βgalactosidase e os produzidos com DMEM suplementado com 0,4% de glicose nos ensaios de adesão em células HEp-2.

### 3.8 Ensaio de Atividade de βgalactosidase

Foram realizados ensaios de atividade de βgalactosidase para verificar a produção de autoindutor 3 pelas amostras de *E. coli* da microbiota intestinal.

A amostra TEVS232 contendo a fusão *LEE1::lacZ* foi inoculada nos meios de cultura pré-condicionados, preparados em meio LB 0,4M NaCl, e foi medida a atividade de βgalactosidase. A amostra foi inoculada em 3mL do meio pré-condicionado e incubada a 37 °C com agitação de 250rpm até atingir DO<sub>600</sub> < 0,2. Após esse período, as amostras foram incubadas em gelo por aproximadamente 20 minutos. Foi feita a transferência de 100µL do crescimento para um tubo contendo 900µL de tampão Z (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 0,06M/ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O 0,04M/ KCl 0,01M/ MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 0,001M/ βmercaptoetanol 0,05M, pH7,0). Para ruptura das células foi adicionada uma gota de SDS 10% e duas gotas de clorofórmio. Após a homogeneização e a ruptura celular (aproximadamente 5 minutos) foram adicionados 200µL de uma solução de ONPG orto nitrophenil βgalactopranosideo (ONPG) 4mg/mL, em tampão fosfato 0,1 M (Solução A: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O + Solução B: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O, pH 7,2) e feita incubação a temperatura ambiente. A reação foi monitorada por 15 minutos até o aparecimento de uma coloração amarelada e então foi interrompida com a adição de 500µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M. Foi feita então a transferência para microtubos de polipropileno, centrifugação a 12000rpm por 5 minutos e leitura da DO<sub>420</sub>. A atividade de βgalactosidase, definida em unidades de Miller, foi medida da seguinte maneira: Unidades de Miller = 1000\*DO<sub>420</sub>/ t\* v\* DO<sub>600</sub>,

onde  $t$  = tempo da reação,  $v$  = volume inicial da cultura (100  $\mu$ L), \* = multiplicação e / = divisão. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas e os resultados apresentados representam a média e o desvio padrão dos dados obtidos.

### 3.9 Ensaio de adesão em células HEp-2 utilizando MPC

#### 3.9.1 Cultivo e preparo da linhagem celular HEp-2

Conforme descrito no item 3.6.1

#### 3.9.2 Ensaio de adesão

As placas de 24 poços, após a formação da monocamada, foram lavadas por 6 vezes com PBS 1X estéril e 1mL de meio de cultivo, conforme os tratamentos abaixo (**Tabela 4**), foi adicionado a cada poço da placa. Posteriormente, 50 $\mu$ L de cultura bacteriana, mantida por 18h em caldo LB, foram adicionados à preparação e mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> 5% a 37 °C por 3h. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata. Após o período de incubação as placas foram lavadas por 6 vezes com PBS 1X estéril para retirar as bactérias não aderidas. Foi feita então a fixação com metanol 100% por 20 minutos a temperatura ambiente e depois a coloração com solução Giemsa (Merck, Alemanha), diluída na razão 1:3 em tampão Sorensen por 20 minutos. As lamínulas foram lavadas em água corrente para retirar o excesso de corante, secas a temperatura ambiente e montadas em lâminas para microscopia com Entellan (Merck, Alemanha). As lâminas foram observadas em microscópio óptico em aumento de 1000 vezes e fotografadas.

**Tabela 4** - Tratamentos dos ensaios de adesão utilizando MPC.

Tratamento	Meio de cultivo	Amostra bacteriana
A	DMEM com 0,4g de glicose	3157
B	MPC da Am9	3157
C	DMEM com 0,4g de glicose	714
D	MPC da Am9	714
E	DMEM com 0,4g de glicose	2145
F	MPC da Am9	2145

### **3.10 Cinética da adesão de aEPEC utilizando epinefrina**

Sabendo-se que o AI-3 e a epinefrina são reconhecidos pelo mesmo receptor de membrana das bactérias, ativando assim um sinal em cascata que desencadeia a expressão de fatores de virulência, a epinefrina pode ser utilizada como controle positivo para verificar o aumento de adesão nos ensaios. Porém, ela perde sua atividade em curto período. Sendo assim, foi necessário fazer uma cinética para escolher o melhor tempo para sua atividade e assim padronizar os demais ensaios.

#### **3.10.1 Cultivo e preparo da linhagem HEp-2**

Conforme descrito no item 3.6.1, exceto pelas placas terem sido preparadas sem lamínulas de vidro.

#### **3.10.2 Ensaio de quantificação**

As placas de 24 poços, após a formação da monocamada foram lavadas por 6 vezes com PBS 1X estéril e 1mL de DMEM com glicose foi adicionado a cada poço da placa. Foi adicionado também epinefrina na concentração de 100µM. Posteriormente, 50µL de cultura bacteriana (3157), mantida por 18h em caldo LB, foram adicionados à preparação e as placas foram mantidas protegidas da luz em estufa de CO<sub>2</sub> 5% a 37 °C por 30 minutos, 1h30min, 2h, 2h30min, e 3h. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata. Após o período de incubação, as placas foram lavadas por 6 vezes com PBS 1X estéril para retirar as bactérias não aderidas. Foi feito então o rompimento celular com solução de Triton X-100 a 1% em PBS, por 3 minutos, sendo realizadas em sequência as diluições seriadas e o plaqueamento em LBA, para posterior contagem de UFC.

### **3.11 Ensaios de adesão e quantificação em células HEp-2 para comparação entre DMEM, MPC e DMEM acrescido de epinefrina**

Após escolher o melhor tempo da atividade da epinefrina, foram realizados ensaios para quantificação da adesão e comparação dos tratamentos com MPC e com a adição de epinefrina ao meio de cultivo.

### **3.11.1 Cultivo e preparo da linhagem HEp-2**

Conforme descrito no item 3.6.1, exceto por terem sido preparadas também placas sem lamínulas de vidro.

### **3.11.2 Ensaio de adesão**

Conforme descrito no item 3.6.2, com exceção os tratamentos, que serão descritos na tabela 5, do tempo de incubação que foi de 2h e no fato da incubação ter sido protegida da luz.

**Tabela 5** - Ensaio de adesão para a comparação da adesão em DMEM, DMEM acrescido de glicose e MPC.

<b>Tratamento</b>	<b>Meio de cultivo</b>	<b>Amostra bacteriana</b>
<b>A</b>	DME com glicose	3157
<b>B</b>	DMEM com glicose acrescido de epinefrina (100µM)	3157
<b>C</b>	MPC da Am9	3157

### **3.11.3 Ensaio de quantificação**

Conforme descrito no item 3.10.2, com exceção dos tratamentos e dos tempo de incubação, que são os mesmos descritos no item acima.

## **3.12 Ensaio de adesão e quantificação utilizando MPC, epinefrina e bloqueadores de AI-3**

Neste ensaio, além do uso da epinefrina como controle positivo, foram utilizados fentolamina e propanolol. Estes competem com os receptores de AI-3 e epinefrina, sendo considerados assim bloqueadores.

### **3.12.1 Cultivo e preparo da linhagem HEp-2**

Conforme descrito no item 3.11.1

### 3.12.2 Ensaio de adesão

Conforme descrito no item 3.11.2, exceto os tratamentos que estão descritos na tabela 6.

**Tabela 6** - Ensaio de adesão e quantificação com MPC, epinefrina e bloqueadores.

Tratamento	Meio de cultivo	Amostra bacteriana	Fentolamina* (100µM)	Propranolol* (100µM)
A	DMEM com glicose	3157	Não	Não
B	DMEM com glicose + epinefrina	3157	Não	Não
C	MPC da Am9	3157	Não	Não
D	MPC da Am9	3157	Sim	Não
E	MPC da Am9	3157	Não	Sim
F	DMEM com glicose	2145	Não	Não
G	DMEM com glicose + epinefrina	2145	Não	Não
H	MPC Am9	2145	Não	Não
I	MPC Am9	2145	Sim	Não
J	MPC Am9	2145	Não	Sim

\* Quando sim, significa que foi adicionado ao meio de cultivo.

### 3.12.3 Ensaio de quantificação

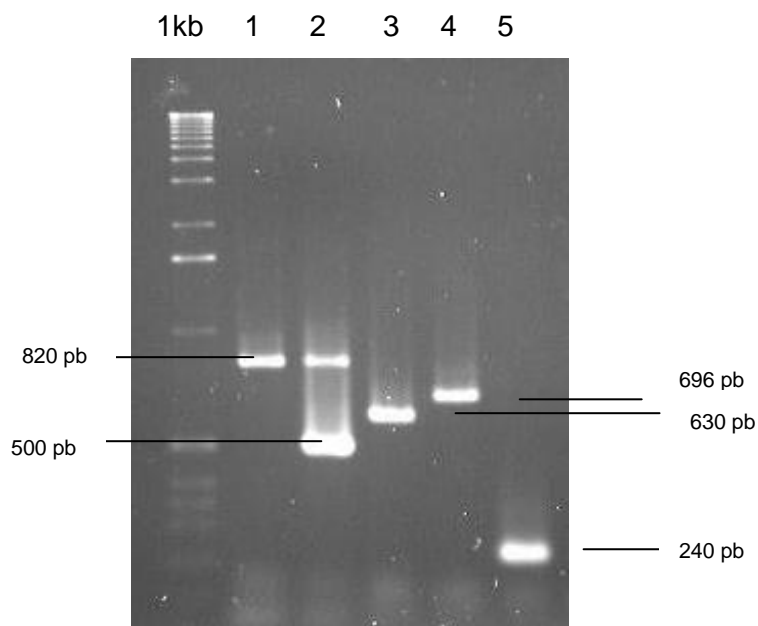
Conforme o item 3.11.3, exceto os tratamentos que são os mesmos do item acima.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Pesquisa de genes de virulência em amostras de *E.coli* da microbiota intestinal

Para confirmar que as quatro amostras de *E. coli* da microbiota intestinal são mesmo comensais, foi realizada uma pesquisa de genes de virulência pertencentes aos principais patótipos de *E. coli* diarreio gênica com a utilização de reação de multiplex PCR para os seguintes genes: *eae*, *stx*, *aa*, *lt* e *st*.

A **Figura 2** mostra os padrões obtidos com as amostras controle e, como já era esperado, as quatro amostras não apresentaram resultados positivos para nenhum dos genes testados.



