

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas
Área de Microbiologia

**Caracterização da adesão de *Escherichia coli* enteropatogênica atípica do
sorotipo O26:H11 a componentes de matriz extracelular**

Sarita Schneider Rossato

Dissertação para obtenção de grau de MESTRE

Orientadora: Dra. Roxane Maria Fontes Piazza

São Paulo
2009

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Sarita Schneider Rossato

**Caracterização da adesão de *Escherichia coli* enteropatogênica atípica do
sorotipo O26:H11 a componentes de matriz extracelular**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção de grau de Mestre

Dra. Roxane Maria Fontes Piazza
Orientadora/presidente

Dra. Tânia Aparecida Tardelli Gomes do Amaral
1°. Examinador(a)

Dra. Gláucia Maria Machado Santelli
2°. Examinador(a)

São Paulo, 15 de setembro de 2009



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética em Experimentação Animal



Ofício CEEA/FCF/54/2009

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Purificação e caracterização de proteínas envolvidas na adesão de 'Escherichia coli' enteropatogênciã atípica do sorotipo O26:H11" (Protocolo nº 203), de responsabilidade da pesquisadora **Sarita Schneider Rossato** sob a orientação da Profa. Dra. Roxane Maria Fontes Piazza, 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 em Experimentação Animal – CEEA, desta Faculdade, em 10 de novembro de 2008.

São Paulo, 13 de julho de 2009.

Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal
CEEA/FCF/USP

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan (São Paulo, SP), com o auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processos 06/07145-0 e 06/58303-5).

Dedicatória

Aos meus pais Gilberto e Marisena,

*Ao meu pai Gilberto, por sempre acreditar e confiar em mim, e por ser exemplo
caráter, de bondade e de perseverança. Agradeço todo o amor e orgulho que tem por
mim, que me faz me esforçar muito em tudo que faço,
À minha mãe Marisena, fonte inesgotável de amor e carinho, dedico este trabalho e
agradeço a dedicação à minha educação e por todos os ensinamentos transmitidos
com muito amor e persistência.*

*Ao meu querido irmão Fábio, por ter sido sempre um ótimo exemplo de caráter,
humildade e altruísmo e por todo carinho e amor*

*E aos três, agradeço as orações que sempre me guiaram e por sempre se esforçarem
para que eu seja feliz.*

Ao meu querido avô Edmundo Schneider, que Deus chamou para sua companhia enquanto eu realizava este trabalho, pela sabedoria em enfrentar as dificuldades com esperança, alegria e atitudes positivas. Agradeço por todos os momentos alegres que me proporcionou, por me ensinar a jogar cartas, e por ter sido exemplo de atitudes corretas, de tratar bem as pessoas bem e sem preconceito. Você foi muito importante para mim e é uma pena que eu não tenha tido coragem suficiente para driblar a vergonha e ter lhe dito isso.

AGRADECIMENTOS

À Deus, agradeço as bênçãos na minha vida, como a oportunidade de crescimento profissional e pessoal com a realização deste trabalho, e agradeço pelas pessoas queridas que conheci durante essa caminhada;

À Dra. Roxane Maria Fontes Piazza por ter me acolhido com confiança em seu laboratório, agradeço pela oportunidade, pelos ensinamentos, carinho, amizade, compreensão e a atenção dedicada a mim e ao meu trabalho;

À Dra. Ângela Barbosa, agradeço pela ajuda, pela disponibilidade, pelas sugestões e também por estar sempre alegre e entusiasmada com os resultados;

Ao Dr. Waldir Pereira Elias Jr., à Dra. Patrícia Abreu e ao Dr. Daniel Pimenta pelo apoio, sugestões e colaborações;

À Luisa e Nadja pela dedicação na secretaria do Laboratório de Bacteriologia;

Aos colegas do curso de Pós-graduação, pelo compartilhamento de experiências;

À Caroline Magalhães, cujo trabalho de mestrado deu origem a este trabalho, agradeço pelas dicas e toda alegria e energia transmitida;

Aos amigos de bancada, Chris, Júlia, Leticia, Márcio, Milton e Natália e aos amigos do Laboratório de bacteriologia, Camila, Dani, Gabi, Keyde, Renato e Sílvio pelo espírito de equipe e pelos momentos de alegria e descontração;

À amiga Bianca, pela boa companhia em viagens, e por não ter medo de afastar sapos enormes;

À amiga Francielli, pela serena convivência;

À amiga Luciana, pelas boas conversas e passeios divertidos;

À amiga Vanessa, pela sabedoria, por todos os pratos gostosos que preparou e pelas lembrancinhas que trouxe das viagens que fez;

Ao amigo Sérgio por ler tantos *papers* e depois compartilhar o conhecimento e por nos fazer rir com seu senso de humor apurado;

Ao Márcio, pela ajuda nos experimentos e por ser um bom companheiro e guia de viagem;

À Helena, minha “grande” amiga, de risada fácil e gargalhada interminável, por estar presente nos momentos de alegria, de vôlei e de balada e pelo apoio e carinho nas horas de choradeira, impaciência, reclamação e indecisão;

Aos amigos que conheci jogando vôlei no Centro de Práticas Esportivas da USP, agradeço pelos momentos de descontração e risadas, especialmente nos dias em que chegava triste ou mal humorada porque os experimentos não tinham dado certo,

Ao meu pastor alemão Fritz, agradeço por ter me ensinado a amar e respeitar ainda mais os animais, principalmente aquele que utilizei neste trabalho, agradeço pelas brincadeiras, pela alegria que demonstrava quando chegava em casa e agradeço por ter feito companhia aos meus pais quando eu não estava lá,

Aos funcionários do Laboratório de Bacteriologia, por toda a cooperação;

A todos que me apoiaram; meu agradecimento.

“O maior obstáculo ao conhecimento não é a ignorância, mas a isusão do conhecimento”

Daniel Boorstin
(1914 – 2004)

RESUMO

Cepas de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) estão entre os patógenos mais freqüentemente envolvidos em casos de diarreia. Este patotipo é subdividido em EPEC típicas e atípicas, sendo que as típicas possuem o gene *eae* (EPEC *attaching and effacing*) e o plasmídeo EAF (EPEC *adherence factor*), e as atípicas albergam somente o gene *eae*. A principal característica de sua patogênese é a formação de uma lesão histopatológica no epitélio intestinal denominada *attaching and effacing* (A/E), que resulta da adesão íntima da bactéria ao enterócito. A adesão é uma etapa crítica na patogênese bacteriana, sendo o primeiro pré-requisito para que as *E. coli* colonizem com sucesso a mucosa do hospedeiro. A ligação da bactéria a um ou mais componentes teciduais da matriz extracelular como colágeno I e IV, laminina, fibronectinas celular e plasmática são indícios de que essas moléculas estão sendo usadas como substrato de adesão e colonização do hospedeiro pela bactéria patogênica. Adesinas com capacidade de interagir com componentes da matriz extracelular já foram identificadas em bactérias patogênicas, no entanto, ainda não foi caracterizada nenhuma proteína de EPEC atípica com essa capacidade de adesão. Essa propriedade foi evidenciada em um isolado de EPEC atípica durante pesquisas em nosso laboratório e neste trabalho visamos identificar e caracterizar a(s) proteína(s) envolvida(s) nesta habilidade adesiva. As proteínas possivelmente envolvidas apresentam massas moleculares relativas de 107, 44 e 35 kDa e a pré-incubação do isolado 2103 com componentes de matriz extracelular provoca uma variação no seu padrão de adesão e influencia o número de bactérias aderidas a células epiteliais. No entanto, como esse patotipo é muito heterogêneo essa característica não pode ser extrapolada para todos os isolados dessa categoria.

Palavras-chave: EPEC atípica, diarreia, adesinas, componentes de matriz extracelular

ABSTRACT

Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) has been a leading cause of childhood diarrhea in developing countries. The main mechanism of atypical EPEC pathogenesis is a lesion called attaching and effacing (A/E), which is characterized by intimate adherence of the bacteria to the intestinal epithelium and destruction of microvillus. Nevertheless, it represents a heterogeneous group and other virulence factors may be involved in atypical EPEC pathogenesis. Previously, we have identified one isolate of atypical EPEC, serotype O26:H11, which secretes proteins that interact with ECM macromolecules. The interactions between pathogenic bacteria and ECM molecules such as fibronectin, laminin and collagen may play an important role in the bacterium adherence to and invasion of host cells. Adhesion is critical for successful *E. coli* colonization of gastrointestinal tract and is mediated by adhesins. The aim of this study is to identify and characterize putative adhesins that may contribute to the binding of the isolate of atypical EPEC to extracellular matrix components. The supernatant of the atypical EPEC isolate was submitted to a solid phase binding assay with matrigel (a mouse basement membrane composed mainly of laminin, collagen IV and fibronectin), the adhered proteins were stripped from the wells, separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and submitted to immunoblotting assay. Three major proteins of apparent molecular weights of 107, 44 e 35 kDa were recognized by the anti-proteins polyclonal serum (produced in rabbit immunized with the isolate's supernatant) through immunoblotting assay. Besides, we observed that in the presence of ECM components the isolate clearly changes its adherence pattern of the isolate to HEp-2 cells, and the number of adhered bacteria to epithelial cells. The atypical EPEC do not share a unique pattern of virulence, suggesting that many virulence factors may contribute to the pathogenesis. The identification of proteins involved in the adhesion with extracellular matrix components in one isolate of this category of diarrheagenic *E. coli* confirms the heterogeneity among the atypical EPEC.

Key-words: adhesins, atypical EPEC, diarrhea, extracellular matrix components

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema de ensaio de ligação do sobrenadante dos isolados de aEPEC aos componentes de matriz extracelular.

Figura 2. Esquema de ensaio de ligação das bactérias aos componentes de extracelular.

Figura 3. Esquema do ensaio dos efeitos do tratamento da bactéria com componentes de matriz extracelular (matrigel, laminina, fibronectina celular, fibronectina plasmática, colágeno I e colágeno IV) na sua capacidade de adesão e invasão de células HEp-2.

Figura 4. Esquema do ensaio de identificação das proteínas envolvidas na adesão do isolado de aEPEC a componentes de matriz extracelular.

Figura 5. Reatividade do soro anti-sobrenadante de isolado O26 contra extrato protéico do sobrenadante dos isolados C3888, 2103 e 2459 de EPEC atípica. Placa de ELISA sensibilizada com 20 µg de proteínas do sobrenadante dos isolados 2103, 2459 e C3888. O soro de coelho foi adicionado nas diluições 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1.600, 1:3.200 e 1:6.4000, seguido de uma incubação com soro de cabra anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase (1:5.000). Após revelação com OPD e interrupção pela adição de 50 µl de H₂SO₄ 8 N, as proteínas aderidas foram detectadas em espectrofotômetro na absorvância de 492 nm em leitor de ELISA. O soro reconheceu proteínas do sobrenadante dos isolados 2103 e 2459 de maneira semelhante e apresentou uma maior reatividade contra o antígeno com o qual o animal foi imunizado (cepa C3888).

Figura 6. Adesão de proteínas do sobrenadante do isolado de EPEC atípica 2103 a matrigel e BSA. Placas de poliestireno, revestidas com 20 µg de matrigel e albumina sérica bovina (BSA) foram incubadas com 100 µl do sobrenadante do isolado 2103 na concentração de 20 µg. Foi adicionado o soro de coelho (1:5.000) seguido de uma incubação com soro de cabra anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase (1:5.000). Após revelação com OPD e interrupção pela adição de 50 µl de H₂SO₄ 8 N, as proteínas aderidas foram detectadas em espectrofotômetro na absorvância de 492 nm em leitor de ELISA. O isolado 2103 apresenta alta ligação à matrigel e a diluição 1:10.000 foi definida para ser utilizada nos ensaios de adesão a componentes de matriz extracelular pois essa diluição apresentou menor reatividade inespecífica do sobrenadante com BSA.

Figura 7. Ligação de proteínas dos sobrenadantes de isolados de EPEC atípica 2103 e 2459 aos componentes de matriz extracelular (laminina; colágeno I; colágeno IV; fibronectina celular; fibronectina plasmática e matrigel) e BSA. Placas de poliestireno, revestidas com 1 µg dos componentes de MEC, matrigel e soro albumina bovina (BSA)

foram incubadas com 100 µl do sobrenadante dos isolados 2103 e 2459 na concentração de 20 µg. Foi adicionado o soro de coelho (1:10.000) seguido de uma incubação com soro de cabra anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase (1:5.000). Após revelação com OPD e interrupção pela adição de 50 µl de H₂SO₄ 8 N, as proteínas aderidas foram detectadas em espectrofotômetro na absorbância de 492 nm em leitor de ELISA. O isolado 2103 se liga aos diferentes componentes de matriz extracelular, em ordem decrescente a interação é matrigel, laminina, colágeno IV, fibronectina celular, fibronectina plasmática e colágeno I. O isolado 2459 não apresenta essa capacidade se comparada àquela observada para o isolado 2103. Além disso, observou-se uma maior inespecificidade de interação deste isolado com BSA.

Figura 8. Unidades formadoras de colônias dos isolados bacterianos de EPECa 2103 e 2459 aderidos à BSA e aos componentes de matriz extracelular: laminina; fibronectina celular; fibronectina plasmática; colágeno I; colágeno IV e matrigel. 1 x 10⁸ células bacterianas dos isolados 2103 e 2459 de EPECa foram incubadas a 37°C por 4 h. Em seguida, os poços foram lavados com PBS estéril, e as células bacterianas aderidas aos componentes de matriz foram recuperadas com Triton X-100 0.1% (vol/vol) em PBS e plaqueadas em placas de LB ágar em diluições seriadas. O número das bactérias aderidas foi determinado pela contagem das colônias em triplicata. O isolado 2103 de EPECa apresenta alta capacidade em aderir aos componentes de matriz extracelular enquanto que o isolado 2459 pertencente ao mesmo sorotipo não apresenta essa capacidade, ou ela é bastante diminuída.

