KEYDE CRISTINA MARTINS DE MELO

***Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) atípica
sorotipo O55:H7: descrição da antifagocitose a partir de
um fator secretado**

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

**São Paulo
2010**

KEYDE CRISTINA MARTINS DE MELO

***Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) atípica
sorotipo O55:H7: descrição da antifagocitose a partir de
um fator secretado**

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

Orientadora: Dra. Rita de Cássia Ruiz

**São Paulo
2010**

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

© reprodução total

Melo, Keyde Cristina Martins de.

Escherichia coli enteropatogênica (EPEC) atípica sorotipo O55:H7: descrição da antifagocitose a partir de um fator secretado. / Keyde Cristina Martins de Melo. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Rita de Cássia Ruiz.

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: Estudo da biologia de células infectadas por *Escherichia coli* enteropatogênica atípica (EPECa)

Versão do título para o inglês: Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) serotype O55:H7: description of anti-phagocytosis from a secreted factor..

Descritores: 1. *Escherichia coli* 2. Macrófagos 3. Antifagocitose I. Ruiz, Rita de Cássia II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. III. Título.

ICB/SBIB0217/2010

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

Candidato (a): Keyde Cristina Martins de Melo.

Título da Tese: *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) atípica sorotipo
O55:H7: descrição da antifagocitose a partir de um fator
secretado.

Orientador (a): Rita de Cássia Ruiz.

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

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

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

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

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

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo da interação de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) atípica com macrófagos de cultura primária e de linhagem", protocolo nº412/07, sob a responsabilidade de Rita de Cássia Ruiz e Keyde Cristina Martins de Melo, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 12/09/2007.

São Paulo, 12 de setembro de 2007.

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:

Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida:

Aos meus pais, Luiz e Cida, meu Porto Seguro. Muito Obrigada pelo amor,
confiança e apoio. Amo vocês!

Á minha querida irmã Kelly pelo apoio e torcida e a minha linda princesinha Ágata
por seu sorriso, carinho e amor. Amo vocês!

Á você meu inesquecível avô João Vicente, pelos ensinamentos, carinho e por ser
uma das pessoas que mais acreditou em mim. Amo você!

AGRADECIMENTOS

À Dra Rita de Cássia Ruiz, minha querida “mãe científica” pela sua dedicação, paciência, conselhos, confiança e amizade.

Ao Dr Rafael Marques Porto, meu co-orinetador, pelos ensinamentos científicos, culturais e amizade.

Ao Dr Daniel Carvalho Pimenta, pela ajuda bioquímica inicial.

Ao Dr Osvaldo Sant’Anna, pelas conversas nos corredores, ensinamentos.

Aos pesquisadores Mona Borges, Marta Domingos, Denise Horton, Waldir Elias, Cecília Abe, Márcia Franzolin e Roxane Piazza, muito obrigada pelos conselhos, amizade, torcida e ajuda.

À minha querida amiga “Bibi” de Andrade, não tenho como agradecer tudo que tem feito, nesses anos de amizade, só posso retribuir. Te Adoro!

Ao Silvio pela amizade, companheirismo e ajuda nas análises de estatísticas.

À Tatiane Porangaba, pela amizade, risadas e ajuda, nos PCR.

Aos amigos Chris Ozaki Marina dos Anjos, Diego Mafra, Chyntia (Model), Demétria e D. Maria, pelo companheirismo, ajuda, conselhos e carinho.

Aos meus queridos amigos de bancada Lívia Corrêa, Daniel Christo, Bete Soares, Camila Barbosa e Taysi Mazur, vocês fizeram a diferença, com certeza devo muito do meu aprendizado a vocês!

Aos amigos do Laboratório de Bacteriologia (Ludmila, Davi (nosso querido amigo “perueiro”), Natália, Márcio, Letícia, Sílvia, Denise, Gleice, Luciano, Fernanda, Fran Paiva, Claudia, Hebert, Cris Mota, Andressa e Afonso.

Aos funcionários do Instituto Butantan, Nadja, Maria Luisa, Sebastiana, Regina, Reginaldo, Juscelino e “tio” Edson pelo auxílio no preparo de materiais.

Aos funcionários da secretaria da Biotecnologia (Fábia, Marcos e Eliane), por serem sempre prestativos e a Mônica, que foi muito atenciosa na revisão da dissertação.

Aos meus tios Sônia e Wladimir, pela incansável torcida.

Ao querido Alexandre Montanholi Soares, por sempre estar ao meu lado, me ajudando e torcendo por mim.

A minhas queridas amigas Eliza Higuti, Dani Kajihara e Dani Rangel pelos momentos de descontração e desabafos.

OBRIGADA!!!

“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada.”

(Albert Einstein)

Este projeto foi realizado no Laboratório de Bacteriologia e no Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP e Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoas de Nível Superior - CAPES.

RESUMO

MELO, K. C. M. ***Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) atípica sorotipo O55:H7**: descrição da antifagocitose a partir de um fator secretado. 2010. 112 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Escherichia coli enteropatogênica atípica (EPECa) é uma bactéria extracelular responsável por causar diarreia em crianças e adultos que apresenta alta heterogeneidade quanto aos fatores de virulência. O aumento dos casos de diarreia causados por EPECa evoca a capacidade de adaptação e patogenicidade desta subcategoria, que atualmente é considerada um patógeno emergente. O objetivo aqui foi estudar o comportamento de EPECa na interação com fagócitos profissionais afim de esclarecer os mecanismos que lhe conferem tamanhas adaptabilidade e patogenicidade. Macrófagos de cultura primária, derivados de medula óssea de C57/BL6 ou de linhagem J774.A1 foram infectados com diversas amostras bacterianas. A amostra 7 (O55:H7) foi a única a apresentar menor interação com os macrófagos. Na detecção das bactérias fagocitadas, através da determinação da UFC/mL, a amostra 7 foi menos fagocitada nos diferentes pulsos de infecção (10, 30 e 60min). A pré-incubação de macrófagos com o sobrenadante da amostra 7 reduziu a fagocitose de uma amostra controle, sugerindo que o fator responsável pelo efeito antifagocítico estava presente no sobrenadante. O sobrenadante de cultivo da amostra 7, crescida em meio TSB, foi submetido ao fracionamento por SPE e HPLC e a fração que manteve o efeito antifagocítico (25% ACN - 7) mostrou-se capaz de: i) inibir 100% a fagocitose de bactérias; ii) reduzir a fagocitose de *Saccharomyces cerevisiae* e iii) reduzir a adesão da EPEC típica E234869 às células HEp-2 e Caco-2. Resultados semelhantes foram obtidos com a fração 25% ACN obtida da EPECa 320 (O55:H7). Os perfis cromatográficos das frações 25% ACN – 7 e 320 originários do meio TSB mostraram-se extremamente complexos, impossibilitando a identificação do fator responsável pelo efeito antifagocítico. No fracionamento do sobrenadante da amostra 7, crescida em meio mínimo, também foi identificado uma fração com capacidade de reduzir a fagocitose. Como esperado, o perfil cromatográfico desta fração mostrou-se mais simples, já que este meio é composto apenas de sais e glicose. Assim, a partir deste meio será mais fácil purificar e identificar o fator antifagocítico. Conseguimos com este trabalho encontrar um mecanismo que, embora talvez não sozinho, provavelmente exerce papel importante na adaptabilidade e patogenicidade das EPECa. Ainda, iniciamos a caracterização de um fator antifagocítico secretado por EPECa (O55:H7) e que é solúvel em meio aquoso, é termoestável, é uma molécula pequena, menor que 2kDa, não é microbicida ou citotóxico e, por último, há indicativos de que possa apresentar uma região glicosídica. Resta agora continuar o trabalho de purificação e caracterização a fim de identificar o fator antifagocítico.

Palavras-chave: EPEC atípica. Macrófago. Antifagocitose.

ABSTRACT

MELO, K. C. M. **Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) serotype O55:H7**: description of anti-phagocytosis from a secreted factor. 2010. 112 p. Master thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) is an extracellular bacterium causing diarrhea in children and adults and presenting a high heterogeneity regarding its virulence factors. The increasing number of cases of diarrhea caused by aEPEC denotes the high capacity of adaptation and pathogenicity of this *E. coli* sub-category, which is now considered an emergent pathogen. The objective here was to study the interaction between aEPEC and professional phagocytes in order to understand the mechanisms that generate such adaptability and pathogenicity. Primary cultured, Bone marrow derived (C57/BL6) or J774.A1 macrophages were infected with several bacterial samples. Sample 7 (O55:H7) presented a significantly lower level of interaction with the macrophages. Sample 7 (O55:H7) was also the least phagocytosed sample as determined by counting the number of CFU/ml, after different 10', 20' and 30' of infection. Pre-incubation of the macrophages with the supernatant from sample 7 reduced phagocytosis of a control sample, suggesting that an anti-phagocytic soluble factor, secreted by sample 7, is present in the supernatant. The culture supernatant from sample 7, grown in TSB, was fractionated by SPE and HPLC, and the active fraction was able to: i) inhibit bacteria phagocytosis by 100 %; ii) reduce phagocytosis of *Saccharomyces cerevisiae* and iii) reduce adhesion of typical EPEC E234869 to HEp-2 and Caco-2 cells. Similar results were obtained with the culture supernatant of aEPEC 320 (O55:H7). The HPLC profiles of samples 7 and 320 TSB culture supernatants, previously fractionated by SPE were still too complex, so that no single peak could be identified as the one responsible for the anti-phagocytic effect. An active fraction was also obtained from the culture supernatant of bacteria grown in minimum medium. As expected the profile obtained with the supernatant from this medium was much simpler, since it is constituted only of salts and glucose. Thus, it should be much easier to purify and identify the anti-phagocytic factor from this medium. In this work we found a mechanism that, though possibly not alone, is very likely responsible for the adaptability and pathogenicity of aEPEC. Furthermore, we initiated the characterization of an anti-phagocytic factor secreted by aEPEC (O55:H7) that is thermo-stable, is smaller than 2 kDa, is not microbicide or cytotoxic and, finally, that possibly presents a glycoside. We now have to continue the purification and characterization work in order to identify the aEPEC anti-phagocytic factor.

Key words: Atypical EPEC. Macrophages. Anti-phagocytosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Microscopia eletrônica mostrando a Lesão A/E, destruição das microvilosidades (mv) e a formação do pedestal.....	19
Figura 2-	Esquema representando o Sistema de Secreção do Tipo 3 (SST3) em EPEC.....	21
Figura 3-	Padrão de Adesão de amostras de <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica (EPEC).....	24
Figura 4-	Mecanismos pelo qual patógenos bacterianos inibem o seu englobamento.....	29
Figura 5-	Comparação da interação da amostra 7 de EPEC atípica com a amostra 251, no pulso de 10min; com a amostra 268, no pulso de 30min; com a amostra E2348/69, no pulso de 60min.....	47
Figura 6-	Comparação da interação das amostras de EPEC atípica: 7, 251, 84 e 268 e EPEC típica E2348/69 com macrófagos J774.A1, nos pulsos de infecção 10, 30 e 60min.....	48
Figura 7-	Porcentagem de macrófagos J774.A1 contendo bactérias incubados com diferentes DOs bacterianas das amostras 7 e E2348/69, durante de 10min de infecção.....	49
Figura 8-	Comparação da interação da amostra 7 e E2348/69 (diferentes DOs) com macrófagos J774.A1, durante 10min de infecção.....	50
Figura 9-	Número de bactérias (aderidas e/ou internalizadas) / macrófagos J774.A1 da amostra 7 de EPEC atípica e da amostra E2348/69 de EPEC típica, nos pulsos de infecção de 10, 30 e 60 min.....	52
Figura 10-	Quantidade de bactéria fagocitada das amostras 7 e E2348/69, fagocitadas por macrófagos J774.A1, após os pulsos de infecção de 10, 30 e 60min.....	53
Figura 11-	Interação de macrófagos J774.A1 com amostra E2348/69 em presença ou ausência do sobrenadante de cultivo da amostra 7, no pulso de 10min. de infecção.....	54
Figura 12-	Perfil cromatográfico das frações obtidas do sobrenadante da amostra 7 eluído com 0, 25 e 50% de ACN por SPE liofilizadas, ressuspensas em TFA 0,1% e analisadas por HPLC em coluna de C8 submetido a um gradiente de 0 a 100% de solvente B (90% ACN em TFA 0,1%).....	55
Figura 13-	Investigação da capacidade das frações obtidas a partir do sobrenadante da amostra 7 eluídas com 25, 50, 75 e 100% de ACN inibir a fagocitose.....	56

Figura 14-	Investigação da capacidade da fração contendo 25% de ACN, obtida por SPE, em inibir a fagocitose da amostra E2348/69.....	58
Figura 15-	Ensaio de microbicidade realizado com <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922), <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923), e amostra de EPEC típica (E2348/69) na presença das frações 25% ACN a partir do: meio TSB (A); C600 (B); 7 (C), e 7, 10x concentrada (D), em placas de ágar PB.....	60
Figura 16-	Ensaio de inibição de crescimento das bactérias <i>Micrococcus luteus</i> (ATCC 10240), <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923), <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853) e E2348/69 em presença das frações 25% ACN da amostra 7 ou esta 10x concentrada, C600 ou TSB, após 18h de crescimento em meio PB. Leitura da absorbância em 595 nm.....	61
Figura 17-	Fagocitose de levedura por macrófagos J774.A1 pré-incubados com a fração 25% ACN 7 e 320.....	62
Figura 18-	Fagocitose de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> por macrófagos previamente tratados com a fração 25% ACN - 7; 25% ACN - 320; 25% ACN - TSB; na ausência da fração. Após a infecção de 60min.....	63
Figura 19-	Porcentagem de macrófagos contendo <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	64
Figura 20-	Adesão da amostra de EPEC típica E2348/69 em células HEp-2 previamente incubadas com as frações 25% ACN - 7; 25% ACN - 320; 25% ACN - TSB; na ausência da fração, infectadas por 6h e só células HEp-2.....	66
Figura 21-	Investigação do efeito citotóxico da fração 25% ACN - 7 através da incorporação do vermelho neutro pelos lisossomos. Absorbância em 620 nm.....	68
Figura 22-	Investigação do descolamento celular a partir da incubação de células com a fração 25% ACN - 7 através do método de coloração por cristal violeta. Absorbância em 550 nm.....	68
Figura 23-	Investigação da capacidade antifagocítica das frações obtidas por HPLC.....	71
Figura 24-	Investigação da capacidade antifagocítica das frações obtidas por HPLC.....	73
Figura 25-	Investigação da capacidade antifagocítica das diferentes frações obtidas por HPLC.....	74
Figura 26-	Investigação da capacidade dos produtos obtidos da diálise da fração 25% ACN - 7, contendo moléculas maiores ou menores que 1000 Da inibir a fagocitose da amostra E2348/69 em macrófagos	

J774.A1.....	75
Figura 27-	Espectro de massas da fração 25% ACN da amostra 7 em TSB, mostrando alta complexidade e grande predomínio de moléculas monocarregadas e com massa menor do que 2000 Da.....76
Figura 28-	Comparação do perfil cromatográfico da fração 25% ACN - 7, com a fração 25% ACN - 7 contendo moléculas menores que 1000 Da submetida ao HPLC em coluna de C8 com gradiente de 0 a 90% de ACN em TFA 0,1%, monitorado a 214 nm.....77
Figura 29-	Investigação da capacidade antifagocítica da fração eluída, por SPE, com 25% de ACN – 7 cultivada em M9 inibir a fagocitose da amostra E2348/69. Como controle negativo foi utilizado somente a bactéria (sem fração)..... 78
Figura 30-	Investigação da capacidade da fração 25% ACN – 7 obtida a partir do M9, em inibir a fagocitose da amostra E2348/69.....78
Figura 31-	Comparação do perfil cromatográfico da fração 25% ACN - 7, crescida em meio mínimo, com as frações 25% ACN - 7 crescida em TSB e após diálise (somente moléculas menores que 1000 Da) submetida ao HPLC em coluna de C8 com gradiente de 0 a 90% de ACN em TFA 0,1%, monitorado a 214 nm.....79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Principais sorotipos de EPEC típica e atípica.....	23
Tabela 2-	Amostras bacterianas utilizadas neste estudo.....	32
Tabela 3-	Marcadores de virulência, seqüências e concentração dos <i>primers</i> , ciclos de amplificações e tamanho dos fragmentos amplificados utilizados para a pesquisa de fatores de virulência da amostra 7 (O55:H7).....	43
Tabela 4-	Amostras utilizadas como controles das reações de PCR neste estudo.....	44
Tabela 5-	Fatores de virulência presentes nas amostra 7 e 320 de EPEC atípica.....	69
Tabela 6-	Frações obtidas por HPLC monitorado pelos comprimentos de onda 254 nm e 214 nm.....	70
Tabela 7-	Frações obtidas por HPLC monitorado pelo comprimento de onda 214 nm.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Aderência agregativa
ACN	Acetonitrila
AD	Aderência difusa
A/E	<i>Attaching and effacing</i>
AL	Aderência localizada
ALL	Aderência localizada <i>like</i>
BFP	<i>Bundle forming pilus</i>
DAEC	<i>E. coli</i> que apresentam padrão de adesão difusa às células epiteliais
DMEM	Dulbecco Mem
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DO	Densidade óptica
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EAST-1	<i>Enteroagragative Stable Toxin</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
E-hly	EHEC <i>hemolysin</i>
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasora
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
Esp	EPEC <i>secreted protein</i>
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
LB	(caldo ou ágar) Luria Bertani
LEE	<i>Locus of enterocyte effacement</i>
Map	<i>mitochondrion-associated protein</i>
M-CSF	fator estimulador de colônias de monócitos
M9	Meio mínimo
PAMPs	<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
PB	(caldo ou ágar) Meio Pobre
PBS	Solução tampão fosfato salina
PCR	Reação de polimerização em cadeia
pEAF	EPEC <i>adherence factor</i>
Pet	<i>Plasmid-encoded toxin</i>

PI3-K	Fosfatidilinositol 3 quinase
PNED	Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento
PRRs	<i>Pattern Recognition Receptores</i>
q.s.p	Quantidade suficiente para
SFB	Soro Fetal Bovino
SPE	<i>Solid-phase extraction</i>
SST3	Sistema de Secreção Tipo III
STEC	<i>Escherichia coli</i> produtora de toxina de Shiga
Stx	<i>Shiga toxin</i>
Ta	Temperatura ambiente
TBE	Tris/Borato/EDTA
TFA	Ácido trifluoroacético
Tir	<i>Translocated intimin receptor</i>
TSB	Caldo de soja tripticaseína
UFC	Unidade formadora de colônia
X	Vezes
Yop	<i>Yersinia outer membrane proteins</i>

Unidades de medidas

Da	Dalton
g	gramas
h	Hora
kDa	Kilodalton
Mg	Miligrama
Min	Minuto
mL	Mililitro
Mø	Macrófago
Pb	Pares de bases
Pmol	Pico mol
Rpm	Rotação por minuto
nm	Nanômetro
µg	Micrograma
µL	Microlitro
°C	Grau Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Impacto da diarreia infantil.....	18
1.2 <i>Escherichia coli</i> diarreiogênica.....	18
1.2.1 <i>EPEC atípica</i>	22
1.3 Fagocitose.....	25
1.4 Mecanismo antifagocítico.....	27
2 OBJETIVOS.....	31
2.1 Objetivo geral.....	31
2.2 Objetivos específicos.....	31
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1 Amostras bacterianas.....	32
3.2 Cultivo de bactérias.....	32
3.3 Manutenção das células.....	33
3.3.1 <i>Cultura de macrófagos derivados de medula óssea</i>	33
3.3.2 <i>Cultura de macrófagos de linhagem J774.A1</i>	33
3.3.3 <i>Cultura de células epiteliais</i>	33
3.4 Cinética de interação das bactérias com macrófagos.....	34
3.5 Investigação da ação do sobrenadante da cultura da amostra 7 de <i>EPEC atípica</i> na fagocitose.....	35
3.6 Caracterização do “fator antifagocítico” secretado pela <i>EPEC atípica</i> (O55:H7).....	36
3.6.1 <i>Obtenção do sobrenadante</i>	36
3.6.2 <i>Fracionamento do sobrenadante</i>	37
3.7 Investigação da capacidade antifagocítica das frações geradas.....	38
3.7.1 <i>Fagocitose de bactérias</i>	38
3.7.2 <i>Fagocitose de leveduras (Saccharomyces cerevisiae)</i>	39
3.8 Investigação da capacidade microbicida da fração 25 % ACN.....	39
3.9 Ação da fração 25 % ACN na adesão bacteriana às células epiteliais....	40
3.10 Investigação da capacidade citotóxica da fração 25 % ACN da amostra 7.....	40
3.10.1 <i>Incorporação do vermelho neutro</i>	41
3.10.2 <i>Coloração por cristal violeta</i>	41
3.11 Pesquisa de fatores de virulência na amostra 7 (O55:H7) de <i>EPEC atípica</i>	42
3.12 Eletroforese em gel de agarose.....	44
3.13 Análises estatísticas.....	44
4 RESULTADOS.....	46
4.1 Determinação da cinética de interação das bactérias com macrófagos.....	46
4.2 Estabelecimento do número de bactérias / macrófagos infectado.....	51
4.3 Estudo da ação do sobrenadante da amostra 7 na fagocitose.....	53
4.4 Fracionamento do sobrenadante obtido do cultivo bacteriano.....	54
4.5 Investigação da capacidade das frações obtidas por SPE inibir a fagocitose.....	55
4.6 Investigação da capacidade microbicida da fração 25 % ACN.....	59
4.7 Investigação sobre a capacidade da fração 25 % ACN – 7 e 25% ACN -	