**Figura 2.** Padrão obtido nas amplificações de fragmentos de genes de virulência encontrados em amostras de *E. coli* diarreio gênica. 1Kb - Marcador de peso molecular, 1 - padrão obtido na amplificação do gene *eae*, 2 - padrão obtido na amplificação dos genes *eae* e *stx*, 3 - padrão obtido na amplificação do gene *aa*, 4 - padrão obtido na amplificação dos gene *lt* e 5 - padrão obtido na amplificação do gene *st*.

### 4.2 Ocorrência do gene *luxS*

Foram realizadas reações de PCR para verificar a presença do gene *luxS* nas amostras de *E. coli* da microbiota intestinal.

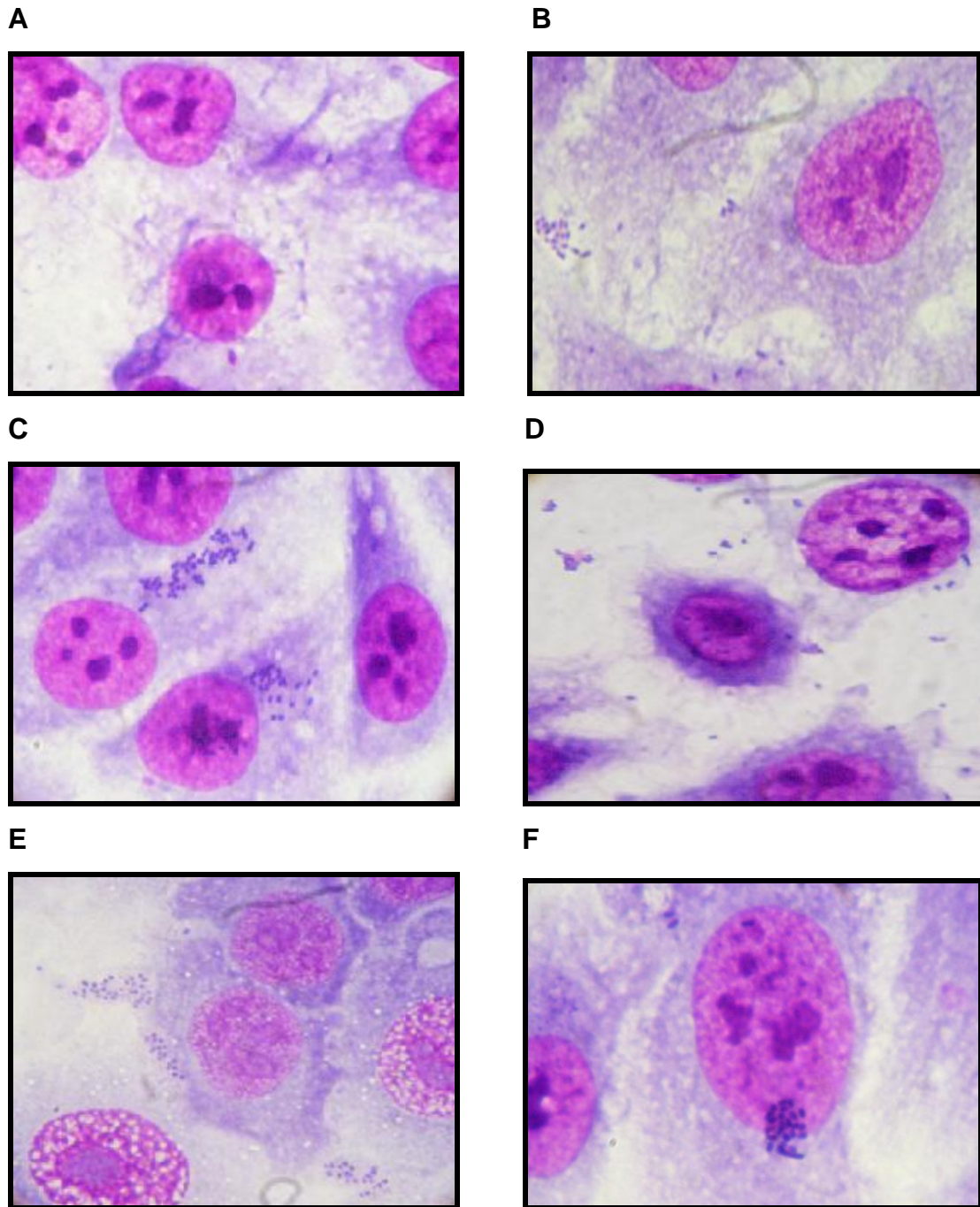


#### 4.4 Ensaios de co-cultura em células HEp-2

Com a utilização de ensaios de adesão em células HEp-2, foi realizado estudo de interação de amostras de aEPEC e tEPEC com uma amostra de *E. coli* da microbiota intestinal. Foram realizados ensaios de co-cultura entre as amostras 3157 e Am9 e entre as amostras VS104 e Am9.

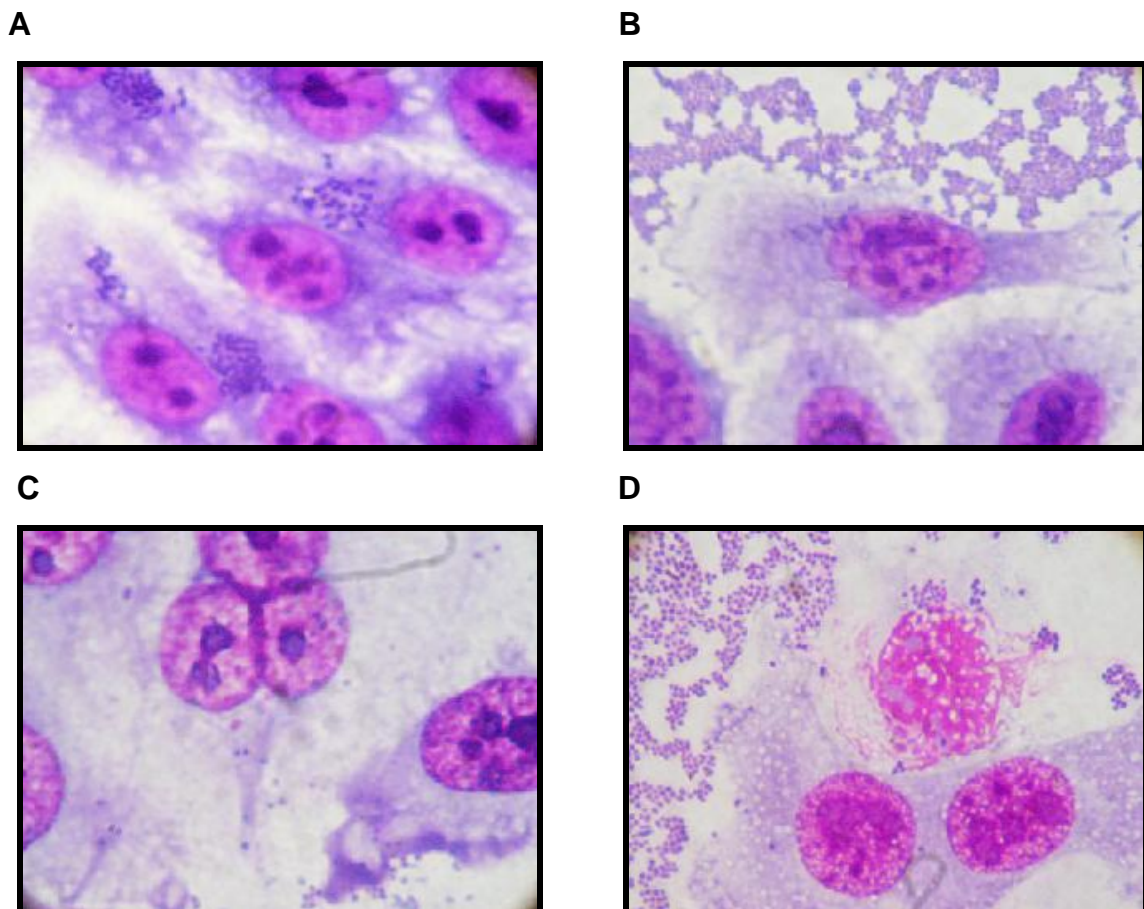
A **Figura 4** corresponde ao ensaio de 6 horas entre as amostras 3157 e Am9 em que se utilizou o meio DMEM. A **Figura 4-A** apresenta um controle onde só existem células em cultura sem a inoculação de bactérias. A **Figura 4-B** mostra o padrão obtido quando somente a Am9 é inoculada no tecido. Praticamente não existe adesão no tecido. A **Figura 4-C** mostra o padrão obtido quando é realizada a inoculação da amostra 3157. O padrão de adesão obtido é o ALL, no qual existe a formação de microcolônias que estão frouxamente agrupadas em um padrão característico descrito para amostras de aEPEC em ensaios de adesão com 6 horas de incubação (SCALETSKY et al., 1999). A **Figura 4-D** mostra o padrão obtido quando é feita a inoculação da amostra 3157 e incubação por 3 horas, seguida da inoculação da amostra Am9 com incubação por mais 3 horas. Aparentemente, houve pouca adesão e talvez a amostra Am9 esteja interferindo na capacidade de adesão da amostra 3157. A **Figura 4-E** mostra o padrão obtido quando é feita a inoculação da amostra Am9 com incubação de 3 horas, seguida da inoculação da amostra 3157 com incubação por mais 3 horas. Observou-se que em 3 horas já é possível verificar o padrão de adesão ALL e também uma mudança na morfologia do tecido celular, as células aparentam um efeito citotóxico com destruição do núcleo. A **Figura 4-F** mostra o padrão obtido quando é feita a inoculação da Am9 com incubação de 3 horas, seguida da lavagem com PBS, troca de meio e inoculação da amostra 3157 com incubação por mais 3 horas. Novamente observou-se que em 3 horas é possível verificar o padrão ALL, porém o efeito citotóxico deixou de ser observado.





