## DANIELLE DIAS MUNHOZ

# EXPRESSÃO E PRODUÇÃO DA FÍMBRIA ECP POR Escherichia coli ENTEROPATOGÊNICA ATÍPICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências

São Paulo 2015

## DANIELLE DIAS MUNHOZ

## EXPRESSÃO E PRODUÇÃO DA FÍMBRIA ECP POR *Escherichia coli* ENTEROPATOGÊNICA ATÍPICA

Dissertação apresentada ao Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Roxane Fontes Piazza

Versão original

São Paulo 2015 DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Munhoz, Danielle Dias.

Expressão e produção da fimbria ECP por *Escherichia coli* enteropatogênica atípica / Danielle Dias Munhoz. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Roxane Maria Fontes Piazza.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: *Escherichia coli* enteropatogênica.

Versão do título para o inglês: Expression and production of ECP by atypical enteropathogenic *Escherichia coli*.

1. Diarreia 2. Escherichia coli 3. *Escherichia coli* enteropatogênica atípica 4. Fímbrias 5. *E. coli* Common Pilus I. Piazza, Profa. Dra. Roxane Maria Fontes II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0142/2015

## UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):	Danielle Dias Munhoz.
Título da	Expressão e produção da fímbria ECP por Escherichia coli enteropatogênica atípica.
Orientador(a):	Profa. Dra. Roxane Maria Fontes Piazza.
A Comissão J em sessão p ( )	ulgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, ública realizada a
Examinador(a):	Assinatura:
Examinador(a):	Assinatura:
Presidente:	Assinatura:



#### UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

Comissão de Ética em Pesquisa

## CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° **690/14** referente ao projeto intitulado: "*Caracterização do padrão de adesão localizado-like em isolados de Escherichia coli enteropatogência atípica com diferentes perfis genéticos fimbriais*" sob a responsabilidade de **Danielle Dias Munhoz,** foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSH-COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP n°466 de 2012.

São Paulo, 21 de agosto de 2014.

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

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

Dedico este trabalho à minha mãe, minha inspiração na ciência e na vida.

### AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra Roxane Piazza, pela oportunidade de desenvolver minha formação acadênica, por tornar os anos de mestrado muito agradáveis, mas principalmente pelas conversas carinhosas e divertidas. Obrigada chefe!

Ao diretor do Laboratório de Bacteriologia, Dr Waldir Elias, por permitir a realização do meu trabalho e por todas as sugestões dadas ao longo do meu mestrado.

À minha grande amiga Daniela Luz, por todas as inúmeras ajudas ao longo do meu trabalho, por conseguir me manter calma nos momentos mais difíceis e por mais trabalhoso que seja, me fazer lembrar da minha capacidade. Obrigada por estar comigo nessa, minha amiga!

Ao Fernando, por ser o PubMed portátil do laboratório, por ter me auxiliado com diversos problemas encontrados durante o mestrado e por ter me dado grandes idéias de como concluir o trabalho.

À todos os meus grandes amigos do Laboratório de Bacteriologia, Bruna, Bruno, Camila, Juliana, Letícia e Thaís pelos dias divertidos e todas as nossas risadas.

À todos os colegas e funcionários do Laboratório de Bacteriologia, muito obrigada!

À minha mãe e ao meu irmão, que são a minha força em todos os momentos, que me incentivam a ir cada vez mais longe, e que sem os quais tudo seria mais difícil. Muito obrigada!!

À minha avó, que sempre me disse que para ter o "Dr" antes do nome eu deveria estudar muito. Estou cada vez mais perto vó. Obrigada por me incentivar e estar sempre comigo.

Ao Pedro, que mesmo sem entender direito o "mundo das *E. coli"* está ao meu lado e torce para que eu me supere cada dia mais. Você me faz querer ser uma pessoa melhor. Muito obrigada!

À toda minha família que sempre estão dispostos a me ajudar, que ficam contentes e comemoram comigo a cada nova conquista. Muito obrigada!!.

Ao apoio do setor de Microscópio Confocal de Varredura a Laser do Instituto Butantan.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro.

"A lei da mente é implacável. O que você pensa, você cria; O que você sente, você atrai; O que você acredita, torna-se realidade".