Figura 9. Efeito na adesão de 6 horas do isolado 2103 de EPEC atípica tratada com MEC. A. 2103 sem tratamento, B. 2103 controle sem tratamento, C. 2103 tratada com BSA, D. 2103 tratada com fibronectina plasmática, E. 2103 tratada com fibronectina celular, F. 2103 tratada com laminina, G. 2103 tratada com colágeno I, H. 2103 tratada com colágeno IV, I. 2103 tratada com matrigel. 40 µl do cultivo bacteriano do isolado 2103 foram incubados com 25 µg/ml dos componentes por 1 hora a 37°C e então submetidos à ensaio de adesão a células epiteliais. A pré-incubação do isolado bacteriano com fibronectina celular ou com laminina ou com col I ou com col IV claramente modificou o padrão de adesão após 6 horas de incubação com a célula epitelial, que passou a apresentar um padrão de adesão difuso. A pré-incubação com fibronectina plasmática provocou uma diminuição do número de bactéria aderidas e modificação do padrão de adesão, para adesão difusa, enquanto que a interação com matrigel modificou o padrão para o tipo localizado.

Figura 10. Número de bactérias aderidas a células HEp-2 do isolado 2103 de EPEC atípica tratada com componentes de MEC. 40 µl do cultivo bacteriano do isolado 2103 foram incubados com 25 µg/ml dos componentes por 1 hora a 37°C e então submetidos à ensaio de quantificação de adesão a células epiteliais. A preincubação do isolado 2103 com laminina, colágeno I, colágeno IV, fibronectina celular e matrigel provocou um aumento no número de bactérias aderidas às células epiteliais enquanto que fibronectina plasmática provocou efeito contrário, de diminuição do número de bactérias aderidas a células epiteliais.

Figura 11. A. Frações protéicas do extrato bacteriano do sobrenadante do isolado 2103 previamente incubado com matrigel separadas eletroforéticamente (SDS/PAGE 12%) e coradas com nitrato de prata. **B.** Membrana de nitrocelulose contendo frações protéicas do extrato bacteriano do sobrenadante do isolado 2103 previamente incubado com matrigel separadas eletroforéticamente (SDS/PAGE 12%) foi incubada com anticorpo anti-C3888 (1:1.000) e soro de cabra anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase diluído 1:10000. A ligação dos anticorpos foi detectada utilizando-se substrato para quimioluminescência. **C.** Membrana de nitrocelulose contendo frações protéicas dos extratos bacterianos dos sobrenadantes dos isolados 2103 e 2459 previamente incubados com I-laminina, II- fibronectina celular, III- fibronectina plasmática, IV- colágeno I, V-colágeno IV, VI- BSA. A membrana foi incubada com anticorpo anti-C3888 (1:1.000) e soro de cabra anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase diluído 1:10000. A ligação dos anticorpos foi detectada utilizando-se substrato para quimioluminescência. Após adesão aos diferentes componentes de MEC, cinco proteínas do sobrenadante do isolado 2103, de massas moleculares de 124, 107, 44, 35 e 29 kDa foram coradas e reveladas pelo soro anti-sobrenadante de isolado O26 em ensaio de *immunoblotting*, sendo três delas exclusivas deste isolado em relação ao isolado 2459 e correspondem às proteínas de massa molecular aparente de 107, 44 e 35 kDa.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

1 INTRODUÇÃO.....	20
1.1 <i>Escherichia coli</i>.....	20
1.2 <i>E. coli</i> diarreio gênicas.....	21
1.3 <i>E. coli</i> enteropatogênica (EPEC).....	21
1.4 Patogênese de EPEC.....	24
1.5 Sorotipos.....	26
1.6 Adesinas bacterianas.....	28
1.7 Adesinas bacterianas com capacidade de ligação à matriz extracelular (MEC).....	34
2. OBJETIVO.....	34
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 Isolados bacterianos.....	35
3.2 Preparo dos antígenos.....	35
3.3 Obtenção de soro de coelho anti-sobrenadante do isolado O26.....	36
3.3.1 Imunização.....	36
3.3.2 Adsorção do soro.....	36
3.4 Reatividade do soro de coelho anti-sobrenadante do isolado O26.....	37
3.4.1 ELISA com sobrenadantes bacterianos.....	37
3.4.2 ELISA com componentes de matriz extracelular.....	37
3.5 Ensaio de caracterização da adesão aos componentes de MEC.....	39
3.5.1 Ligação das bactérias aos componentes de MEC.....	39
3.5.2 Ensaio com células HEp-2.....	40
3.5.2.1 Linhagem celular.....	40
3.5.2.2 Ensaio de adesão.....	41
3.6 Ensaio de identificação da(s) proteína(s).....	43
3.6.1 SDS PAGE e <i>Blotting</i> das proteínas aderidas a MEC.....	43
4. RESULTADOS.....	45
4.1 Reatividade do soro de coelho anti-sobrenadante do isolado O26.....	45
4.2 Adesão aos componentes de MEC.....	47
4.2.1 ELISA da adesão dos isolados 2103 e 2459 aos componentes de MEC.....	47
4.2.2 Quantificação da adesão aos componentes de MEC.....	49

4.3 Adesão em células HEp-2.....	50
4.3.1 Padrão de adesão.....	50
4.3.2 Bactérias aderidas a células HEp-2.....	53
4.4 Ensaio de identificação da(s) proteína(s).....	54
5. DISCUSSÃO.....	56
6. CONCLUSÕES.....	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli é o anaeróbio facultativo predominante da flora intestinal humana e coloniza o trato gastrointestinal dentro de poucas horas após o nascimento. É um bacilo Gram negativo pertencente à família *Enterobacteriaceae*, exercendo um importante papel na manutenção da fisiologia intestinal tanto humana quanto animal (NATARO, KAPPER, 1998).

E. coli normalmente permanece inofensiva confinada ao lúmen intestinal, entretanto, mesmo as cepas de *E. coli* não patogênicas podem causar infecção quando o hospedeiro encontra-se debilitado ou imunossuprimido ou quando as barreiras gastrointestinais são violadas. Ao longo do tempo, há cepas de *E. coli* patogênicas vem adquirindo fatores de virulência específicos, conferindo um aumento na habilidade de se adaptar a novos nichos causando um amplo espectro de doenças em indivíduos saudáveis (KAPER *et al.*, 2004). Três síndromes clínicas podem resultar da infecção por estes patotipos: infecções do trato urinário, sepse e meningite. Um outro patotipo é associado a doenças entéricas, e isolados dessa linhagem são conhecidos como *E. coli* diarreiogênica (LEVINE, 1987).

Isolados de *E. coli* diarreiogênica têm grande importância médica e epidemiológica, pois representam o patógeno bacteriano mais comumente associado com formas endêmicas de diarreia. A diarreia, por sua vez, é considerada um dos grandes problemas de saúde pública mundial, com mais de dois milhões de mortes ocorridas a cada ano, particularmente entre crianças abaixo de cinco anos de idade (CLARK *et al.*, 2003).

Considerando-se seus mecanismos de virulência específicos, as síndromes clínicas que causam, os sorotipos O:H, aspectos epidemiológicos e/ou tipos de interação em linhagens celulares (NATARO, KAPER, 1998), as *E. coli* diarreio gênicas são classificadas em seis categorias: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* produtora da toxina de Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* que apresenta padrão de adesão difusa (DAEC). Embora essa classificação continue sendo usada pela maioria dos autores, já se torna evidente que algumas categorias incluem patótipos bastante diferentes. Desta forma, as EPEC e EAEC foram subdivididas em típicas e atípicas e as *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) passaram a constituir uma subcategoria das *E. coli* produtoras da toxina de Shiga (STEC) (KAPER *et al.*, 2004).

1.2 *E. coli* diarreio gênicas

EPEC tem sido identificada como o principal agente de diarreia aguda em países em desenvolvimento (NATARO, KAPER, 1998). Isolados de EPEC são capazes de causar um efeito histopatológico característico em biópsias intestinais, bem como em culturas celulares, conhecido como *attachment and effacement* (A/E) (MOON *et al.*, 1983).

ETEC é um importante patógeno causador da diarreia aguda e é a principal causa de morbidade e mortalidade entre crianças de um a cinco anos de idade em países em desenvolvimento (BLACK, 1993). Além disso, está associado à diarreia dos viajantes que acomete turistas e militares de países industrializados em visita a regiões tropicais e subtropicais endêmicas. Estes organismos produzem as enterotoxinas

termo estável (ST) e termo lábil (LT), que dentre as enterotoxinas são as mais bem caracterizadas (SEARS, KAPER, 1996).

EIEC apresenta a capacidade de invadir e de multiplicar-se em células epiteliais, causa diarreia aquosa e quando a infecção é severa pode causar colite inflamatória, como *Shigella* ssp. (LEVINE, 1987; NATARO, KAPER, 1998).

STEC compreende todas as amostras de *Escherichia coli* que produzem as toxinas de Shiga, Stx-I e Stx-II, e que estão associadas à colite hemorrágica e à síndrome hemolítica urêmica (AGBODAZE, 1999). Este patógeno representa o mais importante agente etiológico de surtos diarreicos causados por alimentos, sendo prevalente principalmente em países desenvolvidos (PATON, PATON, 1998). Dentro deste patotipo está o subgrupo das EHEC que além da expressão das toxinas de Shiga, causa lesão A/E como as EPEC.

DAEC é a categoria de *E. coli* diarreiogênica que apresenta um padrão de adesão difusa em células epiteliais em cultura. Neste padrão de adesão as bactérias encontram-se aderidas de forma difusa sobre toda a superfície celular. (ELLIOTT, NATARO, 1995). Sua patogenicidade ainda é desconhecida, uma vez que amostras de DAEC são isoladas tanto de amostras diarreicas como de fezes não diarreicas (KAPER *et al.*, 2004).

EAEC é caracterizada por aderir a células epiteliais cultivadas no padrão denominado de adesão agregativa (tijolos empilhados) (NATARO *et al.*, 1987). Estão envolvidas em surtos de diarreia persistente principalmente em crianças pequenas e idosos (KAPER *et al.*, 2004).

1.3 *E. coli* enteropatogênica (EPEC)

EPEC foi o primeiro patotipo de *E. coli* a ser descrito. Surtos de diarreia infantil no Reino Unido levaram Bray, em 1945, a descrever um grupo sorologicamente distinto de linhagens de *E. coli* que foram isoladas de crianças com diarreia, mas não de crianças saudáveis.

Em 1995, EPEC foi dividida em dois grupos: EPEC típica (EPECt) e EPEC atípica (EPECa), onde o plasmídeo pEAF está presente somente no primeiro grupo (KAPER *et al.*; 1996). EPEC típica e atípica pertencem a dois conjuntos diferentes de patotipos, sendo que EPECa é definida como cepas de *E. coli* pertencentes ou não ao sorogrupo clássico de EPEC, que produz lesão A/E em células intestinais, não expressam BFP e não tem genes da toxina de Shiga (HERNANDES *et al.*, 2009).

Dados recentes sugerem que EPECa é mais prevalente que EPECt tanto nos países em desenvolvimento como nos desenvolvidos (OCHOA *et al.*, 2008), embora EPECt tenha sido considerada por muitos anos como a principal causa de diarreia infantil nos países em desenvolvimento e foi considerada rara nos países industrializados onde EPECa parece ter sido a causa mais importante de diarreia.

A associação de EPECa com diarreia ainda é controversa, mas sua alta prevalência no mundo e o envolvimento de algumas cepas em surtos de diarreia confirmam que algumas cepas são diarreicas (HERNANDES *et al.*, 2009). Em recente estudo na Noruega, detectou-se uma alta prevalência de EPECa em crianças com e sem diarreia. Quando as linhagens foram analisadas quanto a presença de genes de virulência utilizando-se *microarray* e PCR, vários genes foram significativamente associados com diarreia, indicando uma possível associação entre o potencial patogênico de linhagens de EPECa (AFSET *et al.*, 2008).

Um grande surto de diarreia causado pelo sorotipo O11:H9 de EPECa foi descrito na Finlândia (KNUTTON *et al.*, 1989). Afset detectou na Noruega linhagens de EPECa em 12 de 38 pacientes (31,6%) com sintomas de gastroenterite com duração prolongada. O fato de que quase um terço dos pacientes com EPECa apresentaram diarreia prolongada foi surpreendente (AFSET *et al.*, 2003).

Embora alguns estudos tenham mostrado que pacientes infectados com EPECa tenham uma diarreia suave, não desidratante e não inflamatória (NGUYEN *et al.*, 2006), tipicamente a duração da diarreia em pacientes infectados com EPECa é significativamente mais longa do que aquelas causadas por outros patógenos, indicando que EPECa tem uma propensão inata em persistir no intestino por mais tempo do que outras *E coli* diarreiogênicas (OCHOA *et al.*, 2008). Algumas evidências sugerem que EPECa pode diminuir apoptose das células do epitélio intestinal (HECZKO *et al.*, 2001).

Os estudos realizados no Brasil mostraram a associação entre cepas de EPECa à diarreia aguda infantil (SCALETSKY *et al.*, 1999; FRANZOLIN *et al.*, 2005; ARAUJO *et al.*, 2007), enquanto que outros trabalhos recentes vincularam EPECa a casos de diarreia persistente (AFSET *et al.*, 2004; NGUYEN *et al.*, 2006)

Apesar dos dados controversos em relação à associação epidemiológica de cepas de EPECa a casos de diarreia, o isolamento de cepas de EPECa em pacientes diarreicos de idades variadas e de pacientes aidéticos, indica que algumas cepas de EPECa com certas combinações genéticas são verdadeiros enteropatógenos (HERNANDES *et al.*, 2009).

1.4 Patogênese de EPEC

O mecanismo central da patogênese de EPEC é uma lesão chamada *attaching and effacing (A/E)*, que é caracterizada pela aderência íntima da bactéria ao epitélio intestinal, agregação da actina polarizada, formação de um pedestal e destruição das microvilosidades e de outros elementos do citoesqueleto nos sítios de ligação da bactéria. Os genes associados à lesão A/E residem no *locus of enterocyte effacement (LEE)*, uma ilha de patogenicidade de 35,5 kb, onde estão presentes 41 *open reading frames (ORFs)*, sendo que a maior parte dessas codificam o sistema de secreção tipo III (SSTT) (JARVIS *et al.*, 1995) e chaperoninas associadas – genes *esc (E. coli secretion)*. Em LEE também estão localizados: o gene *eae (E. coli attachment effacement)*, responsável por codificar uma proteína de membrana externa de 94 kDa, denominada intimina, que medeia a adesão íntima da bactéria à célula epitelial (JERSE *et al.*, 1990; FRANKEL *et al.*, 1994); os genes *esp [EPEC secreted proteins]* e o gene *map (mitochondria associated protein)*, responsáveis pela codificação de proteínas efetoras e estruturais como EspA, EspB, EspD, EspF, EspG, EspH e Map (KAPER *et al.*, 2004). As proteínas efetoras são secretadas para o interior da célula eucariótica através do filamento estrutural EspA (KNUTTON *et al.*, 1998); o gene *tir (translocated intimin receptor)* codifica a proteína efetora de 90 kDa denominada Tir, que também é translocada para o interior da célula epitelial (KENNY, WARAWA, 2001).