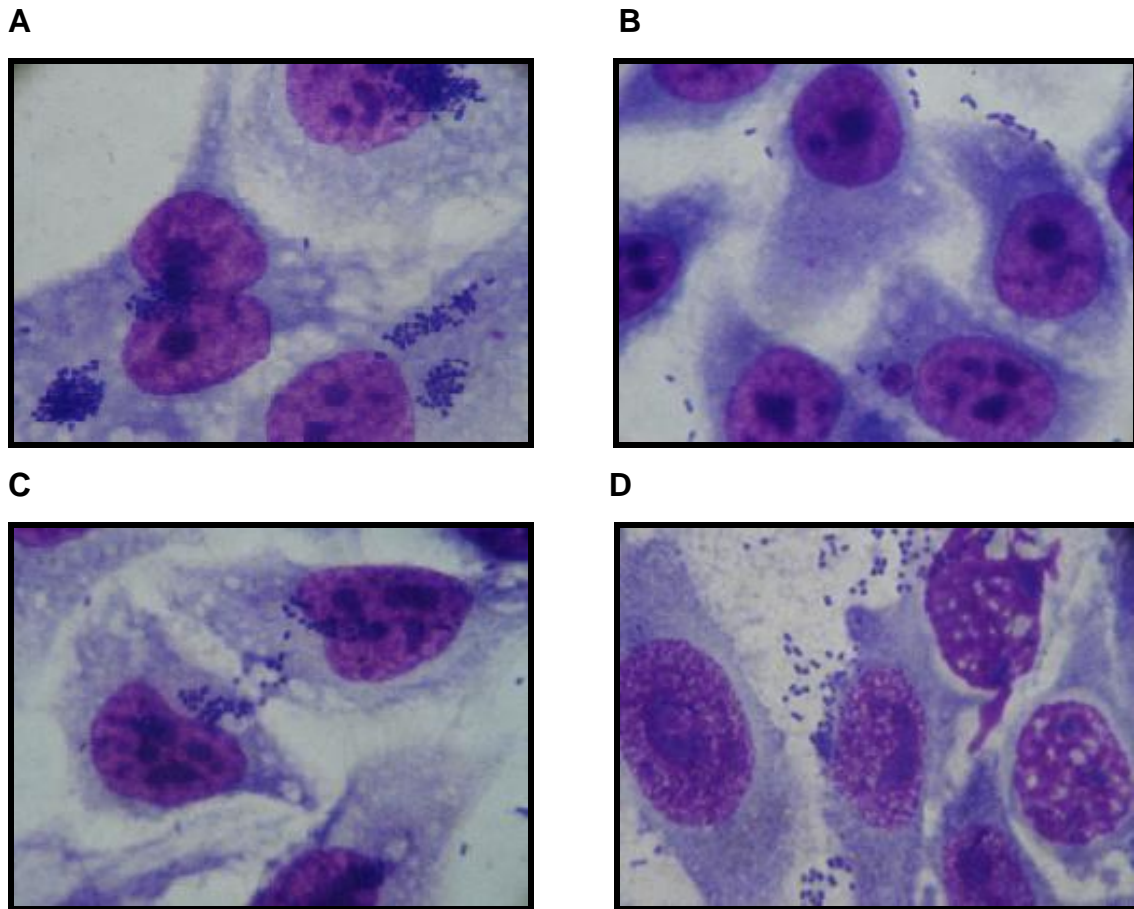
**Figura 4.** Imagem de microscopia óptica em aumento de 1000X. Ensaio de co-cultura em células HEp-2, entre as amostras 3157 e Am9. Ensaio de 6h. DMEM foi utilizado como meio de cultivo. Figura A: Células HEp-2. Figura B: Am9 (*E. coli* da microbiota intestinal). Figura C: 3157 (aEPEC). Figura D: 3h 3157 + 3h Am9. Figura E: 3h Am9 + 3h 3157. Figura F: 3h Am9 + 3h 3157 (com lavagem de PBS e troca de meio no intervalo de 3h).

A **Figura 5** corresponde ao ensaio de 6 horas contendo as amostras 3157 e Am9 com utilização do meio DMEM com 0,4% de glicose. A **Figura 5-A** mostra o padrão obtido quando é realizada a inoculação da amostra 3157 com incubação de 6 horas. É observado então o padrão ALL. A **Figura 5-B** mostra o padrão obtido quando é realizada a inoculação da amostra Am9 com incubação de 6 horas. Praticamente não se observa adesão no tecido, porém há presença de bactérias aderidas na lamínula. A **Figura 5-C** mostra o padrão obtido quando é feita a inoculação da amostra 3157 e incubação por 3 horas, seguida da inoculação da amostra Am9 com incubação por mais 3 horas. Nota-se pouca adesão bacteriana. A **Figura 5-D** mostra o padrão obtido quando é feita a inoculação da amostra Am9 com incubação de 3 horas, seguida da inoculação da amostra 3157 com incubação por mais 3 horas. Observou-se, assim como na **Figura 4-E**, o padrão ALL e o efeito citotóxico com destruição do núcleo.



**Figura 5.** Imagem de microscopia óptica em aumento de 1000X. Ensaio de co-cultura em células HEP-2, entre as amostras 3157 e Am9. Ensaio de 6h. DMEM com 0,4% de glicose foi utilizado como meio de cultivo. Figura A: 3157 (aEPEC). Figura B: Am9 (*E. coli* da microbiota intestinal). Figura C: 3h 3157 + 3h Am9. Figura D: 3h Am9 + 3h 3157.

A **Figura 6** corresponde ao ensaio de 3 horas entre as amostras VS104 e Am9 com utilização do meio DMEM. A **Figura 6-A** mostra o padrão obtido quando é realizada a inoculação da amostra VS104 com incubação por 3 horas. O padrão de adesão encontrado é conhecido com AL, no qual existe a formação de microcolônias compactas em um padrão característico descrito para amostras de tEPEC em ensaios de adesão com 3 horas de incubação (SCALETSKY et al., 1984). A **Figura 6-B** mostra o padrão obtido quando é realizada a inoculação da amostra Am9 com incubação por 3 horas. Observa-se que aparentemente ela se adere ao tecido celular sem nenhum dos padrões já descritos. Ela parece sempre se aderir ao redor das células. Muitas bactérias aderem-se na lamínula. A **Figura 6-C** mostra o padrão obtido quando é feita a inoculação da amostra VS104 com incubação por 1 hora e meia, seguida da inoculação da amostra Am9 com incubação por mais 1 hora e meia. Nota-se que já existe adesão. A **Figura 6-D** mostra o padrão obtido quando é feita a inoculação da amostra Am9 com incubação por 1 hora e meia, seguida da inoculação da amostra VS104 com incubação por mais 1 hora e meia. Nesta foto observa-se claramente o possível efeito citotóxico que ocorre no tecido celular.

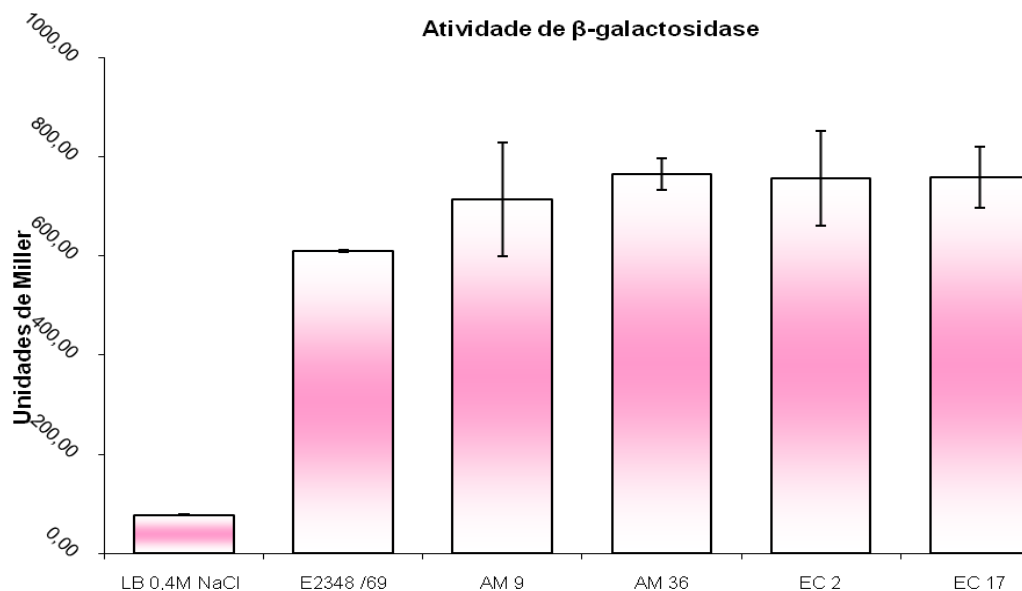


**Figura 6.** Imagem de microscopia óptica em aumento de 1000X. Ensaio de co-cultura em células HEP-2, entre as amostras VS104 e Am9. Ensaio de 3h. DMEM foi utilizado como meio de cultivo. Figura A: VS104 (tEPEC). Figura B: Am9 (*E. coli* da microbiota intestinal). Figura C: 1h30 VS104 + 1h30 Am9. Figura D: 1h30 Am9 + 1h30 VS104.

#### 4.5 Ensaio de Atividade de $\beta$ galactosidase

Foram realizados ensaios de atividades de  $\beta$ galactosidase para verificar a produção de AI-3. Para isso foram utilizados os meios pré-condicionados das amostras de *E. coli* da microbiota intestinal, utilizando como repórter a amostra TEVS232. A amostra E2348/69 foi utilizada como controle positivo e o meio LB 0,4M NaCl como controle negativo.

Com os resultados (**Figura 7**) é possível verificar a produção de AI-3 pelas quatro amostras testadas e também quantificar sua capacidade de indução.