320 interferir na fagocitose de levedura.....	61
4.8 Investigação da possibilidade das frações 25 % ACN (7 e 320) inibirem a adesão bacteriana às células epiteliais.....	64
4.9 Investigação da citotoxicidade da fração 25% ACN-7.....	67
4.9.1 <i>Incorporação de vermelho neutro</i>	67
4.9.2 <i>Coloração por cristal violeta</i>	67
4.10 Pesquisa de fatores de virulência da amostra 7 (O55:H7).....	69
4.11 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) da fração 25% ACN-7.....	69
4.12 Avaliação da capacidade antifagocítica da fração 25% ACN – 7 submetida à diálise.....	74
4.13 Análise da fração 25% ACN – 7 por espectrometria de massas.....	75
4.14 Comparação do perfil cromatográfico da fração 25% ACN – 7 por HPLC.....	76
4.15 Investigação da capacidade da fração 25% ACN – 7 (em M9) inibir a fagocitose.....	77
 5 DISCUSSÃO.....	 80
 6 CONCLUSÃO.....	 90
REFERÊNCIAS.....	91
 APÊNDICE - Meios e Soluções Utilizadas.....	 105

1 INTRODUÇÃO

1.1 Impacto da diarreia infantil

Diarreia é um dos maiores problemas de saúde pública que acarreta um enorme impacto econômico nos países em desenvolvimento. A diarreia aguda, sozinha, é responsável por aproximadamente 20% de todas as mortes infantis. Anualmente, cinco mil casos de diarreia são relatados em todo o mundo levando a 1,8 milhões de óbitos em crianças com menos de cinco anos de idade (Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento, 2006). A diarreia mata mais crianças do que a malária e a tuberculose, seis vezes mais do que conflitos armados e cinco vezes mais do que a AIDS (PNED, 2006; BLACK et al., 2010). A presença de saneamento básico e água potável podem reduzir significativamente os casos de diarreia, porém estudos epidemiológicos demonstraram que 80% da população da América Latina não têm acesso a sistemas de esgoto ou água tratada (PNED, 2006). Isso se deve ao alto custo financeiro para implantação de sistemas de saneamento básico. Segundo dados relatados pela PNED, para se universalizar o acesso a esgoto no planeta é estimado um custo anual de cerca de 10 bilhões de dólares americanos ao longo de duas décadas.

Devido ao impacto universal causado por patógenos entéricos à saúde pública e a grande dificuldade e demora na implantação de sistemas de saneamento básico em países em desenvolvimento, um grande esforço tem sido direcionado no entendimento da patogenia causada por microrganismos potencialmente diarreiogênicos.

1.2 *Escherichia coli* diarreiogênica

Há diferentes agentes etiológicos responsáveis por causar a diarreia, entre eles, encontram-se as *E. coli* diarreiogênicas que associam-se às gastroenterites e são classificadas em seis patótipos: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC); *E. coli* enteroinvasora (EIEC); *E. coli* enteroagregativa (EAEC); *E. coli* que apresentam padrão de adesão difusa às células epiteliais (DAEC); *E. coli* produtora da toxina de Shiga (Stx) (STEC) e *E. coli* enteropatogênica (EPEC). Estes patótipos foram

classificados de acordo com o mecanismo de patogenicidade, síndrome clínica, características epidemiológicas e/ou fenótipo de adesão à linhagens celulares (NATARO; KAPER, 1998). Atualmente, vários estudos demonstraram que em um patótipo pode haver amostras com diferentes perfis de virulência, sendo assim, tanto as EPEC como as EAEC foram subdivididas em típicas e atípicas, enquanto as STEC apresentam uma subcategoria conhecida como *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

O primeiro patótipo a ser identificado foi a EPEC, atualmente ela está entre as bactérias mais estudadas devido ao seqüenciamento genômico da amostra protótipo E2348/69 (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

O mecanismo central da patogenia da EPEC é a capacidade de induzir uma lesão histopatológica denominada lesão A/E (*attaching and effacing*) nas células epiteliais do intestino (Figura 1). Esta lesão é caracterizada pelo apagamento das microvilosidades locais, aderência íntima da bactéria ao epitélio intestinal, polimerização da actina e outros componentes do citoesqueleto, logo abaixo do sítio de ligação da bactéria, resultando na formação de uma estrutura em forma de pedestal (MOON et al., 1983). Estas alterações nos enterócitos resultam na redução da capacidade de absorção da mucosa intestinal, o que desencadeia a interrupção do balanço eletrolítico nas células epiteliais do intestino, levando à diarreia. Este mecanismo de patogenia não é exclusivo da EPEC, sendo detectado também em EHEC, além de outras espécies bacterianas como *Citrobacter rodentium* (CLARKE et al., 2003).

Figura 1- Microscopia eletrônica mostrando a Lesão A/E, destruição das microvilosidades (mv) e a formação do pedestal (★).
Fonte: Pedroso et al. (1993).

Os determinantes genéticos para a produção da lesão A/E estão localizados em uma ilha de patogenicidade, denominada LEE (*Locus of enterocyte effacement*) (McDANIEL et al., 1995). A região LEE de EPEC contém 5 operons denominados LEE 1, LEE 2, LEE 3, LEE 4 e LEE 5.

Os operons LEE 1, LEE 2 e LEE 3 contêm os genes que codificam os componentes do Sistema de Secreção Tipo III (SST3) (genes *esc* e *sep*) (ELLIOTT et al., 2000), LEE 4 codifica as proteínas secretadas Esp (*EPEC secreted protein*): EspA, EspB, EspD, EspF entre outras (ELLIOTT et al., 1998), LEE 5 codifica as proteínas intimina (gene *eae*), e a proteína Tir (*Translocated intimin receptor*) (gene *tir*) (SÁNCHEZ-SANMARTÍN et al., 2001). Intimina é uma proteína de membrana externa com função de adesina, responsável pela adesão íntima da bactéria à célula hospedeira (JERSE; KAPER, 1991; DONNENBERG; YU; KAPER, 1993) cujo receptor é a proteína Tir, o qual é translocado para o enterócito pela própria bactéria através do SST3 (KENNY et al., 1997).

Em EPEC o SST3 (Figura 2) é composto por cerca de 20 proteínas diferentes, o que inclui as proteínas efetoras, regulatórias, estruturais e as chaperoninas (HUECK, 1998; BLATTNER; BONAS, 2002). Para as proteínas efetoras alcançarem o citoplasma da célula hospedeira, há a formação de uma estrutura complexa denominada translocon, que se assemelha a uma seringa, estendendo-se desde a membrana interna da bactéria até a membrana externa (GARMENDIA; FRANKEL; CREPIN, 2005). O canal transmembrânico que liga a bactéria à célula ocorre pela extensão da proteína EspA por onde passam as proteínas EspB e EspD, responsáveis por formar o poro na membrana do enterócito (KENNY et al., 1997; KNUTTON et al., 1998; HARTLAND et al., 2000).

McNamara et al. (2001) demonstraram que a proteína efetora EspF é capaz de alterar a permeabilidade das junções oclusivas da célula epitelial, enquanto a proteína Map (*mitochondrion-associated protein*) no estágio inicial da infecção, parece ser responsável pela formação de um filopódio no local da interação (KENNY et al., 2002). Além disso, foi demonstrado que a proteína Map também é capaz de desestabilizar a barreira intestinal, por alterar a permeabilidade das junções oclusivas, porém, através de um mecanismo independente de EspF (DEAN; KENNY, 2004).

1.2.1 EPEC atípica

EPEC é dividida em duas subcategorias denominadas típica e atípica. O termo EPEC atípica foi criado em 1995 para diferenciá-las das EPEC típicas por não apresentarem o plasmídio EAF (*EPEC adherence factor*) (pEAF) que codifica a fímbria BFP (*Bundle forming pilus*), a qual interconecta as bactérias dentro das microcolônias e por não produzirem a toxina de Shiga (Stx) diferenciando-se das EHEC (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002). Porém em comum, as EPEC típicas e atípicas possuem o gene *eae* (*EPEC attaching and effacing*) importante na formação da lesão A/E (KAPER, 1996).

No entanto, outra importante diferença está relacionada aos fatores de virulência. As EPEC típicas são mais homogêneas em suas propriedades de virulência, pois expressam basicamente os fatores de virulência codificados pela região LEE e pelo pEAF (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002). Por outro lado as EPEC atípicas são altamente heterogêneas, embora apresentem também a região LEE, podem expressar fatores de virulência adicionais não codificados por esta ilha de patogenicidade. Dados da literatura mostram que as EPEC atípicas possuem fatores inicialmente descritos em outros patótipos, como a expressão da toxina EAST-1 (toxina termo-estável de EAEC) (VIEIRA et al., 2001; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002); a expressão de enterohemolisinas E-hly (EHEC *hemolysin*) (CAMPOS et al., 1994; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002); a expressão da toxina Pet (*plasmid-encoded toxin* de EAEC) (SOARES et al., 2008) e a identificação de genes que codificam as das toxinas Pic (*protein intestinal colonization* de EAEC), Sat (*secreted autotransporter toxin* de DAEC), EspC (autotransportadora de EPEC) e EspP (autotransportadora de EHEC) (ELIAS et al., 2008).

Os sorotipos de EPEC atípica podem ou não pertencer aos chamados sorogrupos (O) clássicos de EPEC (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002). Quando apresentam o mesmo sorogrupo (tipagem do antígeno somático O, que corresponde a porção polissacarídica do LPS), elas se diferem dos sorotipos (O:H) de EPEC típica, basicamente pelos antígenos H que correspondem as proteínas flagelares (Tabela 1).

Tabela 1- Principais sorotipos de EPEC típica e atípica.

EPEC	Sorotipos
Típica	O55:[H6], O86:H34, O111:[H2], O114:[H2], O119:[H6], O127:H6, O142:H6, O142:H34
Atípica	O26:[H11], O55:[H7], O55:H34, O86:H8, O111:[H9], O111:H25, O119:H2, O125ac:H6, O128:H2

Fonte: Trabulsi, Keller e Gomes (2002).

Nota: [] indica a ocorrência freqüente de amostras imóveis.

EPEC típica é conhecida por aderir-se às células epiteliais de linhagens HEp-2 e HeLa produzindo um padrão de aderência característico, denominado adesão localizada (AL) (SCALETSKY et al., 1984). Este padrão é caracterizado pela adesão bacteriana em áreas localizadas na superfície da célula, formando microcolônias compactas (Figura 3), que tem sido atribuído à fímbria BFP (GIRÓN; HO; SCHOOLNIK, 1991).

No caso da EPEC atípica, além de apresentar o padrão AL, mesmo na ausência da fímbria BFP (HERNANDES et al., 2008), pode apresentar também os padrões: i) de adesão localizada *like* (ALL), caracterizado pela presença de bactérias também em áreas localizadas, porém dispostas de maneira frouxa (Figura 3) (SCALETSKY et al., 1999; PELAYO et al., 1998; VIEIRA et al., 2001; ABE et al., 2009); ii) padrão de adesão difusa (AD), onde as bactérias aderem-se de maneira uniforme em toda superfície da célula (Figura 3) (VIEIRA et al., 2001; DULGUER et al., 2003; NUNES et al., 2003; ROBINS-BROWNE et al., 2004; ABE et al., 2009) característico de DAEC (NATARO; KAPER, 1998); iii) padrão de adesão agregativa (AA), onde as bactérias encontram-se empilhadas na superfície celular ou na lamínula (Figura 3) (VIEIRA et al., 2001; DULGUER et al., 2003; NUNES et al., 2003;

ROBINS-BROWNE et al., 2004; ABE et al., 2009) característico de EAEC (NATARO; KAPER, 1998).

Além disso, foram também detectadas amostras de EPEC atípica que não apresentam um padrão de adesão determinado sendo classificado como padrão indefinido ou até amostras que não se aderem às células, denominadas não aderentes (NA) (ROBINS-BROWNE et al., 2004; ABE et al., 2009). Em EPEC atípica os padrões de adesão são melhores observados após 6h de incubação com células epiteliais de cultura (VIEIRA et al., 2001; DULGUER et al., 2003; NUNES et al., 2003; ROBINS-BROWNE et al., 2004; ABE et al., 2009). Diferente das EPEC típicas onde o padrão AL é claramente visualizado após 3h de incubação (SCALETISKY et al., 1984).

Figura 3- Padrão de Adesão de amostras de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC). Adesão Localizada (AL); Adesão Localizada Like (ALL); Adesão Difusa (AD); Adesão Agregativa (AA). Aumento 100x.
Fonte: Trabulsi, Keller e Gomes (2002).

EPEC típica era frequentemente relacionada a surtos de diarreia nos países desenvolvidos, onde estiveram, durante muitos anos, associadas à diarreia aguda infantil, a partir da década de 1960 esta categoria foi raramente isoladas nestes

países. Já nos países em desenvolvimento, na década de 1990, a EPEC típica era o patógeno mais prevalente associado a casos de diarreia em crianças de até 2 anos de idade (NATARO; KAPER, 1998).

Nos últimos anos, diferentes estudos epidemiológicos demonstraram uma significativa diminuição da prevalência de EPEC típica em países em desenvolvimento, incluindo o Brasil (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002; CHEN; FRANKEL, 2005; OCHOA et al., 2008).

Juntamente com o desaparecimento de EPEC típica nos países em desenvolvimento, houve uma maior prevalência de sorotipos de EPEC atípica nestes países como também em países desenvolvidos (FRANZOLIN et al., 2005; ORLANDI et al., 2006; ARAUJO et al., 2007; BUERIS et al., 2007; HERNANDES et al., 2009; SCALETSKY et al., 2009; MORENO et al., 2010).

Alguns estudos têm demonstrado que EPEC atípica pode estar associada à diarreia aguda infantil (SCALETSKY et al., 1999; FRANZOLIN et al., 2005; ARAUJO et al., 2007) ou à diarreia persistente (AFSET et al., 2004; NGUYEN et al., 2006), podendo ser encontrada em pacientes de várias idades e em pacientes imunocomprometidos pelo HIV (GASSAMA-SOW et al., 2004; GOMES et al., 2004).

O estudo e identificação de fatores de virulência é um importante aspecto para o entendimento da interação patógeno-hospedeiro, porém, até o momento, nenhum fator de virulência exclusivo para EPEC atípica foi identificado. Ao contrário disto, vários estudos tem demonstrado que EPEC atípica apresenta fatores de virulência muitas vezes, mais semelhantes à EHEC, responsável por causar uma diarreia potencialmente mais grave, do que com a própria EPEC típica (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002).

Estes achados reforçam a idéia de que a distribuição dos fatores de virulência em EPEC atípica é altamente heterogênea (VIEIRA et al., 2001; GOMES et al., 2004; ABE et al., 2009).

1.3 Fagocitose

Fagocitose é um processo conservado evolutivamente utilizado pela maioria das células para ingerir patógenos microbianos, células senescentes ou danificadas e antígenos particulados, como poluentes (STOSSEL, 1999). Esta via não

constitutiva engloba ligantes com mais de 1 μm e é fundamental ao remodelamento de tecido, inflamação e morte de microrganismos patogênicos que são englobadas a partir da interação com receptores presentes na superfície da célula hospedeira (ALLEN; ADEREM, 1996).

Os receptores descritos para a identificação de patógenos são conhecidos como PRRs (*Pattern Recognition Receptores*), os quais se ligam especificamente aos chamados PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*) que são moléculas conservadas presentes na superfície do microrganismo, por exemplo, os ácidos lipoteicoícos, peptideoglicanas, lipopolissacarídeos e flagelina presentes na superfície de bactérias Gram + e Gram - (JANEWAY, 1992).

A partir do englobamento de um patógeno microbiano a morte do microrganismo pode ser decorrente da fusão do fagossoma ao lisossoma, o qual é rico em enzimas hidrolíticas e pela formação de íons superóxidos reativos (DELEO et al., 1999).

A partir de 1995, Rabinovitch classificou as células em fagócitos não profissionais e profissionais. Os fagócitos não profissionais incluem diferentes tipos celulares, tais como fibroblastos, células epiteliais e endoteliais que apresentam baixa capacidade microbicida e, portanto são altamente explorados por patógenos intracelulares. Por outro lado os fagócitos profissionais são células especializadas tais como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, assim denominadas, por apresentarem uma maior diversidade de receptores transmembrânicos e uma maior capacidade microbicida (RABINOVITCH, 1995).

Diferentes receptores presentes em um fagócito podem ser simultaneamente utilizados. Este reconhecimento pode acontecer por ligação direta como, por exemplo, através dos receptores de manose, lixeira, Toll-R (Toll-like receptor) e de outras integrinas ou ligação indireta que inclui as opsoninas como: IgG, moléculas do complemento ou proteína A, que são reconhecidas pelos receptores Fc e CR (UNDERHILL; OZINSKY, 2002).

Após o reconhecimento da partícula estranha pelo receptor específico, o processo fagocítico inicia-se através do rearranjo do citoesqueleto, polimerização da actina e conseqüentemente a formação de pseudópodes logo abaixo da região de contato ligante – receptor (GREENBERG, 1999). A partícula aderida é englobada dentro de um fagossomo, independente de clatrina. Logo após a internalização, a actina F é despolimerizada do fagossoma e a membrana vacuolar se torna acessível

aos endossomas recentes (SWANSON; BAER, 1995). Através de uma série de eventos de fusão à membrana vacuolar, tanto a membrana como o conteúdo vacuolar madura, fusionando-se com os endossomas tardios, antes da fusão com o lisossomo. A proporção da fusão lisossomo-fagossomo varia drasticamente dependendo da natureza da partícula ingerida (PITT et al., 1992), bem como do receptor envolvido. Enquanto fagossomas contendo partículas de látex podem demorar horas até a formação do fagolisossoma, ligantes englobados via receptor Fc ou manose podem, após 30 min, ser encontrados nos fagolisossomas (CHASTELLIER; THILO, 1997).

A fagocitose, principalmente a desencadeada por células dendríticas é responsável por direcionar o antígeno, dependendo da sua origem, ao compartimento MHC de classe I ou II funcionando desta forma como uma efetora da imunidade inata, bem como, uma importante ponte entre imunidade inata e resposta imune adquirida (ADEREM; UNDERHILL, 1999).

No entanto, tem-se descrito diferentes estratégias que tem sido utilizadas por diversos patógenos a fim de burlar a interação com os fagócitos profissionais visando prevenir ou retardar a imunidade inata.

1.4 Mecanismo antifagocítico

A capacidade de interferir no processo de fagocitose já foi descrita para *Yersinia sp* (ROSQVIST; BOLIN; WOLF-WATZ, 1988; WIEDERMANN et al., 2001); *Pseudomonas aeruginosa* (GARRITY-RYAN et al., 2000); *Klebsiella pneumoniae* (ÁLVAREZ et al., 2000); *Staphylococcus aureus* (THAKKER et al., 1998); *Streptococcus pneumoniae* (CLAVERYS et al., 2000); *Neisseria meningitidis* (VOEGEL et al., 1997); *Helicobacter pylori* (ALLEN et al., 2000; RAMARAO et al., 2000); *Mycobacterium tuberculosis* (FLYNN; CHAN, 2003) e EPEC típica (GOOSNEY et al., 1999). Embora o resultado final da interação por estes patógenos seja o retardamento ou a prevenção da fagocitose, as estratégias utilizadas para desencadear o mecanismo antifagocítico são diversas (CELLI; FINLAY, 2002; COOMBES; VALDEZ; FINLAY, 2004).