Buda

### RESUMO

MUNHOZ, D.D. **Expressão e produção da fímbria ECP por Escherichia coli enteropatogênica atípica.** 2015. 93f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Escherichia coli enteropatogênica atípica (aEPEC) é um dos principais agentes causadores de diarreia em crianças. Ao contrário das cepas de EPEC típica, aEPEC não produzem a fímbria BFP (bundle-forming pilus). A ausência de BFP sugere que outras adesinas fimbriais e afimbriais devem estar envolvidas na adesão de aEPEC à célula hospedeira, o que poderia explicar os diferentes padrões de interação que apresentam em ensaios de aderênciain vitro com células epiteliais. A fímbria E. coli common pilus (ECP) é encontrada na maioria das cepas patogênicas e não patogênicas de E. coli, e, provavelmente, desempenha um papel importante na aderência bacteriana. O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão e produção de ECP em cepas de aEPEC isoladas de casos de diarreia com diferentes perfis As cepas BA2103, BA3378, BA4132 e BA4147 foram genéticos fimbriais. investigadas guanto à presença do operon ecp, composto por cinco genes (ecpA, ecpB, ecpC, ecpD e ecpE) e o seu gene regulador (ecpR) por PCR. A expressão deste operon foi avaliada por PCR utilizando cDNA obtidos a partir de extração de RNA das cepas bacterianas cultivadas em caldo Luria Bertani (LB), DMEM e DMEM pré-condicionado (presença de componentes de sinalização celular da cultura de células HeLa). A produção de ECP foi avaliada por imunofluorescência utilizando soro de coelho anti-EcpA. Foi observado que os genes do operon ecp estão presentes em todas as cepas estudadas, mas a expressão destes cinco genes, por todas as cepas, ocorreu apenas quando foram cultivadas em DMEM précondicionado. Houve expressão diferencial do operon ecp quando o cultivo foi realizado em LB ou DMEM. Apenas a cepa BA2103 produziu ECP quando o cultivo foi realizado em meio LB. Já em DMEM, três das guarto cepas estudadas produziram esta fímbria. Houve um aumento do número de bactérias produtoras de ECP quando as cepas foram cultivadas em DMEM precondicionado. Esses resultados sugerem que a sinalização celular pode interferir na expressão e produção da ECP.

Palavras-chave: Diarreia. aEPEC. fímbria. ECP.

## ABSTRACT

MUNHOZ, D.D **Expression and production of ECP by atypical enteropathogenic** *Escherichia coli.* 2015. 93 p. Masters thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Atypical enteropathogenic Escherichia coli (aEPEC) are one of the most frequent pathotypes that causes diarrhea in infants. Unlike typical EPEC, aEPEC does not produce Bundle Forming Pilus (BFP). The absence of BFP strongly suggests that other fimbrial and non-fimbrial adhesins must be involved in aEPEC adhesion to the host cell, which could explain the different interaction patterns they present on adherence assays with HeLa cells. E. coli common pilus (ECP) is found in most pathogenic and non-pathogenic E. coli and probably has an important role in bacterial adhesion. The objective of this study was to evaluate the expression and production of ECP in aEPEC strains isolated from diarrhea cases with different genetic pili profiles. For that purpose, the following strains were selected: BA2103, BA3378, BA4132 and BA4147. The presence of ecp operon, composed by five genes (ecpA, ecpB, ecpC, ecpD and ecpE) and its regulatory gene (ecpR), was assessed by PCR. The expression of this operon was evaluated by PCR using cDNA obtained from RNA extraction of bacterial strains grown in Luria Bertani broth (LB), DMEM and preconditioned DMEM (presence of cell signaling components from HeLa cell culture). ECP production was evaluated by immunofluorescence with rabbit serum against EcpA. It was observed that the genes comprising ecp operon are present in all strains tested, but expression of these five genes by all strains only occurred when they were grown in preconditioned DMEM. There was differential expression of ecp operon when strains were grown in LB or DMEM. ECP production was observed only by BA2103, when strains were grown in LB medium. Three of the tested strains producted ECP grown in DMEM, but there was a higher production of the pili when strains were grown in DMEM preconditionated medium These results suggest that cellular signaling may interfere with the expression and production of ECP.

Keywords:Diarrhea.aEPEC.Fimbriae.ECP.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do sistema de secreção tipo III, presente em EPEC e EHEC
Figura 2 - Padrões de adesão às células epiteliais encontrados em cepas de aEPEC
Figura 3 - Demonstração esquemática da montagem de fímbrias pelo sistema chaperona/usher
Figura 4 - Representação esquemática do operon <i>ecp</i> , formado pelo gene <i>ecpR</i> e <i>ecpA</i> ao <i>ecpE</i>
Figura 5 - Ensaio de Interação bacteriana com células epiteliais HeLa, com período de 6 h de incubação (3 h + 3 h)49
Figura 6 - Perfil eletroforético das reações de PCR para amplificação dos genes fimbriais das cepas de aEPEC
Figura 7- Perfil eletroforético das reações de PCR para amplificação dos genes do operon <i>ecp</i> nas cepas de aEPEC
Figura 8 - Perfil eletroforético das reações de PCR para amplificação do gene <i>ecpR</i> nas cepas de aEPEC54
Figura 9 - Perfil eletroforético das reações de PCR para amplificação dos genes do operon <i>ecp</i> na cepa 1551-255
Figura 10 - Perfil eletroforético das reações de PCR utilizando o cDNA originado do

cultivo bacteriano em meio LB para amplificação do gene rpoA......56

- Figura 12 Perfil eletroforético das reações de PCR utilizando o cDNA originado do cultivo bacteriano em meio DMEM para amplificação do gene *rpoA*.....58

- Figura 20 Microscopia confocal para detecção de ECP nas cepas bacterianas cultivadas em meio DMEM pré-condicionado por ensaio de imunofluorescência. Soro de coelho anti-EcpA (1:1000) e soro de cabra anti-IgG de coelho conjugado ao FITC (1:500). Aumento 1000X.......69