Há três estágios na patogênese de EPEC: (i) aderência inicial à célula hospedeira, (ii) produção e translocação das proteínas bacterianas por uma agulha formada pelo complexo de secreção do tipo III e (iii) ligação profunda com formação do pedestal (CHEN, FRANKEL, 2005; GARMENDIA *et al.*, 2005; NATARO, KAPER, 1998; VALLANCE, FINLAY, 2000).

Muitas linhagens de EPEC produzem um padrão de aderência característico, chamado adesão localizada, em cultura de tecidos celulares. Neste padrão, a bactéria liga-se em áreas localizadas da superfície celular, formando microcolônias compactas (grupos bacterianos) que podem ser visualizadas após a bactéria ter sido colocada em contato com as células por 3 horas. Esse fenômeno está associado com a presença do plasmídeo denominado fator de aderência de EPEC (pEAF), que carrega a seqüência chamada EAF (fator de aderência de EPEC).

Esse plasmídeo é o mais bem estudado fator de virulência extra LEE, presente apenas nas EPEC típicas, e ausentes nas amostras de EPEC atípicas. Em EAF encontra-se o operon *bfp* [*bundle forming pilus*] que codifica a fímbria BFP, cujo fenótipo é evidenciado pelo padrão de adesão localizado [AL] em células epiteliais cultivadas *in vitro* (GIRON *et al.*, 1991; TRABULSI *et al.*, 2002). BFP, além de possibilitar a agregação bacteriana em microcolônias, também está envolvida no evento de dispersão (KNUTTON, 1999), auxiliando na infecção de outros sítios, e tornando mais eficiente a colonização. Além disso, EAF possui um conjunto de três ORF's denominadas *perA*, *perB* e *perC* (*plasmid-encoded regulator*), cujas proteínas codificadas formam um complexo regulador capaz de ativar a transcrição de alguns genes de LEE, através do gene *ler* (*LEE-encoded regulator*), bem como do operon *bfp* no próprio plasmídeo EAF.

1.5 Sorotipos

Os sorotipos de EPEC encontrados nos sorogrupos O de EPEC são O55:H6, O86:H34, O111:H2, O114:H2, O119:H6, O127:H6, O142:H6, O142:H34, enquanto que os sorotipos O26:H11, O55:H7, O55:H34, O86:H8, O111:H9, O111:H25, O119:H2,

O125ac:H6, O128:H2 pertencem ao patotipo de EPECa. Já os sorotipos de EPEC atípica podem pertencer ou não aos chamados sorogrupos O de EPEC (CAMPOS *et al.*, 2004).

Vieira e colaboradores (2001) identificaram 35 sorotipos entre 59 amostras estudadas, porém um número relativamente grande de antígenos O e H não puderam ser determinados. Mais recentemente, Franzolin e colaboradores (2005) identificaram 18 sorotipos entre 30 amostras estudadas. No entanto, dados mais recentes mostram que os sorotipos presentes nos isolados de EPECa são muito heterogêneos e sem associação com os tipos de intimina e/ou padrões de adesão a célula epitelial (ABE *et al.*, 2009).

Cepas de *Escherichia coli* O26 foram primeiramente descritas por Orskov em 1951, que as associou a diarreia infantil. Desde então, o sorogrupo O26 tem se tornado um dos mais importantes entre as EPEC do sorogrupo O (LEVINE, 1987). Ele inclui vários tipos O:H que são diferentes nas propriedades de virulência (TRABULSI *et al.*, 1996). As cepas mais comuns de O26 pertencem ao sorotipo O26:H11 e O26:H32, ou são não-móveis (O26:H⁻) mas a presença do gene *eae* é mais freqüentemente presente em cepas O26:H11 (SARIDAKIS *et al.*, 1994) e nas não móveis, sendo o sorotipo H32 não-enteropatogênico. As características de virulência variam entre as cepas O26 de acordo com a sua distribuição geográfica, e algumas cepas de O26:H11 produzem toxina de shiga, mas as cepas H⁻ e H11 isoladas no Brasil provaram consistentemente ser Stx-negativas (PEIXOTO *et al.*, 2001).

1.6 Adesinas bacterianas

As adesinas se destacam entre os fatores de virulência implicados na patogênese, pois são proteínas que medeiam a adesão da bactéria às células do hospedeiro. A adesão é essencial tanto na manutenção da microbiota intestinal, como é uma etapa crítica na patogênese bacteriana, sendo o primeiro pré-requisito para que as *E. coli* colonizem com sucesso a mucosa do hospedeiro. Além disso, está se tornando aparente que algumas adesinas são, em parte, secretadas no meio extracelular, agindo em sítios distantes (ARICO *et al.*; 1993).

Linhagens de EPEC típica e atípica diferem em seus padrões de aderência a células epiteliais cultivadas. Enquanto as EPEC típicas apresentam o padrão de adesão localizado (AL), no qual as bactérias apresentam-se aderidas em pontos localizados da célula formando grupos compactos (SCALETSKY *et al.*, 1984), as EPEC atípicas podem aderir ou não às células HEp-2.

As amostras aderentes expressam predominantemente o padrão localizado-like (ALL), no qual as bactérias apresentam-se aderidas em pontos isolados da célula epitelial, formando microcolônias frouxas, o que é evidenciado após períodos prolongados de interação bactéria-célula epitelial (RODRIGUES *et al.*, 1996; PELAYO *et al.*, 1999; SCALETSKY *et al.*, 1999). Além do padrão ALL, os padrões AA -aderência agregativa- (do VALLE *et al.*, 1997; BARROS *et al.*, 2008) e AD -aderência difusa- (TRABULSI *et al.*, 2002) também são expressos por amostras de EPEC atípica. Os padrões AA e AD são característicos das EAEC e DAEC, respectivamente. Algumas amostras de EPEC atípicas podem ainda expressar o padrão AL após 6h de interação bactéria-célula epitelial (HERNANDES *et al.*, 2006).

O sequenciamento do genoma da cepa protótipo de EPEC típica E2348/69 (O127:H6) foi finalizado e foram observadas 10 regiões de codificação de proteínas que apresentam homologia com adesinas não-fimbriais, além da intimina, codificada pela região LEE (IGUSHI *et al.*, 2008). A intimina é a mais importante proteína envolvida na patogênese desta categoria de *E. coli*, sendo responsável pela adesão íntima da bactéria às células epiteliais (JERSE *et al.*, 1990).

A proteína EspA (*EPEC secreted protein A*), cujo contato com as células epiteliais permite o início da adesão, é descrita como uma organela de superfície bacteriana que possibilita uma ligação física entre a bactéria e a célula, permitindo a translocação das proteínas secretadas EspB e EspD, e Tir (KAPER *et al.*, 2004). Estudos mostraram que a ligação de EPEC a células sanguíneas pode ser mediada por EspA e que este contato íntimo não é dependente de hemolisinas (SHAW *et al.*, 2001). Além disso, outro estudo com células Caco-2 mostrou a participação de EspA na adesão inicial à membrana apical destas células, sugerindo que EspA pode ser uma adesina responsável pela adesão inicial de EPEC na ausência de BFP (CLEARY *et al.*, 2004), assim como LifA, outra adesina que parece ter importante papel na adesão de cepas EPEC na ausência de BFP (BADEA *et al.*, 2003).

Um conjunto de genes, denominado locus para adesão difusa (*Ida*), responsável pelo padrão de adesão difuso em células HEp-2 de um isolado O26:H11 foi identificado e caracterizado. *Ida* é parte de uma possível ilha de patogenicidade e foi encontrado também em isolados dos sorotipos O26:H⁻, O5:H⁻, O111:H⁻ e O145:H16 (SCALETSKY *et al.*, 2005).

Após análise de nove linhagens de EPECa de oito sorotipos diferentes, com padrão de adesão LA6 (presença de microcolônias compactas) após 6h de incubação

com células HeLa, Hernandez e colaboradores (2006) sugeriram que os sítios de adesão LA nestas EPECa provavelmente resultam da expressão de um ou mais genes cromossomais codificadores de adesinas e que a formação das microcolônias compactas nessas linhagens seja provocada por uma nova estrutura adesiva (HERNANDES *et al.*, 2006). No entanto, o fenótipo LA6 não está associado com qualquer uma das adesinas recentemente descritas nas diferentes subcategorias de DEC, Saa (STEC adesina de autoaglutinação), Paa (*porcine A/E* associada), ToxB (um *locus* plasmidial encontrado em EHEC O157:H7 envolvido em adesão), Iha (adesina homóloga a IrgA), Lpf (fímbria longa e polar) e Lda (*locus* para aderência difusa) (HERNANDES *et al.*, 2008).

Hernandes e colaboradores (2008) demonstraram também que a formação de microcolônias indistinguíveis da cepa E2348/69 após 6h de infecção por uma linhagem de EPECa do fenótipo LA6 é resultado de um processo invasivo pela intimina do subtipo omicron e da molécula Tir (receptor da molécula de intimina).

Em outras categorias de *E. coli* patogênicas as adesinas afimbriais também são fatores de virulência bastante importantes. Em *E. coli* uropatogênicas (UPEC) a família de adesinas Afa/Dr é considerada um importante fator de virulência (BLANC-PORTARD *et al.*, 2002) sendo AfaE-V a mais prevalente em cepas de *E. coli* desta categoria. Em cepas de EHEC foi caracterizado um conjunto de genes cromossomais que codificam a adesina afimbrial Efa1 (TORRES *et al.*, 2005). Ao contrário, nas cepas de STEC que não possuem a região LEE, uma adesina autoaglutinante denominada Saa foi descrita como envolvida na adesão às células epiteliais (PATON *et al.*, 2001).

1.7 Adesinas bacterianas com capacidade de ligação à matriz extracelular (MEC)

A interação dos patógenos com a matriz extracelular é um fator primário na colonização dos tecidos do hospedeiro. A matriz extracelular compreende todas as moléculas que são secretadas e imobilizadas fora da célula. Ela é dividida em matriz fibrilar, que compreende as fibras colágenas, reticulares e o sistema elástico e matriz fundamental, que é formada por glicoproteínas multiadesivas, glicosaminoglicanos e proteoglicanos. Ela desempenha papel importante na estabilização da estrutura física dos tecidos, na regulação da adesão celular eucariótica, diferenciação, migração, proliferação, forma e função dos tecidos. A composição da matriz extracelular é diferente entre os diversos órgãos, e os principais constituintes do trato gastrointestinal são fibronectina, laminina, colágeno I e colágeno IV.

A ligação da bactéria a um ou mais componentes teciduais da matriz extracelular como colágeno I e IV, laminina, fibronectinas celular e plasmática são indícios de que essas moléculas estão sendo usadas como substrato de adesão e colonização do hospedeiro pela bactéria patogênica (LOWRANCE *et al.*, 1988), através de adesinas com capacidade de se ligarem à matriz extracelular. Essa evidência foi demonstrada na capacidade de ligação ao colágeno IV pelas adesinas fimbriais da família Dr de *E. coli* (KOROTKOVA *et al.*, 2007).

A interação da matriz extracelular dos mamíferos com as células eucarióticas é realizada através de mediadores, os receptores de adesão celular, como as integrinas, caderinas, IgCAMs (Immunoglobulin-related cell adhesion molecules) e selectinas. Assim, bactérias patogênicas que se ligam a proteínas de matriz extracelular indiretamente se conectam a esses receptores auxiliando a interação entre o

microrganismo e a célula eucariótica (LIANG, JI, 2006). Esses receptores, por sua vez, estão conectados aos filamentos de actina, responsáveis pela motilidade celular.

Como exemplo de bactérias patogênicas com capacidade de ligação aos componentes de matriz extracelular, pode-se citar *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycobacterium* spp e *Leptospira interrogans*. Elas secretam proteínas, expressam proteínas de membrana externa ou proteínas associadas à membrana celular com capacidade de ligação a proteínas de matriz extracelular (MEC) e indiretamente se conectam a integrinas auxiliando a interação entre o microrganismo e a célula eucariótica (LIANG, JI, 2006). A ligação da bactéria a proteínas da MEC do hospedeiro possibilita a colonização de múltiplos sítios e pode contribuir para o processo de invasão das células do hospedeiro (PATTI, HOOK, 1994).

Um novo grupo de adesinas não fimbriais com capacidade de formar estrutura trimérica estável na superfície celular bacteriana, através da translocação do domínio passageiro do poro β barril trimérico pelo sistema de secreção tipo V, foi relatada (ROGGENKAMP *et al.*, 2003; SURANA *et al.*, 2004). Esse grupo inclui adesinas com capacidade de ligação a componentes de matriz extracelular, como YadA de *Yersinia enterocolitica*, NhhA de *Neisseria meningitidis*, BadA de *Bartonella henselae* e UpaG de *E. coli* uropatogênica .

Yavlovich e Rottem (2006) demonstraram que a ligação a plasminogênio, colágeno tipo III, ou colágeno tipo V marcadamente aumentou a adesão de *Mycoplasma fermentans* a células HeLa, enquanto que pouco efeito sobre sua adesão foi observado com a preincubação com fibronectina, laminina, ou colágeno IV. Além

disso, nenhum efeito de invasão foi evidenciado com o tratamento da bactéria com componentes de matriz extracelular citados.

Farfan e colaboradores (2008) mostraram que o isolado protótipo de EAEC aderiu mais fortemente a superfícies que haviam sido pré-sensibilizadas com proteínas de matriz extracelular: fibronectina, laminina e colágeno tipo IV. Além disso, a adição de fibronectina a superfícies de células T84 polarizadas aumentou a adesão desta cepa e foi demonstrado que este efeito é dependente da expressão do gene *aafA*, que codifica a fímbria AAF/II. Eles concluíram que a ligação à fibronectina pode contribuir para a colonização do trato gastrointestinal por EAEC.