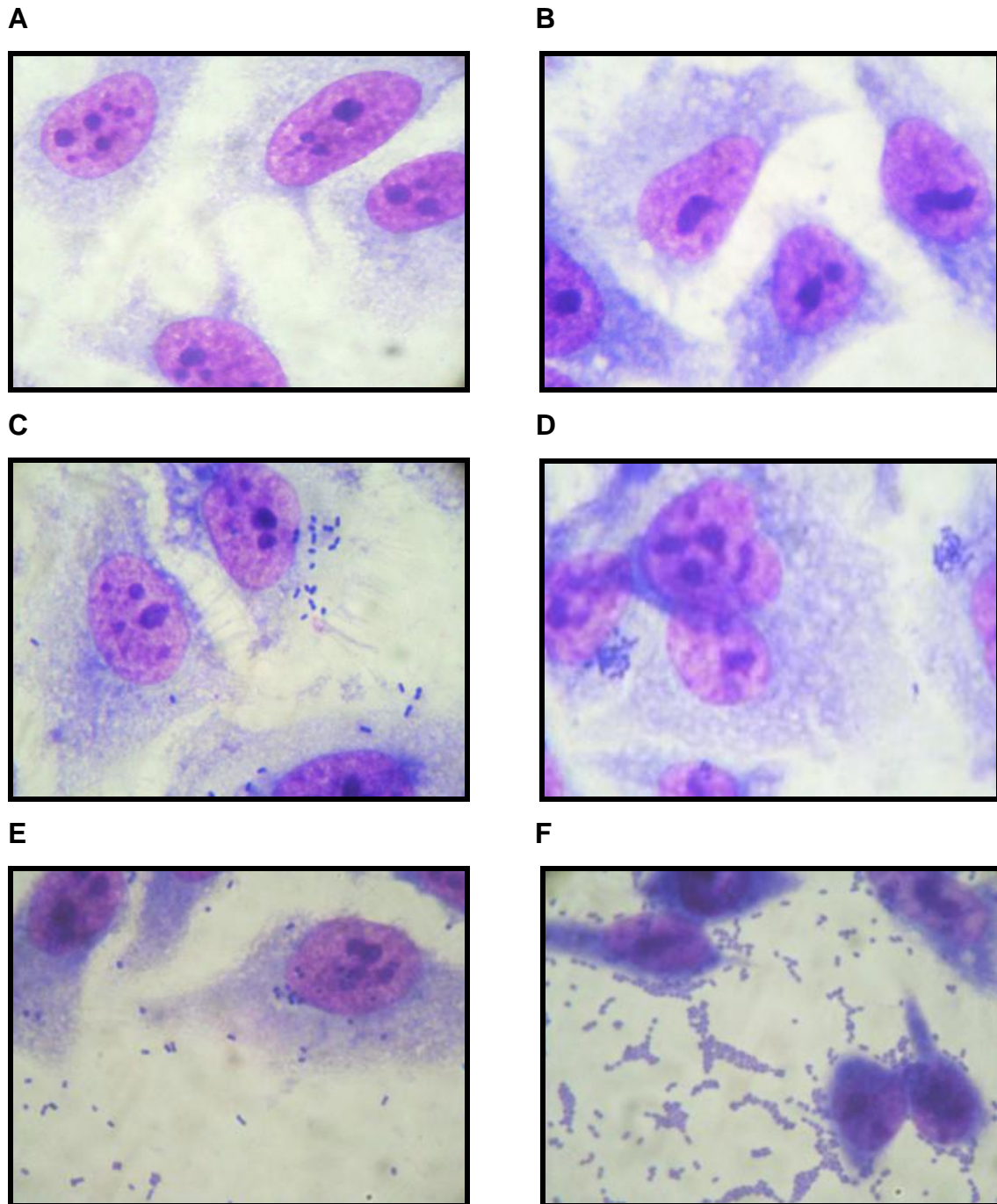


**Figura 7.** Ensaio de atividade de  $\beta$ galactosidase em amostras de *E. coli* da microbiota intestinal.

#### 4.6 Ensaio de adesão em células HEp-2 utilizando MPC

Com a utilização do meio pré-condicionado da amostra de *E. coli* da microbiota intestinal (Am9), preparado em D-MEM com glicose, foram realizados ensaios de adesão em células HEp-2 com amostras de EPEC atípica com padrões de adesão ALL (3157) e AA (2145), como mostra a **Figura 8**, com o objetivo de analisar a influência do meio pré-condicionado na adesão destas amostras.

A **Figura 8-A** representa um controle em que só existem células em cultura incubadas em meio DMEM e a **Figura 8-B**, também um controle, apresenta células em cultura incubadas em MPC da Am9. A **Figura 8-C** mostra o padrão obtido quando é realizada a inoculação da amostra 3157 com incubação de 3 horas em DMEM. Observa-se pouca aderência e, como era de se esperar, não é possível visualizar o padrão característico ALL. A **Figura 8-D** mostra o padrão obtido quando é realizada a incubação da mesma amostra, por mesmo tempo de incubação, porém utilizando o MPC da amostra Am9. É possível observar claramente o padrão ALL representado pela formação de microcolônias frouxas. A **Figura 8-E** mostra o padrão obtido quando é realizada a inoculação da amostra 2145 com incubação de 3 horas em meio DMEM. Observa-se pouca aderência e, como era de se esperar, não é possível visualizar o padrão característico AA. A **Figura 8-F** mostra o padrão obtido quando é realizada a incubação da mesma amostra, por mesmo tempo de incubação, porém utilizando o MPC da Am9. Observa-se o padrão característico AA. O padrão AA, descrito como característico, apresenta as bactérias aderidas uma às outras, em uma configuração que lembra tijolos empilhados, sobre a superfície das células epiteliais e da lamínula. O tempo necessário para esse padrão é de 6 horas (NATARO et al., 1987).

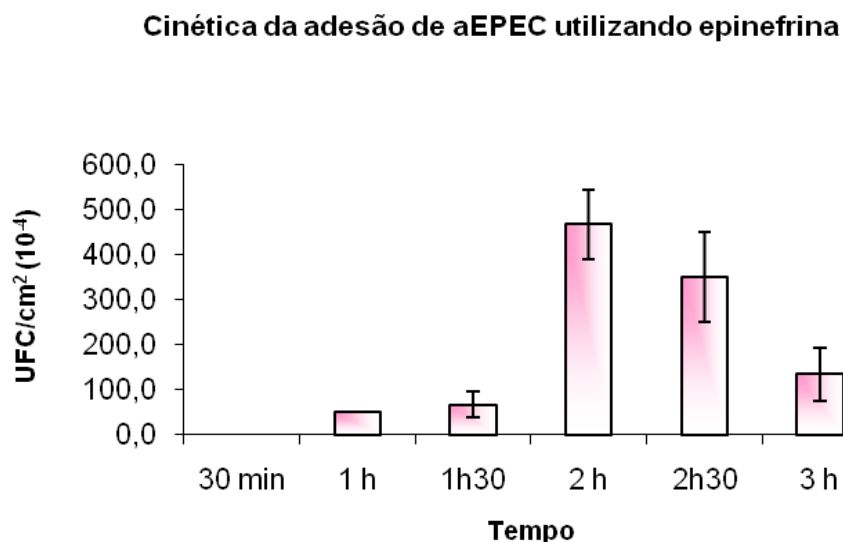


**Figura 8.** Imagem de microscopia óptica em aumento de 1000X. Ensaio de adesão em células HEp-2. Ensaio de 3h. Figura A: Células HEp-2 em DMEM. Figura B: Células HEp-2 em MPC da Am9. Figura C: 3157 (aEPEC) em DMEM. Figura D: 3157 (aEPEC) em MPC da Am9. Figura E: 2145 (aEPEC) em DMEM. Figura F: 2145 (aEPEC) em MPC da Am9.

#### 4.7 Cinética da adesão de aEPEC utilizando epinefrina

Utilizando ensaio de quantificação de adesão em células HEp-2 da amostra 3157 (aEPEC), foi realizado uma cinética para escolha do melhor tempo de atividade da epinefrina para padronização dos posteriores ensaios. A **Figura 9** demonstra os resultados obtidos.

É possível observar que nos tratamentos testados o melhor tempo da atividade da epinefrina correspondeu a 2 horas.

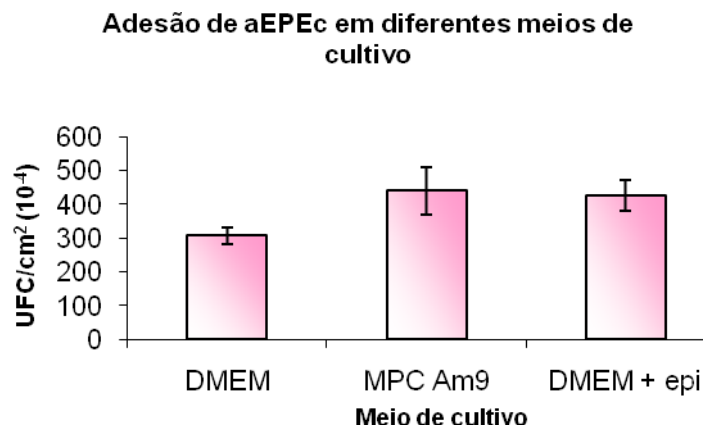


**Figura 9.** Cinética da adesão em células HEp-2 da amostra 3157 (aEPEC) em meio DMEM com glicose acrescido de 100 $\mu$ M de epinefrina. Incubação de 30 minutos, 1h, 1h30, 2h, 2h30 e 3h.

#### 4.8 Ensaio de adesão e quantificação em células HEp-2 para comparação entre DMEM, MPC e DMEM acrescido de epinefrina

Após escolher o melhor tempo da atividade da epinefrina, foram realizados ensaios de adesão (**Figura 11**) e de quantificação (**Figura 10**) para comparação da adesão entre os diferentes meios de cultivo (DMEM, MPC e DMEM acrescido com epinefrina).