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sorotipos e perfis genéticos fimbriais das cepas de aEPEC utilizadas neste trabalho
Tabela 2 - Condições de amplificação dos genes fimbriais para ensaios de PCR42
Tabela 3 - Condições de amplificação dos genes do operon ecp para ensaio de   PCR
Tabela 4 - Sequência dos iniciadores e produto de amplificação do gene ecpE45
Tabela 5 - Sequência dos iniciadores e produto de amplificação do gene rpoA47
Tabela 6 - Perfil genético fimbrial das cepas de aEPEC51
Tabela 7 - Transcrição do operon ecp com cultivo bacteriano em meios de cultivoLB, DMEM e DMEM pré-condicionado70
Tabela 8 - Produção da fímbria ECP analisada por ensaios de imunofluorescência

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AA: Adesão agregativa
- AD: Adesão difusa
- aEPEC: Escherichia coli enteropatogênica atípica
- AL: Adesão localizada
- ALL: Adesão localizada-like
- ATV: Associação tripsina versene
- BFP: Bundle-forming pilus
- cDNA: DNA complementar
- DAEC: Escherichia coli difusamente aderente
- DEC: Escherichia coli diarreiogênica
- DMEM: Meio essencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco
- dNTP: Desoxirribonucleotídeos trifosfato
- EAEC: Escherichia coli enteroagregativa
- EAF: EPEC adherence factor
- ECP: E. coli common pilus
- EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético
- EHEC: Escherichia coli enterohemorrágica
- EIEC: Escherichia coli enteroinvasora
- EPEC: Escherichia coli enteropatogênica
- Esp: Proteínas secretadas por EPEC
- ETEC: Escherichia coli enterotoxigênica
- LEE: Locus of enterocyte effacement
- LT: Toxina termo-lábil
- NMEC: Escherichia coli responsáveis por meningite.

- PCR: Reação em cadeia da polimerase
- RNA: Ácido ribonucleico
- SST3: Sistema de secreção do tipo 3
- ST: Toxina termo-estável
- STEC: Escherichia coli produtora da toxina Shiga
- Stx: Toxina Shiga
- tEPEC: Escherchia coli enteropatogênica típica
- Tir: Receptor translocado de intimina
- UPEC: Escherichia coli uropatogênicas

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1 1 Diarreia	19
1 2 Escherichia coli	20
1 3 Escherichia coli diarreiogênica (DEC)	21
1 4 Escherichia coli enteropatogênica	24
1 4 1 Escherichia coli enteropatogênica atípica	27
1 4 2 Adesinas fímbriais	29
2 OBJETIVOS	36
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
3 1 Cepas bacterianas	37
3 1 1 Cepas controles	37
3 2 Meios de cultivo	38
3 2 1 Luria Bertani (LB)	38
3 2 2 Meio essencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)	38
3 3 Cultivo de células HeLa	39
3 4 Condições de cultivo bacteriano	40
3 4 1 Obtenção de DMEM pré-condicionado	40
3 5 Confirmação do padrão de adesão das cepas de aEPEC	40
3 6 Confirmação do perfil genético fimbrial das cepas bacterianas por Rea em Cadeia da Polimerase (PCR)	<b>;ão</b> 41
3 6 1 Extração de DNA bacteriano	43
3 6 2 Detecção dos genes fimbriais por PCR	43
3 7 Avaliação da presença do operon <i>ecp</i> nas cepas bacterianas por PCR	44
3 8 Avaliação da transcrição do operon <i>ecp</i>	45
3 8 1 Desenho dos iniciadores para <i>ecpE</i>	45
3 8 2 Extração de RNA bacteriano e obtenção de cDNA	45
3 8 3 Análise da transcrição dos genes do operon ecp	46
3 9 Avaliação da produção de ECP por ensaio de imunofluorescência	47
4 RESULTADOS	48
4 1 Confirmação do padrão de adesão das cepas de aEPEC	48
4 2 Confirmação do perfil genético fimbrial	50
4 3 Avaliação da presença do operon ecp nas cepas bacterianas	52

4 4 Avaliação da transcrição do operon <i>ecp</i> e do gene regulador				
4 5 Avaliação da produção de ECP por ensaio de imunofluorescência	62			
5 DISCUSSÃO	72			
6 CONCLUSÃO	79			
REFERÊNCIAS	80			

### 1 INTRODUÇÃO

### 1 1 Diarreia

Anualmente, são registradas cerca de 6,5 milhões de mortes de crianças menores de cinco anos de idade (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014). Mais da metade destas mortes está relacionada a condições que podem ser prevenidas ou tratadas com acesso a intervenções simples e com preços acessíveis, como saneamento básico, acesso a água tratada, conscientização de higiene pessoal, entre outros. Dados alarmantes mostram que 780 milhões de pessoas não têm acesso a água potável e 2,5 bilhões de pessoas não têm acesso a saneamento básico (WHO, 2013). Mesmo com esforços globais para reduzir a mortalidade causada pela diarreia nos últimos 30 anos, essa ainda é a segunda principal causa de morte. A diarreia pode acometer aproximadamente 2 bilhões de pessoas a cada ano, sendo que 36 milhões progridem para casos mais severos. O grupo mais suscetível são as crianças menores de cinco anos de idade, com estimativa de 800 mil mortes a cada ano (WHO, 2013). Outras consequências diretas da diarreia infantil em países mais pobres incluem desnutrição, retardo do crescimento e atraso no desenvolvimento cognitivo (WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANIZATION, 2012).