Em geral, os patógenos mostram-se capazes de subverter a fagocitose por:

- 1º) inibir a adesão aos macrófagos como é o caso do *Staphylococcus aureus*

(ROOIJAKKERS; KESSEL; STRIJP, 2005) e *Streptococcus pyogenes* (FISCHETTI, 1989); 2º) aderirem-se aos macrófagos, interferindo na internalização como é o caso da *Yersinia* (ROSQVIST et al., 1990), *Pseudomonas aeruginosa* (GARRITY-RYAN, et al., 2000) e EPEC típica (CELLI; OLIVIER; FINLAY, 2001); 3º) uma vez fagocitados subvertem os mecanismos de destruição intracelular por: i) escapar do fagossoma como é o caso da *Listeria monocytogenes* (DRAMSI; COSSART, 2002) e *Trypanosoma cruzi* (NOGUEIRA; COHN, 1976); ii) impedir a formação do fagolisossomo classicamente descrito para *Mycobacterium tuberculosis* (DERETIC; FRATTI, 1999) e *Toxoplasma gondii* (CHARRON; SIBLEY, 2002); iii) sobreviver dentro de um ambiente inóspito como o fagolisossomo observado tanto nos macrófagos infectados por *Coxiella burnetii* (BACA; LI; KUMAR, 1994) e *Leishmania* sp (ALEXANDER; VICKERMAN, 1975).

Uma das estratégias antifagocíticas mais bem conhecida é a utilizada pela *Yersinia* sp. Estudos demonstraram que após a adesão ao macrófago, o SST3 é estabelecido e diferentes proteínas efetoras conhecidas como Yops (*Yersinia* outer membrane proteins) são injetadas na célula. Pelo menos 4 proteínas efetoras já foram descritas como importantes no bloqueio do englobamento por fagócitos profissionais (Figura 4).

YopH é uma proteína tirosina fosfatase (PTPase) que interrompe os sinais fagocíticos por desfosforilar proteínas sinalizadoras importantes na fagocitose via receptor Fcy (ROSQVIST; BOLIN; WOLF-WATZ, 1988; FALLMAN et al., 1995; ANDERSSON et al., 1996), a YopE ativa as GTP-ases da família Rho (RhoA, Rac e Cdc42) (BLACK; BLISKA, 2000), que induz a despolimerização do citoesqueleto da célula hospedeira, impedindo o englobamento da bactéria (ROSQVIST et al., 1990; ROSQVIST; FORSBERG; WOLF-WATZ, 1991), a Yop T é uma cisteína protease que depolimeriza filamentos de actina, por clivar as Rho GTPase (RhoA, Rac e Cdc42) diretamente na cisteína da porção C-terminal, liberando-as da membrana (SHAO et al., 2003) e a Yop P que foi demonstrada como importante na inibição da fagocitose de células dendríticas e que também é capaz de inibir a apresentação de antígeno no contexto do MHC de classe I, para as células T CD8+ (TRÜLZSCH et al., 2005; ADKINS et al., 2007).

Pseudomonas aeruginosa também utiliza o SST3 para secretar as proteínas efetoras (ExoS e ExoT) dentro do macrófago. Muito semelhante a YopE de *Yersinia*, ExoS e ExoT também tem atividade GAP e portanto afeta RhoA, Rac1 e Cdc42,

impedindo sua internalização (Figura 4) (GOEHRING et al., 1999; COWELL et al., 2000).

Figura 4- Mecanismos pelo qual patógenos bacterianos inibem o seu englobamento.
Fonte: Knodler, Celli e Finlay (2001).

A estratégia de interferir na polimerização de actina sob o sítio de adesão da bactéria foi também descrita como estratégia de prevenção da fagocitose para EPEC típica (Figura 4). Goosney et al. (1999) mostraram que o efeito antifagocítico é dependente do SST3 e das proteínas EspA, EspB, EspD, apresentando dependência intermediária de intimina e Tir. Este mecanismo ocorre a partir de 2h de contato com a célula hospedeira e parece ser maior, quanto maior for o número de bactérias aderidas ao macrófago (GOOSNEY et al., 1999).

Anos depois se demonstrou que a diminuição do englobamento era devido à inibição da fosfatidilinositol 3 quinase (PI3-K), importante para a polimerização da actina, via receptor Fc (CELLI; OLIVIER; FINLAY, 2001). A ativação da PI3-K é essencial para a formação do fagossomo, devido o seu envolvimento no rearranjo da actina-F e consequentemente o englobamento pelo macrófago (COX et al., 1999).

Em seus estudos Celli, Olivier e Finlay (2001) demonstraram que macrófagos J774.A1 infectados com EPEC não fagocitavam zimosam opsonizados com IgG, enquanto a fagocitose de zimosam opsonizado com C3bi permanecia inalterada, comprovando que o receptor CR3 continuava funcional. Entretanto, Marcheès et al. (2008), mostraram que EspJ, outra proteína secretada por EPEC típica, é importante na inibição da fagocitose de glóbulos vermelhos de carneiro opsonizados, tanto com

IgG como com C3bi, mostrando o envolvimento dos receptores Fc e CR3. Interessantemente, EHEC também bloqueia a internalização de partículas opsonizadas, igualmente como descrito para EPEC (Marcheès et al. 2008).

Quitard et al. (2006) demonstraram que a proteína efetora EspF, inicialmente descrita como responsável pela destruição da barreira epitelial (DEAN; KENNY, 2004) bem como morte celular através da mitocôndria (NAGAI; ABE; SASAKAWA, 2005) é também responsável pela inibição da PI3-K em macrófagos J774.A1, por vias independentes desses processos.

Um mecanismo não dependente de PI3-K também foi descrito como importante no impedimento do englobamento de EPEC típica. Neste trabalho os autores mostraram que a proteína Esp B, também injetada pelo SST3, liga-se à miosina impedindo a ligação à actina- F e conseqüentemente a formação de pseudópodes (IIZUMI et al., 2007).

O fato de estudos epidemiológicos demonstrarem aumento na incidência de casos de diarreia por EPEC atípica (FERNANDES-FILHO, 2004; FRANZOLIN et al., 2005; ARAUJO et al., 2007; BUERIS et al., 2007; ABE et al., 2009) aliado a heterogeneidade na distribuição dos fatores de virulência descrita nesta “sub-categorias” (VIEIRA et al., 2001; GOMES et al., 2004; ABE et al., 2009) despertou o interesse em investigar a interação de EPEC atípica com fagócitos profissionais, até o momento, totalmente desconhecido.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar o comportamento de EPEC atípica na interação com fagócitos profissionais.

2.2 Objetivo específico

Investigar se a EPEC atípica é capaz de induzir um mecanismo antifagocítico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras bacterianas

Para o estudo da interação de EPEC atípica com macrófagos, foram utilizadas amostras bacterianas pertencentes à coleção do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan e amostras provenientes de um estudo epidemiológico realizado em Salvador, Bahia (FRANZOLIN et al., 2005) (Tabela 2).

Tabela 2- Amostras bacterianas utilizadas neste estudo.

Amostra	Sorotipo	Categoria	Referência
7 *	O55:H7	EPEC atípica	RODRIGUES et al., 1996
320 #	O55:H7	EPEC atípica	BUERIS et al., 2007
251 #	O11:H10	EPEC atípica	BUERIS et al., 2007
84 #	O86:H11	EPEC atípica	BUERIS et al., 2007
268 #	O49:H6	EPEC atípica	BUERIS et al., 2007
E2348/69 *	O126:H7	EPEC típica	LEVINE et al., 1978
C600 *	K12	<i>E. coli</i> (não patogênica)	SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989 ATCC 25923
<i>Staphylococcus aureus</i> *			ATCC 25922
<i>Escherichia coli</i> *			ATCC 27853
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> *			ATCC 10240
<i>Micrococcus luteus</i> *			

* Coleção do Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan;

Projeto Bahia, Franzolin et al. (2005).

3.2 Cultivo de bactérias

As amostras bacterianas estocadas em meio TSB (caldo de soja tripticaseína) (BD, EUA) acrescido de 80% de glicerol foram mantidas à -20 °C. Para o uso, as amostras foram cultivadas em TSB e semeadas em ágar MacConkey (Merck, Alemanha). Para os ensaios, colônias isoladas foram retiradas e cultivadas em meio TSB durante 18h a 37 °C em condições estáticas, antes do uso, as culturas bacterianas foram ajustadas para a densidade óptica (DO) 0,6 (550 nm) (Spectronic 20 Genesis, USA).

3.3 Manutenção das células

3.3.1 *Cultura de macrófagos derivados de medula óssea*

Para a obtenção de macrófagos de cultura primária, camundongos isogênicos C57/BL6 foram sacrificados em câmara de CO₂, em seguida, os fêmures foram retirados e a medula óssea extraída assepticamente. Estas células foram mantidas em placas de Petri para cultivo celular, em meio RPMI 20% Soro Fetal Bovino (SFB) (Cultilab, Brasil) e 30% de meio condicionado por células L-929 (R 20/30), contendo M-CSF (fator estimulador de colônias de monócitos), durante 7 dias em atmosfera de 5% de CO₂ até a diferenciação celular. No 4º dia de cultura adicionou-se 10 mL de meio R 20/30 (BOLTZ-NITULESCU et al., 1987; SURESH; SODHI, 1991; GERSUK; HIRAOKA; MARR, 2005).

O descolamento dos macrófagos foi realizado no 7º dia de cultivo incubando-se as células por cerca de 20min a 4 °C em meio Hank's (Cultilab, Brasil). As células resgatadas foram centrifugadas a 259 x g (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, EUA), por 5min a 4 °C e distribuídas em placas de cultura de células contendo 24 poços, na concentração de $1,5 \times 10^5$ células/poço, em meio RPMI 10% SFB mais 5% de meio condicionado (R 10/5).

3.3.2 *Cultura de Macrófagos de Linhagem J774.A1*

Macrófagos de murinos da linhagem J774.A1 foram cultivados em meio RPMI 10% SFB. Após a formação da monocamada, as células aderidas foram retiradas por raspagem, centrifugadas e distribuídas na concentração de 2×10^5 macrófagos/poço em placas de cultura contendo 24 poços. As culturas foram mantidas sob atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C e utilizadas nos ensaios 24h após o plaqueamento.

3.3.3 *Cultura de células epiteliais*

Células originárias de carcinoma de laringe humana (HEp-2) e células originárias de adenocarcinoma intestinal humano (Caco-2), ambas provenientes do

Instituto Adolf Lutz, foram mantidas em meio Dulbecco Mem (DMEM) contendo 4,5 g de glicose (Cultilab, Brasil) com 10% de SFB, para HEp-2 ou 15% SFB para Caco-2.

Para o ensaio, as culturas foram tripsinizadas acrescentando-se 2 mL de solução Tripsina/ETDA 2,5 g/L (Cultilab, Brasil) por aproximadamente 2min. Após o descolamento celular, a tripsina foi inativada com DMEM 10% SFB e as culturas centrifugadas e distribuídas em placa de cultura na concentração de 5×10^4 células HEp-2/poço ou 2×10^5 células Caco-2/poços. As células HEp-2 foram utilizadas 48h após o plaqueamento, enquanto as culturas de células Caco-2 só foram utilizadas após 10 dias de cultura, tempo necessário para obter-se a polarização celular. Durante este período o meio de cultura das células Caco-2 foi substituído a cada 48h.

3.4 Cinética de interação das bactérias com macrófagos

Os ensaios de cinética de interação foram realizados com macrófagos de cultura primária e de linhagem J774.A1. As amostras 7, 251, 84, 268 de EPEC atípica e a amostra controle E2348/69 de EPEC típica foram utilizadas. As lamínulas contendo células aderidas foram lavadas 1 x com PBS (tampão fosfato salina) estéril, em seguida, acrescentou-se 960 μ L de meio RPMI 2% SFB e 40 μ L de cultura bacteriana (DO 0,6) incubando-se durante 10, 30 e 60min. Após cada um dos diferentes pulsos de infecção, as células foram lavadas 3 x com PBS, fixadas com metanol 100% (Sigma, EUA) durante 30min à temperatura ambiente (Ta) e coradas com May-Grünwald (Merck, Alemanha), diluído 1:2 em tampão Sørensen, durante 5min e com o corante Giemsa (Merck, Alemanha) diluído 1:3, no mesmo tampão, por 20min. Após a coloração, as lamínulas foram lavadas com água destilada, secas em Ta e montadas sobre lâminas de vidro com auxílio de Entellan (Merck, Alemanha).

A porcentagem de macrófagos contendo bactérias associadas (aderidas e internalizadas) foi determinada contando-se ao microscópio de luz (objetiva 100 x) (Alphaphot-2 YS2, Nikon, China) 300 células/lamínula em diferentes campos. Este experimento foi sempre realizado em triplicatas.

Para os ensaios que visavam avaliar a interação das bactérias em diferentes DO, culturas bacterianas com DO 0,6 foram diluídas para 0,06; 0,006. Para a

obtenção da DO 1,2, a cultura foi concentrada. Para isso, 6 mL do caldo bacteriano foram centrifugados e 3 mL do sobrenadante foi desprezado, sendo o *pellet* ressuspensão nos 3 mL restantes. Posteriormente a absorbância foi ajustada para 1,2. As culturas bacterianas em diferentes DOs foram adicionadas sobre macrófagos J774.A1 nos pulsos de infecção 10, 30 e 60min.

A determinação do número de bactérias/macrófagos foi obtida após a contagem de no mínimo 100 células contendo bactérias, nos 3 pulsos de infecção, classificando-as em 3 grupos: **Grupo A:** células contendo de 1 a 5 bactérias/macrófagos; **Grupo B:** de 6 a 15 bactérias/macrófagos e **Grupo C:** de 16 ou mais bactérias/macrófagos. Este experimento foi sempre realizado em triplicatas.

Paralelamente a este experimento, a determinação da porcentagem de fagocitose foi obtida lavando-se as culturas, após o pulso de infecção e incubando-as com 100 µg/mL de sulfato de gentamicina (Cultilab, Brasil), durante 1h a 37 °C, para a eliminação de bactérias extracelulares. Em seguida, as células foram lavadas mais 3 x com PBS e rompidas com 100 µL de detergente Triton-X 100 (Merck, Alemanha) à 0,1%. Esta solução foi diluída a 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} em salina 0,85% e plaqueada em ágar LB. Após 18h a 37 °C, a unidade formadora de colônia (UFC/mL) foi determinada. Como controle da eficiência do antibiótico, o sobrenadante das culturas, após a incubação com gentamicina, também foi plaqueado.

3.5 Investigação da ação do sobrenadante da cultura da amostra 7 de EPEC atípica na fagocitose

a) Obtenção do sobrenadante da amostra 7

O sobrenadante da amostra 7 foi obtido após o crescimento bacteriano durante 18h em meio TSB ou Meio Mínimo (M9). A cultura bacteriana foi centrifugada 10min a 3214 x g (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, EUA) e o sobrenadante foi resgatado e utilizado;

b) Preparo da amostra de EPEC típica

A amostra E2348/69 foi submetida ao mesmo procedimento descrito acima, porém, a DO da cultura foi ajustada para 0,6. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* lavado 2 x com TSB ou M9, em seguida, o material foi ressuspensão no mesmo volume inicial a fim de manter-se a DO 0,6.

c) Ensaio fagocítico

Macrófagos plaqueados como descrito na seção 3.3.2 foram pré incubados com 100 μ L do sobrenadante de cultura bacteriana da amostra 7, mais 860 μ L de meio RPMI 2% SFB durante 30min. Para descartar a possibilidade do sobrenadante da amostra E2348/69 conter algum fator que interferisse na fagocitose, a cultura bacteriana foi centrifugada e o *pellet* foi ressuspensão em meio novo. Em seguida, os macrófagos foram infectados com 40 μ L da amostra E2348/69, durante os pulsos de 10, 30 e 60min.

Como controle positivo do efeito antifagocítico, as células foram infectadas com a amostra 7, como controle negativo as células foram infectadas com a amostra E2348/69.

3.6 Caracterização do “fator antifagocítico” secretado pela EPEC atípica (O55:H7)

3.6.1 Obtenção do sobrenadante

As amostras 7, 320 de EPEC atípica e C600 (não patogênica) foram crescidas por 18h em meio TSB ou M9 a 37 °C, sob agitação de 150 rpm. Em seguida, as culturas foram centrifugadas a 9870 x g (Hitachi high speed refrigerated centrifuge CR21, Japão) a 4 °C, por 10min. Os sobrenadantes obtidos foram separados e fracionados como descrito abaixo.

3.6.2 Fracionamento do sobrenadante

a) Técnica de extração em fase sólida (SPE)

Os sobrenadantes das amostras obtidas na seção 3.6.1 foram submetidos a extração em fase sólida (*Solid-phase extraction* (SPE)) em cartucho C18 2g Sep-Pak de 20 mL (Waters, USA). A resina foi ativada com 3 volumes de metanol e equilibrada com 3 volumes de Ácido Trifluoroacético 0,1% (TFA) (Sigma-Aldrich, USA). Em seguida, foram passados 200 mL de sobrenadante e o material não retido foi coletado. Foram então passados em sequência 3 volumes de Acetonitrila (ACN) (J.T.Baker, EUA) 25%, 50%, 75% e 90%, sempre contendo 0,1% TFA. As frações eluídas com cada concentração de ACN foram liofilizadas e ressuspensas em meio RPMI.

Cada fração foi analisada quanto à capacidade de inibir a fagocitose da amostra de EPEC típica (E2348/69) que não apresenta efeito antifagocítico nestas condições. O meio de cultivo TSB foi também submetido à SPE para ser utilizado como controle negativo nos ensaios. Concomitantemente as frações eluídas do cartucho de SPE foram liofilizadas e ressuspensas em TFA 0,1% à concentração de até 8 mg/mL para análise por HPLC.

As frações obtidas da SPE utilizadas nos ensaios foram originadas a partir de 2 lotes de sobrenadantes bacterianos obtidos conforme descrito na seção 3.6.1.

b) Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Todas as análises por HPLC foram realizadas em um sistema 20A binário da Shimadzu (Japão) em coluna ACE C8 de 5 μ m, 4,6 x 250 mm (ACE, Escócia). O material ressuspenso em solvente A (TFA 0,1%) foi injetado no sistema e submetido a um gradiente de 0 a 100% de solvente B (90% ACN em TFA 0,1%) em 20min, sob fluxo constante de 1 mL min⁻¹. O material foi fracionado por intervalos de tempo variando de 2 a 5min e as diferentes frações foram liofilizadas, ressuspensas em meio RPMI e investigadas quanto à capacidade de inibir a fagocitose conforme descrito na seção 3.7.1.

c) Espectrometria de massas

As análises de espectrometria de massas foram realizadas em um espectrômetro de massas ESI (LCQDuo™, ThermoFinnigan, USA) equipado com uma fonte *nanospray* e conectado a um sistema nano-HPLC (UltiMate 129 HPLC System, LC Packings, Dionex, USA). As amostras foram diluídas em 5% ACN, 0,2% ácido fórmico e introduzidas no espectrômetro a um fluxo de $1\mu\text{L min}^{-1}$. A voltagem do spray foi mantida a 1,8 kV, a voltagem do capilar a 46 V, a temperatura do capilar a 180° C e o “offset” da lente do tubo foi mantido a -5 V. Os espectros de massas foram coletados na região de 50 a 2000 m/z. Controles dos instrumentos, aquisição e análise de dados foram realizados com a suíte de programas Xcalibur.

d) Diálise

Com a finalidade de se diminuir a complexidade do perfil da fração 25% ACN da amostra 7, o material foi submetido a diálise utilizando-se uma membrana com *cut-off* de 1000 Da (Spectrum, Canadá). Cerca de 30 mL da fração foram dialisados contra 500 mL de água destilada, com a realização de 2 trocas ao longo de 18h, a 4 °C, sob agitação, sendo a água da troca reservada. Tanto a água utilizada na diálise contendo moléculas menores que 1000 Da, como o material retido na membrana foram liofilizados e testados quanto à capacidade de inibir a fagocitose.

3.7 Investigação da capacidade antifagocítica das frações geradas

3.7.1 Fagocitose de bactérias

Macrófagos J774.A1 pré-incubados com 300 μL das frações resultantes da SPE ou HPLC, durante 30min. Em seguida, 40 μL da amostra E2348/69 (DO 0,6) foram adicionados as culturas que permaneceram incubadas, durante 60min a 37 °C.

Após a incubação, as células foram lavadas 3 x com PBS e posteriormente incubadas com 100 $\mu\text{g/mL}$ de sulfato de gentamicina por 1h a 37 °C. Os macrófagos foram novamente lavados 3 x com PBS, lisados com 100 μL de Triton-X 100 à 0,1%,

diluídos a 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} e plaqueados em ágar LB, para a determinação da UFC/mL. Como controle da efetividade do antibiótico, o sobrenadante das culturas resultante da incubação com a gentamicina, também foi plaqueado.

Paralelamente ao experimento em que as células foram lisadas para a determinação da UFC/mL, o mesmo experimento foi realizado corando-se as células com os corantes May e Giemsa para a análise por microscopia de luz.