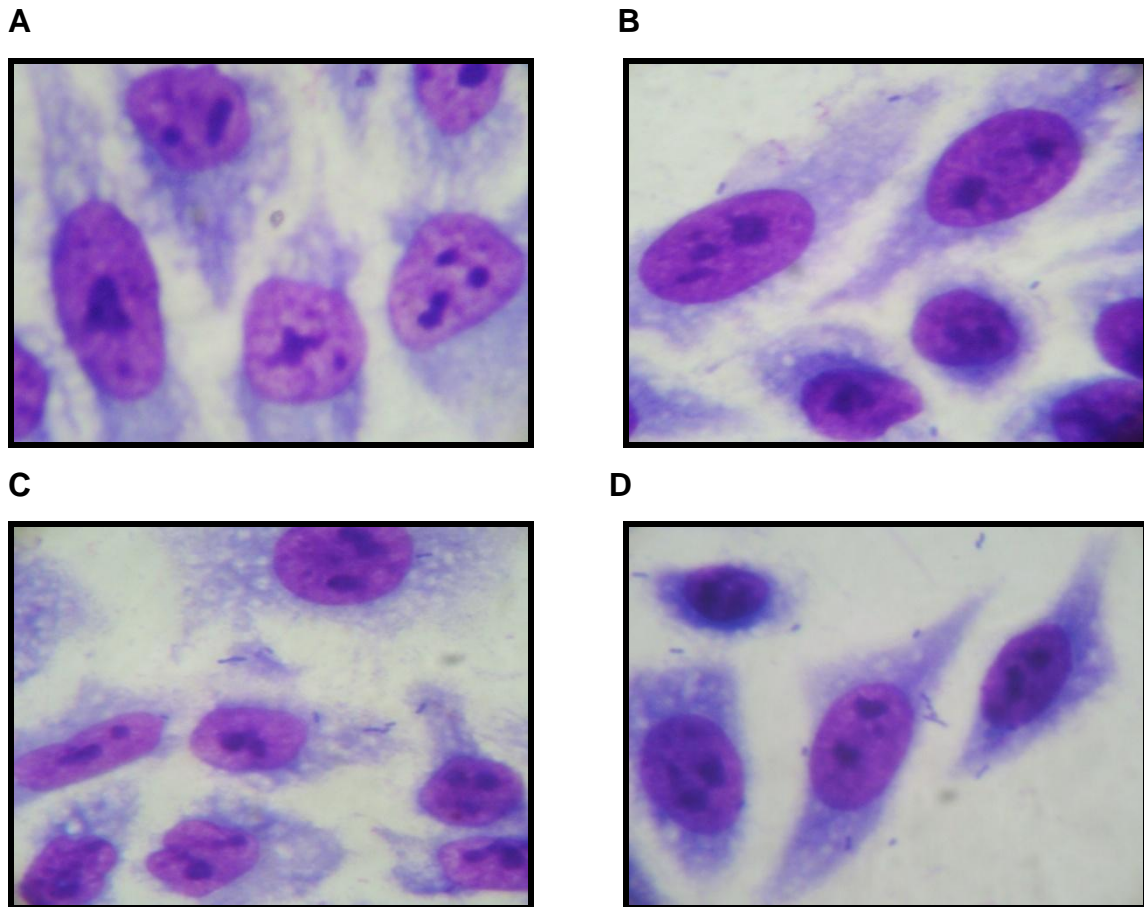




**Figura 10.** Comparação da adesão em HEp-2 da amostra 3157 (aEPEC) em DMEM, MPC da Am9 e DMEM acrescido de epinefrina.

Como é possível observar na **Figura 10**, a adesão da amostra 3157 foi maior quando se utilizou o MPC da Am9. A adesão da amostra no tratamento com meio DMEM acrescido com epinefrina também foi maior que o tratamento em que se usou apenas DMEM.

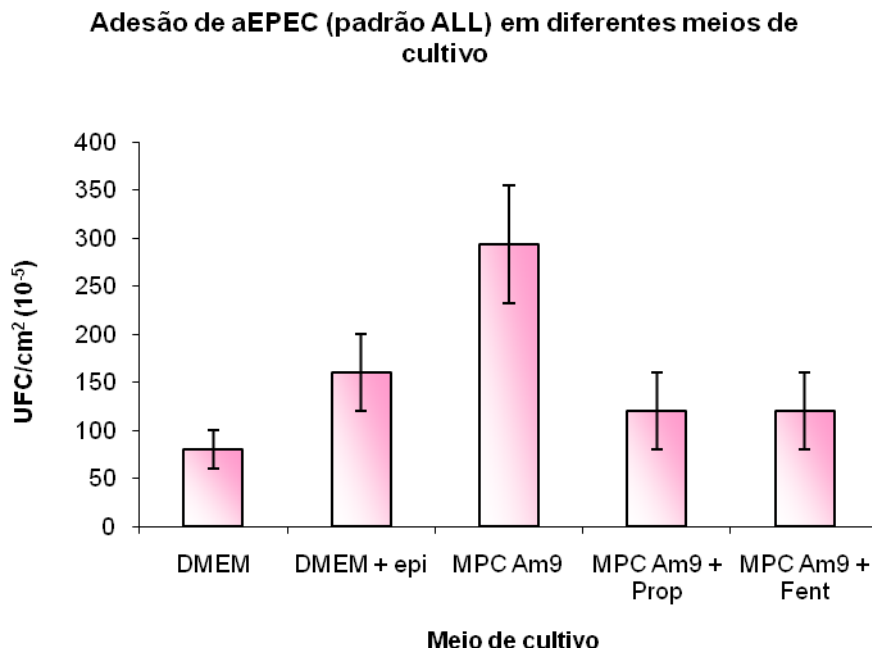
A **Figura 11-A** apresenta um controle em que só existem células em cultura incubadas em meio DMEM. A **Figura 11-B** mostra o padrão obtido quando é realizada a incubação da amostra 3157 em meio DMEM com incubação de 2 horas. Observa-se pouca adesão bacteriana e nota-se que as bactérias estão isoladas umas das outras. A **Figura 11-C** mostra o padrão obtido quando é realizada a incubação da amostra 3157 em MPC da Am9. Nota-se mais bactérias que o tratamento anterior e pode-se observar que as bactérias já estão mais próximas umas das outras. A **Figura 11-D** mostra o padrão obtido quando é realizada a incubação da amostra 3157 em DMEM acrescido com epinefrina. O que se observa é semelhante ao mostrado na **Figura 11-C**, em que há mais bactérias em relação ao resultado obtido no tratamento com o meio DMEM e que elas estão mais próximas.



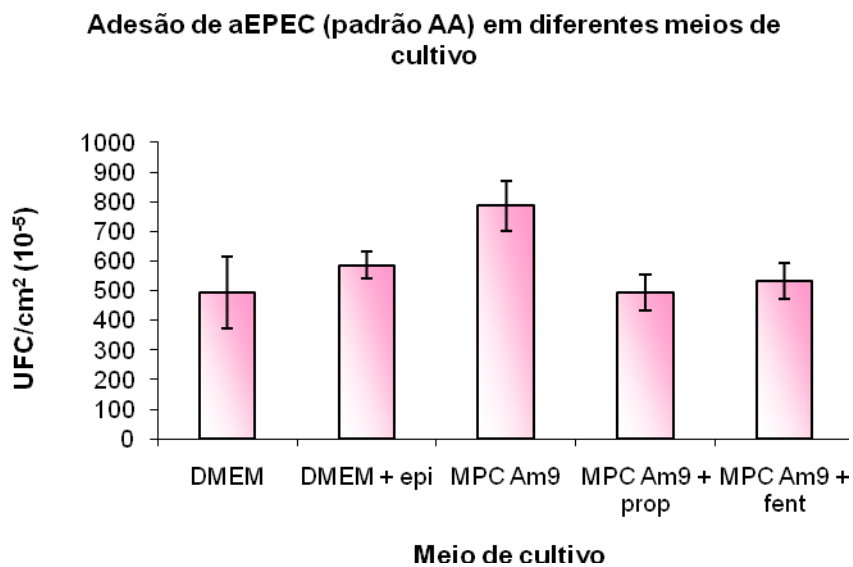
**Figura 11.** Imagem de microscopia óptica em aumento de 1000 X. Ensaio de adesão em células HEp-2. Ensaio de 2h. Figura A: Células HEp-2 em DMEM. Figura B: 3157 (aEPEC) em DMEM. Figura C: 3157 (aEPEC) em MPC da Am9. Figura D: 3157 (aEPEC) em DMEM acrescido com 100µM de epinefrina.

#### **4.9 Ensaio de adesão e quantificação utilizando MPC, epinefrina e bloqueadores de AI-3**

Este ensaio foi realizado para verificar se possivelmente o AI-3 presente no MPC pode acelerar a adesão das amostras de aEPEC. Para isso utilizou-se como controle positivo o meio DMEM com epinefrina e como controles negativos o MPC acrescido de bloqueadores (fentolamina e propanolol). Os resultados da amostra 3157 encontram-se nas **Figuras 12 e 14**, enquanto que os da amostra 2145 encontram-se nas **Figuras 13 e 15**.



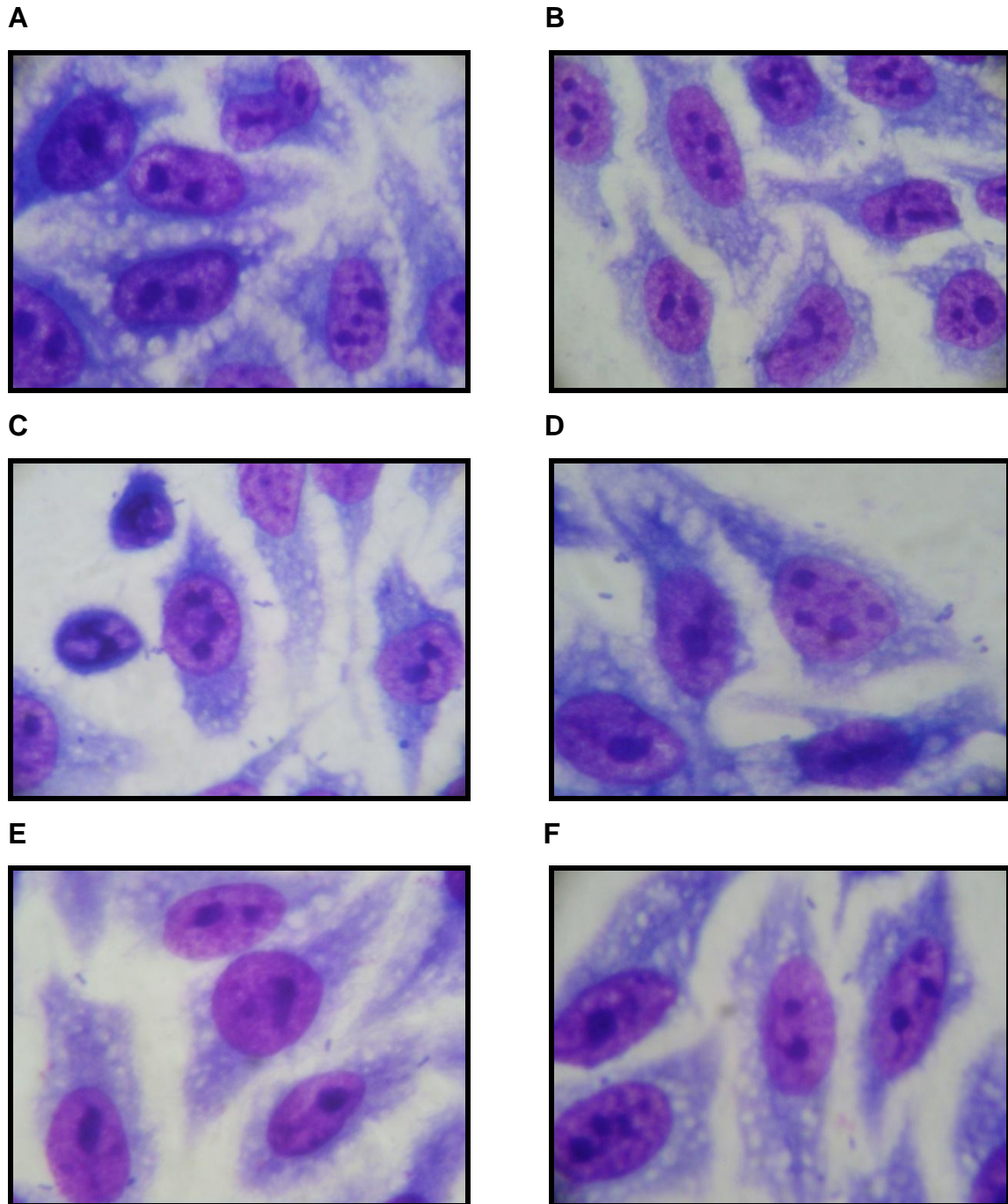
**Figura 12.** Quantificação da adesão da amostra 3157 em DMEM, MPC da Am9, DMEM com epinefrina e MPC da Am9 com bloqueadores (fentolamina e propranolol).