Os casos de diarreia levam a redução da absorção de carboidratos, proteínas, potássio, zinco e outros nutrientes, contribuindo para um estado de desidratação severa e má nutrição (ASHWORTH, 2001). A relação entre diarreia e má nutrição é bidirecional, já que a má nutrição predispõe a criança a uma maior incidência e duração de diarreia, enquanto que a diarreia pode levar ou agravar a má nutrição (LIMA et al., 1992). Perdas significativas de água em consequência da diarreia podem levar não apenas a desidratação, mas também à um desequilíbrio eletrolítico, diminuição da capacidade mental e, então, à morte (SUH et al., 2010). Episódios prolongados de diarreia também estão associados com o aumento da morbidade e mortalidade relacionadas a outras doenças (MOORE et al., 2010). Nos países em desenvolvimento, crianças menores de três anos sofrem em média três episódios de diarreia a cada ano, sendo uma das principais causas da desnutrição, (WHO, 2009) o que torna as crianças 9,5 vezes mais vulneráveis à morte por diarreia quando

comparadas a crianças nutridas (UNICEF, 2012).

O mais frequente agente causador da diarreia é o Rotavírus, seguido pela *Escherichia coli*, que é o principal agente bacteriano. Juntos são responsáveis por 55% dos casos de diarreia registrados, mas este número pode ser maior já que em 34% dos casos, o agente causador da diarreia não é identificado (LANATA et al., 2013)

### 1 2 Escherichia coli

*Escherichia coli* é um bastonente Gram-negativo, anaeróbio facultativo, pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Trata-se de um microrganismo predominante na microbiota intestinal humana e de inúmeras espécies animais, como mamíferos e até animais de sangue frio, como peixes que habitam determinadas temperaturas (HUGGINS; RAST, 1963). A estimativa é que estejam presentes 10<sup>21</sup> células bacterianas de *E. coli* no corpo humano, sendo esta uma das primeiras bactérias a colonizar recém-nascidos e permanecem na microbiota (PALMER et al., 2007). Este grupo bacteriano obtém nutrientes da camada mucosa do organismo para a colonização, permanecendo neste local como membro de uma mistura de biofilmes (CONWAY; COHEN, 2015).

Ao ser eliminado de um organismo, *E. coli* persiste no ambiente até entrar em contato com seu novo hospedeiro. Um mecanismo de estresse que a bactéria encontra é a acidez estomacal, mas é capaz de sobreviver graças a mecanismos ácido resistentes que são induzidos pela mesma em fase estacionária (FOSTER, 2004). A colonização intestinal bacteriana bem-sucedida depende de inúmeros fatores, como a disponibilidade e classe dos nutrientes disponíveis, a capacidade de superar a competição com uma densa e diversificada microbiota (FRETER et al., 1983), a resistência aos mecanismos de defesa do hospedeiro (BERGSTROM et al., 2012; McGUCKIN et al., 2011), além do rápido crescimento, que possibilita superar a renovação da camada mucosa (RANG et al., 1999) e, assim, ser incorporada ao lúmen intestinal.

O organismo é colonizado em média por cinco diferentes cepas de *E. coli* comensais, o que sugere que existam diferenças entre estes microrganismos, e que estas cepas utilizem diferentes estratégias nutricionais para favorecer seu crescimento (APPERLOO-RENKEMA, 1990).

Devido a sua grande versatilidade, *E. coli* é amplamente estudada e utilizada em algumas áreas de atuação. É conhecido sua importância na produção de vitamina K (NAKAGAWA, 2013), sua utilização como célula hospedeira em tecnologia de DNA recombinante, como produtora de proteínas de interesse biotecnológico, entre outras aplicações. Porém, essa grande versatilidade pode torna-la um patógeno que pode levar à morte. Distintas cepas de *E. coli* podem causar doenças extra intestinais e intestinais, devido a fatores de virulência que atingem grande variedade de processos celulares (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Dentre as principais *E. coli* que causam doenças extra intestinais estão as *E. coli* uropatogênicas (UPEC) e *E. coli* responsáveis por meningite (NMEC).

### 1 3 Escherichia coli diarreiogênica (DEC)

Cepas de *E. coli* que possuem fatores de virulência e levam a doenças entéricas são denominadas *Escherichia coli* diarreiogênicas (DEC) e compreendem seis grupos (ou patotipos). Esta classificação considera os mecanismos de virulência específicos, as síndromes clínicas e os aspectos epidemiológicos, dividindo asDEC em: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli*difusamente aderente (DAEC), *E. coli* produtora da toxina Shiga (STEC) e seu subgrupo *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (NATARO; KAPER, 1998).