Ensaio fagocíticos também foram realizados com a fração 25% de ACN (7 em TSB) que foi aquecida por 10min a 100 °C.

3.7.2 Fagocitose de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*)

Macrófagos J774.A1 foram pré-incubados com 300 µL das frações 25% ACN por SPE (7 ou 320), durante 30min. Em seguida, as células foram infectadas com 6×10^5 leveduras/poço na proporção de 3:1, durante 60min. Após a incubação as células foram lavadas, fixadas, coradas com May e Giemsa e analisadas ao microscópio de luz (objetiva 100 x).

A porcentagem de macrófagos contendo levedura foi determinada pela contagem de 200 células em diferentes campos, já a determinação da porcentagem de leveduras aderidas ou internalizadas foi obtida contando-se 100 células infectadas. Como controles, macrófagos foram infectados com leveduras na ausência ou presença da fração 25% ACN (TSB).

3.8 Investigação da capacidade microbicida da fração 25% ACN

A capacidade microbicida da fração 25% ACN da amostra 7 crescida em meio TSB foi avaliada por dois diferentes ensaios de microbicidade. No primeiro ensaio utilizou-se *Staphylococcus aureus* (Gram +), *Escherichia coli* (Gram -) e a amostra E2348/69 semeadas em placas de ágar PB (caldo pobre). Em seguida, 10 µL da fração 25% ACN da amostra 7 ou esta fração 10x concentrada foram adicionados ao ágar. As placas foram incubadas a 37 °C, durante 18h. Como controles, bactérias foram incubadas com as frações 25% ACN obtidas da amostra não-patogênica (C600) e com apenas o meio TSB.

No segundo ensaio utilizaram-se, além das amostras anteriores, as espécies bacterianas, *Pseudomonas aeruginosa* (Gram -) e *Micrococcus luteus* (Gram +).

A DO das bactérias crescidas em PB ajustada para DO 0,001 foram distribuídas no volume de 90 µL/poço em placa de cultura de células com 96 poços, juntamente com 10 µL da fração 25% ACN da amostra 7 (1x ou 10x concentrada). Como controles, as bactérias foram incubadas na ausência ou presença das frações 25% ACN obtidas, da amostra C600 e do meio TSB. As culturas foram incubadas durante 18h à 150 rpm e a DO foi determinada a 595 nm em leitor de ELISA Multiskan®EX (Thermo Isher Scientific, EUA).

3.9 Ação da fração 25% ACN na adesão bacteriana às células epiteliais

Os ensaios de adesão bacteriana foram realizados em culturas de células HEp-2 ou Caco-2, conforme descrito por Cravioto et al. (1979), com modificações. As células foram previamente incubadas com 300 µL das frações 25% de ACN (7 ou 320), mais 180 µL de DMEM 2% SFB e 1% de D-manose (Inlab, Brasil), durante 30min. Em seguida, 20 µL da cultura da amostra E2348/69 foram adicionados (diluição final de 1:25) às células HEp-2 incubadas por 3h, após 4 x lavagens com PBS estéril, para a remoção das bactérias não aderidas, as culturas permaneceram incubadas por mais 3h, quando foram novamente lavadas.

Nos ensaios realizados com as células Caco-2, as culturas foram incubadas com as bactérias por apenas 2h. Após as lavagens lamínulas contendo células HEp-2 ou Caco-2 foram fixadas e coradas com May e Giemsa.

Como controles, tanto as culturas de HEp-2 como as de Caco-2 foram ou não previamente incubadas com as frações 25% ACN (C600 ou TSB), antes da adição das bactérias.

3.10 Investigação da capacidade citotóxica da fração 25% ACN da amostra 7

A investigação sobre a capacidade citotóxica da fração 25% ACN (amostra 7) foi realizada com as frações obtidas de culturas crescidas em meio TSB, fracionada por SPE.

Para o ensaio de citotoxicidade foram utilizadas duas metodologias, cujos princípios diferem. O primeiro ensaio visou a incorporação do vermelho neutro que por ser solúvel em água, atravessa a membrana de células viáveis, concentrando-se

nos lisossomos. A segunda metodologia visou avaliar o descolamento celular através da coloração por Cristal Violeta, que é incorporado ao DNA. As duas metodologias foram avaliadas pela medida de intensidade de cor em leitor de ELISA Multiskan®EX (Thermo Isher Scientific, EUA).

3.10.1 Incorporação do vermelho neutro

Este ensaio foi realizado segundo Ciapetti et al. (1996), com modificações. Para isto, células HEp-2 distribuídas na concentração de 2×10^4 /poço em placas de 96 poços foram incubadas durante 24h. No dia seguinte, a fração 25% ACN (amostra 7) (diluída 1:10 em DMEM 5% SFB) foi adicionada e a cultura permaneceu por mais 24h a 37 °C, em estufa de CO₂. Após este período, as culturas celulares receberam 20 µL da solução de vermelho neutro 1% /poço e permaneceram incubadas a 37 °C, durante 4h. Em seguida, o sobrenadante das culturas foi removido e o corante presente nas células foi solubilizado com 200 µL/poço da solução descorante para o vermelho neutro. A absorbância foi determinada em 620 nm em leitor de ELISA Multiskan®EX (Thermo Isher Scientific, EUA).

3.10.2 Coloração por cristal violeta

Células HEp-2 foram distribuídas na concentração de 5×10^4 /poço em placas de 96 poços, 24h antes do ensaio. As culturas celulares foram incubadas com a fração 25% ACN da amostra 7 (diluída 1:2 em meio DMEM 5% SFB) por 24h a 37 °C, em estufa de CO₂. Após o período de incubação a placa foi lavada 2 x com PBS e fixadas com metanol, por 10min. Posteriormente as células foram lavadas 2 x com PBS, coradas com solução de cristal violeta, durante 10min. Após 2 novas lavagens, as culturas foram descoradas administrando-se 100 µL da solução descorante que permaneceu durante 30min. A absorbância foi detereminada em 550 nm em leitor de ELISA Multiskan®EX (Thermo Isher Scientific, EUA) (ITAGAKI et al., 1991).

Os controles para ambas metodologias foram: células incubadas com as frações 25% ACN (C600 ou TSB) e com Triton X 100 (0,1%), neste caso, durante apenas os últimos 15min do ensaio.

3.11 Pesquisa de fatores de virulência na amostra 7 (O55:H7) de EPEC atípica

Marcadores de virulência pesquisados na amostra 320 por PCR (Tabela 3) (PORANGABA et al., 2006, 2008; SANTOS et al.; 2008) foram também investigados na amostra 7, que compartilha o mesmo sorotipo. Como controle negativo para as reações de PCR foi utilizado a amostra C600.

Para as reações o lisado da amostra 7 (O55:H7) foi preparado a partir de 1 mL do caldo bacteriano, crescido em meio LB por 18h. A cultura foi centrifugada a 15700 x g (centrifuge 5415 D, Eppendorf, EUA) durante 5min, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspenso em 300 µL de água miliQ estéril. Esta suspensão foi submetida a fervura por 10min e após este período o produto foi incubado a 0 °C, durante 10min. O lisado foi centrifugado novamente, o sobrenadante aliqotado e armazenado a – 20 °C, até o momento do uso. O mesmo procedimento foi realizado para as amostras utilizadas como controles positivos (Tabela 4).

Algumas reações foram preparadas na forma de “multiplex-PCR” (*sat*, *toxB*, *pic*, *pet*, *hly* e *efa1/lifA*) ou simples PCR (*epeA*, *ehly1*, *espC* e *espP*).

Para cada reação de PCR foram utilizados: tampão para PCR 10x concentrado; 1,5 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂); 200 mM da mistura de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP); 2,5 U de *Taq* DNA *Polymerase* (Invitrogen, EUA); *primers* na concentração indicada (Tabela 3), 2 µL do lisado de cada amostra e água deionizada estéril para um volume final de 25 µL. Com exceções, para o multiplex (*pic*, *pet*) foi utilizado 1,25 U de *Taq* DNA *Polymerase* e para a detecção do gene *eatA*, 2,5 mM de MgCl₂.

As PCRs foram realizadas no termociclador Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems, EUA).

Tabela 3- Marcadores de virulência, seqüências e concentração dos *primers*, ciclos de amplificações e tamanho dos fragmentos amplificados utilizados para a pesquisa de fatores de virulência da amostra 7 (O55:H7).

Genes	Seqüência dos <i>primers</i>	Concentração dos <i>primers</i> (pmol)	Ciclo de Amplificação		Tamanho fragmento (PB)	Referência
<i>pet</i>	(F) 5'-GTGTTTCAACCAGGTTCAACA-3' (R) 5'-CCTTCACCAATTTTATGCAGT-3'	20	5' 94 °C; 25 x (30" 94 °C, 1' 55 °C, 1' 30" 72 °C) e 7' 72 °C		1037	GIOPPO et al., 2000
<i>pic</i>	(F) 5'- GGGTATTGTCCGTTCCGAT-3' (R) 5'- ACAACGATACCGTCTCCCG-3'	20	5' 94 °C; 25 x (30" 94 °C, 1' 55 °C, 1' 30" 72 °C) e 7' 72 °C		1175	HENDERSON et al., 1999
<i>hly</i>	(F) 5'-GGTGCAGCAGAAAAAGTTGTAG-3' (R) 5'- TCTCGCCTGATAGTGTGTTGGTA-3'	40	5' 94 °C; 30 x (45" 94 °C, 45" °C, 1' 30" 72 °C) e 8' 72 °C	57	1551	YAMAMOTO et al., 1995
<i>efa1</i>	(F) 5'-CGGAACAGTAGGTTACCTTC-3' (R) 5'-AGTGCCCGTGTTCTTGAAGT -3'	40	5' 94 °C; 30 x (45" 94 °C, 45" °C, 1' 30" 72 °C) e 8' 72 °C	57	2226	KLAPPROTH et al., 2000
<i>sat</i>	(F) 5'-AGGTCGGTGCGGATAACAAACA-3' (R) 5'- CACCGGACGCATCACGCAGTA-3'	40	5' 94 °C; 35 x (1' 94 °C, 1'30" °C, 2' 72 °C) e 8' 72 °C	64	549	PORANGABA et al., 2008
<i>tox B</i>	(F) 5'-CTACGAGTGAAGCGGCGAACA-3' (R) 5'-ATAACCACAACCCACCAT-3'	80	5' 94 °C; 35 x (1' 94 °C, 1'30" °C, 2' 72 °C) e 8' 72 °C	64	1138	PORANGABA et al., 2006
<i>ehly1</i>	(F) 5'-GCCGGGCACGTCTGTTTC-3' (R) 5'-GCGCGGTGCCGTTTCCTG-3'	20	5' 94 °C; 30 x (45" 94 °C, 30" °C, 2' 72 °C) e 8' 72 °C	62	712	SANTOS et al., 2008
<i>epeA</i>	(F) 5'- CACCCTGTAGAATCTTA -3' (R) 5'-CTGAATAAATCCAGCCC-3'	40	5' 94 °C; 30 x (1' 94 °C, 1' 46 °C, 1' 72 °C) e 8' 72 °C		1360	LEYTON et al., 2003
<i>espP</i>	(F) 5'-GTCCATGCAGGGACATGCCA-3' (R) 5'-TCACATCAGCACCGTTCTCTAT-3'	40	5' 94 °C; 30 x (1' 94 °C, 1' 55 °C, 1' 72 °C) e 8' 72 °C		547	PORANGABA et al., 2008
<i>espC</i>	(F) 5'-TAGTGCAGTGCAGAAAGCAGTT-3' (R) 5'-AGTTTTCTGTTGCTGTATGCC-3'	40	5' 94 °C; 25 x (30" 94 °C, 1' 55 °C, 1' 72 °C) e 8' 72 °C		301	PORANGABA et al., 2008

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

Tabela 4– Amostras utilizadas como controles das reações de PCR neste estudo.

Amostra	Sorotipo	Deteção dos genes (C+)	Referência
042 (EAEC)	O44:H18	<i>pet, pic, sat</i>	NATARO et al., 1985
E2348/69 (t-EPEC)	O127:H6	<i>efa/lifA, espC</i>	LEVINE et al., 1978
3077-88 (EHEC)	O157:H7	<i>hly, toxB</i>	REID; BETTING; WHITTAM, 1999
(a-EPEC)	O26:H11	<i>ehly1</i>	SCALETSKY et al., 2005
EDL933 (EHEC)	O157:H7	<i>espP</i>	WELLS et al., 1983
C600 (<i>E.coli</i> não-patogênica)	K12	controle negativo	SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989

3.12 Eletroforese em gel de agarose

Após as amplificações dos genes, os produtos foram analisados através da eletroforese em gel de agarose. Os géis foram preparados por aquecimento dissolvendo-se a agarose (Invitrogen, EUA) em tampão TBE 0,5 X, na concentração final de 1%.

Os produtos da PCR foram acrescidos de tampão de amostra 1x. Como marcador de tamanho foi utilizado o 1 *Kb DNA Ladder* (Invitrogen, EUA). Depois da corrida eletroforética, realizada sob corrente constante de 75 V, em tampão TBE 0,5 X.

Os géis foram corados em solução de brometo de etídio na concentração de 10 µg/mL, durante 10min e observados em transiluminador de luz ultravioleta.

As imagens foram registradas através do sistema de captação de imagem Alphamager 2200 (Alpha Inntech, EUA).

3.13 Análises estatísticas

O teste de Lilliefors foi utilizado para verificar a normalidade das amostras analisadas. Para as amostras que demonstraram distribuição normal, a análise foi realizada pelos testes paramétricos: i) ANOVA: 1 critério, com o teste Tuckey; ii) teste t de *student*. Para as amostras que não demonstraram distribuição normal utilizou-se os testes não-paramétricos: i) Kruskal-Wallis com o método de Dunn; ii) Mann-Whitney.

Os resultados foram significativos quando: *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. Como ferramentas foram utilizadas os programas: *GraphPad Prism* versão 5 e o BioEstat versão 5.

4 RESULTADOS

4.1 Determinação da cinética de interação das bactérias com macrófagos

Macrófagos de cultura primária, originários da medula óssea de camundongos isogênicos da linhagem C57/BL6 foram infectados com as amostras 7, 251, 84 e 268 de EPEC atípica e a amostra protótipo de EPEC típica E2348/69, nos pulsos de infecção de 10, 30 e 60min. Os macrófagos infectados com a amostra 7 apresentavam pouquíssimas bactérias associadas, entretanto, quando infectados com as outras amostras observou-se que a maioria dos macrófagos apresentou inúmeras bactérias associadas, nos 3 pulsos de infecção (Figura 5).

Resultados semelhantes foram obtidos utilizando-se macrófagos de linhagem J774.A1, infectados com as mesmas amostras e pulsos de infecção. Os dados mostrados na figura 6 representam a média de 4 experimentos independentes realizados em triplicata.

Todas as amostras, exceto a amostra 7, apresentaram altos índices de interação com os macrófagos J774.A1, a partir de 10min de contato. A porcentagem de bactérias das amostras 251, 84, 268 e E2348/69 associadas aos macrófagos foi de 91%, 73,2%, 80,4% e 91,2%, respectivamente, enquanto a interação da amostra 7 foi de apenas 20% (Figura 6).

No pulso de 30min de infecção observou-se um aumento no número de macrófagos contendo bactérias da amostra 7. No entanto, ainda assim, o número de células infectadas foi significativamente menor do que o observado nas demais amostras. Apenas no pulso de 60min a interação da amostra 7 foi semelhante as demais (Figura 6).

Como a menor interação da amostra 7 ocorreu tanto nos macrófagos derivados da medula como nos de linhagem, optou-se por dar continuidade ao estudo utilizando-se os macrófagos de linhagem J774.A1, devido às facilidades na obtenção e manutenção.

Pulso 10min

Pulso 30min

Pulso 60min

Figura 5- Comparação da interação da amostra 7 de EPEC atípica com a amostra 251, no pulso de 10min; com a amostra 268, no pulso de 30min; com a amostra E2348/69, no pulso de 60min. Após a infecção, os macrófagos de cultura primária foram lavados, fixados e corados com May e Giemsa. As setas indicam as bactérias. Visualização através da microscopia de luz (objetiva 100x).

Figura 6- Comparação da interação das amostras de EPEC atípica: 7, 251, 84 e 268 e EPEC típica E2348/69 com macrófagos J774.A1, nos pulsos de infecção 10, 30 e 60min. As contagens referem-se à média de 4 experimentos independentes, realizados em triplicatas.* Diferença significativa quando comparada as outras amostras no pulso de 10 e 30min de infecção. Análise obtida pelo teste paramétrico ANOVA de 1 critério, com teste de Tuckey. *** $p < 0,001$.

As amostras 251, 84 e 268 utilizadas neste estudo haviam sido na época do início deste trabalho, caracterizadas como EPEC atípica (BUERIS et al., 2007). No entanto, Monteiro (2008) no estudo da caracterização da proteína dispersina em diferentes amostras de EPEC atípica, investigou também a presença do gene *eae* a partir da utilização de diferentes iniciadores, entre eles, iniciadores para a região conservada (BATCHELOR et al. 1999). O fato de nenhum destes iniciadores terem amplificado o gene *eae* das amostras 251, 268 e 84 indica que elas não são EPECa. Em função disso, a amostra escolhida para ser utilizado nos experimentos posteriores foi a amostra E2348/69.

Como a menor interação com os macrófagos foi descrita utilizando-se cultura bacteriana na DO 0,6 (Figuras 5 e 6), o passo seguinte foi investigar se a menor interação também ocorria quando os macrófagos eram submetidos à diferentes concentrações bacterianas. Para isto, as células foram incubadas com o dobro da concentração utilizada inicialmente (DO 1,2) e com concentrações 10 e 100 vezes menores (DO 0,06 e 0,006) que a concentração cuja menor interação foi observada (DO 0,6). Como controle negativo do efeito, a amostra E2348/69 foi utilizada, nas mesmas concentrações.

A figura 7 mostra que a interação da EPEC atípica amostra 7 com os macrófagos foi significativamente menor do que a observada na amostra E2348/69, nas diferentes DOs testadas. A interação da amostra 7, após 10min de infecção, esta mostrada na Figura 8. Resultados semelhantes foram encontrados também nos pulsos de 30 e 60min de infecção (dados não mostrados), o que sugere que a menor interação da amostra não dependa da concentração bacteriana.

Figura 7- Porcentagem de macrófagos J774.A1 contendo bactérias incubados com diferentes DOs bacterianas das amostras 7 e E2348/69, durante de 10min de infecção. As contagens referem-se à média de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas. * Diferença significativa quando comparada a amostra controle, análise obtida pelo teste paramétrico t de *student*, *** p < 0,001, ** p < 0,01.

Figura 8- Comparação da interação da amostra 7 e E2348/69 (diferentes DOs) com macrófagos J774.A1, durante 10min de infecção. Após a infecção as células foram lavadas, fixadas e coradas com May e Giemsa. As setas indicam as bactérias. Visualização através da microscopia de luz (objetiva 100x).

4.2 Estabelecimento do número de bactérias / macrófagos infectado

Em função dos resultados obtidos pela análise por microscopia de luz que mostrou uma quantidade inferior de bactérias da amostra 7/macrófago quando comparada a quantidade de bactérias no controle, a diferença entre elas foi quantificada. Para isto, o número de bactérias por célula foi determinado classificando-se as células infectadas em 3 grupos: **grupo A:** contendo de 1 a 5 bactérias/macrófago; **grupo B:** 6 a 15 bactérias/macrófago e **grupo C:** 16 ou mais bactérias/macrófago (Figura 9).

Interessantemente, após 10min de infecção, 96,6% das células infectadas com a amostra 7 apresentavam no máximo 5 bactérias/célula, enquanto 68% dos macrófagos infectados com a amostra E2348/69 apresentavam mais de 16 bactérias/células (Figura 9). Mesmo nos pulsos de 30 e 60min macrófagos classificados no grupo A foram predominantes quando a infecção foi com a amostra 7. Por outro lado os macrófagos infectados com a amostra E2348/69 foram classificados predominantemente no grupo C, já a partir de 10min de infecção (Figura 9).

Figura 9- Número de bactérias (aderidas e/ou internalizadas) / macrófagos J774.A1 da amostra 7 de EPEC atípica e da amostra E2348/69 de EPEC típica, nos pulsos de infecção de 10, 30 e 60min. Parâmetros adotados: macrófagos com 1 a 5 bactérias; 6 a 15 bactérias; 16 ou mais bactérias. As contagens referem-se à média de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas. * Diferença significativa quando comparada a amostra controle, análise obtida pelo teste paramétrico t de *student*, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$.