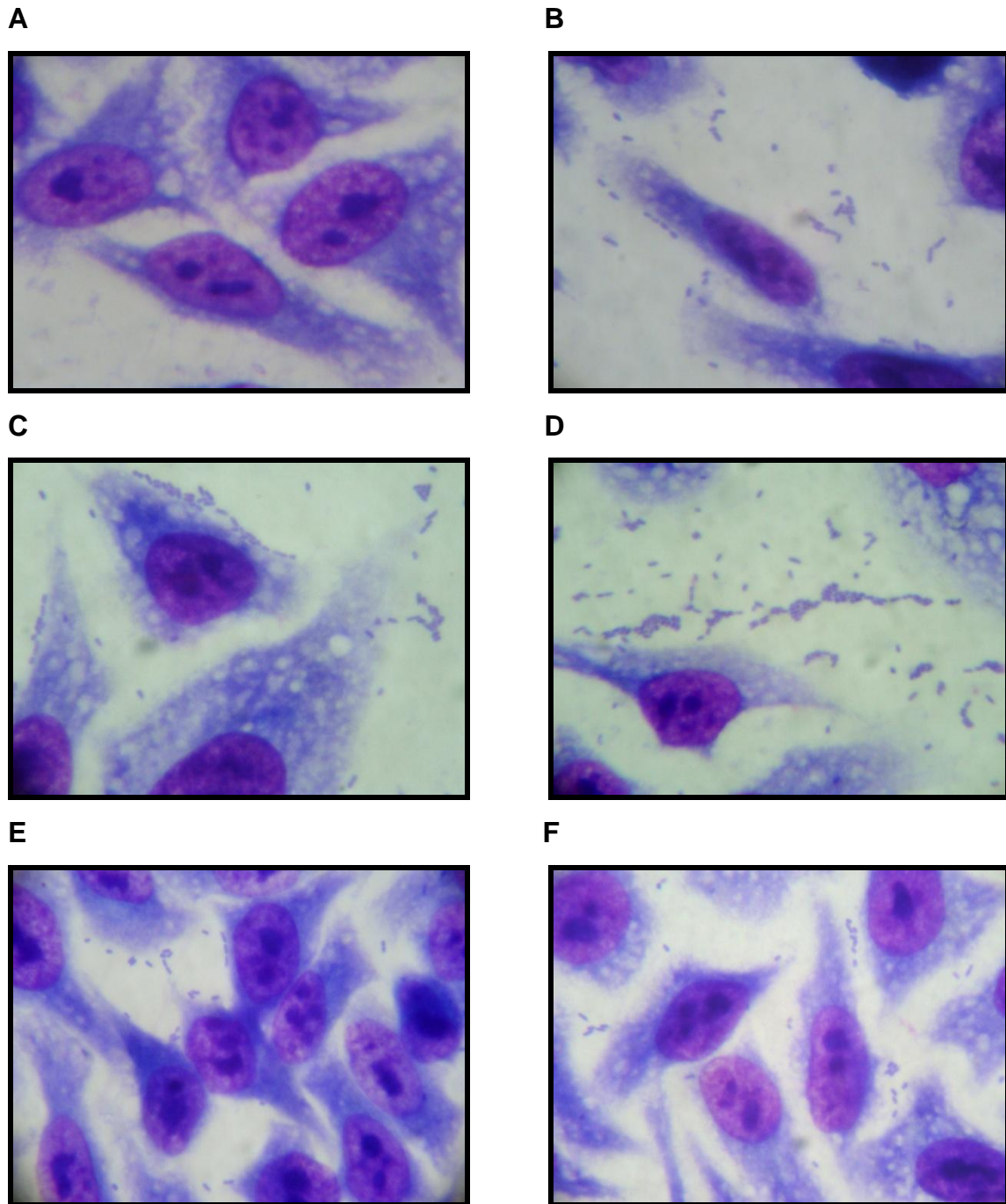
**Figura 13.** Quantificação da adesão da amostra 2145 em DMEM, MPC da Am9, DMEM com epinefrina e MPC da Am9 com bloqueadores (fentolamina e propranolol).

Na **Figura 12** observa-se que a adesão da amostra 3157 foi bem maior quando se utilizou o MPC da Am9 comparado a adesão em DMEM. Foi maior até mesmo do que no meio DMEM acrescido com epinefrina. Em contra ponto, a adesão

utilizando o MPC da Am9 diminuiu quando foram adicionados os bloqueadores no meio. Na **Figura 13** observa-se a mesma situação, com a diferença de que a adesão da amostra 2145 em MPC da Am9 não aumentou tanto quanto a amostra 3157 em mesmo meio.



**Figura 14.** Imagem de microscopia óptica em aumento de 1000X. Ensaio de adesão em células HEp-2. Ensaio de 2h. Figura A: Células HEp-2 em DMEM. Figura B: 3157 ( $\alpha$ EPEC – ALL) em DMEM. Figura C: 3157 em DMEM acrescido com 100µM de epinefrina. Figura D: 3157 em MPC da Am9. Figura E: 3157 em MPC da Am9 acrescido com 100µM de propranolol. Figura F: 3157 em MPC da Am9 acrescido com 100µM de fentolamina.



**Figura 15.** Imagem de microscopia óptica em aumento de 1000X. Ensaio de adesão em células HEp-2. Ensaio de 2h. Figura A: Células HEp-2 em DMEM. Figura B: 2145 (aEPEC – AA) em DMEM. Figura C: 2145 em DMEM acrescido com 100µM de epinefrina. Figura D: 2145 em MPC da Am9. Figura E: 2145 em MPC da Am9 acrescido com 100µM de propanolol. Figura F: 2145 em MPC da Am9 acrescido com 100µM de fentolamina.

A **Figura 14** refere-se ao ensaio de adesão de 2 horas com a amostra 3157. A **Figura 14-A** apresenta um controle de células em DMEM sem a inoculação de bactérias. A **Figura 14-B** mostra o padrão obtido quando é realizada a inoculação da amostra 3157 em DMEM. Aparentemente houve pouca adesão e as bactérias encontram-se isoladamente umas das outras. A **Figura 14-C** mostra o padrão obtido

quando é realizada a inoculação da amostra 3157 em DMEM acrescido com epinefrina. Observa-se que há mais bactérias aderidas e elas já estão em uma posição que lembra o início do padrão de adesão ALL. A **Figura 14-D** mostra o padrão obtido quando é realizada a inoculação da amostra 3157 em MPC da Am9. O padrão encontrado é o mesmo observado na figura anterior. A **Figura 14-E** mostra o padrão obtido quando é realizada a inoculação da amostra 3157 em MPC da Am9 acrescido com propanolol. Observa-se que a adesão reduziu e que as bactérias encontram-se isoladas. A **Figura 14-F** mostra o padrão obtido quando é realizada a inoculação da amostra 3157 em MPC da Am9 acrescido com fentolamina. É observado o mesmo padrão de adesão da figura anterior.

A **Figura 15** refere-se ao ensaio de adesão de 2 horas com a amostra 2145. A **Figura 14-A** apresenta um controle de células em DMEM sem a inoculação de bactérias. A **Figura 14-B** mostra o padrão obtido quando é realizada a inoculação da amostra 2145 em DMEM. Já é possível começar a observar um padrão que lembra o padrão de adesão AA. A **Figura 14-C** mostra o padrão obtido quando é realizada a inoculação da amostra 2145 em DMEM acrescido com epinefrina. Observa-se que o padrão AA está mais evidenciado, as bactérias já apresentam melhor a configuração do padrão AA. A **Figura 14-D** mostra o padrão obtido quando é realizada a inoculação da amostra 2145 em MPC da Am9. Observa-se a configuração de tijolos empilhados aderidos a superfície celular e a lamínula, caracterizando o padrão AA. A **Figura 14-E** mostra o padrão obtido quando é realizada a inoculação da amostra 2145 em MPC da Am9 acrescido com propanolol. Observa-se que a adesão reduziu e que deixou de ser observado a configuração do padrão AA. A **Figura 14-F** mostra o padrão obtido quando é realizada a inoculação da amostra 2145 em MPC da Am9 acrescido com fentolamina. É observado o mesmo padrão de adesão da figura anterior.

## 5 DISCUSSÃO

As *Escherichia coli* enteropatogênicas são importantes causadoras de diarreia em crianças de 0 a 1 ano de idade em países em desenvolvimento (ALBERT et al., 1995; ALBERT, 1996; TORRES et al., 2001). Fazem parte de um grupo de patógenos capazes de formar um tipo de lesão característica em cultura de tecidos epiteliais, denominada A/E. Os genes necessários para formação da lesão A/E estão localizados em uma ilha de patogenicidade denominada região LEE (*locus of enterocyte effacement*) (MCDANIEL et al., 1995). A transcrição de genes da região LEE está sujeita a regulação por *quorum sensing* (SPERANDIO et al., 2000). O autoindutor AI-3 é capaz de ativar a transcrição de LEE1, que codifica *ler* ativando outros genes de LEE (SPERANDIO et al., 2003). Muitas espécies de bactérias comensais são capazes de produzir AI-3, entre elas *E. coli* comensal.

Este trabalho foi direcionado para o estudo da possibilidade de interação de amostras de *E. coli* da microbiota intestinal e amostras de *E. coli* enteropatogênicas atípica, através da produção de autoindutores e possível regulação por *quorum sensing*; mecanismo de regulação gênica dependente da concentração celular (BASSLER, 1999). Um dos sistemas de *quorum sensing* é representado pelo sistema AI-3, o qual é encontrado em bactérias Gram-negativas e é o menos estudado até o momento (SPERANDIO et al., 2003).

Primeiramente, para confirmar que as amostras de *E. coli* da microbiota intestinal são mesmo comensais, foi realizada uma pesquisa de genes de virulência pertencentes aos principais patótipos de *E. coli* diarreiogênica com a utilização de uma reação de multiplex PCR. Como era esperado, as quatro amostras de *E. coli* da microbiota intestinal não apresentaram resultados positivos pra nenhum dos cinco genes (*eae*, *stx*, *lt, st* e *aa*) testados.