A prevalência de enteropatógenos varia entre países e áreas geográficas (AFSET; BERGH; BEVANGER, 2003; COHEN et al., 2005), sendo que asDEC ainda apresentam uma grande relevância em saúde pública, (CROXEN et al., 2013; HERNANDES et al., 2009; NATARO; KAPER; MOBLEY, 2004).

As cepas de *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC) possuem um plasmídeo que contém os genes *elt, estla* e *estlb* que codificam as enterotoxinas termo-lábil (LT) e termoestável (ST) (LEVINE, 1987), as quais podem ser secretadas separadamente ou em conjunto (NATARO; KAPER, 1998). Ao colonizarem a mucosa do intestino delgado, cepas ETEC liberam as enterotoxinas e levam a diarreia aguda e aquosa em crianças, além de ser a principal causa da diarreia do viajante, acometendo adultos visitantes de áreas endêmicas (MARCHOU, 2013). Estudos revelaram que cepas de ETEC originam de diferentes linhagens evolucionárias, indicando que a aquisição dos genes *elt* e *est* podem ser suficientes para a classificação de cepas

como ETEC (TURNER et al., 2006). Corroborando com estes dados, foi observado por Chen, Savarino e Vankatesan (2006) que o cromossomo da cepa protótipo de ETEC H10407 é praticamente idêntico ao cromossomo da *E. coli* laboratorial MG1655, sugerindo que o principal fator que originou este patotipo foi a aquisição do plasmídeo contendo *elt* e *est.* Além das enterotoxinas, as ETEC possuem os fatores de colonização (CF), que são proteína estruturais de superfície (EVANS et al., 1975) e já foram descritos 25 subtipos codificados por genes plamidiais, como os fatores antigênicos de colonização (CFA) e antígenos de superfície de coli (CS) (GAASTRA; SVENNERHOLM, 1996; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; QADRI, 2005). Estes CFs podem ser classificados em três grupos de acordo com suas características estruturais: fímbrias de filamentos rígidos, fímbrias de filamentos flexíveis (*bundleforming*) e fibrilas, que são finas e flexíveis (NATARO; KAPER, 1998). A variabilidade dos genes de virulência e fatores de colonização sugerem que ETEC seja um grupo heterogêneo de cepas que tenham adquirido os genes de virulência por transferência horizontal (SAHL et al., 2011).

O grupo das *E. coli* difusamente aderente (DAEC) é caracterizado por seu padrão de adesão difuso em culturas de células epiteliais (SCALETSKY; SILVA; TRABULSI, 1984). Foram caracterizadas duas adesinas capazes de determinar o fenótipo de aderência difusa em cepas de DAEC. A adesina fimbrial F1845 foi caracterizada na cepa protótipo C1845 e medeia a aderência desta cepa às células epiteliais (BILGE et al., 1989; SERVIN, 2005). Esta fimbria é codificada por um operon composto de cinco genes denominado *daaABCDE*e por homologia, pertence à família das adesinas Afa/Dr (BILGE et al., 1993; NOWICKI et al., 1990). Outra adesina envolvida na aderência difusa é a AIDA-I, sendo que a proteína precursora da fímbria é codificada pelo gene *aidA* e sua conformação final medeia a adesão difusa às células HeLa (BENZ; SCHMIDT, 1992). Estudos conduzidos no Espirito Santo, Nordeste brasileiro e em São Paulo observaram que DAEC é mais prevalente em crianças com diarreia aguda (SCALETSKY et al., 2002; SPANO et al., 2008).

As *E. coli* enteroagregativas (EAEC) fazem parte de um grupo heterogêneo associado a diarreia aguda e persistente em crianças e adultos (FLORES; OKHUYSEN, 2009; HARRINGTON; DUDDLEY; NATARO, 2006). EAEC ganhou atenção nas últimas décadas como causa de diarreia aquosa, responsável por alguns surtos esporádicos, sendo que em um número significativo de pacientes esta diarreia se torna persistente (WEINTRAUB, 2007). Este patotipo é considerado o principal causador de diarreia em várias regiões do Brasil (ARAUJO et al., 2007; BENEVIDES-MATOS et al., 2015; LIMA et al., 2014). Este grupo exibe grande adesão à mucosa intestinal e produz diferentes enterotoxinas e citotoxinas, resultando na indução de inflamação na mucosa (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). A adesão deste patotipo é mediada por adesinas fimbriais agregativas, que levam à formação do padrão de adesão agregativo (AA) às células epiteliais, formando uma "parede de tijolos empilhados" (NATARO et al., 1987).