Algumas bactérias patogênicas são capazes também de se ligar diretamente aos receptores, como as com capacidade de ligação às integrinas e ao se ligarem diretamente a esses receptores as bactérias exploram a ligação ao citoesqueleto de actina celular que esses receptores proporcionam para controlar o dinamismo deste citoesqueleto (HAUCK, 2002).

Considerando-se as várias funções dos componentes de matriz extracelular e dos receptores de adesão aos quais eles estão ligados, torna-se evidente que a adesão da bactéria patogênica a eles não apenas induz a internalização do microorganismo, mas também modula sinais adicionais induzidos por essas moléculas (HAUCK, 2002).

Em EPECa, o papel das adesinas intimina e EspA está elucidado, no entanto, nenhuma proteína com capacidade de adesão à matriz extracelular foi descrita. Essa capacidade foi evidenciada em um isolado de EPEC atípica durante pesquisas em nosso laboratório e neste trabalho caracterizou-se a adesão desse isolado de EPECa do sorotipo O26:H11 a componentes de matriz extracelular.

2 OBJETIVO

Caracterizar a adesão de *Escherichia coli* enteropatogênica atípica do sorotipo O26:H11 a componentes de matriz extracelular

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a ligação das proteínas secretadas do isolado 2103 de EPECa aos componentes de matriz extracelular

- Identificar as proteínas envolvidas na ligação do isolado 2103 de EPECa aos componentes de matriz extracelular

- Avaliar a influência da interação do isolado 2103 de EPECa aos componentes de matriz extracelular no padrão de adesão a células epiteliais

- Avaliar a influência desta interação no número de bactérias aderidas a células epiteliais

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolados bacterianos

Os isolados bacterianos 2103 (isolado com alta capacidade de ligação a componentes de MEC) e 2459 (isolado com baixa capacidade de ligação a componentes de MEC) empregados neste estudo pertencem ao sorotipo O26:H11, sendo definidos anteriormente como EPEC atípicas pela detecção por PCR do gene *eae* e ausência do plasmídeo EAF (BUERIS *et al.*, 2008).

Esses isolados apresentam várias características em comum, como o padrão de adesão localizado-like em células epiteliais HEp-2 após 6 h de interação, presença dos genes de virulência *eae*, *tir*, *efa/lifA* e *iha* e expressam as proteínas intimina, Tir e EspA. Nenhum dos isolados possui os genes *IdaH* e *bfpA* e nenhum expressa BFP. O que os difere é o subtipo de intimina, o isolado 2103 apresenta o subtipo beta1 e o isolado 2459 o subtipo lambdaS. Já, o gene *toxB* foi encontrado somente no isolado 2459 (BUERIS, 2008).

O isolado C3888 (O26:H⁻) foi utilizado como antígeno para obtenção do soro de coelho nos ensaios de adesão á matriz extracelular (BEUTIN *et al.*, 1989) e o isolado de EPECa 4013 (O88:H⁻) foi utilizado na adsorção do soro produzido (ABE *et al.*, 2009).

3.2 Preparo dos antígenos

Esses isolados foram cultivados em 200 mL de caldo tripticaseína de soja (TSB) a 37°C, sob agitação constante (150 rpm) por 18 h e centrifugados a 10.000 g por 15 min, sendo os sobrenadantes liofilizados e mantidos a -20°C até o momento do uso

quando foram ressuspensos em 1 mL de PBS 0,01 M pH 7,2 e quantificados por Bradford.

3.3 Obtenção de soro de coelho anti-sobrenadante do isolado O26

3.3.1 Imunização

Um coelho (Nova Zelândia) de 60-65 dias de idade foi imunizado com o sobrenadante de cultivo da cepa C3888, previamente liofilizado e ressuspenso em 1 mL de água destilada. O sobrenadante do isolado C3888 foi obtido conforme mencionado no item anterior.

A imunização consistiu de uma primeira dose contendo 200 µg do antígeno emulsificado V/V com adjuvante Montanide (SEPPIC-França), por via intramuscular, seguida de um reforço na mesma concentração após 15 dias. A sangria de prova para verificar a titulação do soro foi realizada 15 dias após a injeção de reforço. Essa titulação foi realizada através de ensaio de ELISA, utilizando o sobrenadante de C3888 como antígeno (ENGVALL, PERLMANN, 1971). Após verificação do título, o coelho foi submetido à sangria total, e o soro obtido por centrifugação foi estocado a -20°C até sua utilização.

3.3.2 Adsorção do soro

O soro obtido foi adsorvido com isolado bacteriano 4013 (O88:H⁻), crescido nas mesmas condições descritas no item 1. Este isolado não apresentou capacidade de adesão a MEC. O sedimento bacteriano obtido foi ressuspenso em PBS 0,01 M pH 7,2

contendo 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), centrifugado novamente a 10.000 g por 15 min e mantido a -20°C até o momento do uso.

Para adsorção, cerca de 1,5 mL de soro foi homogeneizado com o sedimento, armazenado nos tubos tipo *eppendorf* e mantido sob agitação por 2 h à temperatura ambiente, seguido de uma incubação de 16-18 h a 4°C . Após incubação, a mistura de soro e bactéria foi centrifugada a 5.000 g por 10 min e o precipitado descartado, sendo esse procedimento repetido duas vezes. Após a última adsorção, os soros foram filtrados em membrana de 0,22 μm e mantidos a -20°C até o momento do uso.

3.4 Reatividade do soro de coelho anti-sobrenadante do isolado O26

3.4.1 ELISA com sobrenadantes bacterianos

Para os ensaios de ELISA, placas de fundo chato com superfície altamente aderente (MaxiSorp – NUNC) foram sensibilizadas com 20 μg de proteína do sobrenadante de cultivo dos isolados bacterianos diluídos em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6, incubadas a 4°C em câmara úmida por 16-18 h e bloqueadas com BSA 1% em PBS 0.01 M pH 7,2 por 2 horas a 37°C . Após bloqueio a placa foi incubada com diluições sucessivas do soro anti-O26 (1:100 a 1:6.400) em solução de bloqueio por 1 h a temperatura ambiente. Após três lavagens com solução de PBS Tween 0,05% (PBS-T), a placa foi incubada com soro de cabra anti-IgG de coelho (1:5.000) pelo mesmo tempo e temperatura. As reações foram reveladas com 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de σ -fenilenodiamino (OPD) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Após 20 min, a reação foi interrompida pela adição de 50 μl de H_2SO_4 8 N e a leitura realizada a 492 nm em espectrofotômetro (*ELISA reader Multiskan*, Labsystems).

3.4.2 ELISA de ligação a componentes de matriz extracelular

Placas de fundo chato (Maxi Sorp - NUNC) foram sensibilizadas com 1 μ g dos componentes de matriz extracelular (laminina, colágeno Tipo I, colágeno Tipo IV, fibronectina celular, fibronectina plasmática) ou 1 μ g de matrigel ou 1 μ g de BSA - *Bovine Serum Albumin* - (controle negativo), diluídos em 100 μ l de PBS. Todos os componentes foram adquiridos comercialmente (Sigma). As placas foram mantidas a 37°C por 2 h e posteriormente lavadas três vezes com PBS-T 0,05%. O bloqueio foi feito com 200 μ l de BSA 1% por 1 h a 37°C, seguido de incubação a 4°C por 16 h.

Vinte microgramas de proteína (sobrenadante concentrado) dos isolados 2103 e 2459 foram diluídos em PBS e adicionados a cada poço. Após um período de incubação de 1h30min a 37°C, os poços foram lavados seis vezes com PBS-T 0,05%. As proteínas aderidas foram detectadas pela adição de anti-soro produzido em coelho nas diluições de 1/5.000 e 1/10.000 seguida de uma incubação por 1 h com soro de cabra anti-coelho conjugado à peroxidase. Após três lavagens com PBS-T 0,05%, foi adicionado OPD (0,04%) diluído em tampão citrato-fosfato (pH 5,0) e 0,01% de H₂O₂. Após 20 min, a reação foi interrompida pela adição de 50 μ l de H₂SO₄ 8 N. A absorbância a 492 nm foi determinada em leitor de microplacas. O esquema deste ensaio está mostrado na **figura 1**.

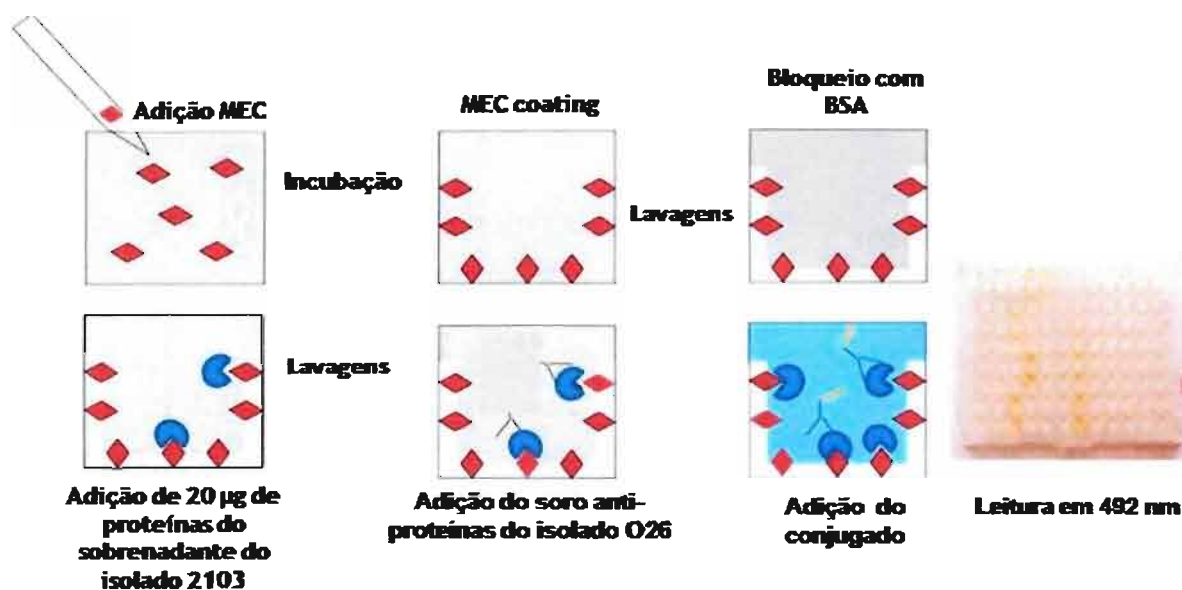


Figura 1. Esquema de ensaio de ligação do sobrenadante dos isolados de EPECa aos componentes de matriz extracelular.

3.5 Ensaios de caracterização da adesão aos componentes de MEC

3.5.1 Ligação das bactérias aos componentes de MEC

Placas de fundo chato (Maxi Sorp - NUNC) foram sensibilizadas com 1 µg dos componentes de matriz e BSA, como descrito em 3.2. Após três lavagens com PBS estéril, os poços foram incubados a 37°C por 4 h. com 1 ml do meio Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/4.5 g/l de glucose, contendo 1×10^8 bacterias, na escala de McFarland, dos isolados 2103 e 2459 de aEPEC. Em seguida, os poços foram lavados com PBS estéril, e as células bacterianas aderidas aos componentes de matriz foram recuperadas com Triton X-100 0.1% (vol/vol) em PBS e plaqueadas em placas de LB ágar em diluições seriadas. O número das bactérias aderidas foi determinado pela contagem das colônias em triplicata. A figura 2 representa esse ensaio.

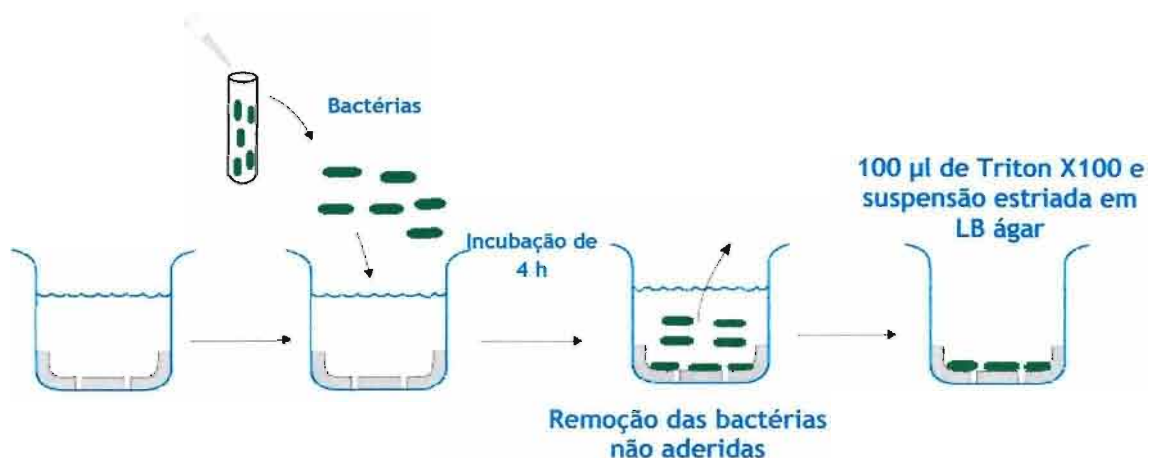


Figura 2. Esquema de ensaio de ligação das bactérias aos componentes de extracelular.

3.5.2 Ensaio com células HEp-2

3.5.2.1 Linhagem celular

As células HEp-2 utilizadas neste trabalho são originárias de carcinoma de laringe humana e foram adquiridas no Instituto Adolfo Lutz - São Paulo. As células foram mantidas em frascos de cultura de 75 mm² em meio DMEM 10% SFB e quando atingiram aproximadamente 70% de confluência, o meio foi retirado e as células lavadas com PBS. Após a lavagem, 2 mL de tripsina foram adicionados e após a observação do descolamento das células, 4 mL do meio utilizado no crescimento foram adicionados. Após homogeneização, o excesso de célula foi retirado e 10 mL do meio de cultivo foram acrescidos novamente ao frasco.