Devido às limitações na observação por microscopia de luz, não era possível em muitos casos diferenciar bactérias aderidas de bactérias internalizadas, desta forma, era possível que bactérias apenas aderidas, tivessem sido incluídas nas contagens de células infectadas. Em função disto, o experimento foi repetido, eliminando-se bactérias extracelulares, com o tratamento com gentamicina, e em seguida, lisando-se os macrófagos para a determinação do número de bactérias fagocitadas através da determinação de UFC/mL. Conforme mostra a figura 10, nos pulsos de 10, 30 e 60min de infecção, a amostra 7 foi significativamente menos fagocitada do que as bactérias da amostra E2348/69, sugerindo a existência de um mecanismo antifagocítico.

Figura 10- Quantidade de bactéria fagocitada das amostras 7 e E2348/69, fagocitadas por macrófagos J774.A1, após os pulsos de infecção de 10, 30 e 60min. As contagens referem-se à média de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas. * Diferença significativa quando comparada a amostra controle, análise obtida pelo teste não paramétrico Mann-Whitney, *** $p < 0,001$.

Visto que, até o momento, todos os resultados indicavam a menor fagocitose da amostra 7, partiu-se para a procura do fator indutor do mecanismo antifagocítico. Neste momento haviam-se duas hipóteses que eram: i) o mecanismo poderia depender de algum fator secretado no meio de cultura; ii) depender do contato direto da bactéria com a célula. Iniciamos os estudos investigando-se a primeira hipótese.

4.3 Estudo da ação do sobrenadante da amostra 7 na fagocitose

Na tentativa de investigar se o(s) fator(s) capaz(es) de induzir a antifagocitose estava(m) presente(s) no sobrenadante de cultivo da amostra 7, ensaios de interação com macrófagos J774.A1 foram realizados incubando-se previamente as células com o sobrenadante da cultura por 30min. Após a incubação, os macrófagos foram infectados com a amostra E2348/69.

Os resultados mostram que a interação da E2348/69 com os macrófagos incubados com o sobrenadante da amostra 7 foi reduzida em relação à interação das mesmas bactérias com macrófagos na ausência do sobrenadante (Figura 11). Este resultado sugeriu pela primeira vez que o fator responsável pela antifagocitose poderia estar presente no sobrenadante do cultivo da EPEC atípica amostra 7.

Presença do sobrenadante

Ausência do sobrenadante

Figura 11- Interação de macrófagos J774.A1 com amostra E2348/69 em presença ou ausência do sobrenadante de cultivo da amostra 7, no pulso de 10min de infecção. Após a infecção as células foram coradas com May e Giemsa. As setas indicam as bactérias. Visualização através da microscopia de luz (objetiva 100x). Os resultados referem-se a 3 experimentos realizados em duplicata.

A partir deste resultado iniciaram-se os ensaios com o objetivo de isolar e caracterizar o fator indutor da antifagocitose, presente no sobrenadante do cultivo da amostra 7 de EPEC atípica.

Os achados que sugerem que o fator responsável pela antifagocitose possa estar presente no sobrenadante bacteriano, corroboram os resultados apresentados na figura 8 A, onde mesmo nos ensaios em que uma maior concentração de bactéria foi utilizada, a diminuição da fagocitose foi observada, sem o aumento do número de bactérias aderidas.

4.4 Fracionamento do Sobrenadante obtido do cultivo bacteriano

O fracionamento do sobrenadante através da extração por SPE, em cartucho C18 Sep-Pak, foi realizado com diferentes concentrações de ACN (0%, 25%, 50%, 75% e 100%) em meio ácido (TFA 0,1%). As frações obtidas foram liofilizadas, ressuspensas em TFA 0,1% e analisadas por HPLC em coluna de C8, submetido a um gradiente de 0 a 100% de solvente B. A figura 12 mostra o perfil cromatográfico obtido por HPLC resultante do fracionamento do sobrenadante da amostra 7 nas concentrações de 0, 25 e 50% de ACN por SPE. Paralelamente, para efeito de comparação, foi utilizada outra amostra de EPEC atípica do mesmo sorotipo

(amostra 320). Como controles foram fracionados os sobrenadantes da *E. coli* não patogênica (C600) e o meio TSB.

Figura 12- Perfil cromatográfico das frações obtidas do sobrenadante da amostra 7 eluído com 0, 25 e 50% de ACN por SPE liofilizadas, ressuspensas em TFA 0,1% e analisadas por HPLC em coluna de C8 submetido a um gradiente de 0 a 100% de solvente B (90% ACN em TFA 0,1%).

Frações das amostras 7, 320, C600 e o meio TSB eluídas com ACN em diferentes concentrações (0, 25, 50, 75 e 100%) foram coletadas. A presença do efeito antifagocítico foi investigada nas diferentes frações através dos ensaios de inibição da fagocitose.

4.5 Investigação da capacidade das frações obtidas por SPE inibir a fagocitose

As frações 25, 50, 75, e 100% ACN obtidas por SPE das amostras 7, 320 e C600 foram testadas quanto à capacidade de inibir a fagocitose da amostra E2348/69, que não apresenta efeito antifagocítico nestas condições. Macrófagos J774.A1 pré-incubados 30min com as diferentes frações, foram infectados, durante 60 min. Após este período, as células foram lavadas, tratadas com gentamicina e lisadas com triton X 100. As bactérias fagocitadas foram resgatadas e plaqueadas em ágar LB para a determinação de UFC/mL.

A fração eluída da amostra 7 com 25% de ACN (25% ACN 7) foi capaz de inibir 100% a fagocitose (Figura 13). Uma redução significativa da fagocitose foi

também obtida quando se utilizou a fração 50% de ACN. Por outro lado, o número de UFC/mL obtido das frações 75 e 100% de ACN foi semelhante a dos controles negativos (só bactéria), fração 25% da C600 e meio TSB, conforme mostra a figura 13. Interessantemente, o sobrenadante da amostra 320 eluída com 25% de ACN (25% ACN 320), foi igualmente a fração 25% ACN 7 capaz de inibir a fagocitose (dados não mostrados).

Figura 13- Investigação da capacidade das frações obtidas a partir do sobrenadante da amostra 7 eluídas com 25, 50, 75 e 100% de ACN inibir a fagocitose. Como controles negativos foram utilizados somente a bactéria (sem fração), sobrenadante da C600 ou meio TSB eluídos em 25% de ACN. As contagens referem-se à 1 experimento realizado em triplicata. * Diferença significativa quando comparada a amostra controle, análise obtida pelo teste paramétrico *t* de Student, *** $p < 0,001$.

Paralelamente ao experimento para a determinação de UFC, culturas celulares incubadas com as diferentes frações foram fixadas e coradas para a observação por microscopia de luz. A ausência da fagocitose nas células incubadas com as frações 25% ACN – 7 e 25% ACN - 320 foi confirmada por microscopia de luz (Figuras 14 A e B). Interessantemente o mesmo efeito foi observado quando a fração 25% ACN - 7 foi submetida à fervura, sugerindo que o fator responsável pela antifagocitose seja uma molécula termo-estável (Figura 14 C).

A presença de bactérias nas células incubadas com as frações obtidas da amostra C600 e do meio TSB (Figuras 14 D e E) foi semelhante à observada nas células incubadas com as bactérias na ausência de quaisquer frações (Figura 14 F), o que sugere que o fator responsável pela inibição da fagocitose é uma molécula solúvel em meio aquoso e termo-estável.

Fração 25% ACN da amostra 7

Fração 25% ACN da amostra 320

Fração 25% ACN da amostra 7- fervida

Fração 25% ACN da C600

Fração 25% ACN meio TSB

Ausência da fração

Figura 14- Investigação da capacidade da fração contendo 25% de ACN, obtida por SPE, inibir a fagocitose da amostra E2348/69. Macrófagos J774.A1 foram pré-incubados 30min com as frações 25% ACN da amostra 7; amostra 320; amostra 7 fervida; C600; meio TSB e na ausência da fração. Em seguida, as bactérias foram adicionadas e incubadas por 60min. As células foram lavadas, fixadas e coradas com May e Giemsa. Visualização através da microscopia de luz (objetiva 100x). As setas indicam as bactérias.

4.6 Investigação da capacidade microbicide da fração 25% ACN

Como o desaparecimento das bactérias observado nos ensaios em que as células foram pré-incubadas com as frações 25% ACN - 7 e 25% ACN - 320 (Figuras 14 A e B), poderia ser atribuída a uma ação microbicide das frações e não pelo impedimento da fagocitose, resolveu-se submeter as frações 25% ACN - 7, C600 e meio TSB a dois ensaios de microbicide.

O primeiro ensaio foi realizado plaqueando-se uma espécie de bactéria Gram +, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), uma Gram -, *Escherichia coli* (ATCC 25922) e a amostra E2348/69, utilizada nos ensaios de inibição da fagocitose, em presença da fração 25% ACN – 7 e 25% ACN – 7 10x concentrada, à placa de ágar PB. Como controle, as bactérias foram incubadas com as frações 25% do meio TSB e C600. A figura 15 mostra a ausência de halo, que indicaria efeito microbicide, tanto na fração 25% ACN - 7 como nas frações controles (meio TSB e C600).

Figura 15- Ensaio de microbicidade realizado com *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), e amostra de EPEC típica (E2348/69) na presença das frações 25% ACN a partir do: meio TSB (A); C600 (B); 7 (C), e 7, 10x concentrada (D), em placas de ágar PB.

Foto: Porto, 2010 (utilização da imagem, com permissão)¹.

O segundo ensaio de microbicidade foi realizado com duas amostras Gram -, duas Gram + e a amostra E2348/69. Neste ensaio *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Micrococcus luteus* (ATCC 10240) e a E2348/69 foram incubadas na ausência ou presença das frações 25% ACN – 7, 25% ACN – 7 10x concentrada, C600 ou TSB. Após 18h de incubação a DO foi determinada. Em nenhuma das espécies

¹ PORTO, Rafael Marques. São Paulo, 2010.

bacterianas ensaiadas observou-se alteração do crescimento bacteriano, o que confirma a ausência de efeito microbicida das frações 25% ACN (Figura 16). Os resultados de microbicidade referem-se a 1 experimento realizado em triplicata.

Figura 16- Ensaio de inibição de crescimento das bactérias *Micrococcus luteus* (ATCC 10240), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e E2348/69 em presença das frações 25% ACN da amostra 7 ou esta 10x concentrada, C600 ou TSB, após 18h de crescimento em meio PB. Leitura da absorbância em 595 nm.

4.7 Investigação sobre a capacidade das frações 25% ACN – 7 e 25% ACN – 320 interferir na fagocitose de levedura

A capacidade da fração 25% ACN 7 e 320 inibir praticamente 100% a fagocitose de bactéria despertou o interesse em investigar se este fator antifagocítico poderia interferir na fagocitose de outro microrganismo, que não bactéria. Para isto, macrófagos de cultura pré-incubados com a fração 25% de ACN 7 e 320 foram infectados com *Saccharomyces cerevisiae*. Após 60min de infecção, as células foram lavadas, fixadas, coradas e analisadas por microscopia de luz. Como controle, macrófagos infectados com levedura na ausência da fração 25% ACN, originária da EPEC atípica, ou em presença da fração 25% ACN TSB foram testados.

Neste experimento, determinou-se inicialmente a porcentagem de macrófagos contendo leveduras. Conforme mostra a figura 17, a porcentagem de macrófagos infectados com levedura em presença das frações 25% ACN 7 e 320 foi 6,1% e 4,8% respectivamente, enquanto a infecção do grupo controle, sem fração ou com a fração 25% ACN do meio TSB, foi 24,5% e 22% respectivamente. Estes resultados indicam que o fator antifagocítico secretado pelas EPEC atípica sorotipo O55:H7 é capaz também de reduzir a fagocitose de microrganismo não bacteriano. Além disso, a maioria das leveduras do grupo experimental encontrava-se aderidas às células e não internalizadas (Figuras 18 A e B), ao contrário do que se observam nos controles (Figuras 18 C e D). Para quantificar esta diferença, os macrófagos infectados foram recontados a fim de se determinar a porcentagem de macrófagos contendo apenas leveduras aderidas, em oposição às células com leveduras internalizadas, nos diferentes grupos ensaiados (Figura 19).

Os resultados mostram que além da pequena porcentagem de macrófagos contendo levedura nos grupos tratados com a fração 25% ACN 7 e 320 (Figura 17), aproximadamente 87% das células quantificadas apresentavam apenas leveduras aderidas, enquanto nos grupos controles apenas 6% das células tinham leveduras aderidas (Figura 19). Com isso, a fração 25% ACN 7 e 320 mostraram-se capaz de interferir também na fagocitose de leveduras.

Figura 17- Fagocitose de levedura por macrófagos J774.A1 pré-incubados com a fração 25% ACN 7 e 320. Como controle, os macrófagos foram infectados com levedura na ausência da fração 25% ACN ou em presença da fração 25% ACN TSB. O gráfico representa a contagem de 300 células/lamínula.

Fração 25% ACN - 7

Fração 25% ACN - 320

Fração 25% ACN - TSB

Ausência da fração

Figura 18- Fagocitose de *Saccharomyces cerevisiae* por macrófagos previamente tratados com a fração 25% ACN - 7; 25% ACN - 320; 25% ACN - TSB; na ausência da fração. Após a infecção de 60min, as células foram lavadas, fixadas e coradas com May e Giemsa. Visualização através da microscopia de luz (objetiva 100x). As setas indicam as Leveduras.

Figura 19- Porcentagem de macrófagos contendo *Saccharomyces cerevisiae*. Macrófagos previamente tratados com as frações 25% ACN (amostra 7, 320 e do meio TSB) foram infectados com levedura (3 leveduras/macrófago), durante 60min. O gráfico representa a contagem de 100 células contendo leveduras.

4.8 Investigação da possibilidade das frações 25% ACN (7 e 320) inibirem a adesão bacteriana às células epiteliais

O fato da fração 25% ACN da amostra 7 e 320 inibir a fagocitose de bactérias (Figura 13) e leveduras (Figura 17), interferindo particularmente na adesão de ambos microrganismos aos macrófagos (Figuras 14 e 19), despertou o interesse em investigar se as frações 25% ACN 7 e 320 eram capazes de interferir na adesão de EPEC típica que apresenta um fenótipo de adesão bastante conhecido (AL) a partir de 3h de incubação (SCALETSKY et al., 1984).

Para este estudo células HEp-2 pré-incubadas com a fração 25% ACN (7 e 320) foram infectadas com a amostra de EPEC típica E2348/69, durante 3h. Após este período, as células foram lavadas e reincubadas por mais 3h. Conforme mostra a figura 20, as células incubadas com a fração 25% ACN (7 e 320) apresentaram uma extraordinária redução da quantidade de bactérias aderidas (Figuras 20 A e B), em relação aos controles (Figuras 20 C e D).

A redução da quantidade de bactérias aderidas também foi obtidas quando utilizou-se células epiteliais intestinais humana polarizada, da linhagem Caco-2,

quando incubadas com EPEC típica, na presença das frações 25% ACN 7 e 320, por apenas 2h (Dados não mostrados).

Células HEp-2 (3+3h)

Fração 25 % ACN - 7

Fração 25 % ACN - 320

Fração 25% ACN - TSB

Ausência fração 25% ACN

Somente células HEp-2

Figura 20- Adesão da amostra de EPEC típica E2348/69 em células HEp-2 previamente incubadas com as frações 25% ACN - 7; 25% ACN - 320; 25% ACN - TSB; na ausência da fração, infectadas por 6h e só células HEp-2. Após o período de incubação as células foram lavadas, fixadas e coradas com May e Giemsa. As setas indicam as bactérias. Visualização através da microscopia de luz (objetiva 100x). Foram analisados 3 experimentos realizados em duplicata.

4.9 Investigação da citotoxicidade da fração 25% ACN-7

Os achados relacionados a inibição da adesão bacteriana às células epiteliais mostraram-se extremamente promissores, pois levantaram a possibilidade de se interferir na adesão de bactérias patogênicas à célula hospedeira, o que poderia evitar o estabelecimento da infecção. No entanto, havia a necessidade de se investigar se a fração responsável por tal efeito, não exercia efeito citotóxico. Para isso, dois métodos distintos de avaliação de citotoxicidade foram realizados.

4.9.1 Incorporação de vermelho neutro

A incorporação de vermelho neutro nos lisossomas é uma medida de viabilidade celular, visto que ela ocorre apenas em células viáveis. Desta forma, células HEP-2 previamente incubadas com a fração 25% ACN - 7 foram posteriormente incubadas com o vermelho neutro. Como controles as células foram incubadas com as frações 25% ACN (C600 e TSB) e com Triton X 100 (0,1%). Em seguida, as células foram lavadas, o vermelho neutro solubilizado e a absorbância da solução determinada a 620 nm. Nenhuma das frações ensaiadas mostrou-se citotóxicas conforme mostra a figura 21.

4.9.2 Coloração por cristal violeta

O descolamento celular foi o parâmetro citotóxico avaliado pela coloração por cristal violeta, que é um corante incorporado ao DNA de células viáveis. Células HEP-2 incubadas com a fração 25% ACN - 7, durante 24h, foram lavadas, fixadas e coradas com a solução de cristal violeta. Em seguida, o corante foi solubilizado com a solução descorante e a absorbância determinada em 550 nm. Conforme mostra a figura 22 todas as frações testadas não induziram um descolamento celular significativo mostrado através da análise obtida pelo teste *t student*.

Figura 21- Investigação do efeito citotóxico da fração 25% ACN - 7 através da incorporação do vermelho neutro pelos lisossomos. Absorbância em 620 nm. Os resultados mostrados referem-se a 1 experimento realizado em triplicata.

Figura 22- Investigação do descolamento celular a partir da incubação de células com a fração 25% ACN - 7 através do método de coloração por cristal violeta. Absorbância em 550 nm. Os resultados mostrados referem-se a 1 experimento realizado em triplicata.

4.10 Pesquisa de fatores de virulência da amostra 7 (O55:H7)

Os marcadores de virulência para *E. coli* diarreio gênica: *pet* (*plasmid-encoded toxin* de EAEC); *pic* (*protein intestinal colonization*); *hly* (enterohemolisina); *efa1/lifA* (EHEC *factor for adherence/lymphocyte inhibitor factor*); *sat* (*secreted autotransporter toxin*); *toxB* (relacionada com aumento da adesão e inibição da ativação de linfócitos em EHEC); *ehly 1* (enterohemolisina 1); *espC* (toxina autotransportadora de EPEC); *espP* (toxina autotransportadora de EHEC); *epeA* (toxina autotransportadora), já investigados na amostra 320 por Porangaba et al. (2006; 2008) e Santos et al. (2008), foram investigados na amostra 7.

Após a reação de PCR, os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose. Conforme mostra a Tabela 5 o único fator de virulência amplificado, em ambas as amostras, foi *efa1/lifA*.

Tabela 5- Fatores de virulência presentes nas amostras 7 e 320 de EPEC atípica.

Amostra	<i>Hly</i>	<i>toxB</i>	<i>efa1/lifA</i>	<i>pet</i>	<i>pic</i>	<i>sat</i>	<i>ehly1</i>	<i>epeA</i>	<i>espP</i>	<i>espC</i>
320	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

4.11 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) da fração 25% ACN -7

Concomitantemente aos estudos de interação, iniciou-se a caracterização bioquímica do(s) fator(s) presente(s) na fração de 25% de ACN – 7.

Como em todos os ensaios de inibição da fagocitose os resultados obtidos com as frações 25% ACN 7 e 320 foram idênticos, optou-se por seguir a caracterização apenas com a fração 25%. Inicialmente, realizou-se o fracionamento por HPLC em coluna de C8, monitorado nos comprimentos de onda 254 nm e 214 nm (Figura 23 A). Devido à complexidade do perfil, que não apresentava picos bem definidos, o material foi fracionado por diferentes intervalos de tempo (Tabela 6). Este fracionamento originou 9 frações (Tabela 6 e Figura 23 A) que foram liofilizadas, ressuspensas em meio RPMI e testadas quanto a capacidade de inibir a fagocitose da amostra E2348/69 (seção 3.7.1).

Macrófagos pré-incubados, com cada uma das frações foram infectados com a amostra E2348/69, durante 60min. Após as lavagens, as células foram rompidas e plaqueadas para determinação de UFC/mL. A fração 6, que corresponde ao intervalo de tempo de 15 a 20min, foi a única capaz de interferir na fagocitose, inibindo 100% a entrada das bactérias nos macrófagos (Figura 23 B).

Tabela 6- Frações obtidas por HPLC monitorado pelos comprimentos de onda 254nm e 214 nm.

