

**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**

## 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 diarréia em crianças e adultos que apresenta alta heterogeneidade quanto aos fatores de virulência. O aumento dos casos de diarréia 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 phagocytized 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.

## **1 INTRODUÇÃO**

### **1.1 Impacto da diarréia infantil**

Diarréia é um dos maiores problemas de saúde pública que acarreta um enorme impacto econômico nos países em desenvolvimento. A diarréia aguda, sozinha, é responsável por aproximadamente 20% de todas as mortes infantis. Anualmente, cinco mil casos de diarréia 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 diarréia 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 diarréia, 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 diarreogênicos.

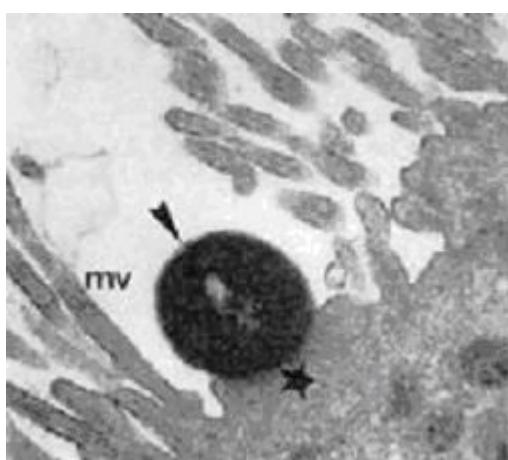
### **1.2 *Escherichia coli* diarreogênica**

Há diferentes agentes etiológicos responsáveis por causar a diarréia, entre eles, encontram-se as *E. coli* diarreogênicas 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 diarréia. 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).



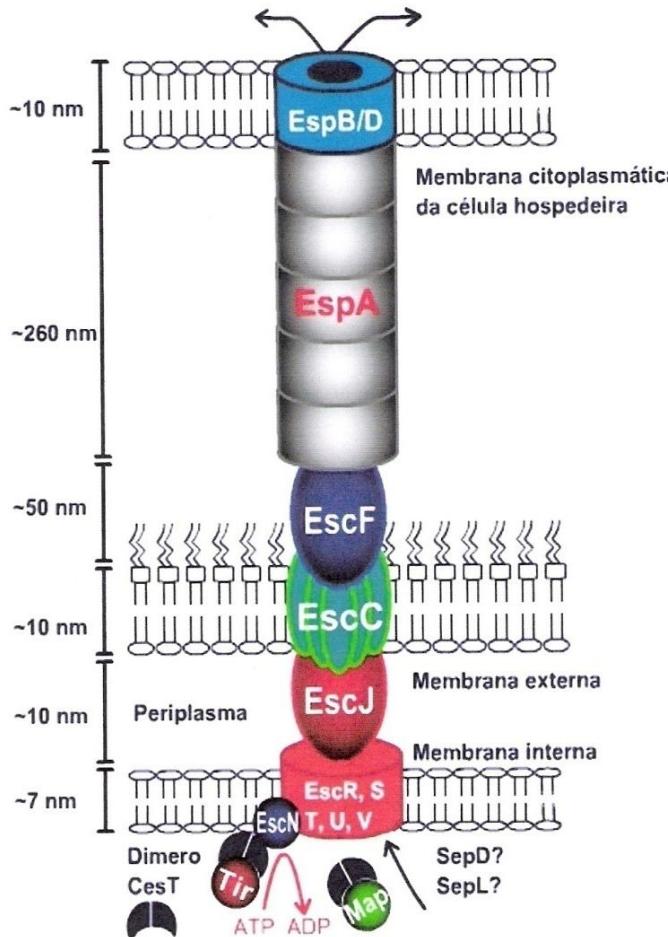
**Figura 1-** Microscopia eletrônica mostrando a Lesão A/E, destruição das microvilosidades (mv) e a formação do pedestal (★).

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).



**Figura 2-** Esquema representando o Sistema de Secreção do Tipo 3 (SST3) em EPEC.  
Fonte: Garmendia, Frankel e Crepin (2005).