Este patotipo é dividido em típica e atípica, sendo que as típicas possuem o gene do regulador transcricional *aggR*, membro da família AraC de ativadores (NATARO et al., 1994), enquanto que as atípicas não possuem este gene regulador (DUDDLEY et al., 2006). As EAEC típicas produzem ao menos quatro adesinas fimbriais, denominadas *aggregative adherence fimbriae* (AAF) (BERNIER; GOUDON; LE BOUGUENCE, 2002; BOISEN et al., 2008; CZECZULIN et al., 1997; NATARO et al., 1992). Entre as adesinas fimbriais AAF existem diferenças genotípicas e fenotípicas, o que as classificam como fimbrias distintas. Já as EAEC atípicas, que não possuem o gene regulador *aggR*, possuem um operon plasmidial denominado *pil*, que codifica a fímbria Pil. Esta é uma fímbria tipo IV que aparentemente contribui para a conjugação plasmidial, aderência *in vitro* às células epiteliais e a interação bactéria-bactéria ao biofilme (KIM; KOMANO, 1997).

São classificadas como STEC todas as *E. coli* produtoras de toxina Shiga (Stx) (KONOWALCHUK; SPEIRS; STAVRIC, 1977; PATON J; PATON A, 1998). As STEC são conhecidas por conter um grande número de proteínas responsáveis por adesão e contribuir para o estabelecimento, persistência e tropismo no tecido durante a infecção por este patotipo (McWILLIAMS; TORRES, 2014). Este patotipo produz as toxinas Stx1 e Stx2, assim denominadas devido a homologia estrutural e de atividade biológica com a toxina Shiga (Stx) produzida por *Shigella dysenteriae* tipo 1, responsáveis pelo efeito tóxico no hospedeiro, capazes de produzir diarreia sanguinolenta (O'BRIEN et al., 1982; O'BRIEN; LA VECK, 1983). Muitos indivíduos infectados com STEC inicialmente desenvolvem diarreia aquosa, mas em alguns casos esta diarreia avança em um ou dois dias para diarreia com presença de sangue ou colite hemorrágica (O'BRIEN, 1983; RILEY et al., 1983; RILEY, 1987). A infecção por cepas de STEC também pode evoluir para a denominada síndrome hemolítica urêmica (SHU), caracterizada por falência renal aguda, anemia hemolítica

micro-angiopática etrombocitopenia, podendo até levar à morte (KARMALI et al., 1983,1985).

O subgrupo de STEC denominado *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), além de produzir as toxinas Shiga (Stx 1 e/ou 2), possui uma ilha de patogenicidade conhecida como região LEE (*locus of enterocyte effacement*). Na região LEE são encontrados genes que codificam proteínas ligadas à lesão histopatológica característica deste patotipo, denominada lesão *attaching and effacing* (A/E) (McDANIEL et al., 1995; MOON et al., 1983). Dentre este patotipo, o sorogrupo O157:H7 é responsável por casos graves de diarreia, principalmente pelo consumo de carne contaminada malpassada ou vegetais contaminados (BESSER-WIEK et al., 1996; COOKSON; WOODWARD, 2003; MOON et al., 1983).

### 1 4 Escherichia coli enteropatogênica

O termo *E. coli enteropatogênica* (EPEC) foi primeiramente utilizado por Neter et al. (1955) a fim de distinguir sorogrupos (antígeno O) de *E. coli* associados a pacientes com diarreia em virtude de infecções extra intestinais ou das *E. coli* encontradas em indivíduos saudáveis. Cepas de EPEC são responsáveis por diarreia infantil em diversos países em desenvolvimento (ABBA et al., 2009; CHANDRAet al., 2012; CONTRERAS et al., 2012; NAKHJAVANI et al., 2013).

Os estudos com *E. coli* que aderem intimamente às células epiteliais aumentaram nos anos 90, quando foi descrito o gene *eae* em cepas de EPEC e observado que a proteína codificada por este gene é necessária para que seja estabelecida a lesão histopatológica característica deste patótipo e de EHEC, denominada lesão A/E (FRANCIS; COLLINS; DUIMSTRA, 1986). É codificado por este gene uma adesina denominada intimina, que induz a sinalização transmembranica e transloca seu próprio receptor, denominado Tir (*translocated intimin receptor*). Alguns estudos avaliam as variações nos resíduos de aminoácidos da porção C-terminal de intimina, que é o domínio de ligação ao receptor da proteína, definindo diferentes tipos ou subtipos de intimina em cepas de EPEC e STEC (ADU-BOBIE et al., 1998).

A lesão A/E é caracterizada pela adesão íntima da bactéria pela ligação intimina/Tir ao epitélio intestinal, seguido da destruição das microvilosidades, polimerização de actina e de outros elementos do citoesqueleto, resultando na