Frações	Tempo (min)
1	2,5 – 5
2	5 – 8
3	8 – 10
4	10 - 12,5
5	12,5 – 15
6	15 – 20
7	20 – 25
8	25 – 30
9	30 – 35

Figura 23- Investigação da capacidade antifagocítica das frações obtidas por HPLC. A fração obtida da extração de fase sólida, com 25% ACN - 7 que apresenta efeito antifagocítico foi submetida ao HPLC em coluna de C8 com gradiente de 0 a 90% de ACN em TFA 0,1% em 20min, monitorada a 214 nm (azul) e 254 nm (vermelho) (A); investigação da capacidade antifagocítica das diferentes frações obtidas por HPLC (B).

Como a fração 6 que corresponde ao material coletado, no intervalo de 15 a 20min, apresenta um perfil extremamente complexo indicativo de inúmeros componentes (Figura 23 A), o material foi submetido a um novo fracionamento, por HPLC, em outros intervalos de tempo. Este fracionamento originou 6 novas frações (Tabela 7) que foram testadas quanto a capacidade de inibir a fagocitose da amostra E2348/69.

Apenas os macrófagos incubados com as frações 5 e 6 que correspondem a um intervalo de tempo de 18 a 22min (Tabela 7) foram capazes de inibir significativamente a fagocitose (Figura 24 B). Embora se tenha reduzido o intervalo de tempo em que o efeito antifagocítico foi identificado, ainda assim, o perfil cromatográfico continuava complexo (Figura 24 A).

Tabela 7- Frações obtidas por HPLC monitorado pelo comprimento de onda 214 nm.

Frações	Tempo (min)
1	5 – 10
2	10 – 15
3	15 – 16,5
4	16,5 – 18
5	18 – 20
6	20 – 22

Figura 24- Investigação da capacidade antifagocítica das frações obtidas por HPLC. A fração obtida da extração de fase sólida, com 25% ACN - 7 foi submetida ao HPLC em coluna de C8 com gradiente de 0 a 90% de ACN em TFA 0,1% em 20min, monitorada a 214 nm (A); Investigação da capacidade antifagocítica das diferentes frações obtidas por HPLC (B). *Diferença significativa quando comparada a amostra controle, análise obtida pelo teste paramétrico *t* de Student. ** $p < 0,01$.

Os experimentos de HPLC para fracionamento da fração 25% ACN – 7, obtida por SPE, foram também realizados com Metanol, ao invés da ACN. Porém, interessante, nenhuma das frações originárias do fracionamento com metanol apresentou efeito (Figura 25).

Figura 25- Investigação da capacidade antifagocítica das diferentes frações obtidas por HPLC. A fração obtida por SPE, com 25% de ACN - 7 foi submetida ao HPLC em coluna de C8 com gradiente de 0 a 90% de metanol em TFA 0,1% em 20min.

4.12 Avaliação da capacidade antifagocítica da fração 25% ACN – 7 submetida à diálise

O fato do sobrenadante da cultura bacteriana da amostra 7, utilizado no fracionamento, ter sido obtido do meio TSB que é rico em proteínas e outras moléculas, muito provavelmente contribuía na complexidade do perfil cromatográfico gerado, o que dificultava o isolamento do fator.

Para diminuir a complexidade do perfil e facilitar a identificação e isolamento do(s) fator(es) antifagocítico(s), a fração 25% ACN - 7 foi dialisada utilizando-se uma membrana com *cut-off* de 1000 Da. Após a diálise, a solução retida na membrana, contendo moléculas maiores que 1000 Da e a solução de diálise contendo moléculas menores foram liofilizados e testados quanto à capacidade de inibir a fagocitose.

Os resultados mostraram que somente o produto da diálise contendo moléculas menores que 1000 Da foi capaz de induzir o efeito antifagocítico em

macrófagos, enquanto o material contendo as moléculas maiores que 1000 Da não exerceu nenhum efeito (Figura 26).

Figura 26- Investigação da capacidade dos produtos obtidos da diálise da fração 25% ACN - 7, contendo moléculas maiores ou menores que 1000 Da inibir a fagocitose da amostra E2348/69 em macrófagos J774.A1.

4.13 Análise da fração 25% ACN – 7 por espectrometria de massas

Uma análise preliminar da fração 25% ACN – 7 por Espectrometria de Massa, realizada pelo Dr Daniel Carvalho Pimenta, corrobora os dados anteriormente obtidos já que indicam uma alta complexidade e grande predomínio de moléculas monocarregadas e com massa menor do que 2000 Da (Figura 27).

k7 #152-288 RT: 4.93-7.01 AV: 73 NL: 1.07E5
T: + p NSI Full ms [50.00-2000.00]

Figura 27- Espectro de massas da fração 25% ACN da amostra 7 em TSB, mostrando alta complexidade e grande predomínio de moléculas monocarregadas e com massa menor do que 2000 Da.

4.14 Comparação do perfil cromatográfico da fração 25% ACN – 7 por HPLC

Desta forma, o passo seguinte foi comparar o perfil cromatográfico da fração 25% ACN, com a fração 25% ACN 7 após diálise, que contem apenas moléculas menores que 1000 Da e que apresentou efeito antifagocítico (Figura 27). A análise comparativa mostrou que o perfil cromatográfico do produto da diálise da fração 25% ACN 7 apresentou uma pequena melhora na definição dos picos, mas não o suficiente para viabilizar o prosseguimento da caracterização deste material (Figura 28).

Figura 28- Comparação do perfil cromatográfico da fração 25% ACN - 7, com a fração 25% ACN - 7 contendo moléculas menores que 1000 Da submetida ao HPLC em coluna de C8 com gradiente de 0 a 90% de ACN em TFA 0,1%, monitorado a 214 nm.

4.15 Investigação da capacidade da fração 25% ACN – 7 (em M9) inibir a fagocitose

A permanência da complexidade do perfil cromatográfico do produto da diálise da fração 25% ACN – 7 apontou para a necessidade de se buscar um outro meio de cultivo bacteriano, mais pobre, mas que não interferisse na secreção do fator pela amostra 7 de EPEC atípica.

Para isto, a amostra 7 foi cultivada em meio mínimo (M9), como descrito na seção 3.5 e o sobrenadante foi utilizado em ensaios fagocíticos. O efeito antifagocítico obtido com o sobrenadante originário do M9 foi semelhante ao detectado com meio TSB (Dados não mostrados).

Após estas observações, o sobrenadante do cultivo bacteriano da amostra 7 proveniente do M9 foi submetido ao mesmo fracionamento por SPE e HPLC, como descrito na seção 3.6.2 (A e B) e posteriormente as frações foram submetidas ao ensaio fagocítico como descrito na seção 3.7.1.

Os resultados mostraram que a fração 25% ACN – 7 (M9) originária da SPE, também foi capaz de inibir 100% a fagocitose da amostra E2348/69 (Figura 29). Paralelamente, macrófagos pré-incubados com a fração 25% ACN – 7 (M9), foram fixados, corados e analisados por microscopia de luz (Figura 30). A análise destas culturas corrobora a ausência de UFC, já que raras bactérias foram encontradas nas

culturas incubadas com a fração 25% de ACN – 7 (M9) analisada por microscopia de luz (Figura 30).

Figura 29- Investigação da capacidade antifagocítica da fração eluída, por SPE, com 25% de ACN – 7 cultivada em M9 inibir a fagocitose da amostra E2348/69. Como controle negativo foi utilizado somente a bactéria (sem fração). As contagens referem-se à 1 experimento realizado em triplicata.

Figura 30- Investigação da capacidade da fração 25% ACN – 7 obtida a partir do M9, em inibir a fagocitose da amostra E2348/69. Macrófagos J774,A1 pré-incubados 30min com a fração 25% ACN – 7 (M9) foram infectada durante 60min com a amostra E2348/69. Presença da fração; ausência da fração. Visualização através da microscopia de luz (objetiva 100x). As setas indicam as bactérias.

Como a fração 25% ACN - 7 (M9) apresentou a mesma capacidade antifagocítica da fração 25% ACN – 7 (TSB) realizou-se uma comparação do perfil cromatográfico, destes materiais, por HPLC monitorado no comprimento de onda de 214 nm em coluna C8 (Figura 31).

Chama a atenção a enorme diminuição da complexidade do perfil da fração 25% ACN – 7 (M9) quando comparado a fração 25% ACN – 7 (TSB) (Figura 31). Além disso, o perfil apresentado pela fração 25% ACN – 7 (M9) apresenta apenas produtos de secreção bacteriana, uma vez que os sais e a glicose (únicos componentes do meio mínimo) foram eliminados com 0% de ACN na SPE.

Figura 31- Comparação do perfil cromatográfico da fração 25% ACN - 7, crescida em meio mínimo, com as frações 25% ACN - 7 crescida em TSB e após diálise (somente moléculas menores que 1000 Da) submetida ao HPLC em coluna de C8 com gradiente de 0 a 90% de ACN em TFA 0,1%, monitorado a 214 nm.

5 DISCUSSÃO

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que os surtos de diarreia ocorridos no Brasil e em outros países têm sido freqüentemente causados por sorotipos de EPEC atípica (SMITH et al., 1996; GIRÃO et al., 2001; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002; FERNANDES-FILHO, 2004; FRANZOLIN et al., 2005; BUERIS et al., 2007; ARAUJO et al., 2007; HERNANDES et al., 2009). Até o momento, nenhum fator de virulência específico para esta categoria foi descrito. Em geral, amostras de EPEC atípica carregam genes que codificam fatores de virulência encontrados em outros patótipos (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002).

O estudo e identificação de fatores de virulência é um importante aspecto no entendimento da interação patógeno-hospedeiro, intensamente investigado em EPEC típica e EHEC (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004) e praticamente desconhecido em EPEC atípica.

Sabendo-se que um aspecto que contribui para a virulência de diversos patógenos é o desenvolvimento de mecanismos cuja finalidade é “burlar” o mecanismo fagocítico, uma estratégia de subversão da primeira linha de defesa do hospedeiro conferiria vantagens à bactéria, já que preveniria ou retardaria a ativação da resposta imune.

No estudo do comportamento de EPEC atípica em macrófagos, a amostra 7 sorotipo O55:H7, isolada de uma criança com diarreia no Chile (RODRIGUES et al., 1996) apresentou uma pequena interação com os macrófagos de cultura primária derivados de medula óssea de camundongos da linhagem C57/BL6 (Figura 5), como nos macrófagos da linhagem J774.A1 (Figura 6).

Embora na determinação da porcentagem de macrófagos contendo bactérias, a diferença significativa tivesse sido mostrada nos pulsos de infecção de 10min e 30min (Figura 6), a observação das células por microscopia de luz mostrou que os macrófagos incubados com a amostra 7 apresentavam uma quantidade muito inferior de bactéria/célula nos pulsos de infecção de 10, 30 e 60min, quando comparado a amostra de EPEC típica E2348/69, cuja interação com o macrófago foi elevada a partir do pulso de 10min (Figura 6).

A quantificação desta diferença foi realizada classificando os macrófagos infectados conforme o número de bactérias por célula, como descrito por Goosney et

al. (1999). Na análise dos resultados observou-se que a maioria das células infectadas com a amostra 7 classificava-se no grupo com menor quantidade de bactéria (de 1 a 5 bactérias/célula). No pulso de 10min, 97% das células infectadas com a amostra 7 apresentavam de 1 a 5 bactérias, o elevado número de macrófagos contendo poucas bactérias também foi observado nos pulsos de 30 e 60min com 80% e 60% de células respectivamente. Por outro lado, já no pulso de 10min, 92% dos macrófagos infectados com a amostra E2348/69 apresentavam mais de 16 bactérias/macrófago (Figura 9). A discrepância do número de bactérias da amostra 7 comparada a amostra E2348/69, por macrófago, nos pulsos de 10, 30 e 60min, foi confirmada também pela análise por microscopia de luz (Figura 8).

Ensaio de interação, a fim de avaliar se a menor interação dependia da concentração bacteriana, foram realizados utilizando-se o dobro da DO (DO 1,2) cuja menor interação foi descrita (DO 0,6) e DO 10 e 100 vezes menor (DO 0,06 e 0,006). Os resultados mostraram que mesmo utilizando-se duas vezes mais bactérias (DO 1,2) ou até 100 vezes menos bactérias (DO 0,006) a menor interação foi demonstrada, quando comparada a amostra E2348/69 utilizada nas mesmas condições (Figura 7).

O fato do estabelecimento da porcentagem de células infectadas não ser um bom parâmetro para a avaliação da fagocitose, já que na microscopia de luz é difícil diferenciar, bactéria aderida de bactéria internalizada, ensaios para a determinação de UFC/mL foram realizados. Nestes ensaios, verificou-se que a amostra 7 de EPEC atípica é significativamente menos internalizada nos pulsos de infecção de 10, 30 e 60min (Figura 10), confirmando os indícios observados na determinação da porcentagem de interação (Figuras 6 e 7) e que sugeriam a redução da fagocitose.

Do ponto de vista bacteriano a indução de um efeito antifagocítico rápido (Figura 10) e independente da concentração bacteriana é extremamente interessante, já que a bactéria poderia escapar logo após o primeiro contato. No entanto, o mecanismo antifagocítico descrito para EPEC típica difere destes achados, já que foi descrito ocorrer após 2h de contato com a célula. Além disso, um maior efeito antifagocítico é observado quanto maior for o número de bactérias/célula (GOOSNEY et al., 1999).

Vale lembrar que o mecanismo descrito para EPEC típica depende do SST3, que só é estabelecido após 1h de contato com a célula hospedeira (BUERIS, 2008)

e de proteínas efetoras EspF (QUITARD et al., 2006), EspB (IIZUMI et al., 2007) e EspJ (MARCHÈS et al., 2008) injetadas na célula através do SST3.

A completa ausência de efeito antifagocítico da amostra E2348/69 nas condições descritas para a amostra 7 de EPEC atípica permitiu que a amostra E2348/69 fosse utilizada como controle negativo do efeito aqui descrito. O fato dos achados para a amostra 7 de EPEC atípica ser diferente dos descritos para típica, que depende de um longo contato da bactéria com a célula (GOOSNEY et al., 1999) suscitou o interesse em investigar se o componente importante na indução da antifagocitose observada na amostra 7, diferentemente da EPEC típica, estava presente no sobrenadante do cultivo bacteriano.

Desta forma, macrófagos previamente incubados ou não com o sobrenadante da cultura da amostra 7 foram infectados com a amostra E2348/69. Conforme mostra a figura 11 as células pré incubadas com o sobrenadante apresentaram menos bactérias, do que as células do grupo controle, não tratadas com o sobrenadante, sugerindo ineditamente que a EPEC atípica poderia estar secretando o(s) fator(es) responsável(s) pelo mecanismo antifagocítico observado.

A evidência de que o fator antifagocítico está presente no sobrenadante do cultivo bacteriano permitiu correlacionar dados anteriormente obtidos. Vale lembrar que a redução da interação da bactéria com os macrófagos, observada nos ensaios em que as células foram infectadas com culturas bacterianas com DO 1,2, foi semelhante (diferença não significativa pelo teste t de *student*) à obtida quando as células foram infectadas com bactérias à DO 0,6 (Figuras 7 e 8). É importante destacar que para a obtenção da DO 1,2 as culturas bacterianas foram centrifugadas e parte do sobrenadante do cultivo descartado, conforme descrito na seção 3.4, o que reduziu a concentração do fator secretado.

Estes resultados também são indicativos de que o mecanismo antifagocítico desencadeado pela amostra 7 não depende do contato bactéria-célula, já que nos macrófagos infectados com o dobro da concentração (DO 1,2) não foi observado aumento de bactérias aderidas as células (Figuras 7 e 8) o que está de acordo com os resultados que apontam que o “fator antifagocítico” está presente no sobrenadante de cultivo desta amostra (Figura 11).

No início da caracterização de moléculas presentes no sobrenadante do cultivo da amostra 7, outra amostra de EPEC atípica (amostra 320), com o mesmo

sorotipo da amostra 7 (O55:H7) e bem caracterizada pelo nosso grupo, foi também submetida a análise a SPE. Como controles negativos foram também fracionados o sobrenadante do cultivo da amostra C600, *E.coli* não patogênica e o próprio meio TSB. Todas as frações obtidas foram testadas quanto à capacidade de inibir a fagocitose da amostra E2348/69.

Interessantemente apenas as frações eluídas com 25% de ACN da amostra 7 e também da amostra 320 (25% ACN - 7 e 320) inibiram a fagocitose. Nenhuma fração obtida da amostra C600 ou do meio TSB exerceram interferência na fagocitose de bactérias (Figuras 13 e 14). A redução de 100% da fagocitose só foi vista nas células tratadas com as frações 25% ACN - 7 ou 320, embora a fração 50% de ACN tenha reduzido também significativamente a fagocitose, esta redução, pode ser decorrente de alguma(s) molécula(s) que não foram eluídas com 25% de ACN, permanecendo retida na coluna da SPE, sendo eluída apenas com a fração 50% (Figura 13).

Estes resultados indicam que o aumento da concentração do fator presente no sobrenadante fracionado por SPE e liofilizado potencializou enormemente o mecanismo antifagocítico inicialmente descrito (Figura 10), passando a inibir totalmente a fagocitose (Figura 13). Além disto, os resultados obtidos no fracionamento por SPE apontam a amostra 320 de EPEC atípica também como secretora de um fator capaz de reduzir a fagocitose (Figura 14), semelhante ao descrito para a amostra 7.

Outro fato interessante é que a fração 25% de ACN da amostra 7 não perdeu sua atividade quando submetida ao aquecimento, sugerindo que o fator responsável pela inibição da fagocitose seja termo-estável.

Frente a estes resultados, um aspecto importante foi verificar se as frações 25% de ACN - 7 e 320 eram microbidas, já que os macrófagos tratados com ambas as frações, praticamente não apresentavam bactérias (Figura 14).

No entanto, os resultados obtidos em dois diferentes ensaios de microbicidade mostram ausência de efeito microbicida, inclusive na fração 25% ACN - 7 10x concentrada (Figuras 15 e 16). A ausência de ação microbicida na fração 25% ACN - 7 demonstra que o desaparecimento de bactérias em macrófagos contendo a fração deve-se a interferência na fagocitose, e não a lise bacteriana, o

que poderia ser atribuído, por exemplo, a colicina, uma bacteriocina com massa molecular entre 40 a 80 kDa (SCHWARTZ; HELINSKI, 1971) e que está presente no meio de cultivo de algumas amostras de *Escherichia coli* (GRATIA, 1925).

Como estes resultados mostram a interferência na fagocitose de bactérias, foi interessante investigar se o fator presente na fração 25% ACN - 7 e 320, responsáveis pelo efeito antifagocítico de bactérias, era também capaz de interferir na fagocitose de outro microrganismo.

Para avaliar esta hipótese, macrófagos pré incubados ou não com as frações 25% ACN - 7 e 320 receberam *Saccharomyces cerevisiae* durante 1h. A porcentagem de infecção dos macrófagos incubados com as frações 25% ACN - 7 e 320 foi cerca de cinco vezes menor do que a porcentagem de células infectadas no grupo controle, incubadas com a fração 25% - TSB ou que não recebeu a fração (Figura 17). Além disso, a análise por microscopia de luz permitiu verificar que além do grupo de macrófagos que receberam a fração ativa apresentarem uma redução de células infectadas, quando havia levedura, a maioria encontrava-se apenas aderida.

Para quantificar esta diferença apenas as células infectadas foram recontadas e classificadas conforme a localização da levedura, isto porque pela microscopia de luz é possível diferenciar *S. cerevisiae* internalizado, através da visualização da membrana vacuolar envolvendo o *S. cerevisiae* (Figuras 18 A e B) do *S. cerevisiae* aderido à célula (Figuras 18 C e D).

A figura 19 mostra que das poucas células infectadas, após o prévio tratamento com as frações 25% ACN - 7 e 320, apenas 13% apresentavam leveduras internalizadas, enquanto nos controles, a porcentagem de células contendo levedura internalizada foi de cerca de 90% (Figura 19). A interferência na entrada de leveduras nos macrófagos pré-incubados com as frações 25% ACN - 7 e 320 são extremamente interessantes, visto que é sabido que os levedos aderem-se facilmente aos macrófagos e são rapidamente internalizados.

Com estes resultados é possível especular que o fator presente na fração 25% ACN - 7 e 320 poderiam interferir em receptores dos macrófagos, ou de alguma forma menos específica, atravessar a membrana celular, interferindo na transdução de sinal como, por exemplo, de alguma via importante para a reorganização do

citoesqueleto e formação de pseudópodes, o que culminaria na inibição da fagocitose.