Após a formação completa deste aparato, a bactéria injeta para dentro da célula hospedeira várias proteínas efetoras, entre elas, a proteína Tir (receptor da intimina) que é inserido na membrana do enterócito, possibilitando a ligação da intimina o que garante a adesão íntima da bactéria à célula hospedeira. Em seguida, Tir é fosforilado dando inicio a polimerização da actina e formação do pedestal (KENNY et al., 1999; CAMPELLONE et al., 2002).

EspB além de se associar à EspD para formar o poro na membrana da célula (FRANKEL et al, 1998), também é secretada para o interior da célula, participando do rearranjo do citoesqueleto, polimerização da actina e consequentemente na formação do pedestal (TAYLOR; LUTHER; DONNENBERG, 1999). Além disso, EspB também se associa a outras proteínas do hospedeiro como a miosina que se liga a actina-F (IIZUMI et al., 2007).

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抗ígenos 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).

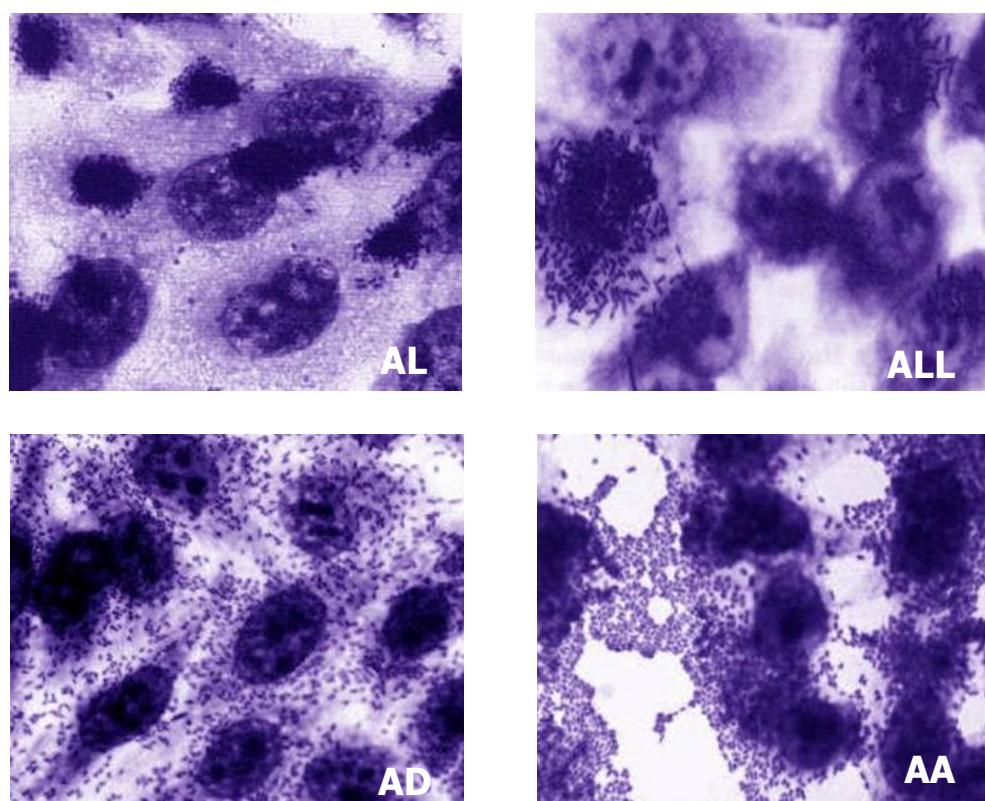
Nota: [ ] indica a ocorrência freqüente de amostras imóveis.

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 fimbria BFP (GIRÓN; HO; SCHOOLNIK, 1991).