Foram realizadas reações de PCR para verificar a presença do gene *luxS* nas amostras de *E. coli* da microbiota intestinal. Este gene está envolvido na produção de AI-2 e já foi identificado em 285 espécies bacterianas (NCBI, 2010; MILLER et al., 2004; XAVIER; BASSLER, 2003). Muitas espécies comensais, entre elas *E. coli*, são capazes de produzir AI-2 e AI-3 (WALTERS; SIRCILI; SPERANDIO, 2006). Como era de se esperar o gene *luxS* está presente em todas as amostras de *E. coli* comensais estudadas.

Em seguida, foi realizado um antibiograma com o objetivo de encontrar um antimicrobiano cuja amostra 3157 (aEPEC) apresentasse resistência e a Am9 fosse sensível. A escolha desse antimicrobiano foi importante, já que se necessário, ele seria utilizado para distinguir as duas amostras nos ensaios de co-cultura. Como as amostras utilizadas não podem ser distinguidas pelo aspecto das colônias, além disso, reações de PCR ou bioquímicas são inviáveis, esta metodologia foi a mais eficiente possibilitando a distinção entre as amostras.

Foram realizados ensaios de  $\beta$ galactosidase para comprovar a produção de AI-3 pelas amostras da microbiota intestinal em estudo, já que estudos realizados por Walters et al. (2006) constataram a produção de AI-3 por bactérias comensais. AI-3 é capaz de ativar a transcrição de LEE1 que ativa a expressão do gene cromossômico *ler*, disparando uma cascata de expressão e ativando os operons LEE2, LEE3, LEE4 e LEE5 (SPERANDIO et al., 2003). Os resultados mostraram que os meios pré-condicionados das amostras estudadas possuem a capacidade de ativar a transcrição da fusão *LEE1::lacZ*, portanto as amostras produzem o AI-3; mostram também a possibilidade de AI-3 ser um sinal universal, representando uma comunicação interespecífica, já que a molécula de autoindutor é produzida por uma amostra e reconhecida por outra.

Filtrados fecais contendo autoindutores produzidos por amostras da microbiota intestinal humana são capazes de ativar a transcrição de LEE-1, assim como a produção de bioluminescência em *V. harveyi*, sugerindo mais uma vez que amostras da microbiota intestinal humana produzem AI-3 e AI-2 (SPERANDIO et al., 2003). Sendo assim, com a utilização de ensaios de adesão em células HEp-2, foi realizado estudo de interação de uma amostra de aEPEC com uma amostra de *E. coli* da microbiota intestinal.

Nesses ensaios observou-se que nos tratamentos em que foram feitas a inoculação da amostra de *E. coli* da microbiota intestinal com incubação de 3 horas, seguida da inoculação da amostra de aEPEC por mais 3 horas, já é possível verificar o padrão de adesão ALL, no qual existe a formação de microcolônias que estão frouxamente agrupadas em um padrão característico descrito para amostras de aEPEC em ensaios de adesão com 6 horas de incubação (SCALETSKY et al., 1999). Além do padrão de adesão ALL, observou-se também uma mudança na morfologia do tecido celular, as células aparentam um efeito citotóxico com destruição do núcleo. Nos tratamentos em que foram feitas a inoculação da amostra



de *E. coli* da microbiota intestinal com incubação de 3 horas, seguida da lavagem com PBS, troca de meio e inoculação da amostra de aEPEC com incubação por mais 3 horas, novamente observou-se que em 3 horas já era possível verificar o padrão ALL, porém o efeito citotóxico deixou de ser observado.

Por um erro durante os ensaios foi utilizado também, como o meio de cultivo, o DMEM acrescido com 0,4% de glicose. Os mesmos resultados foram obtidos com a diferença na quantidade de bactérias. Os ensaios com DMEM acrescido de glicose apresentou um número maior de bactérias.

Apesar do foco principal do estudo ser amostras de aEPEC, resolvemos fazer os mesmos ensaios utilizando tEPEC para verificar se os mesmos resultados poderiam ser observados e os resultados obtidos mostraram que os resultados foram semelhantes. Nos tratamentos em que foram feitas a inoculação da amostra de *E. coli* da microbiota intestinal com incubação por 1 hora e meia, seguida da inoculação da amostra de tEPEC com incubação por mais 1 hora e meia observou-se claramente o possível efeito citotóxico que ocorre no tecido celular. Já nos tratamentos em que houve a inoculação da amostra de *E. coli* da microbiota intestinal com incubação por 1 hora e meia, seguida da lavagem com PBS, troca de meio e inoculação da amostra de tEPEC com incubação por mais 1 hora e meia, o efeito citotóxico deixou de ser observado.

Este tipo de ensaio não apresenta resultados que nos permitam afirmar que existe a participação de *quorum sensing* nesta interação, porém os resultados fenotípicos observados podem proporcionar indícios da participação de autoindutores. Isto porque este efeito citotóxico só foi observado quando foram inoculadas tanto a amostra de aEPEC quanto tEPEC no mesmo meio em que estava a amostra de *E. coli* da microbiota intestinal. Quando foi realizada a troca do meio nos intervalos de 1 hora e meia e 3 horas para adicionar novo meio e fazer o inóculo das amostras de EPEC típica e atípica respectivamente, não foi observado esse efeito. Este fato mostra que talvez a amostra de *E. coli* da microbiota intestinal esteja produzindo alguma substância que em contato com as amostras de EPEC causa esse efeito.

Para um melhor estudo da possível participação de *quorum sensing* nesta interação, foram realizados ensaios de adesão em células HEp-2 com amostras de aEPEC com padrões de adesão ALL e AA em que utilizou-se o meio pré-condicionado da amostra de *E. coli* da microbiota intestinal.

Nesses ensaios foi possível verificar que nos tratamentos em que se utilizou DMEM para inoculação das amostras de aEPEC não foi possível visualizar os padrões de adesão ALL e AA no período de incubação de 3 horas. Já nos tratamentos em que se utilizou o meio pré-condicionado da amostra de *E. coli* da microbiota intestinal para inoculação das amostras de aEPEC observou-se os padrões ALL e AA em 3 horas de incubação.

Com esses ensaios verificou-se que o AI-3 presente no MPC possivelmente acelerou a adesão das amostras de aEPEC. Tanto o padrão ALL quanto o padrão AA, que só podem ser vistos com 6 horas de incubação, foram visualizados em apenas 3 horas de incubação quando as amostras de aEPEC foram inoculadas em meio pré-condicionado; já o grupo controle em que se utilizou o meio DMEM para inoculação não apresentou os padrões de adesão.

Para verificar se os resultados obtidos até aqui são devido à presença de AI-3 produzido pela amostra de *E. coli* da microbiota intestinal utilizou-se como controle positivo epinefrina. Epinefrina e AI-3 são reconhecidos pelo mesmo receptor de membrana, QseC, sugerindo que estes apresentam estrutura similar (WALTERS; SIRCILI; SPERANDIO, 2006). Epinefrina pode substituir AI-3 na regulação dos genes de virulência de EHEC. Isso porque a epinefrina é capaz de ativar a transcrição do promotor LEE1, restaurar o sistema de secreção do tipo III, a secreção de EspB e EspA e restaurar a mobilidade em mutantes *luxS*, que tem a produção de AI-3 afetada. (SPERANDIO et al., 2003).

Como a epinefrina perde sua atividade em curto período, foi necessário primeiramente realizar uma cinética de adesão para escolher o melhor tempo para sua atividade e assim padronizar os demais ensaios. Com os resultados obtidos o tempo escolhido foi o de 2 horas.

Após escolher o melhor período de incubação, foram realizados ensaios de adesão e quantificação para comparar o número de adesão em tratamentos em que se utilizaram os seguintes meios: DMEM, MPC e DMEM acrescido com epinefrina. Observou-se que os tratamentos com MPC e DMEM acrescido de epinefrina foram semelhantes, comprovando a similaridade entre AI-3 e epinefrina e mostrando que a epinefrina pode ser utilizada como controle positivo para demonstrar os efeitos de AI-3. A epinefrina é utilizada para estudar os efeitos de AI-3 devido à dificuldade de purificar grandes quantidades de AI-3.

Para comprovar que o AI-3 presente no MPC é o responsável por acelerar o tempo de adesão em aEPEC, realizou-se ensaios de adesão e quantificação utilizando MPC, epinefrina e bloqueadores (propranolol e fentolamina). Propranolol e fentolamina são chamados de bloqueadores porque esses adrenérgicos antagonistas são capazes de bloquear os efeitos de epinefrina e AI-3 na ativação de LEE-1 (CLARKE et al., 2006; SPERANDIO et al., 2003).

Os resultados mostraram que a adesão aumentou nos tratamentos em que se utilizaram os meios DMEM acrescido com epinefrina e MPC, no último o aumento de adesão foi maior. Verificou-se também que além do aumento da adesão foi possível observar padrões de adesão que lembram a configuração dos padrões ALL e AA. Já nos tratamentos em que se utilizaram o MPC acrescido de fentolamina ou propranolol observou-se a diminuição da adesão quando comparado à adesão no tratamento com MPC e deixou de ser observado a configuração dos padrões ALL e AA.

Estes resultados sugerem que o menor tempo nos padrões de adesão que só são observados em um período de incubação de 6 horas, possa ser resultado da capacidade de detecção, pelas amostras de aEPEC, de altas concentrações de AI-3 produzido pela amostra de *E. coli* da microbiota intestinal, seguido da transcrição dos genes de virulência que resultam na lesão.

Os genes necessários para a formação da lesão A/E estão localizados na região LEE (MCDANIEL et al., 1995). Estudos demonstram que a transcrição de genes da região LEE está sujeita a regulação por *quorum sensing* através de AI-3 (SPERANDIO et al., 2000).

O plasmídio EAF, presente em tEPEC e ausente em aEPEC contém o operon *per* que codifica um ativador transcricional Per (GOMEZ-DUARTE; KAPER, 1995) e este ativa a expressão do gene cromossômico *ler* disparando uma cascata de expressão e ativando os operons LEE2 a LEE5 (SPERANDIO et al., 2000).