Helicobacter pylori é conhecido por interferir na fagocitose através de proteínas secretadas pelo Sistema de Secreção do tipo 4 (SST4) (RAMARAO et al., 2000). Interessantemente monócitos infectados pelo *H. pylori* fagocitam menos *Neisseria gonorrhoeae*, que envolve proteoglicanas de heparan sulfato, e menos partículas de látex que depende do receptor CD66. Estes achados indicam que o fator responsável pela antifagocitose de *H. pylori* afeta uma via sinalizadora comum a diferentes receptores de fagócitos (RAMARAO et al., 2000).

Neste trabalho a fração 25% ACN - 7 e 320 capaz de inibir a fagocitose de bactérias (Figura 13) e de levedura (Figura 17), parecia interferir particularmente na adesão de ambos os microrganismos, aos macrófagos (Figuras 14 e 19).

Estes achados foram importantes para delinear um experimento a fim de se investigar se a fração 25% ACN - 7 e 320 eram capazes de interferir na adesão de bactéria diarreiogênica a fagócitos não profissionais. Para isto, células epiteliais HEp-2 e células epiteliais intestinais polarizadas Caco-2 foram infectadas com a amostra de EPEC típica E2348/69, que apresenta o fenótipo de adesão localizada, classicamente descrito como importante fator de virulência (BALDINI et al., 1983; SCALETSKY et al., 1984).

A análise dos ensaios de adesão bacteriana realizados com células HEp-2, durante 6h de incubação, e em células Caco-2 com 2h de incubação mostra que células HEp-2 incubadas com as frações 25% ACN - 7 e 320 apresentaram uma extraordinária redução da quantidade de bactérias aderidas em relação aos controles (Figura 20), também visualizada nas células Caco-2 (dados não mostrados).

Vale ressaltar que o tempo de 6h de incubação só é utilizado em amostras que na 3^a hora de incubação ainda não apresentam um fenótipo de adesão determinado (RODRIGUES et al., 1996; ABE et al., 2009). No caso da amostra E2348/69, o tempo de 6h é considerado um exagero, mas como o objetivo deste experimento era investigar a inibição de adesão, optou-se propositalmente por incubar as células infectadas por um período mais longo. Considerando que EPEC é uma bactéria extracelular e que a sua transmissão ocorre por via oral, a possibilidade de se interferir na adesão, etapa fundamental ao estabelecimento da infecção, torna-se extremamente promissor, visto que os enterócitos são o primeiro

passo para a instalação e desenvolvimento da patogenia das bactérias diarreinogênicas (FINLAY; FALKOW 1997; NOUGAYRÈDE et al., 2003; TORRES et al., 2005).

Devido ao potencial que as frações ACN 25% - 7 e 320 abriram para o estudo da interação, também em fagócitos não profissionais, a capacidade citotóxica destas frações foi avaliada por dois métodos. Os dois métodos utilizados comprovaram a ausência de efeito citotóxico em todas as frações testadas (Figuras 21 e 22).

O fato dos resultados obtidos até este momento mostrarem que o(s) elemento(s) presente(s) nas frações 25% - 7 e 320: i) inibem a fagocitose de bactéria e levedura; ii) são secretados, termoestáveis e solúveis em meio aquoso; iii) não exercem ação microbicida ou citotóxica e iii) reduzem de forma contundente a adesão de EPEC típica às células epiteliais, justificaram a importância da continuidade do trabalho no sentido de direcionar os estudos à caracterização do fator antifagocítico secretado. No entanto, como os resultados obtidos com as frações 25% ACN - 7 e 320 foram sempre idênticos, inclusive na semelhança dos fatores de virulência testados (Tabela 5), optou-se em prosseguir a caracterização utilizando-se apenas a fração 25% ACN - 7.

Com isso, a fração 25% ACN - 7 foi analisada e fracionada por HPLC, sendo que a fração coletada no intervalo de tempo de 15 a 20min inibiu 100% a fagocitose da amostra E2348/69 (Figura 23 B). No entanto, na análise do perfil cromatográfico entre o intervalo de 15 a 20min não observava-se picos definidos (Figura 23A). Na tentativa de se detectar o efeito antifagocítico em uma fração com picos melhor definidos a fração ativa (intervalo 6) foi novamente fracionada.

A análise das frações originárias do novo fracionamento identificou o efeito antifagocítico nas frações correspondentes ao intervalo de 18 a 22min. No entanto, embora significativa, a inibição não foi de 100% (Figura 24 B). A análise do perfil cromatográfico deste fracionamento mostra que mesmo nestas condições não se detectava picos isolados (Figura 24A) impossibilitando avançar no processo de isolamento do fator antifagocítico. O fato de não ter havido redução de 100% da fagocitose pode ser devido à separação de moléculas efetoras entre as duas frações ativas (Figura 24 B).

Por outro lado, um indício sobre a natureza do fator surgiu quando a acetonitrila foi substituída por metanol no fracionamento por HPLC. Interessantemente nenhuma das frações obtidas utilizando-se metanol foi capaz de interferir na fagocitose (Figura 25). Sabe-se que em meio ácido pode ocorrer transferência do grupo metil do metanol para a hidroxila de um glicosídeo. Como a fase móvel utilizada no HPLC apresenta estas condições, podemos especular que o fator antifagocítico possa apresentar um glicosídeo envolvido no mecanismo de inibição da fagocitose o que explicaria o desaparecimento do efeito antifagocítico (Lebrun, 2009 (informação pessoal))².

Na tentativa de reduzir a complexidade do perfil cromatográfico das frações contendo o fator de interesse, duas medidas foram tomadas: 1º) diálise da fração 25% de ACN - 7 e 2º) emprego de um novo meio de cultivo, menos rico.

Embora a análise do perfil cromatográfico da fração 25% de ACN – 7 dialisada não tenha simplificado o perfil (Figura 28), permitiu mostrar que o fator antifagocítico apresenta tamanho de até 2 kDa, visto que apenas na solução da diálise realizada com membrana de 1000 Da foi detectado o efeito antifagocítico (Figura 26). O predomínio de moléculas de massa menor do que 2 kDa na fração 25% ACN - 7, também foi verificada em uma análise preliminar por Espectrometria de Massa, realizada pelo Dr Daniel Carvalho Pimenta (Figura 27).

Com a persistência do problema da complexidade do perfil cromatográfico da fração em TSB, um meio complexo elaborado a partir de um organismo inteiro, a soja, a segunda medida foi adotada.

Felizmente a utilização do meio mínimo, composto apenas de sais e glicose, permitiu a secreção do fator. A fração 25% ACN originária do fracionamento do sobrenadante da amostra 7 em SPE (25% ACN 7 M9) inibiu também 100% a fagocitose (Figuras 29 e 30), de forma semelhante a observada com a fração 25% 25 % ACN 7 TSB (Figuras 13 e 14). E, como esperado, a complexidade do perfil desta fração, em HPLC, foi consideravelmente menor do que quando o meio TSB era usado (Figura 31). Ademais este perfil apresenta apenas componentes oriundos da bactéria cultivada, os componentes do meio mínimo, sais e glicose, são eliminados do cartucho de SPE na lavagem com 0% de ACN.

² LEBRUN, Ivo. São Paulo: Laboratório de Bioquímica e Farmacologia do Instituto Butantan, 2009.

A constatação de que a amostra 7 de EPEC atípica secreta o fator antifagocítico em meio mínimo viabilizará os estudos futuros de caracterização e identificação do fator antifagocítico, além de abrir perspectivas para novos estudos sobre os produtos secretados pela EPEC atípica, nessas condições.

Além destas importantes perspectivas, interessante, na tentativa de se isolar o fator antifagocítico, o qual prejudicaria o desenvolvimento da resposta celular e contribuiria para a sobrevivência bacteriana, detectou-se também um efeito adicional, capaz de interferir na adesão da bactéria à célula epitelial, o que conferiria uma desvantagem para a bactéria.

Com estes resultados surge a pergunta: *Por que um patógeno produziria um fator que tivesse ações antagônicas no processo de colonização?*

Embora ainda não tenhamos a explicação para tal, é possível levantar algumas hipóteses:

1º) *Em condições e concentrações mais próximas das “naturais” apenas o efeito antifagocítico é observado. Entretanto, somente quando o sobrenadante é concentrado e o efeito antifagocítico potencializado, verificou-se o efeito adicional, capaz de inibição a adesão da bactéria ao epitélio intestinal;*

2º) *Durante a técnica de fracionamento pode ter havido a eliminação de fatores que atuam na promoção da adesão das bactérias ao epitélio. Desta forma, o efeito de inibir a adesão pode ser decorrente da ausência de componente, perdidos durante o processo de fracionamento, e não propriamente pela secreção de um novo fator;*

3º) *Na fração 25% ACN (amostra 7 ou 320) ainda há muitos componentes e possivelmente o fator responsável pelo efeito antifagocítico não seja o mesmo capaz de interferir na adesão bacteriana às células epiteliais;*

É a primeira vez que se descreve um mecanismo antifagocítico em EPEC atípica. Além disso, este mecanismo difere de outros descritos por depender de um fator secretado e solúvel em meio aquoso. Esta descoberta abre a possibilidade da identificação também de um fator que dificulte a adesão bacteriana a fagócitos profissionais e não-profissionais. Levantando, assim, a perspectiva de controle da

colonização bacteriana como forma de prevenção da diarreia. Considerando o crescente interesse econômico em compostos secretados por microrganismos, de interesse médico e patenteáveis, é de grande importância a futura identificação e caracterização deste fator.

6 CONCLUSÃO

No estudo do comportamento de EPEC atípica com macrófagos identificamos duas amostras do sorotipo O55:H7 que foram capazes de induzir um efeito antifagocítico inédito a partir de um fator secretado no meio de cultura. A fração ativa, obtida pelo fracionamento, a partir do sobrenadante do cultivo bacteriano do sorotipo O55:H7 mostrou-se capaz de: i) inibir a fagocitose de outros microrganismos como EPEC típica e *Saccharomyces cerevisiae* ;ii) reduzir de forma contundente a adesão de EPEC típica às células epiteliais.

Este achado sugere que o fator antifagocítico possa, embora talvez não sozinho, possa exercer um importante papel na adaptabilidade e patogenicidade das EPECa. Adicionalmente, iniciamos a caracterização do fator antifagocítico secretado que é solúvel em meio aquoso, termoestável, apresenta pequeno peso molecular (menor que 2kDa), não é microbicida ou citotóxico e, por último, há indicativos de que possa apresentar uma região glicosídica. Resta agora continuar o trabalho de purificação e caracterização a fim de identificar o fator antifagocítico o que contribuirá no entendimento deste importante mecanismo.

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. **J. Diag. Microbiol. Infec. Dis.**, v. 64, p. 357-365, 2009.
- ALLEN, L. A. H.; ADEREM, A. Mechanisms of phagocytosis. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 8, p. 36-40, 1996.
- ADEREM, A.; UNDERHILL, D. M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 17, p. 593-623, 1999.
- ADKINS, I.; KOBERLE, M.; GROBNER, S.; BOHN, E.; AUTENRIETH, I. B.; BORGMANN, S. *Yersinia* outer proteins E, H, P and T differentially target the cytoskeleton and inhibit phagocytic capacity of dendritic cells. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 297, p. 235-244, 2007.
- AFSET, J. E.; BEVANGER, L.; ROMUNDSTAD, P.; BERGH, K. Association of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with prolonged diarrhoea. **J. Med. Microbiol.**, v. 53, p. 1137-1144, 2004.
- ALLEN, L. A.; SCHLESINGER, L. S.; KANG, B. Virulent strains of *Helicobacter pylori* demonstrate delayed phagocytosis and stimulate homotypic phagosome fusion in macrophages. **J. Exp. Med.**, v. 191, p. 115-128, 2000.
- ALVAREZ, D.; MERINO, S.; TOMAS, J. M.; BENEDI, V. J.; ALBERTI, S. Capsular polysaccharide is a major complement resistance factor in lipopolysaccharide O side chain-deficient *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. **Infec. Immun.**, v. 68, p. 953-955, 2000.
- ALEXANDER, J.; VICKERMAN, K. Fusion of host cell secondary lysosomes with the parasitophorous vacuoles of *Leishmania mexicana* infected macrophages. **J. Protozool.** v. 22, p. 502-508, 1975.

* De acordo com:

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

ANDERSSON, K.; CARBALLEIRA, K.; MAGNUSSON, C.; PERSSON, O.; STENDAHL, H.; WOLF-WATZ; FALLMAN, M. YopH of *Yersinia pseudotuberculosis* interrupts early phosphotyrosine signaling associated with phagocytosis. **Mol. Microbiol.**, v. 20, p. 1057-1069, 1996.

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

BACA, G.; LI, Y. P.; KUMAR, H. Survival of the Q fever agent *Coxiella burnetii* in the phagolysosome. **Trends Microb.**, v. 2, p. 476-480, 1994.

BALDINI, M. M.; KAPER, J. B.; LEVINE, M. M.; CANDY, D. C.; MOON, H. W. Plasmid-mediated adhesion in enteropathogenic *Escherichia coli*. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 3, p. 534-538, 1983.

BLACK, D. S.; BLISKA, J. B. The RhoGAP activity of the *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence. **Mol. Microbiol.**, v. 37, p. 515-527, 2000.

BLACK, R. E.; COUSENS, S.; JOHNSON, H. L.; LAWN, J. E.; RUDAN, I.; BASSANI, D. G.; JHA, P.; CAMPBELL, H.; WALKER, C. F.; CIBULSKIS, R.; EISELE, T.; LIU, L.; MATHERS, C.; for the Child Health Epidemiology Reference Group of WHO and UNICEF. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. **Lancet**, v. 375, p. 1969-1987, 2010.

BLATTNER, D.; BONAS, U. Port of entry – the type III secretion translocon. **TRENDS Microbiol.**, v. 4, p. 186-194, 2002.

BOLTZ-NITULESCU, G.; WILTSCHKE, C.; HOLZINGER, C.; FELLINGER, A.; SCHEINER, O.; GESSL, A.; FORSTER, O. Differentiation of Rat Bone Marrow Cells Into Macrophages Under the Influence of Mouse L929 Cell Supernatant. **J. Leukoc. Biolog.**, v. 41, p. 83-91, 1987.

BUERIS, V.; SIRCILI, M. P.; TADDEI, C. R.; SANTOS, M. F.; FRANZOLIN, M. R.; MARTINEZ, M. B.; FERRER, S. R.; BARRETO, M. R.; 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, nov. 2007.

BUERIS, V. **Interação de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) atípica que apresenta o padrão de adesão localizada-like com células epiteliais *in vitro*.** 2002. 131 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

CAMPOS, L. C.; WHITTAM, T. S.; GOMES, T. A.; ANDRADE, J. R.; 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.

CAMPELLONE, K. G.; GIESE, A.; TIPPER, D. J.; LEONG, J. M. A tyrosine-phosphorylated 12-amino-acid sequence of enteropathogenic *Escherichia coli* Tir binds the host adaptor protein Nck and is required for Nck localization to actin pedestals. **Mol. Microbiol.**, v. 43, p. 1227-1241, 2002.

CELLI, J.; OLIVIER, M.; FINLAY, B. Enteropathogenic *Escherichia coli* mediates antiphagocytosis through the inhibition of PI 3-kinase-dependent pathways. **EMBO J.**, v. 20, p.1245–1258, 2001.

CELLI, J.; FINLAY, B. Bacterial avoidance of phagocytosis. **TRENDS Microbiol.**, v. 10, p. 232-237, 2002.

CHARRON, A. J.; SIBLEY, L. D. Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. **J. Cell Sci.**, v. 115, p. 3049-3059, 2002.

CHASTELLIER, C.; THILO, L. Phagosome maturation and fusion with lysosomes in relation to surface property and size of the phagocytic particle. **Eur. J. Cell Biol.**, v. 74, p. 49-62, 1997.

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

CIAPETTI, G.; GRANCHI, D.; VERRI, E.; SAVARINO, L.; CAVEGAGNA, D.; PIZZOFERRATO, A. Application of a combination of neutral red and amido black staining for rapid, reliable cytotoxicity testing of biomaterials. **Biomaterials**, v. 17, p. 1259-1284, 1996.

CLARKE, S. C.; HAIGH, R. D.; FREESTONE, P. P.; WILLIAMS, P. H.; Virulence of Enteropathogenic *Escherichia coli* a Global Pathogen. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 16, p. 365-378, 2003.

CLAVERYS, J. P.; PRUDHOMME, M.; MORTIER-BARRIERE, I.; MARTIN, B. Adaptation to the environment: *Streptococcus pneumoniae*, a paradigm for recombination-mediated genetic plasticity? **Mol. Microbiol.**, v. 35, p. 251–259, 2000.

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

COX, D.; TSENG, C. C.; BJEKIC, G.; GREENBERG, S. A requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in pseudopod extension. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 3, p. 1240-1247, 1999.

COOMBES, B. K.; VALDEZ, Y.; FINLAY, B. B. Evasive Maneuvers by Secreted Bacterial Proteins to Avoid Innate Immune Responses. **Curr. Biol.**, v. 14, p. 856-867, 2004.

COWELL, B. A.; CHEN, D. Y.; FRANK, D. W.; VALLIS, A. J.; FLEISZIG, S. M. ExoT of cytotoxic *Pseudomonas aeruginosa* prevents uptake by corneal epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 403–406, 2000.

DEAN, P.; KENNY, B. Intestinal barrier dysfunction by enteropathogenic *Escherichia coli* is mediated by two effector molecules and a bacterial surface protein. **Mol. Microbiol.**, v. 54, p. 665-675, 2004.

DELEO, F. R., ALLEN, L. A. APICELLA, M., NAUSEEF, W. M. NADPH oxidase activation and assembly during phagocytosis. **J. Immunol.**, v. 163, p. 6732-6740, 1999.

DERETIC, V.; FRATTI, R. A. *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. **Mol. Microbiol.**, v. 31, p. 1603-1609, 1999.

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

DRAMSI, S. COSSART, P. Listeriolysin O: a genuine cytolysin optimized for an intracellular parasite. **J. Cell Biol.**, v. 156, p. 943-946, 2002.

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

coli strains: phenotypic and genetic profiling reveals a strong association between enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin and diarrhea. **J. Infect. Dis.**, v. 188, p. 1685-1694, 2003.

ELIAS, W., PORANGABA, T., BUERIS, V., SIRCILI, M., NAVARRO-GARCIA, F. Prevalence of autotransporter protein genes of diarrheagenic *Escherichia coli* among atypical enteropathogenic *E. coli* strains. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF BACTERIOLOGY AND APPLIED MICROBIOLOGY, 12., Istanbul. **Abstracts...**Three Divisions of the International Union of Microbiological Societies, 2008. p. 137, res. BP-211.

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.; McDANIEL, T. K.; KAPER, J. B. The locus of enterocyte effacement (LEE) – encoded regulator controls expression of both LEE- and- non LEE- encoded virulence factor in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 6115-6126, 2000.

FALLMAN, M.; ANDERSSON, K.; HAKANSSON, S.; MAGNUSSON, K. E.; STENDAHL, O.; WOLF-WATZ, H. Yersinia pseudotuberculosis inhibits Fc receptor-mediated phagocytosis in J774 cells. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 3117-3124, 1995.

FERNANDES-FILHO, A. **Doença diarréica aguda em João Pessoa: Prevalência de enteropatógenos e importância dos potenciais fatores de risco e proteção.** 2004. 119 f. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

FINLAY, B. B.; FALKOW, S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. **Microbiol. Rev.**, v. 61, p.136-169, 1997.

FISCHETTI, V. A. *Streptococcal* M protein: molecular design and biological behavior. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.2, p. 285-314, 1989.

FLYNN, J.; CHAN, J. immune evasion by *Mycobacterium tuberculosis*: living with the enemy. **Curr. Opin. Immunol.**, v.15, n. 4, p. 450-455, 2003.

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, jul. 2005.

FRANKEL, G.; PHILIPS, A. D.; ROSENSHINE, I.; DOUGAN, G.; KAPER, J. B.; KNUTTON, S. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. **Mol. Microbiol.**, v. 30, p. 911–921, 1998.

GARMENDIA, J.; FRANKEL, G.; CREPIN, V. F. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 2573-2385, 2005.

GARRITY-RYAN, L.; KAZMIERCZAK, B.; KOWAL, R.; COMOLLI, J.; HAUSER, A.; ENGEL, J. N. The arginine finger domain of ExoT contributes to actin cytoskeleton disruption and inhibition of internalization of *Pseudomonas aeruginosa* by epithelial cells and macrophages. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 7100-7113, 2000.

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

GERSUK, G.; HIRAOKA, A.; MARR, K. A. Human monocytes differentiate into macrophages under the influence of human KPB-M15 conditioned medium. **J. Immunol. Methods.**, v. 299, n. 1-2, p. 99-106, abr. 2005.