3.5.2.2 Ensaio de adesão

Este ensaio foi realizado de acordo com Yavlovich e Rottem (2006), com algumas adaptações e está esquematizado na **figura 2**. 40 µl de crescimento bacteriano do isolado 2103 de EPEC atípica em caldo tripticaseína de soja (TSB) na escala de $1,5 \times 10^8$ de McFarland foram incubados com 25 µg/ml de cada um dos componentes de MEC: laminina, colágeno Tipo I, colágeno Tipo IV, fibronectina celular, fibronectina plasmática, com matrigel e albumina sérica bovina, por 1 h a 37°C. Após esse período, foram feitas três lavagens que consistiam na centrifugação a 5.000 g por 5 min e ressuspensão do sedimento com DMEM. Esse procedimento também foi realizado com o crescimento bacteriano sem tratamento com MEC como controle do experimento. Na última centrifugação o sedimento foi ressuspensionado em 1 ml de DMEM com 2 % de SFB e manose 2% e acrescentado aos poços de placas de 24 poços com lamínulas (para o ensaio de adesão) ou sem lamínulas (para o ensaio de contagem de unidade formadora de colônias), previamente revestidos com células HEp-2 até atingirem camada semiconfluente de células. Procedeu-se ensaio de adesão de 6 h como descrito por Cravioto *et al.* (1979) e ao ensaio de quantificação da adesão.

Os ensaios foram realizados em duplicata. No ensaio de adesão, depois de adicionadas as misturas às placas de células HEp-2, procedeu-se a uma incubação a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂ por 6 h. Após 6 lavagens com PBS 1 X estéril, e fixação com metanol durante 30 min, as células foram coradas com May Grunwald por 5 min e Giemsa por 20 min, ambos os corantes filtrados em papel de filtro. A placa foi lavada em água corrente, as lamínulas foram secas à temperatura ambiente, montadas e coladas sobre lâminas de vidro para serem observadas ao microscópio óptico comum,

utilizando-se objetiva de 100X. A quantificação das bactérias aderidas as células epiteliais foi realizada como descrito no item 3.5.1.

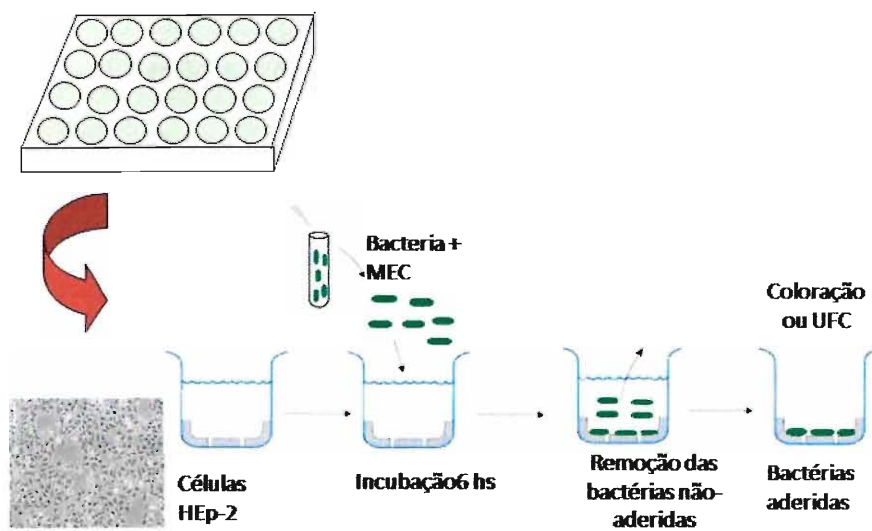


Figura 3. Esquema do ensaio dos efeitos do tratamento da bactéria com componentes de matriz extracelular (matrigel, laminina, fibronectina celular, fibronectina plasmática, colágeno I e colágeno IV) na sua capacidade de adesão a células HEp-2.

3.6 Ensaios de identificação da(s) proteína(s)

3.6.1 SDS PAGE e *Blotting* das proteínas aderidas a MEC

Os passos para a realização deste ensaio estão esquematizados na **figura 4**, e foram realizados conforme descrito por Hoke *et al*, 2008. 20 µg de proteínas do sobrenadante dos isolados 2103 e 2459 diluídas em PBS 0,01 M pH 7,2 foram incubadas por 1 h e 30 min a 37 °C com componentes de matriz extracelular adquiridos comercialmente (Sigma, EUA) em placas de poliestireno, previamente sensibilizadas com 1 µg de laminina, colágeno Tipo I, colágeno Tipo IV, fibronectina celular, fibronectina plasmática, e albumina sérica bovina (BSA- como controle negativo) diluídos em 100 µl de PBS 0,01 M pH 7,2. Após 6 lavagens com PBS-Tween 0,05 %, as proteínas aderidas foram retiradas com tampão de dissociação (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, 2% dodecil sulfato de sódio – SDS, 10% glicerol e 0,1% azul de bromofenol) e aquecidas à temperatura de 100 °C por 5 min e então submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12% SDS (SDS/PAGE) em condições desnaturantes (LAEMMLI, 1970; STUDIER, 1973).

As proteínas separadas por SDS/PAGE foram transferidas para a membrana de nitrocelulose (Hybond-ECL– Amersham) (TOWBIN *et al.*, 1979) e bloqueadas com leite desnatado (Nestlé) a 10 % em PBS 0,01 M pH 7,2 por 16-18 h. Após bloqueio, as membranas foram incubadas por 1 h com soro de coelho anti-sobrenadante de isolado O26 diluído 1:1.000, seguido da incubação com soro de cabra anti-coelho conjugado à peroxidase 1:10.000 (Zymed). A ligação dos anticorpos foi detectada utilizando-se substrato para quimioluminescência (Pierce). Como padrão de massa molecular foi utilizado o *Low marker weight* (97 a 14,4 kDa – Amersham Biosciences).

O ensaio foi repetido com a incubação das proteínas dos isolados 2103 e 2459 com matrigel (um composto de componentes de matriz extracelular, constituído principalmente de laminina e colágeno IV), sendo um gel transferido para a membrana de nitrocelulose e submetido ao ensaio de *immunoblotting* como descrito acima.

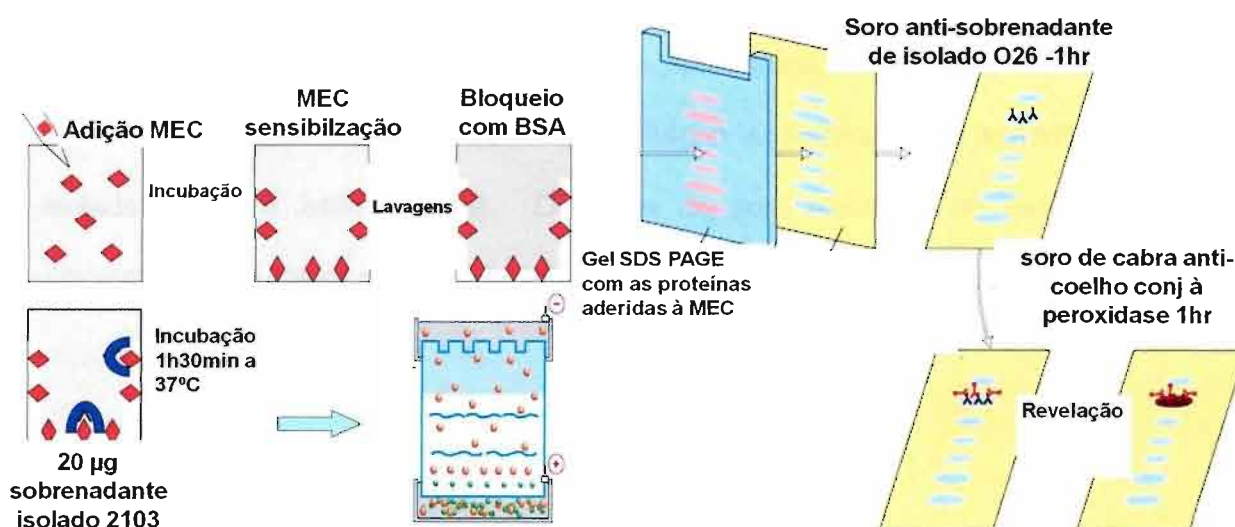


Figura 4. Esquema do ensaio de identificação das proteínas envolvidas na adesão do isolado de EPECa a componentes de matriz extracelular.

4 RESULTADOS

4.1 Reatividade do soro de coelho anti-sobrenadante do isolado O26

Inicialmente, avaliou-se por ensaio de ELISA a reatividade do soro anti-sobrenadante do isolado O26 frente aos sobrenadantes concentrados dos isolados C3888, 2103 e 2459, utilizando-se o soro pré-imune como controle negativo. O soro reconheceu proteínas do sobrenadante de todos os isolados (**fig. 5**).

Na titulação do soro observa-se uma maior reatividade com o antígeno com o qual o animal foi imunizado (cepa C3888), que apresentou leitura de 1,801, na diluição 1/500 do soro, enquanto que nessa mesma diluição a reatividade foi semelhante entre os isolados 2103 e 2459 (**fig. 5**). Diluições do soro menores do que 1/400 não resultaram em uma maior reatividade frente ao sobrenadante dos isolados.

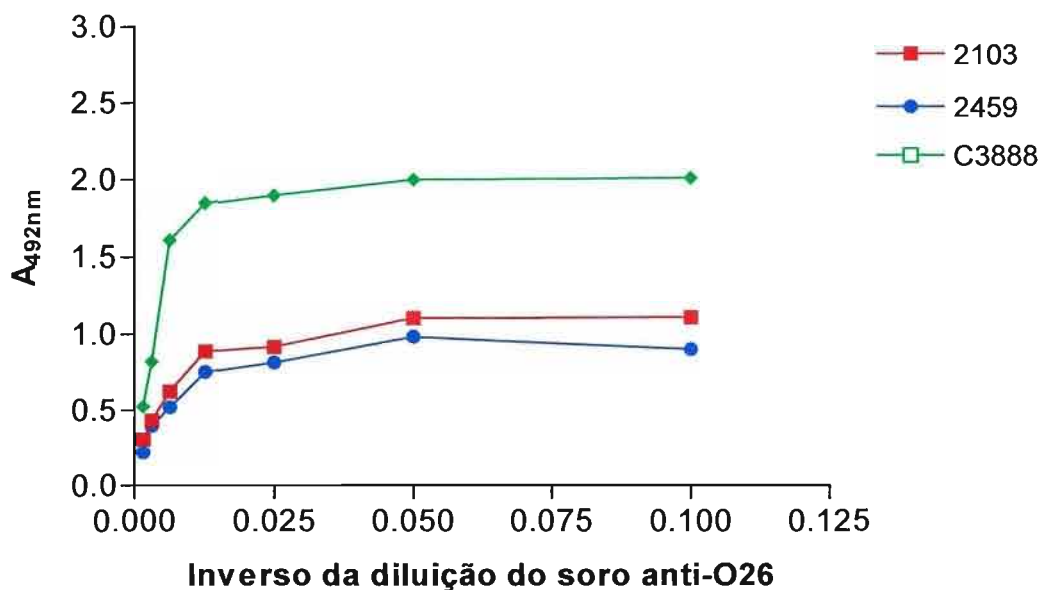


Figura 5. Reatividade do soro anti-sobrenadante de isolado O26 contra extrato protéico do sobrenadante dos isolados C3888, 2103 e 2459 de EPEC atípica. Placa de ELISA sensibilizada com 20 µg de proteínas do sobrenadante dos isolados 2103, 2459 e C3888. O soro de coelho foi adicionado nas diluições 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1.600, 1:3.200 e 1:6.400, seguido de uma incubação com soro de cabra anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase (1:5.000). Após revelação com OPD e interrupção pela adição de 50 µl de H₂SO₄ 8 N, as proteínas aderidas foram detectadas em espectrofotômetro na absorbância de 492 nm em leitor de ELISA. O soro reconheceu proteínas do sobrenadante dos isolados 2103 e 2459 de maneira semelhante e apresentou uma maior reatividade contra o antígeno com o qual o animal foi imunizado (cepa C3888).

Em um segundo momento, definiu-se a diluição do soro a ser utilizada nos ensaios de adesão a componentes de matriz extracelular. Por ELISA, no ensaio de adesão a matrigel com o sobrenadante do isolado 2103 observou-se que na diluição 1:10.000 houve menor reatividade do sobrenadante com BSA que é utilizado como controle negativo da adesão à MEC (fig. 6).

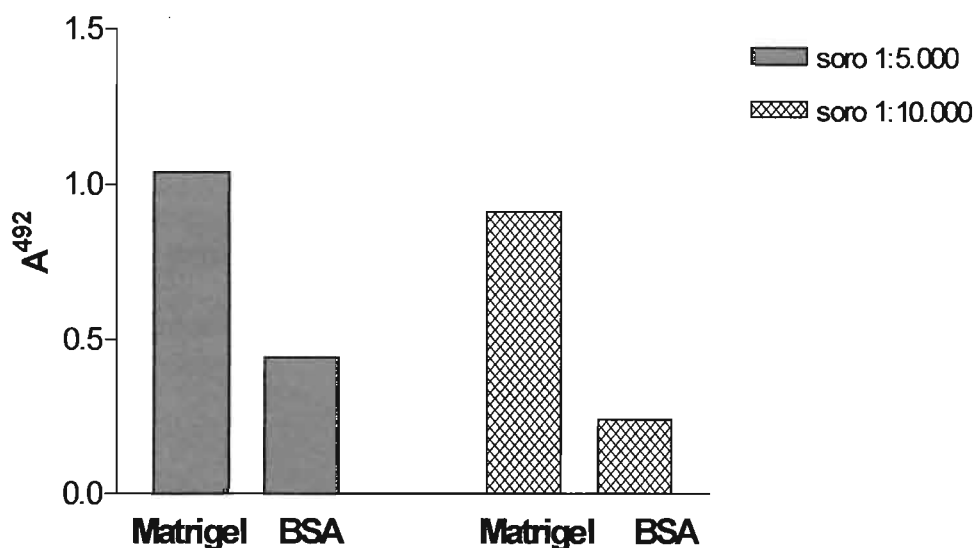


Figura 6. Adesão de proteínas do sobrenadante do isolado de EPEC atípica 2103 a matrigel e BSA. Placas de poliestireno, revestidas com 20 µg de matrigel e albumina sérica bovina (BSA) foram incubadas com 100 µl do sobrenadante do isolado 2103 na concentração de 20 µg. Foi adicionado o soro de coelho (1:5.000) seguido de uma incubação com soro de cabra anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase (1:5.000). Após revelação com OPD e interrupção pela adição de 50 µl de H₂SO₄ 8 N, as proteínas aderidas foram detectadas em espectrofotômetro na absorvância de 492 nm em leitor de ELISA. O isolado 2103 apresenta alta ligação à matrigel e a diluição 1:10.000 foi definida para ser utilizada nos ensaios de adesão a componentes de matriz extracelular pois essa diluição apresentou menor reatividade inespecífica do sobrenadante com BSA.