No caso da EPEC atípica, além de apresentar o padrão AL, mesmo na ausência da fimbria 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 fraca (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 (SCALETSKY 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 freqüentemente relacionada a surtos de diarréia nos países desenvolvidos, onde estiveram, durante muitos anos, associadas à diarréia 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 diarréia 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 diarréia aguda infantil (SCALETSKY et al., 1999; FRANZOLIN et al., 2005; ARAUJO et al., 2007) ou à diarréia 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, mas semelhantes à EHEC, responsável por causar uma diarréia 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抗ígenos particulados, como poluentes (STOSSEL, 1999). Esta via não

constitutiva engloba ligantes com mais de 1  $\mu\text{m}$  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 lipoteicoicos, 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 consequentemente 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 matura, 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* (CLAVERTYS 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*

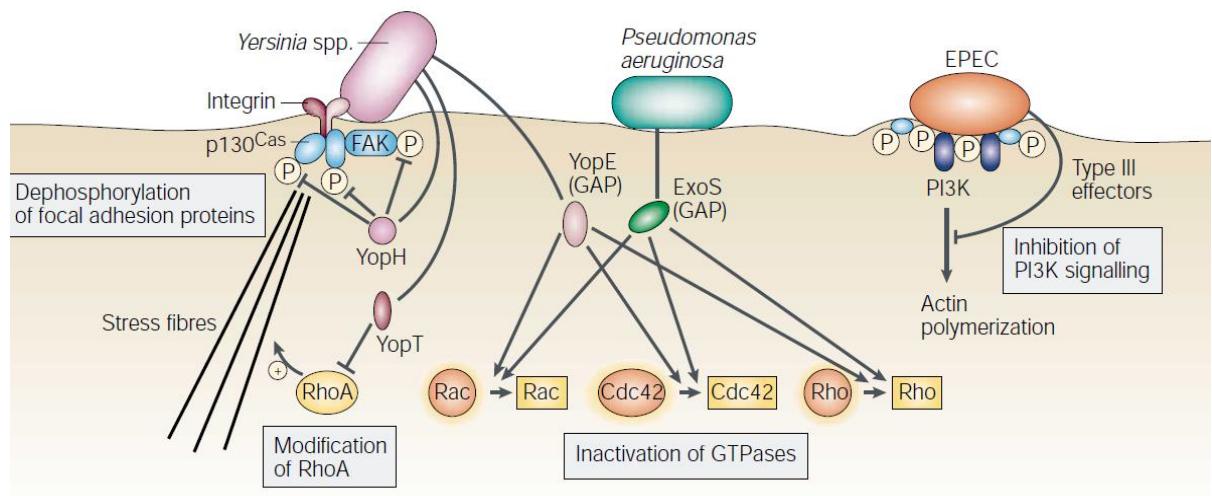
(ROOIJAKKERS; KESSEL; STRIJP, 2005) e *Streptococcus pyogenes* (FISCHETTI, 1989); 2º) aderirem-se aos macrófagos, interferindo na internalização como é o caso da *Yersinia* (ROSQVIST et al., 1990), *Pseudomonas aeruginosa* (GARRITY-RYAN, et al., 2000) e EPEC típica (CELLI; OLIVIER; FINLAY, 2001); 3º) 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 burnetti* (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 Fcγ (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 patogênicos 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 consequentemente a formação de pseudópodes (IIZUMI et al., 2007).

O fato de estudos epidemiológicos demonstrarem aumento na incidência de casos de diarréia 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 “subcategorias” (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.

## **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<sup>+</sup> EAF-negative stx<sup>-</sup> 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.; BORGGMANN, 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.; SCALETSKY, I. C. A. Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among brazilian children. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, p. 3396-3399, 2007.

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 requeriment 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.; SCALETSKY, I. C. A. Atypical enteropathogenic *Escherichia*

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

ELIAS, W., 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.

GAASSAMA-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. Caracterization 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.; REINSCHEID, 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.; PALLENT, 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* enteroaggregativa.** 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.

SCALETSKY, 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.

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

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

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

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

SHAO, F.; VACRATSIS, 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.; TERAI, 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.