Um estudo desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa mostra que em aEPEC, a expressão de alguns dos principais fatores de virulência (Intimina, Tir e EspA) ocorrem com atraso se comparados com tEPEC. Sugerindo que isto ocorra devido a ausência do operon *per* em aEPEC (dados não publicados). Assim sendo, os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a amostra de *E. coli* da microbiota intestinal está produzindo AI-3 que está sendo reconhecido por sensores das amostras de aEPEC e está por sua vez ativando o gene cromossômico *ler* que então dispara uma casacata de expressão, ativando os operons LEE2 a LEE5. Com

isso os genes necessários para a lesão A/E que encontram-se na região LEE são transcritos, resultando no padrão de adesão em menor tempo.

O efeito citotóxico apresentado nos ensaios anteriores em que se utilizou a amostra de *E. coli* da microbiota intestinal ao invés do MPC deixou de ser observado. Provavelmente o efeito seja causado por outra molécula, que não o AI-3, provavelmente uma proteína, produzida pela amostra de *E. coli* da microbiota intestinal. Um estudo mais detalhado poderá ajudar na elucidação deste tipo de fenômeno.

## 6 CONCLUSÕES

- As amostras de *E. coli* da microbiota intestinal são produtoras de AI-3.
- A incubação de *E. coli* da microbiota intestinal antes da incubação de aEPEC e tEPEC causa uma diferente interação de EPEC com células HEP-2, com um aparente efeito citotóxico.
- Na presença de meio pré-condicionado de *E. coli* da microbiota intestinal, amostras de aEPEC que apresentam padrão de adesão ALL e AA forma a lesão A/E em menor tempo.
- Ensaio utilizando epinefrina como controle positivo e bloqueadores mostraram que os padrões de adesão em menor tempo são devidos a presença de AI-3 no meio pré-condicionado, indicando a participação de *quorum sensing* nesta interação.
- O efeito citotóxico não é causado pelo AI-3.

**REFERÊNCIAS\***

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

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

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

ALBERT, M. J.; FARUQUE, S. M.; FARUQUE, A. S. G.; NEOGI, P. K. B.; ANSARUZZAMAN, M.; BHUIYAN, N. A.; ALAM, K.; AKBAR, M. S. Controlled study of *Escherichia coli* diarrheal infections in Bangladeshi children. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, p. 973-977, 1995.

ALBERT, M. J. Epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection in Bangladesh. **Rev. Microbiol.**, v. 7, p. 17-20, 1996.

BASSLER, B. L.; WRIGHT, M.; SHOWALTER, R. E.; SILVERMAN, M. R. Intercellular signaling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. **Mol. Microbiol.**, v. 9, p. 773-786, 1993.

BASSLER, B. L. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 2, p. 582-587, 1999.

BATCHELOR, M.; KNUTTON, S.; CAPRIOLI, A.; HUTER, V.; ZANIAL, M.; DOUGAN, G.; FRANKEL, G. Development of a universal intimin antiserum and PCR primers. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37 n. 12, p. 3822-3827, 1999.

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

BAUER, A. W.; KIRKY, W.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 45, p. 493-496, 1966.

BUERIS, V.; SIRCILI, M. P.; TADDEI, C. R.; 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.

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.

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

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

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

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

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

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

ESCHERICH, T. Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings. **Fortschr. D. Med.**, v. 3, p. 515-522, 1885.

EWING, W. H. **Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae**. 4<sup>th</sup> ed. New York: Elsevier, 1986. 122 p.

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.

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

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

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

GOMES, T. A. T.; RASSI, U.; MACDONALD, K. L.; RAMOS, S. R. T. S.; TRABULSI, L. R.; VIEIRA, M. A. M.; GUTH, B. E. C.; CANDEIAS, J. A. N.; IVEY, C.; TOLEDO, M. R. F.; BLAKE, P. A. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in São Paulo, Brazil. **J. Infect. Dis.**, v. 164, p. 331-337, 1991.

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



GUARNER, F.; MALAGELADA, J. R. Gut microbiota in health and disease. **Lancet**, v. 361, p. 512-519, 2003.

HANAHAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **J. Mol. Biol.**, v. 166, p. 557-580, 1983.

HASTINGS, J. W.; GREENBERG, E. P. Quorum sensing: the explanation of a curious phenomenon reveals a common characteristic of bacteria. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 2667-2668, 1999.

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

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

KIEVIT, T. R.; IGLEWSKI, B. H. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 4839-4849, 2000.

LEVINE, M. M.; BERGQUIST, E. J.; NALIN, D. R.; WATERMAN, D. H.; HORNICK, R. B.; YOUNG, C. R.; SOTMAN, S. *Escherichia coli* that cause diarrhea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. **Lancet**, v. 1, p. 1119-1122, 1978.

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. USA**, v. 92, p. 1664-1668, 1995.

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.

MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. Quorum sensing in bacteria. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 55, p. 165-199, 2001.

MILLER, S. T.; XAVIER, K. B.; CAMPAGNA, S. R.; TAGA, M. E.; SEMMELHACK, M. F.; BASSLER, B. L.; HUGHSON, F. M. *Salmonella typhimurium* recognizes a chemically distinct form of the bacterial quorum sensing signal AI-2. **Mol. Cell.**, v. 15, p. 677-687, 2004.

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

MOSELEY, S. L.; HARDY, J. W.; HUG, M. I.; ECHEVERRIA, P.; FALKOW, S. Isolation and nucleotide sequence determination of a gene encoding a heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 39, n. 3, p. 1167-1174, 1983.

MOURA, R. T.; SIRCILI, M. P.; LEOMIL, L.; MATTÉ, M. H.; TRABULSI, L. R.; ELIAS, W. P.; IRINO, K.; CASTRO, A. F. P. Clonal relationship among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from different animal species and humans. **App. Environm. Microbiol.**, v. 75, 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, 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.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Nucleotide. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 17 dez. 2010.

NEALSON, K. H.; PLATT, T.; HASTINGS, J. W. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. **J. Bacteriol.**, v. 104, p. 313-322, 1970.

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

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

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

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

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

RASKO, D. A.; MOREIRA, C. G.; LI, D. R.; READING, N. C.; RITCHIE, J. M.; WALDOR, M. K.; WILLIAMS, N.; TAUSSIG, R.; WEI, S.; ROTH, M.; HUGHES, D. T.; HUNTLEY, J. F.; FINA, M. W.; FALCK, J. R.; SPERANDIO, V. Targeting QseC Signaling and Virulence for Antibiotic Development. **Science**, v. 321, p. 1078-1080, 2008.

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

RODRIGUES, J.; SCALETSKY, I. C. A.; CAMPOS, L. C.; GOMES, T. A. T.; WHITTAM, T. S.; TRABULSI, L. R. Clonal Structure and Virulence Factors in Strains of *Escherichia coli* of the Classic Serogroup O55. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 2680-2686, 1996.

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

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

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

SCALETSKY, I. C. A.; PEDROSO, M. Z.; OLIVA, C. A. G.; CARVALHO, R. L. B.; MORAIS, M. B. D.; FAGUNDES-NETO, U. A. A adherence localized-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.

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

SCHMIDT, H.; KNOP, C.; FRANKE, S.; ALEKSIC, S.; HEESEMANN, J.; KARCH, H. Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 3, p. 701-705, 1995.

SCHULTSZ, C.; POOL, G. J.; VAN KETEL, R.; WEVER, B.; SPEELMAN, P.; DANKERT, J. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in stool samples by using nonradioactively labeled oligonucleotide DNA probes and PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, n. 10, p. 2393-2397, 1994.

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

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

SPERANDIO, V.; MELLIES, J. L.; DELAHAY, R. M.; FRANKEL, G.; CRAWFORD, J. A.; NGUYEN, W.; KAPER, J. B. Activation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) LEE2 and LEE3 operons by Ler. **Mol. Microbiol.**, v. 38, p. 781-793, 2000.

SPERANDIO, V.; TORRES, A. G.; JARVIS, B.; NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Bacteria-host communication: the language of hormones. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 100, p. 8951-8956, 2003.

SURETTE, M. G.; BASSLER, B. L. Regulation of autoinducer production in *Salmonella typhimurium*. **Mol. Microbiol.**, v. 31, p. 585-595, 1999.

TAGA, M. E.; BASSLER, B. L. Chemical communication among bacteria. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 100, p. 14549-14554, 2003.

TANNOCK, G. W. The normal micromicrobiota: an introduction. In: TANNOCK, G. W. **Medical importance of normal micro-microbiota**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1999. p. 1-20

TOLEDO, M. R. F.; ALVARIZA, M. C. B.; MURAHOVSKI, J.; RAMOS, S. R. T. S.; TRABULSI, L. R. Enteropathogenic *Escherichia coli* Serotypes and Endemic Diarrhea in Infants. **Infect. Immun.**, v. 39, p. 586-589, 1983.

TORRES, M. E.; PIREZ, M. C.; SCHELOTTO, F.; VARELA, G.; PARODI, V.; ALLENDER, F.; FALCONI, E.; DELL'ACQUA, L.; GAIONE, P.; MENDEZ, M. V.; FERRARI, A. M.; MONTANO, A.; ZANETTA, E.; ACUNA, A. M.; CHIPARELLI, H.; INGOLD, E. Etiology of Children's Diarrhea in Montevideo, Uruguay: Associated Pathogens and Unusual Isolates. **J. Clin. Microbio.**, v. 39, p. 2134-2139, 2001.

TRABULSI, L. R.; MANISSADJAN, A.; PENNA, H. A.; LIBERATORE, R.; DUAILIBE, L.; de CAMARGO, PEIXOTO E. S. Infantile diarrhea caused by enteropathogenic colibacilli. Preliminary studies on the occurrence of certain groups and serological types in São Paulo. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 3, p. 267-270, 1961.

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

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

WALTERS, M.; SIRCILI, M. P.; SPERANDIO, V. AI-3 synthesis is not dependent on *luxS* in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** v. 188, p. 5568-5680, 2006.

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.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Improving diarrhea estimates.** Child and Adolescent Health and Development, World Health Organization. Geneva, Switzerland: WHO, 2002.

XAVIER, K. B.; BASSLER, B. LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. **Curr. Opin. Microb.**, v. 6, p. 191-197, 2003.

YAMASAKI, S.; LIN, Z.; SHIRAI, H.; TERAJ, A.; OKU, Y.; ITO, H.; OHMURA, M.; KARASAWA, T.; TSUKAMOTO, T.; KURAZONO, H.; TAKEDA, Y. Typing of verotoxins by DNA colony hybridization with poly- and oligonucleotide probes, a bead-enzyme-linked immunosorbent assay, and polymerase chain reaction. **Microbiol. Immunol.**, v. 40, n. 5, p. 345-352, 1996.