4.2 Adesão aos componentes de MEC

4.2.1 ELISA da adesão dos isolados 2103 e 2459 aos componentes de MEC

Após a definição do título do soro investigou-se a capacidade dos isolados 2103 e 2459 de aderir aos diferentes componentes de MEC por ELISA. Na **figura 7** observa-se claramente a alta capacidade de adesão do isolado 2103 em relação ao isolado 2459 em ligar-se aos diferentes componentes de matriz extracelular

O isolado 2103 aparentemente se liga aos diversos componentes de matriz extracelular com diferentes intensidades. Em ordem decrescente, observa-se maior interação com matrigel, seguida de laminina, colágeno IV, fibronectina celular, fibronectina plasmática e colágeno I.

A ligação do isolado 2459 a todos os componentes foi moderada, se comparada àquela observada para o isolado 2103. Além disso, observou-se uma maior inespecificidade de interação deste isolado com BSA.

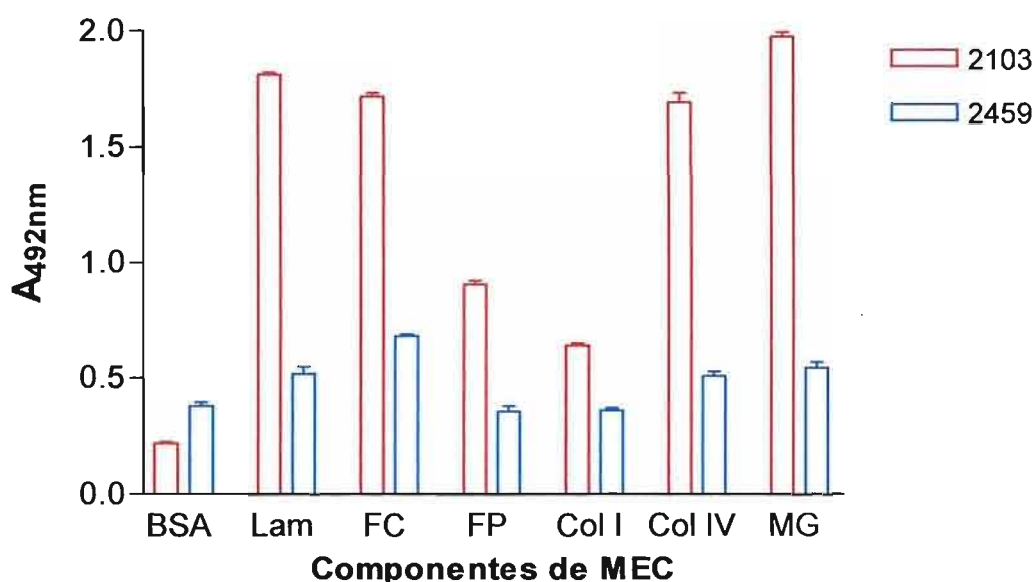


Figura 7. Ligação de proteínas dos sobrenadantes de isolados de EPEC atípica 2103 e 2459 aos componentes de matriz extracelular (laminina; colágeno I; colágeno IV; fibronectina celular; fibronectina plasmática e matrigel) e BSA. Placas de poliestireno, revestidas com 1 μ g dos componentes de MEC, matrigel e soro albumina bovina (BSA) foram incubadas com 100 μ l do sobrenadante dos isolados 2103 e 2459 na concentração de 20 μ g. Foi adicionado o soro de coelho (1:10.000) seguido de uma incubação com soro de cabra anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase (1:5.000). Após revelação com OPD e interrupção pela adição de 50 μ l de H₂SO₄ 8 N, as proteínas aderidas foram detectadas em espectrofotômetro na absorbância de 492 nm em leitor de ELISA. O isolado 2103 se liga aos diferentes componentes de matriz extracelular, em ordem decrescente a interação é matrigel, laminina, colágeno IV, fibronectina celular, fibronectina plasmática e colágeno I. O isolado 2459 não apresenta essa capacidade se comparada àquela observada para o isolado 2103. Além disso, observou-se uma maior inespecificidade de interação deste isolado com BSA.

4.2.2 Quantificação da adesão aos componentes de MEC

Neste ensaio foram determinadas as unidades formadoras de colônias dos isolados 2103 e 2459 após sua adesão aos diferentes componentes de matriz extracelular. Os resultados obtidos no experimento anterior foram confirmados, como a maior capacidade do isolado 2103 de EPECa em aderir fortemente aos componentes de matriz extracelular enquanto que o isolado 2459 pertencente ao mesmo sorotipo não apresenta essa capacidade, ou ela é bastante diminuída (**fig. 8**).

Além disso, confirmou-se a ordem decrescente de capacidade de adesão do isolado 2103 aos componentes de matriz extracelular do isolado 2103: laminina, colágeno IV, fibronectina celular, fibronectina plasmática, colágeno I, e a maior capacidade de adesão aos componentes laminina, colágeno IV e fibronectina celular e em matrigel.

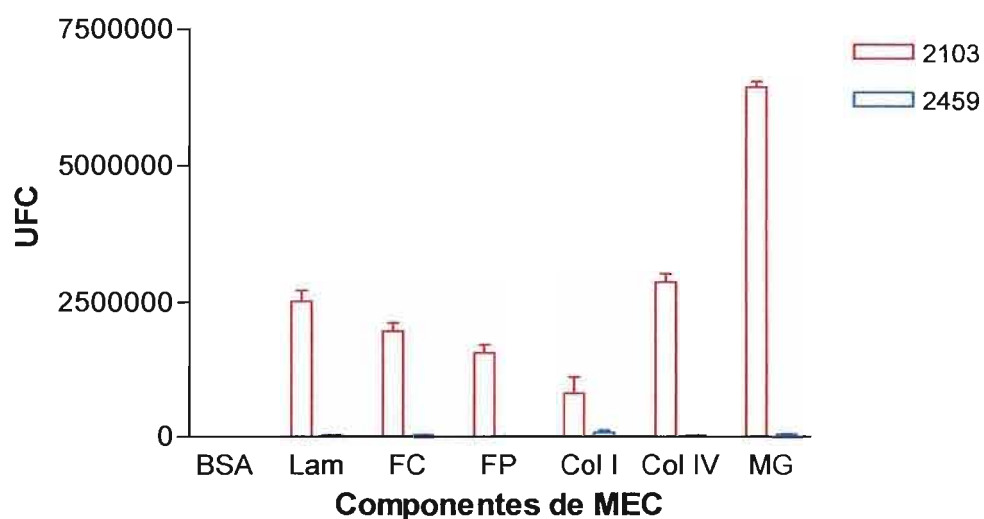


Figura 8. Unidades formadoras de colônias dos isolados bacterianos de EPECa 2103 e 2459 aderidos à BSA e aos componentes de matriz extracelular: laminina; fibronectina celular; fibronectina plasmática; colágeno I; colágeno IV e matrigel. 1×10^8 células bacterianas dos isolados 2103 e 2459 de EPECa foram incubadas a 37°C por 4 h. Em seguida, os poços foram lavados com PBS estéril, e as células bacterianas aderidas aos componentes de matriz foram recuperadas com Triton X-100 0.1% (vol/vol) em PBS e plaqueadas em placas de LB ágar em diluições seriadas. O número das bactérias aderidas foi determinado pela contagem das colônias em triplicata. O isolado 2103 de EPECa apresenta alta capacidade em aderir aos componentes de matriz extracelular enquanto que o isolado 2459 pertencente ao mesmo sorotipo não apresenta essa capacidade, ou ela é bastante diminuída.

4.3 Adesão em células HEp-2

4.3.1 Padrão de adesão

O isolado 2103 de EPEC atípica apresenta padrão de adesão definido como localizado *like* após 6 horas de interação com as células epiteliais (**fig. 9A, 9B**). A pré-incubação deste isolado com componentes de matriz extracelular mostrou uma variação no seu padrão de adesão, como mostra a **figura 9**. A pré-incubação do isolado com

fibronectina celular (**fig. 9E**) ou com laminina (**fig. 9F**) ou com colágeno I (**fig. 9G**) ou com colágeno IV (**fig. 9H**) claramente modificou o padrão de adesão após 6 horas de incubação com a célula epitelial, com a dispersão das bactérias sobre a célula epitelial, que passou a apresentar o padrão semelhante ao definido como padrão difuso. Além disso, percebe-se um maior número de bactérias aderidas em comparação com o controle, o que sugere que na presença desses componentes, o isolado de EPEC aderiu a novos sítios da superfície de células HEp-2.

A pré-incubação do isolado bacteriano com fibronectina plasmática (**fig 9D**) também provocou modificação do padrão para padrão difuso, porém um menor número de bactérias aderidas às células epiteliais foi verificado.

Com relação à pré-incubação com o substrato matrigel (**fig 9I**), foi verificado um maior número de bactérias aderidas às células epiteliais em relação ao controle e também um fenômeno interessante. O padrão verificado após interação com matrigel foi semelhante a do tipo padrão localizado, que é característico das EPEC típicas. A pré-incubação com BSA não influenciou o padrão do isolado.

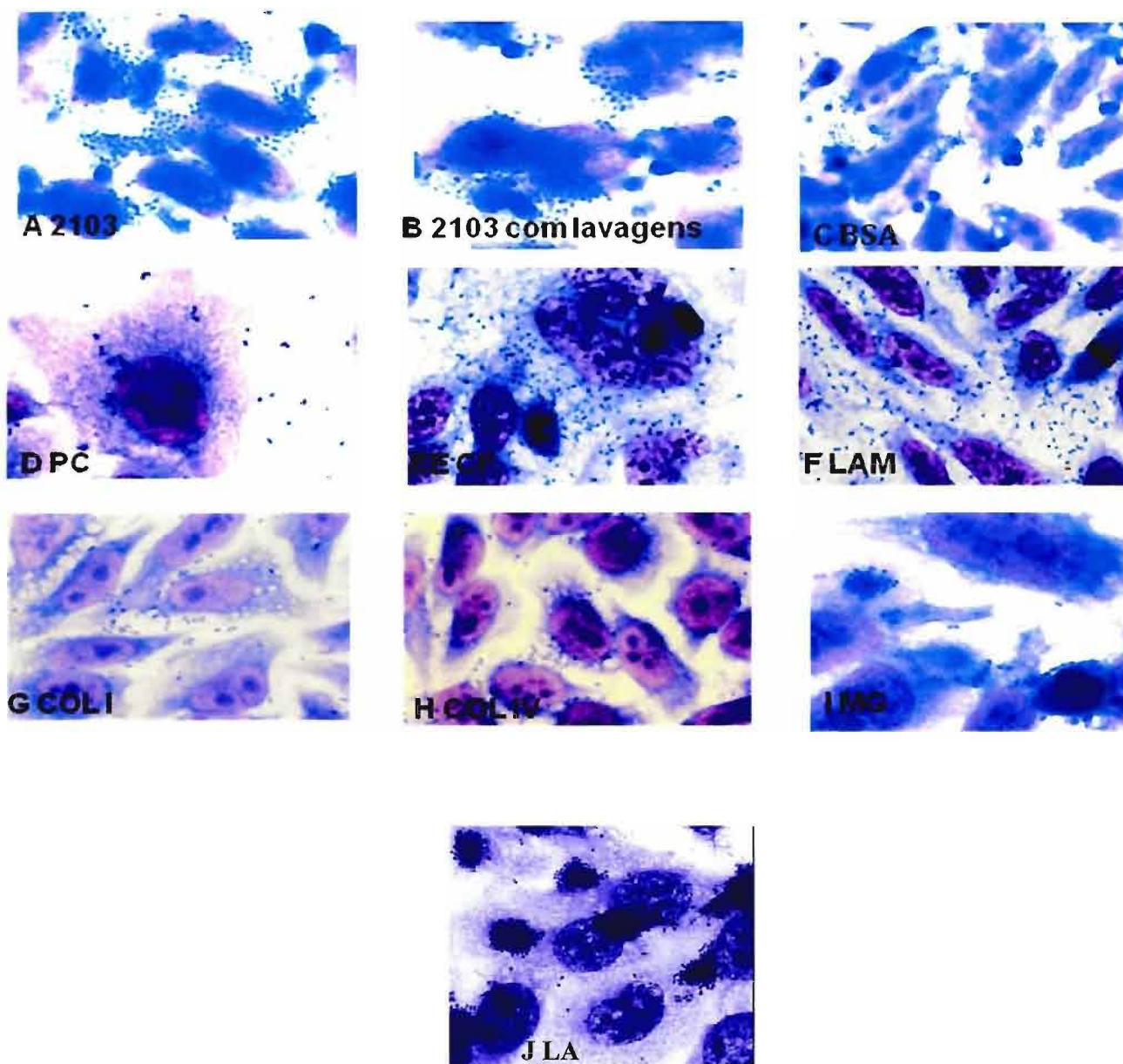


Figura 9. Efeito na adesão de 6 horas do isolado 2103 de EPEC atípica tratada com MEC. A. 2103 sem tratamento, B. 2103 controle sem tratamento, C. 2103 tratada com BSA, D. 2103 tratada com fibronectina plasmática, E. 2103 tratada com fibronectina celular, F. 2103 tratada com laminina, G. 2103 tratada com colágeno I, H. 2103 tratada com colágeno IV, I. 2103 tratada com matrigel. 40 μ l do cultivo bacteriano do isolado 2103 foram incubados com 25 μ g/ml dos componentes por 1 hora a 37°C e então submetidos à ensaio de adesão a células epiteliais. A pré-incubação do isolado bacteriano com fibronectina celular ou com laminina ou com col I ou com col IV claramente modificou o padrão de adesão após 6 horas de incubação com a célula epitelial, que passou a apresentar um padrão de adesão difuso. A pré-incubação com fibronectina plasmática provocou uma diminuição do número de bactéria aderidas e modificação do padrão de adesão, para adesão difusa, enquanto que a interação com matrigel modificou o padrão para o tipo localizado.