formação de uma estrutura semelhante a um pedestal (NATARO; KAPER, 1998). Os fatores determinantes para a produção da lesão A/E estão localizados na ilha de patogenicidade denominada LEE. Esta região possui aproximadamente 36 kb e pode ser dividida em cinco segmentos: LEE1, LEE2, LEE3 LEE4 e LEE5 (ELLIOT et al., 1998; MELLIES et al., 1999), onde são encontrados os genes que codificam a intimina, o receptor Tir, as proteínas efetoras Esp (EPEC secreted protein) e outros componentes que fazem parte do sistema de secreção do tipo III (SST3) (NATARO; KAPER, 1998) (Figura 1). As proteínas Esp (Esp A, B, D) estão envolvidas na formação de um injetossomo, semelhante a uma agulha, que injeta proteínas efetoras até a célula hospedeira, o que desarranja o citoesqueleto e subverte as funções da célula hospedeira (FRANKEL et al., 1998). As proteínas EscC, proteínas de membrana interna e a lipoproteína EscJ, formam uma estrutura anelada que conecta as membranas interna e externa da bactéria (revisado por GARMENDIA; FRANKEL; KREPIN, 2005). A proteína EscF constitui uma estrutura em forma de agulha (WILSON et al., 2001), a partir da qual ocorre a polimerização da subunidade EspA, que irá formar uma estrutura filamentosa oca denominada canal de translocação (CREPIN et al., 2005; DANIELL et al., 2001, 2003). As proteínas EspB e EspD irão formar um poro na membrana citoplasmática da célula hospedeira (BUTTNER; BONAS, 2002; IDE et al., 2001; KRESSE; ROHDE; GUZMAN, 1999), por ondeserão injetadas as proteínas efetoras, além do receptor Tir (FIVAZ; VAN DER GOOT, 1999; KNUTTON et al., 1998).



Figura 1- Representação esquemática do sistema de secreção tipo III presente em EPEC e EHEC.

FONTE: Garmendia, Frankel e Krepin, 2005

A importância do SST3 em EPEC tem sido demonstrada por diversos estudos. Recentemente, Sampaio et al. (2014) verificaram que a mutação nos genes que formam o sistema de secreção em uma cepa de EPEC resultou na perda da capacidade de formar a lesão A/E, assim como de invadir macrófagos.

A colonização de EPEC à célula hospedeira é um processo multifatorial, no qual atuam adesinas fimbriais e afimbriais, que podem agir simultaneamente ou em diferentes estágios da colonização. Esse processo está associado com a presença do plasmídeo pMAR2, conhecido como pEAF (EPEC *adherence factor*), que contém operon bfp (BALDINI et al., 1983; DONNENBERG; ZHANG; STONE, 1997) responsável por codificar uma fímbria tipo IV denominada BFP (Bundle Forming Pilus), que auxilia na adesão bacteriana, conecta as bactérias com as microcolônias,

o que promove a sua estabilização (GIRÓN; HO; SCHOOLNICK, 1991). Alguns autores demonstraram que a ligação inicial entre bactéria e célula hospedeira é mediada por BFP e EspA, sendo esta associação o estímulo necessário para que ocorra a translocação de EspB, Tir e possivelmente outras proteínas efetoras para dentro da célula hospedeira (CLEARLY et al., 2004; KNUTTON et al., 1998).

Algumas cepas de EPEC não possuem o plasmídeo EAF, o gene *bfp* e, portanto, não produzem a fímbria BFP, sendo então conhecidas como EPEC atípicas (ABE et al., 2009; NARA et al., 2010).

#### 1 4 1 Escherichia coli enteropatogênica atípica

A classificação de aEPEC foi primeiramente utilizada por Kaper (1996) para distinguir cepas de EPEC que não portavam o plasmídeo EAF. Inúmeros trabalhos foram realizados a fim de melhor determinar as diferenças genotípicas e fenotípicas entre as EPEC típicas e atípicas, sendo atualmente classificadas como as cepas que não apresentam o pEAF, o operon de *bfp*, que não expressam a fímbria BFP, mas que possuem o gene *eae* e, portanto, são capazes de produzir intimina (ABE et al., 2009; BLANCO et al., 2006; DULGUER et al., 2003; NARA et al., 2010; PELAYO et al., 1999; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002; VIEIRA et al., 2001).

Além das diferenças em relação às tEPEC, aEPEC podem ser bastante heterogêneas, compreendendo cepas que produzem apenas os fatores de virulência codificados por genes da região LEE e outras que expressam tanto os fatores codificados por LEE quanto aqueles localizados fora desta região (CAMPOS et al., 1994; GONÇALVES et al., 1997; RODRIGUES et al., 1996).

Amostras de tEPEC produzem um padrão de aderência característico em linhagens celulares cultivadas *in vitro*, denominado adesão localizada (AL), sendo visualizado após três horas de contato bactéria-célula (SCALETSKY et al., 1984). No padrão AL as bactérias aderem em áreas localizadas da superfície celular, formando microcolônias compactas (*clusters* bacterianos) em razão da participação da fímbria BFP (GIRÓN et al.,1991). Por outro lado, a maioria das cepas de aEPEC exibem um fenótipo de adesão localizado-*like* (ALL) caracterizado pela formação de microcolônias bacterianas frouxas sobre determinadas regiões da superfície celular, sendo visualizado após seis horas de contato (RODRIGUES et al., 1996). Este padrão vem sendo descrito como o mais frequente em isolados de aEPEC (GOMES