GIOPPO, N. M.; ELIAS, W. P.; VIDOTTO, M. C.; LINHARES, R. E.; SARIDAKIS, H. O.; GOMES, T. A.; TRABULSI, L. R.; PELAYO, J. S. Prevalence of HEp-2 cell-adherent *Escherichia coli* and characterisation of enteroaggregative *E.coli* and chain-like adherent *E.coli* isolated from children with and without diarrhea, in Londrina, Brazil. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 190, p. 293-298, 2000.

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

GOEHRING, U. M., SCHMIDT, G., PEDERSON, K. J., AKTORIES, K.; BARBIERI, J. T. The N-terminal domain of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S is a GTPase-activating protein for Rho GTPases. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 36369–36372, 1999.

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.

GOOSNEY, D.; CELLI, J.; KENNY B.; FINLAY, B. Enteropathogenic *Escherichia coli* inhibits phagocytosis. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 490-495, 1999.

GRATIA, A. Sur um remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. **C. R. Soc. Biol.**, v. 93, 1040-1041, 1925.

GREENBERG, S. Modular components of phagocytosis. **J. Leuk. Biol.**, v. 66, p. 712-717, 1999.

HARTLAND, E. L.; DANIELL, S. J.; DELAHAY, R. M.; NEVES, B. C.; WALLIS, T.; SHAW, R. K.; HALE, C.; KNUTTON, S.; FRANKEL, G. The type III protein translocation system of enteropathogenic *Escherichia coli* involves EspA-EspB protein interactions. **Mol. Microbiol.**, v. 35, n. 6, p. 1483-1492, 2000.

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

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

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

HUECK, C. J. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. **Mol. Biol. Rev.**, v. 62, p. 379-433, 1998.

IIZUMI, Y.; SAGARA, H.; KABE, Y.; AZUMA, M.; KUME, K.; OGAWA, M.; NAGAI, T.; GILSEPIE, G.; SASAKAWA, C.; HANDA, H. The Enteropathogenic *Escherichia coli* effector EspB facilitates microvillus effacing and antiphagocytosis by myosin function. **Cell Host Microbe**, v. 2, p. 383-392, 2007.

ITAGAKI, H.; HAGINO, S.; KATO, S.; KOBAYASHI, T.; UMEDA, M. An *in vitro* alternative to the draize eye-irritation test: evaluation of the crystal violet staining method. **Toxic. in vitro**, v. 5, n. 2, p. 139-143, 1991.

JANEWAY, C. A. J. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. **Immunol. Today**, v. 13, p. 11–16, 1992.

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

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

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

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

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

KENNY, B.; ELLIS, S.; LEARD, A. D.; WARAWA, J.; MELLOR, H.; JEPSON, M. A. Co-ordinate regulation of distinct host cell signaling pathways by multifunctional enteropathogenic *Escherichia coli* effector molecules. **Mol. Microbiol.**, v. 44, p. 1095-1107, 2002.

KLAPPROTH, J. M. A.; SCALETSKY, I. C. A.; MCNAMARA, B. P.; LAI, L. C.; MALSTROM, C.; JAMES, S. P.; DONNENBERG, M. S. A Large Toxin from Pathogenic *Escherichia coli* Strains that Inhibit Lymphocyte activation. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 2148-2155, 2000.

KNODLER, L. A.; CELLI, J.; FINLAY, B. B. Pathogenic trickery: deception of host cell processes. **Nat. Rev. Molec. Cell Biol.**, v. 2, p. 578-588, 2001.

KNUTTON, S.; ROSENSHINE, I.; PALLAN, M. J.; NISAN, I.; NEVES, B. C.; BAIN, C.; WOLFF, C.; DOUGAN, G.; FRANKEL, G. A novel EspA-associated surface

organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. **EMBO J.**, v. 17, p. 2166-2176, 1998.

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

LEYTON, D. L.; SLOAN, J.; HILL, R. E.; DOUGHTY, S.; HARTLAND, E. L. Transfer region of pO113 from enterohemorrhagic *Escherichia coli*: similarity with R64 and identification of a novel plasmid-encoded autotransporter, EpeA. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 6307-6319, nov. 2003.

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

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.

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

MONTEIRO, B. T. **Caracterização da proteína dispersina em amostras de *Escherichia coli* não pertencentes ao patótipo de *E. coli* enteroagregativa.** 2008. 97 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

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

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

NAGAI, T.; ABE, A.; SASAKAWA, C. Targeting of enteropathogenic *Escherichia coli* EspF to host mitochondria is essential for bacterial pathogenesis : critical role of the 16th leucine residue in EspF. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 2998-3011, 2005.

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

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

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

NOGUEIRA, N.; COHN, Z. *Trypanosoma cruzi*: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. **Exp. Med.**, v. 143, p. 1402-1420, 1976.

NOUGAYRÈDE, J.; DONNENBERG, M. S.; FERNANDES, P. J. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. **Cell. Microbiol.**, v. 5, p. 359-372, feb. 2003.

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

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

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

PEDROSO, M. Z; Attating-effacing lesions and intracellular penetration in Hela cells and human duodenal mucosa by two *Escherichia coli* strains not belonging to the classical enteropathogenic *E.coli* serogroup. **Infect. Immun.**, v.61, p. 1152-1156, 1993.

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

PITT, A.; MAYORGA, L. S.; STAHL, P. D.; SCHWARTZ, A. L. Alterations in the protein composition of maturing phagosomes. **J. Clin. Invest.**, v. 90, p. 1978-1983, 1992.

PNED (Programa das Nações Unidas para o desenvolvimento). **Developing Human Report**. 2006. Disponível em: <<http://www.pned.org.br>>. Acesso em: 20 nov. 2007.

PORANGABA, T. M.; SIRCILI, M. P.; FRANZOLIN, M. R. Pesquisa de genes de virulência em amostras de EPEC atípicas através de PCR. In: ENCONTRO REGIONAL DE BIOMEDICINA UNIÃO CIENTÍFICA ANUAL, 9., 2006, São Paulo. **Resumos...** São Paulo: Instituto Butantan, 2006. CD-ROM

PORANGABA, T. M.; ELIAS, W. P.; BUERIS, V.; NAVARRO-GARCIA, F.; SIRCILI, M. P. Atypical enteropathogenic *E.coli* strains carry autotransporter protein-encoding genes of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes. In: REUNIÃO CIENTÍFICA ANUAL, 10., 2008, São Paulo. **Resumos...** São Paulo: Instituto Butantan, 2008. CD-ROM.

QUITARD, S.; DEAN, M.; MARESCA, M.; KENNY, B. The enteropathogenic *Escherichia coli* EspF effector molecule inhibits PI-3 kinase-mediated uptake independently of mitochondrial targeting. **Cel. Microbiol.**, v. 8, p. 972-981, 2006.

RABINOVITCH, M. Professional and non-professional phagocytes: an introduction. **Trends**. v. 5, p. 85-87, 1995.

RAMARAO, N.; GRAY-OWEN, S. D.; BACKERT, S.; MEYER, T. F. *Helicobacter pylori* inhibits phagocytosis by professional phagocytes involving type IV secretion components. **Mol. Microbiol.**, v. 37, p. 1389–1404, 2000.

REID, S. D.; BETTING, D. J.; WHITTAM, T. S. Molecular detection and identification of intimin alleles in pathogenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 2719-2722, 1999.

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

RODRIGUES, J.; SCALETSKY, I. C. 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.

ROOIJAKKERS, S. H.; KESSEL, K. P.; STRIJP, J. A. Staphylococcal innate immune evasion. **Trends Microbiol.**, v. 13, p. 596-601, 2005.

ROSQVIST, R.; BOLIN, I.; WOLF-WATZ, H. Inhibition of phagocytosis in *Yersinia pseudotuberculosis*: a virulence plasmid-encoded ability involving the Yop2b protein. **Infect. Immun.**, v. 56, p. 2139-2143, 1988.

ROSQVIST, R.; FORSBERG, A.; RIMPILAINEN, M.; BERGMAN, T.; WOLF-WATZ, H. The cytotoxic protein YopE of *Yersinia* obstructs the primary host defence. **Molec. Microbiol.**, v. 4, p. 657-667, 1990.

ROSQVIST, R.; FORSBERG, A.; WOLF-WATZ, H. Intracellular targeting of the *Yersinia* YopE cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption. **Infect. Immun.**, v. 59, p. 4562-4569, 1991.

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

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

SANTOS, T. O; PORANGABA, T. M.; FRANZOLIN, M. R. SIRCILI, M. P. Estudo da presença de genes de virulência em amostra de EPEC atípica isoladas de pacientes em Salvador (BA). In: ENCONTRO REGIONAL DE BIOMEDICINA, 10., 2008, Botucatu. **Resumos...** Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 2008. p. 55.

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

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

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

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

SCHWARTZ, H. R.; HELINSKI, D. R. Purification and characterization of colicin E1. **J. Biol. Chem.**, v. 246, p. 6318-6327, 1971.

SHAO, F.; VACRATIS, P. O.; BAO, Z.; BOWERS, K. E.; FIERKE, C. A.; DIXON, J. E. Biochemical characterization of the *Yersinia* YopT protease: cleavage site and recognition elements in Rho GTPases. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 100, p. 904-909, 2003.

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

SOARES, E. S.; BARBOSA, C. F. M.; PIAZZA, R. M.; RUIZ, R. C. Um estudo sobre as toxinas expressas sobre *Escherichia coli* enteropatogênica atípica. In: REUNIÃO CIENTÍFICA ANUAL, 10., 2008, São Paulo. **Resumos...** São Paulo: Instituto Butantan, 2008. CD-ROM.

STOSSEL, T. P. The early history of phagocytosis. In: **Phagocytosis and pathogens: the host**. Stamford: Ed. Gordon S., 1999. p. 3-18.

SURESH, A.; SODHII, A. Production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by bone marrow-derived macrophages: effect of cisplatin and lipopolysaccharide. **Immun. Letters**, v. 30, p. 93-100, 1991.

SWANSON, J. A.; BAER, S. C. Phagocytosis by zippers and triggers. **Trends Cell Biol.**, v. 5, p. 89-93, 1995.

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

THAKKER, M.; PARK, J. S.; CAREY, V.; LEE, J. C. *Staphylococcus aureus* serotype 5 capsular polysaccharide is antiphagocytic and enhances bacterial virulence in a murine bacteremia model. **Infec. Immun.**, v.66, p. 5183-5189, 1998.

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

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

TRÜLZSCH, K.; GEGINAT, G.; SPORLEDER, T.; RUCKDESCHEL, K.; HOFFMANN, R.; HEESEMANN, J.; RÜSSMANN, H. *Yersinia* outer protein P inhibits CD8 T cell priming in the mouse infection model. **J. Immunol.**, v. 174, p. 4244-4251, 2005.

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

VOEGEL, U.; WEINBERGER, A.; FRANK, R.; MULLER, A.; KOHL, J.; ATKINSON, J. P.; FROSCH, M. Complement factor C3 deposition and serum resistance in isogenic capsule and lipooligosaccharide sialic acid mutants of serogroup B *Neisseria meningitidis*. **Infec. Immun.**, v. 65, p. 4022–4029, 1997.

UNDERHILL, D. M.; OZINSKY, A. Phagocytosis of Microbes: Complexity in action. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 20, p. 825-852, 2002.

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.

WIEDERMANN, A.; LINDER, S.; GRASSL, G.; ALBERT, M.; AUTENRIETH, I.; ALPFELBACHER, M. *Yersinia enterocolitica* invasin triggers phagocytosis via 1 integrins, CDC42Hs and WASp in macrophages. **Cell. Microbiol.**, v. 3, p. 693–702, 2001.

YAMAMOTO, S.; TERA, A.; YURI, K.; KURAZONO, H.; TAKEDA, Y.; YOSHIDA, O. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 12, p. 85-90, 1995.

APÊNDICE - Meios e Soluções Utilizadas

1 Meios de Cultura e Soluções

Os meios de cultura, sais e reagentes utilizados foram de procedência Difco (Difco laboratories, Michigan, EUA), Merck (Merck Chemical, New Jersey, EUA), Synth (Labsynth, Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP), Cultilab (Meios para cultivo celular, Campinas, Brasil), J.T.Baker (EUA) e Sigma (Sigma-Aldrich Chemical, Missouri, EUA). Foram preparados conforme especificações dos fabricantes de acordo com Sambrook et al (1989).

1.1 ACN– Solução B (SPE e HPLC)

TFA	1 mL
ACN	900 mL
Água deionizada q.s.p	1000 mL

1.2 Ágar Lúria-Bertani (àgar LB) – pH 7,0

Bacto triptona (peptona)	10%
Extrato de levedura	5%
Cloreto de sódio (NaCl)	10%
Água destilada (q.s.p)	100 mL

Todos os elementos foram dissolvidos em água destilada, acrescido de 15% de ágar bacteriológico. O meio foi esterilizado, em autoclave a 121 °C por 15min, em seguida, distribuído em placas de Petri.

1.3 Ágar MacConkey

MacConkey ágar	50 g
Água destilada (q.s.p.)	1000 mL

O MacConkey foi adicionado à água destilada e o meio esterilizado, em autoclave a 121 °C por 15min.

1.4 Caldo Pobre (PB)

Cloreto de Sódio (NaCl)	2,5 g
Bactotripton	5 g

Água destilada (q.s.p.)	500 mL
-------------------------	--------

Todos os elementos foram dissolvidos em água destilada, para o meio sólido foi adicionado 15% de ágar bacteriológico. O meio foi esterilizado, em autoclave a 121 °C por 15min, em seguida, distribuído em placas de Petri.

1.5 Caldo de Soja Trypticaseína (Meio TSB)

Caldo de Soja Trypticaseína	30 g
-----------------------------	------

Água destilada (q.s.p.)	100 mL
-------------------------	--------

O caldo de Soja foi adicionado à água destilada, esterilizado, em autoclave a 121 °C por 15min.

1.6 Cultivo de células L929 para obtenção do fator de crescimento M-CSF.

Para a obtenção do meio condicionado, células L-929 foram cultivadas em meio RPMI 1640 com 10% SFB, durante 7 dias a 37 °C, 5% de CO₂. Após este período o sobrenadante da cultura celular foi centrifugado a 259 x g (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, EUA), por 10 min a 4 °C, filtrado e estocado a –20°C até o momento do uso.

1.7 Meio de Congelamento Bacteriano

Glicerina	80%
-----------	-----

Água destilada	20%
----------------	-----

A glicerina foi adicionada à água destilada, esterilizada, em autoclave a 121 °C por 15min e armazenada a Ta até o momento do uso.

1.8 Meio de congelamento celular

Meio de Cultivo celular (dependendo da célula)	30%
--	-----

Soro Fetal Bovino	50%
-------------------	-----

Dimetil Sulfoxide (DMSO)	20%
--------------------------	-----

A solução foi preparada no momento do uso.

1.9 Meio DULBECCO MEM (DMEM) *low* ou *high* glicose

O meio fornecido na forma desidratada, com L-Glutamina (584 mg/L), foi dissolvido em água destilada estéril, conforme as recomendações do fabricante.

Após dissolver o pó, foi acrescentado 2 g de bicarbonato de sódio 5,6%. O pH foi acertado para 7,2 utilizando-se HCl 1N, em seguida o meio foi esterilizado por filtração em membranas GV (Durapore em PVDF) de 0,22 µm, utilizando pressão positiva e armazenado a 4 °C.

O meio foi utilizado sem antibiótico, acrescido de 10% ou 2% de SFB dependendo da necessidade.

1.10 Meio Mínimo (M9)

Para a solução de sais M9 5x concentrado foram adicionados os seguintes compostos em água destilada:

Fosfato de Sódio Dibásico Heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	64 g
Fosfato Monopotássio (KH_2PO_4)	15 g
Cloreto de Sódio (NaCl)	2,5 g
Cloreto de Amônio (NH_4Cl)	5 g
Dissolver os sais em 1 L de água destilada e autoclavar a 121 °C por 15min.	

Para preparar o Meio Mínimo para solução de uso foram adicionados:

Sais M9 5x concentrado	200 mL
Meio ácido casamínico a 15%	3,45 mL
Sulfeto de Magnésio (MgSO_4) – 1 M	2 mL
Cloreto de Cálcio (CaCl_2) – 1 M	0,1 mL
Glicose 20%	20 mL
Água destilada estéril	750 mL

As soluções de ácido casamínico, MgSO_4 , CaCl_2 foram autoclavadas separadamente e adicionadas aos sais M9 diluídos em água estéril. A solução de glicose foi esterilizada por filtração em seguida também foi adicionada à nova solução.

1.11 Meio RPMI 1640

O meio fornecido na forma desidratada, com L-Glutamina (300 mg/L), foi dissolvido em água destilada estéril, conforme as recomendações do fabricante, utilizando o mesmo processo descrito na seção 1.9.

1.12 PBS (Tampão fosfato salina) (1X) – pH 7,2

Cloreto de Sódio	8%
Fosfato de Sódio Dibásico heptahidratado	0,3%
Fosfato monossódico hidratado	1,15%

Os sais foram dissolvidos em água destilada e a solução foi autoclavada a 121 °C por 15min.

1.13 Solução balanceada de Hank's

O meio fornecido na forma desidratada foi dissolvido em água destilada estéril, conforme as recomendações do fabricante, utilizando o mesmo processo descrito na seção 1.9.

1.14 Solução Cristal violeta

Cristal violeta	0,5%
Metanol	20%
Água destilada q.s.p.	100 mL

O cristal violeta foi dissolvido em água destilada e metanol e a solução foi armazenada à Ta.

1.15 Solução descorante Citrato de Sódio 0,1 M

Citrato de Sódio	2,9 g
Água destilada q.s.p.	100 mL

O sal foi dissolvido em água destilada e a solução armazenada a Ta.

1.16 Solução descorante (vermelho neutro)

Ácido acético	1%
Metanol	50%
Água destilada q.s.p.	100 mL

A solução foi armazenada à Ta.

1.17 Solução estoque de D-manose à 20%

A solução de D-manose foi preparada em água destilada na concentração final de 20% foi esterilizada por filtração em membranas de 0,22 µm, utilizando pressão positiva e armazenado a 4 °C.

1.18 Solução estoque de Triton X-100 à 1%

O detergente Triton X-100 foi diluído em PBS (1X) esterelizado em filtro 0,22 µm e armazenado a 4 °C.

Para os ensaios a solução estoque com 1% de Triton X-100 foi diluída para 0,1% do detergente em PBS.

1.19 Solução Fisiológica (Salina 0,85%)

Cloreto de Sódio	0,85 g
Água destilada	100 mL

O sal foi dissolvido em água destilada e a solução foi autoclavada à 121 °C por 15min.

1.20 Solução Giemsa (azur-eosin- azul de metileno segundo Giemsa)

No momento do uso a solução foi diluída na proporção de 1:3 em tampão Sørénson e filtrada em papel filtro comum.

1.21 Solução May-Grünwald (eosina-azul de metileno segundo May-Grünwald)

A solução foi diluída na proporção de 1:2 em tampão Sørénson e filtrada em papel filtro comum.

1.22 Solução Tampão Sørénson – pH 7,3

Solução A

Fosfato de Potássio monobásico	0,64 g
Água destilada q.s.p	70 mL

Solução B

Fosfato de Sódio	2,3 g
Água destilada q.s.p	250 mL

Para a solução final foram adicionados 69,6 mL da solução A em 230,4 mL da solução B. O pH foi ajustado para 7,3 com a solução B, em seguida, autoclavada à 121 °C por 15min. e armazenada a 4 °C.

1.23 Solução Tripsina/EDTA

Frascos com 40 mL com tripsina (2,5 g/L) com atividade 1:250

1.24 Solução Vermelho neutro 1% em água

Vermelho neutro	1 g
-----------------	-----

Água destilada	100 mL
----------------	--------

O vermelho neutro foi dissolvido em água destilada, esterilizada por filtração em membranas de 0,22 µm, utilizando pressão positiva e armazenado a 37 °C.

1.25 Soro Fetal Bovino (SFB)

Soro fetal bovino inativado.

1.26 Sulfato de Gentamicina

O antibiótico foi diluído em PBS 1x, sendo estocado na concentração de 5 mg/mL e armazenado a - 20 °C.

1.27 Tampão de amostra 1x

Azul de bromofenol	0,25%
--------------------	-------

xileno cianol	0,25%
---------------	-------

glicerol	30%
----------	-----

1.28 Tampão TBE 0,5 X 1%

Tris (hidroximetil) aminometano	44,5 mM
---------------------------------	---------

ácido bórico	44,5 mM
--------------	---------

ácido etilenodiaminotetracético [EDTA]	1 mM
--	------

1.29 TFA (0,1%) – Solução A (SPE e HPLC)

TFA	1 mL
-----	------

Água deionizada	1000 mL
-----------------	---------