4.3.2 Bactérias aderidas a células HEp-2

Como a pré-incubação do isolado 2103 de EPECa com componentes de MEC influenciou o seu padrão de adesão a células HEp-2, foi realizado ensaio para verificar se esse procedimento também influenciaria no número de bactérias aderidas.

A **figura 10** mostra que a preincubação do isolado 2103 a componentes de MEC influencia no número de bactérias aderidas a células HEp-2. Os componentes laminina, colágeno I, colágeno IV, fibronectina celular e matrigel provocaram um aumento no número de bactérias aderidas enquanto que o componente fibronectina plasmática provocou efeito contrário, de diminuição do número de bactérias aderidas a células epiteliais.

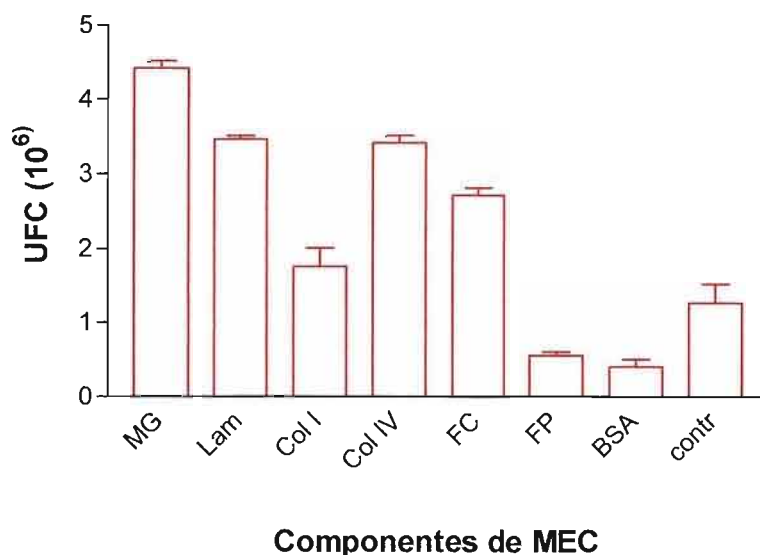


Figura 10. Número de bactérias aderidas a células HEp-2 do isolado 2103 de EPEC atípica tratada com componentes de MEC. 40 μ l do cultivo bacteriano do isolado 2103 foram incubados com 25 μ g/ml dos componentes por 1 hora a 37°C e então submetidos à ensaio de quantificação de adesão a células epiteliais. A preincubação do isolado 2103 com laminina, colágeno I, colágeno IV, fibronectina celular e matrigel provocou um aumento no número de bactérias aderidas às células epiteliais enquanto que a fibronectina plasmática provocou efeito contrário, de diminuição do número de bactérias aderidas a células epiteliais.

4.4 Ensaio de identificação da(s) proteína(s)

Proteínas do isolado 2103 que haviam aderido aos componentes de matriz extracelular foram removidas dos poços de placas de ELISA e submetidas à SDS/PAGE. Cinco proteínas majoritárias de massas moleculares aparentes de 124, 107, 44, 35 e 29 kDa puderam ser identificadas (**fig. 11A**). Essas cinco proteínas, de mesma massa molecular aparente, foram também reveladas pelo soro anti-sobrenadante de isolado O26 em ensaio de *immunoblotting* no isolado 2103, sendo três delas exclusivas deste isolado (**fig. 11B**). Elas apresentam massas moleculares aparentes de 107, 44 e 35 kDa.

Como as mesmas proteínas foram reveladas com a preincubação do isolado aos diferentes componentes de matriz extracelular, conclui-se que as proteínas responsáveis pela adesão do isolado 2103 aos componentes de matriz extracelular são as mesmas para os diferentes componentes e são específicas para este isolado já que não são reconhecidas pelo soro anti-sobrenadante de isolado O26 no isolado 2459, que não tem a capacidade de ligação aos componentes de MEC (**fig. 11C**). As três proteínas numeradas na **figura 11C** correspondem àquelas tripsinizadas do gel para identificação por MALDI TOF.

Infelizmente, as análises realizadas não mostraram resultados satisfatórios. Somente a proteína de 44 kDa apresentou identidade com proteína já descrita. No entanto, essa identidade foi de apenas 14% com uma proteína de O157:H7 envolvida no sistema de fusão de membranas. Essa função não está relacionada com propriedades adesivas.

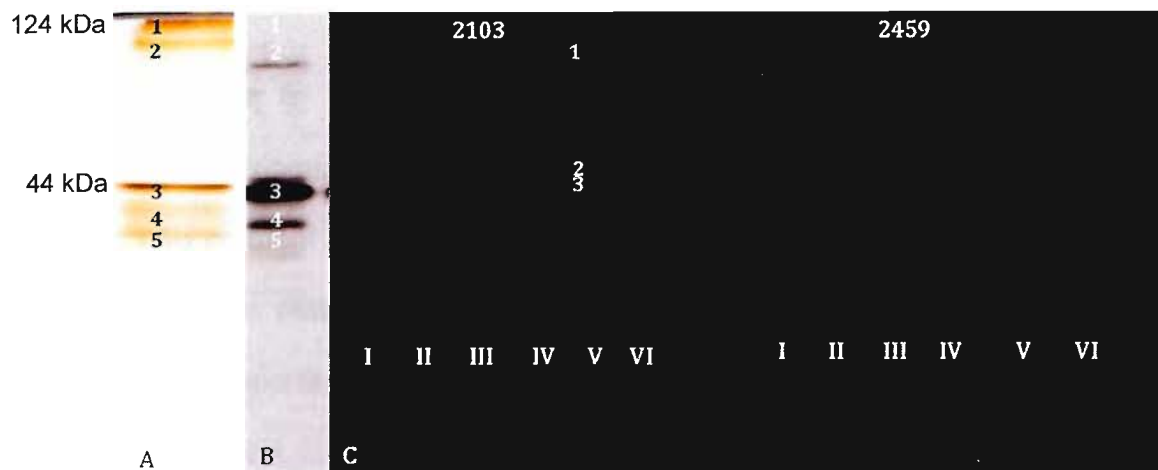


Figura 11. A. Frações protéicas do extrato bacteriano do sobrenadante do isolado 2103 previamente incubado com matrigel separadas eletroforéticamente (SDS/PAGE 12%) e coradas com nitrato de prata. **B.** Membrana de nitrocelulose contendo frações protéicas do extrato bacteriano do sobrenadante do isolado 2103 previamente incubado com matrigel separadas eletroforéticamente (SDS/PAGE 12%) foi incubada com anticorpo anti-C3888 (1:1.000) e soro de cabra anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase diluído 1:10000. A ligação dos anticorpos foi detectada utilizando-se substrato para quimioluminescência. **C.** Membrana de nitrocelulose contendo frações protéicas dos extratos bacterianos dos sobrenadantes dos isolados 2103 e 2459 previamente incubados com I-laminina, II- fibronectina celular, III- fibronectina plasmática, IV- colágeno I, V-colágeno IV, VI- BSA. A membrana foi incubada com anticorpo anti-C3888 (1:1.000) e soro de cabra anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase diluído 1:10000. A ligação dos anticorpos foi detectada utilizando-se substrato para quimioluminescência. Após adesão aos diferentes componentes de MEC, cinco proteínas do sobrenadante do isolado 2103, de massas moleculares de 124, 107, 44, 35 e 29 kDa foram coradas e reveladas pelo soro anti-sobrenadante de isolado O26 em ensaio de *immunoblotting*, sendo três delas exclusivas deste isolado em relação ao isolado 2459 e correspondem às proteínas de massa molecular aparente de 107, 44 e 35 kDa.

5 DISCUSSÃO

Dentre as *E. coli* diarreio gênicas, as EPEC atípicas tornaram-se o agente bacteriano mais comum em nosso meio. Diferentemente das EPEC típicas, as EPEC atípicas não seguem um padrão único de virulência, sugerindo que vários fatores de virulência devem estar envolvidos neste processo. Assim, pesquisar e caracterizar adesinas são importantes contribuições no conhecimento do processo de adesão das *E. coli* patogênicas.

Dentre essas investigações, os resultados inéditos obtidos no projeto de mestrado conduzido por Caroline Magalhães (MAGALHÃES-CASTILHONE, 2007), demonstraram a associação entre a capacidade dos isolados de EPECa expressarem enterohemolisina e a ligação a componentes de matriz extracelular. Além dessa associação, chamou-nos a atenção a altíssima capacidade de ligação do isolado 2103 (O26:H11) a esses componentes, sugerindo que este isolado apresenta proteína(s) com características de adesina(s). Por outro lado, o isolado 2459 também pertencente ao sorotipo O26:H11 não aderiu a estes mesmos componentes. Convém salientar que os dois isolados apresentam alguns genes de virulência em comum.

Em EPEC atípica, intimina e EspA são as adesinas mais bem conhecidas e com papéis definidos na sua patogênese. No entanto, nenhuma dessas duas proteínas mostrou capacidade de adesão à matriz extracelular, ou mesmo qualquer outra proteína com essa característica foi descrita nesse patótipo. O conjunto desses dados conduziu-nos ao objetivo deste trabalho, visando a caracterização da adesão desse isolado de EPEC atípica (2103) a componentes de matriz extracelular.

Para tanto, a purificação da(s) proteína(s) envolvida(s) nesse processo permitiria a sua(s) identificação(ões) e correlação(ões) a proteínas já descritas, além de

possibilitar o emprego dela(s) na imunização de ratos para obtenção de anticorpos policlonais e utilização desses anticorpos em ensaios de caracterização.

Nesse sentido, várias tentativas de purificação da(s) proteína(s) foram realizadas, como purificação por gel filtração, purificação por HPLC, por troca iônica e por afinidade ao colágeno. As frações de todas as purificações foram submetidas ao ensaio de adesão aos componentes de matriz extracelular, e em todos os experimentos não foi possível localizar a fração com a(s) proteína(s) envolvida(s) na adesão, pois não houve predominância na adesão de uma fração a todos os componentes. Os ensaios de purificação provavelmente levavam a uma modificação da sua atividade biológica e com isso, decidiu-se adotar uma nova abordagem.

O soro anti-sobrenadante do isolado O26 utilizado no trabalho de mestrado de Caroline Arantes Magalhães-Castilhone (MAGALHÃES-CASTILHONE, 2007) permitiu a detecção da capacidade de adesão do isolado 2103 de EPECa por ensaios de ELISA de ligação aos componentes de matriz extracelular. Para a realização de experimentos para a purificação e caracterização das proteínas do isolado 2103 responsáveis pela sua capacidade de adesão a MEC, seria necessária a utilização daquele soro. Como não dispúnhamos de grande quantidade, decidiu-se obter mais soro, imunizando-se coelho.

A avaliação da reatividade do soro frente aos sobrenadantes dos isolados C3888, 2103 e 2459 mostrou que o soro reconheceu proteínas do sobrenadante de todos os isolados, sendo maior a reatividade com o antígeno com o qual o animal foi imunizado (cepa C3888) e uma reatividade menor, porém semelhante entre os isolados 2103 (isolado estudado) e 2459 (isolado negativo) foi observada.

No ensaio de adesão aos componentes de matriz extracelular, somente o isolado 2103 aderiu de forma significativa aos componentes testados. Como o soro utilizado reconheceu proteínas dos dois isolados no ensaio de ELISA e somente o isolado 2103 mostrou a capacidade de adesão, no qual foi utilizado o mesmo soro, pode-se afirmar que a adesão do isolado 2103 aos componentes de matriz extracelular é uma característica fenotípica específica deste isolado. Além disso, podemos inferir que essa capacidade não está relacionada ao antígeno O, pois o isolado 2459 pertence ao sorogrupo do isolado 2103 (O26), sendo que só este apresenta capacidade de ligação à matriz extracelular.

Através desse ensaio, verificou-se que o isolado 2103 apresenta alta capacidade de ligação aos componentes laminina, colágeno IV e fibronectina celular, enquanto que a habilidade é menos significativa em relação à capacidade de adesão à fibronectina plasmática e colágeno I. Além disso, o isolado 2103 apresentou menor adesão inespecífica com BSA do que o isolado 2459.

O soro anti-sobrenadante de isolado O26 permitiu o delineamento de um ensaio para identificação das proteínas envolvidas na adesão do isolado 2103 de EPECa a componentes de matriz extracelular. As proteínas do sobrenadante dos isolados 2103 e 2459 aderidas aos componentes de matriz extracelular (laminina ou fibronectina celular ou fibronectina plasmática ou colágeno I ou colágeno IV). foram separadas em gel de poliacrilamida e transferidas eletroforicamente para membrana de nitrocelulose com a qual se realizou ensaio de *immunoblotting*.

Cinco proteínas majoritárias de massas moleculares aparentes de 124, 107, 44, 35 e 29 kDa foram separadas. No ensaio de *immunoblotting* com essas proteínas,

utilizando-se o soro anti-sobrenadante de isolado O26, proteínas de mesma massa molecular aparente foram também reveladas. Como o soro foi o utilizado no ensaio de adesão aos componentes de matriz extracelular, provavelmente as proteínas responsáveis pela adesão do isolado 2103 aos componentes de matriz extracelular são as reveladas pelo soro e são as que foram exclusivamente reveladas para o isolado 2103, que é o isolado com capacidade de adesão aos componentes de matriz extracelular. Além disso, as proteínas responsáveis pela adesão do isolado 2103 aos componentes de matriz extracelular são as mesmas para os diferentes componentes, pois o soro reconheceu proteínas de mesma massa molecular aparente para a incubação do isolado com todos os componentes.

A proteína de 44 kDa apresentou identidade com uma proteína de O157:H7 envolvida no sistema de fusão de membranas, no entanto, com baixa cobertura. Sendo sua função não relacionada à propriedades adesivas. Outra possibilidade é que as proteínas que estamos identificando não tenham sido ainda descritas.

Para aprofundar a caracterização da adesão do isolado 2103 de EPECa aos componentes de matriz extracelular, outros ensaios foram realizados. No ensaio de bactérias aderidas aos componentes de MEC, confirmaram-se os dados obtidos no ensaio de ELISA de adesão aos componentes de matriz extracelular. O isolado 2103 de EPECa apresentou maior número de unidades formadoras de colônia aderidas aos componentes de matriz extracelular em relação ao isolado 2459, pertencente ao mesmo sorotipo e sua ordem decrescente de adesão é: laminina, colágeno IV, fibronectina celular, fibronectina plasmática e colágeno I.

O padrão de adesão é um critério utilizado na classificação das *E. coli* diarreio gênicas. O isolado 2103 de EPEC atípica apresenta padrão de adesão definido

como localizado *like* após 6 horas de interação com as células epiteliais. Como o epitélio intestinal é constituído por componentes de matriz extracelular, é interessante avaliar se a interação com esses componentes influencia o padrão de adesão. Com esse propósito, realizou-se um ensaio baseado em trabalho de Yavlovich *et al.* (2007).

Constatou-se que a pré-incubação do isolado com componentes de matriz extracelular provocou uma variação no seu padrão de adesão. A pré-incubação do isolado 2103 de aEPEC com componentes de matriz extracelular mostrou uma variação no seu padrão de adesão. A pré-incubação do isolado com fibronectina celular ou com laminina ou com colágeno I ou com colágeno IV claramente modificou o padrão de adesão após 6 horas de incubação com a célula epitelial, com a dispersão das bactérias sobre a célula epitelial, que passou a apresentar o padrão semelhante ao definido como padrão difuso. Além disso, percebe-se um maior número de bactérias aderidas em comparação com o controle, o que sugere que na presença desses componentes, o isolado de EPEC aderiu a novos sítios da superfície de células HEP-2, aparentemente pela formação de uma ponte molecular entre a bactéria e componentes da superfície da célula hospedeira (LÄHTEENMÄKI *et al.*, 2005). Esse efeito não foi observado quando a pré-incubação foi realizada com o controle; soro albumina bovina (BSA).

Esse mesmo efeito foi observado em estudos cinéticos por Yavlovich *et al.* (2007) com o micro-organismo *M. fermentans* que na presença de colágeno tipo III, colágeno tipo V e plasminogênio marcadamente aumentou seu nível máximo de aderência à células epiteliais.

Assim, provavelmente a habilidade de EPEC em aderir à célula hospedeira é marcadamente aumentada por um *cross-talk* entre adesina bacteriana, proteínas da

MEC e receptores da célula hospedeira. Portanto, proteínas bacterianas que seletivamente aderem a MEC, utilizam-se desses componentes para ter acesso à célula hospedeira (ALMEIDA *et al.*, 1999; JETT, GILMORE, 2002).

A pré-incubação do isolado bacteriano com fibronectina plasmática também provocou modificação do padrão para padrão difuso, porém um menor número de bactérias aderidas às células epiteliais foi verificado.

Com relação à pré-incubação com o substrato matrigel, foi verificado um maior número de bactérias aderidas às células epiteliais em relação ao controle e também um fenômeno interessante. O padrão verificado após interação com matrigel foi semelhante a do tipo padrão localizado, que é característico das EPEC típicas.

Esse ensaio também foi realizado através da contagem de unidades formadoras de colônias aderidas às células HEp-2. Os resultados mostraram que a preincubação do isolado aos componentes laminina, fibronectina celular, colágeno IV e matrigel (substrato contendo principalmente laminina, colágeno IV e fibronectina) provocaram um aumento no número de bactérias aderidas enquanto que os componentes fibronectina plasmática e colágeno I provocaram efeito contrário, de diminuição do número de bactérias aderidas a células epiteliais, confirmando os resultados do experimento de adesão de 6 horas.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem algumas conclusões:

O isolado 2103 de aEPEC apresenta alta capacidade de adesão aos componentes de matriz extracelular, sendo que o isolado 2459 de mesmo sorotipo não apresenta essa capacidade;

A ordem de capacidade de adesão aos componentes de MEC é MG, Col IV, Lam, FC, FP, Col I;

Houve modificação no padrão de adesão do isolado 2103 de aEPEC às células epiteliais e no número de bactérias aderidas a essas células após ligação da bactéria aos componentes de matriz extracelular;

As prováveis proteínas responsáveis pela ligação do isolado 2103 de aEPEC sorotipo O26:H11 tem massa molecular aparente de 107 kDa, 44 kDa e 35 kDa.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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, ELIAS, W.P. Virulence features of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* identified by the eae(+) EAF-negative stx(-) genetic profile. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 64, p. 357–365, 2009.

AFSET, J.E., BERGH, K., BEVANGERS, L. High prevalence of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Norwegian children with diarrhoea. **J. Med. Microbiol.**, v. 52. ,p. 1015 – 1019, 2003.

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

AGBODAZE, D. Verotoxins (Shiga-like toxins) produced by *Escherichia coli* : a minireview of their classification , clinical presentations and management of a heterogeneous family of cytotoxins. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 22, p. 221, 1999.

ALMEIDA, R. A.; OLIVER, S. P Incubation of *Streptococcus uberis* with extracellular matrix proteins enhances adherence to and internalization into bovine mammary epithelial cells. **FEMS Microbiol Lett**, v. 178, p. 81-85, 1999.

ARAUJO, J. M.; TABARELLI, G. F.; ARANDA, K. R.; FABBRICOTTI, S. H.; FAGUNDES-NETO, U.; MENDES, C. M.; SCALETSKY, I. C. 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. 3396-3999, 2007.

ARICO, B.; NUTI, S.; SCARLATO,V.; RAPPUOLI, R. Adhesion of *Bordetella pertussis* to eukaryotic cells requires a time-dependent export and maturation of filamentous hemagglutinin. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 90, p. 9204-9208, 1993.

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

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

BLACK, R. R. Epidemiology of diarrhoeal disease: Implication for control by vaccines. **Vaccine**, v. 67, p. 826-833, 1993.

BLANC-POTARD, A. B.; TINSLEY, C.; SCALETSKY, I.; LE BOUGUENEC, C.; GUIGNOT, J.; SERVIN, A. L. *et al.* Representational difference analysis between Afa/Dr Diffusely Adhering *Escherichia coli* and nonpathogenic *E. coli* K-12. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 5503-5511, 2002.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dyebinding. **Anal. Biochem.** Baltimore, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAY, J. Isolation of antigenically homogeneous strains of *Bact. Coli neapolitanum* from summer diarrhoea of infants. **J. Pathol. Bacteriol.**, v. 57, p. 239-247, 1945.

BUERIS, V., SIRCILI, M.P.; TADDEI, C.R., SANTOS, M.F.; FRANZOLIN, M.R., MARTINEZ, M.B; FERRER, S.R.; BARRETO, M.L., TRABULSI, L.R. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador in Salvador – Bahia, Brazil, **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 6, p. 839-844, 2007.

BUERIS, V. **Interação de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) atípica que apresenta o padrão de adesão localizada-like com a célula epitelial *in vitro*.** 131 f. Dissertação (Doutorado Direto em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

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

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

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

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

ELLIOTT, S. J.; NATARO, J. P. Enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. **Vet. Med. Microbiol.**, v. 6, p. 196-206, 1995.

ENGVALL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): quantitative assay of immunoglobulin. **Immunochem.**, v. 8, p. 871, 1971.

FARFAN, M.J; NATARO, J. P. The major pilin subunit of the AAF/II fimbriae from enteroaggregative *Escherichia coli* mediates binding to extracellular matrix proteins. **Infect. Immun.**, v. 76, p. 4378-4384, 2008.

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

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

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

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

HAUCK, C.R. Cell adhesion receptors – signaling capacity and exploitation by bacterial pathogens. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 191, p. 55–62, 2002.

HECZKO, U., CARTHY, C.M, O'BRIEN, B.A., BRETT, F. B. Decreased apoptosis in the ileum and ileal Peyer's patches: a feature after infection with rabbit enteropathogenic *Escherichia coli* O103. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 4508-4589, 2001.

HERNANDES, R.T, VIEIRA, M.A.M; CARNEIRO, S. M., SALVADIRM F. A., GOMES, T.A.T. Characterization of Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains that express Typical localized adherence in HeLa Cells in the Absence of the Bundle-Forming Pilus. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, p. 4214 – 4217, 2006.

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 typical enteropathogenic *Escherichia coli* is mediated by intimin omicron and unexpected promotes HeLa cell invasion. **Cell. Microbiol.**, v.10, p. 415-425, 2008.

HOKE, D.E.; EGAN, S.; CULLEN, P.A.; ADLER, B. LipL32 Is an Extracellular Matrix-Interacting Protein of *Leptospira* spp. and *Pseudoalteromonas tunicate*. **Infect. Immun.**, v.76, p. 2063-2069, 2008.

IGUSHI, A., OOKA, T., OGURA, Y., ASADULGHANI, NAKAYAMA, K., FRANKEL, G. AND HAYASHI, T. Genomic comparison of the O-antigen biosynthesis gene clusters of *Escherichia coli* O55 strains belonging to three distinct lineages. **Microbiol.**, v.154., p. 559 – 570, 2008.

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

JETT, B. D.; GILMORE, M. S. Internalization of *Staphylococcus aureus* by human corneal epithelial cells; role of bacterial fibronectin-binding protein and host cell factors. **Infect Immun**, v. 70, p. 4697-4700, 2002.

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

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

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

KENNY, B.; WARAWA, J. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule does not undergo full modification when introduced into host cells by EPEC-independent mechanisms. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 1444-1453, 2001.

KNUTTON S, SHAW R, MCNEISH AS, PHILIPS A, PRICE E, WATSON P. Diagnosis of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Lancet**. 2 (8656). 218. 1989.

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.

KNUTTON, S.; SHAW, R. K.; ANANTHA, R. P.; DONNEMBERG, M. S.; ZORGANI, A. A. The type IV bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli* undergoes dramatic alterations in structure associated with bacterial adherence, aggregation and dispersal. **Mol. Microbiol.**, v. 33, p. 499-509, 1999.

KOROTKOVA, N.; CHATTOPADHYAY, S.; TABATA, T.A. Selection for functional diversity drives accumulation of point mutations in Dr adhesins of *Escherischia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 64, p. 180-194, 2007.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-5, 1970.

LÄHTEENMÄKI, K.; EDELMAN, S; KORHONEN, T.K. Bacterial metastasis: the host plasminogen system in bacterial invasion. **Trends Microbiol.**, v. 13, p. 79-85, 2005.

LEVINE, M.M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. **J. Infect. Dis.**, v. 155, p. 377-390, 1987.

LIANG, X.; YINDUO, J. Alpha-toxin interferes with integrin-mediated adhesion and internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. **Cell. Microbiol.**, v. 8, p. 1656-1668, 2006.

LOWRANCE, J.H.; HASTY, D.L.; SIMPSON, W.A. Adherence of *Streptococcus sanguis* to conformationally specific determinants in fibronectin. **Infect.Immun.**, v. 56, p. 2279-2285, 1988.

MAGALHÃES-CASTILHONE,C.A; **Enterohemolisina de *Escherichia coli* enteropatogênica atípica : novas características fenotípicas.** 71 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

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

NATARO, J. P. & KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol., Rev.** 11. 142 – 201. 1998.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B.; ROBINS-BROWNE, R.; PRADO, V.; VIAL, P. A.; LEVINE, M. M. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 16, p. 829-831, 1987.

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.**, 12. 597 – 603. 2006.

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

PATON JC, PATON AW. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, p. 450-479, 1998.

PATON, A.W.; SRIMANOTE, P.; WOODROW, M.C.; PATON, J.C. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 6999-7009, 2001.

PATON, A.W.; SRIMANOTE, P.; WOODROW, M.C.; PATON, J.C. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 6999-7009, 2001.

PATTI, J.M., ALLEN, B.L., MCGAVIN, M.J., HOOK, M. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 48, p. 585-617, 1994.

PEIXOTO, J.C.; BANDO, S.Y.; ORDONEZ, J.A.; BOTELHO, B.A.; TRABULSI, L.R.; MOREIRA-FILHO, C.A. Genetic differences between *Escherichia coli* O26 strains isolated in Brazil and in other countries. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 196, p. 239-244, 2001.

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.

ROGGENKAMP, A., N. ACKERMANN, C. A. JACOBI, K. TRUELZSCH, H. HOFFMANN, HEESEMANN, J. Molecular analysis of transport and oligomerization of the *Yersinia enterocolitica* adhesin YadA. **J. Bacteriol.**, v. 185, p. 3735-3744, 2003.

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

SARIDAKIS, H.O. Non production of Shiga-like toxins by *Escherichia coli* serogroup O26. **Rev. Microbiol.**, v. 25, p. 154-155, 1994.

SCALETSKY, I. C. A.; SILVA, M. L. M. & TRABULSI, L. R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infect. Immun.**, v. 45, p. 534-36, 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.**, vol. 67, p. 3410-3415, 1999.

SCALETSKY, I. C.; 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.

SEARS, C.,L.; KAPER, J.B. Enteric Bacterial Toxins: Mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. **Microbiol. Rev.**, v. 60, p. 167-215, 1996.

SHAW, R. K., S. DANIELL, F. EBEL, G. FRANKEL, AND S. KNUTTON. EspA filament-mediated protein translocation into red blood cells. **Cell. Microbiol.**, v.3, p. 213–222, 2001.

STUDIER, F. W. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. **J. Mol. Biol.**, v. 79, p. 237-248, 1973.

SURANA, N. K., D. CUTTER, S. J. BARENKAMP, ST. GEME III, J. W. The *Haemophilus influenzae* Hia autotransporter contains an unusually short trimeric translocator domain. **J. Biol. Chem.**, v.279, p. 14679–14685, 2004.

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

TOWBIM, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets:procedure and some applications. **Pro. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

TRABULSI, L.R., CAMPOS, L.C., WITTHAM, T.S., GONÇALVES, T.A.T., RODRIGUES, J. AND GONÇALVES, A.G. Traditional and non-traditional enteropathogenic *Escherichia coli* serogroups. **Rev. Microbiol.**, v. 27, p. 1-6, 1996.

TRABULSI, L.R.; KELLER, R.; GOMES, T.A.T. Typical and Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerging Infec. Dis.**, v. 8, p. 508-513, 2002.

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

VALLANCE, B.A., FINLAY, B.B. Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, p. 8799 – 8806, 2000.

VIEIRA M.A., ANDRADE, J.R., TRABULSI, L.R., ROSA, A.C., DIAS, A.M., RAMOS, S.R., FRANKEL, G., GOMES, T.A. 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.

YAVLOVICH, A and ROTTEM, S. Binding of host extracellular matrix proteins to *Mycoplasma fermentans* and its effects on adherence to, and invasion of HeLa cells. **Microbiol. Lett.**, v. 266, p. 158-162, 2007.