et al., 2004; PELAYO et al., 1999; SCALETSKY et al., 1999). No entanto, algumas cepas de aEPEC também podem apresentar o padrão de adesão localizada, com a ocorrência de variações no padrão AL, sendo visualizados grupos bacterianos menos compactos após seis horas de incubação com células epiteliais (ABE et al., 2009; HERNANDES et al., 2008). Além do padrão AL e ALL, as aEPEC podem apresentar o padrão de adesão difusa (AD), o padrão de adesão agregativa (AA) ou um padrão indeterminado/não característico, além de amostras que apresentam-se não aderentes às células epiteliais *in vitro* (ABE et al., 2009;GOMES et al., 2004; MORA et al., 2009;SCALETSKY et al., 1999). Um estudo realizado por Benevides-Matos et al. (2015) demonstrou que em 90 cepas de aEPEC, isoladas de casos de diarreia, 61,1% apresentavam o padrão ALL, enquanto que nos casos controle 38,9% demonstraram este padrão de adesão.

Figura 2 - Padrões de adesão às células epiteliais encontrados em cepas de aEPEC



FONTE: Trabulsi, Keller e Gomes, 2002.

Por não produzirem BFP, as cepas de aEPEC produzem outras adesinas fimbriais que desempenham um importante papel biológico.

### 1 4 2 Adesinas fímbriais

Em bactérias patogênicas, as fímbrias, frequentemente, são fatores de adesão cruciais, que medeiam a ligação às células alvo, evasão do sistema imune do hospedeiro e formação de biofilme. Por este motivo, são consideradas importante alvo para drogas, necessitando o melhor entendimento de suas estruturas e mecanismo de montagem (CUSUMANO; HULTGREN, 2009; DURAND et al., 2009).

O genoma de cepas de *E. coli* patogênicas e não patogênicas contêm pelo menos 16 diferentes regiões que podem ser operons fimbriais (BLATTNER et al., 1997; PERNA et al., 2001). Trabalhos demonstraram que alguns destes operons fimbriais são expressos por *E. coli* patogênicas e desempenham papel importante na colonização, como os que expressam a fimbria tipo 1 (T1P) e a fímbria curli. O operon cromossomal *fim*, que codifica a T1P, é encontrado na maioria cepas de *E. coli* e em membros da família *Enterobacteriaceae*. Um dos papéis mais conhecidos que esta fímbria desempenha em *E. coli* patogênica é a interação da UPEC com receptores de células epiteliais encontradas no rim, desencadeando a infecção urinária (CONNELL et al., 1996). Outra função desempenhada por T1P é na formação de biofilme pela cepa 042 de EAEC (MOREIRA et al., 2003).

A fímbria longa polar (LPF) é importante na patogênese e virulência de *Salmonela enterica* serovar Typhimurium (BAUMLER; TSOLIS; HEFFRON, 1996; VAN DER VELDEN, 1998). Em *E. coli* O157:H7 estão presentes dois operons *lpf* homólogos ao operon *lpf* encontrado em *Salmonela* sevorar Typhimurium (PERNA et al., 2001), com sequência e funções similares (TORRES et al., 2002). Mutações nos dois operons *lpf* diminuíram a capacidade destas cepas de estabelecer e persistir na colonização em ovelhas e porcos por dois meses e reduziu, mas não eliminou a lesão A/E. Como estabelecido para diversas espécies bacterianas, mecanismos redundantes possibilitam que a bactéria sobreviva em diferentes ambientes, sendo assim, mutações em um sistema, como o operon *lpf*, pode não reduzir totalmente a chance de sobrevivência da população bacteriana (JORDAN et al., 2004).

Cepas de *E. coli* e *Salmonella enterica* expressam a adesina fimbrial denominada curli, que promove a agregação bacteriana (COLLINSON et al., 1993). Estudos demonstraram que em cepas de *E. coli* O157:H7, curli age junto com celulose a fim de colonizar o hospedeiro e formar biofilme (SALDAÑA et al., 2009). A fímbria curli também está associada com a formação de biofilme em baixas temperaturas em uma cepa O55:H7 de aEPEC (WEISS-MUSZKAT et al., 2010).

Em um estudo realizado por Hernandes et al. (2011) foi observado que em 98,6% das cepas de aEPEC, isoladas de casos de diarreia, apresentavam o gene *hcpA*, que codifica a pilina da fímbria tipo IV denominada HCP. Em EAEC, a presença do gene *aggA* (AAF/I) está associada com diarreia, já que foi observada a presença deste gene em 31 cepas de EAEC isoladas de casos de diarreia, enquanto

apenas em uma cepa isolada do caso controle (FLORES; OKHUYSEN, 2009). Estudos demonstram resultados similares, observando alta prevalência do gene *aggA* em cepas isoladas de pacientes com diarreia (PIVA et al., 2003). Estes dados demonstram que a prevalência de AAF tem uma provável relação com a região geográfica de onde as cepas são isoladas.

#### 1 4 2 1 E. coli common pilus (ECP)

Rendón et al. (2007) observaram em um ensaio de interação da cepa de EHEC EDL933 com células epiteliais em 6 h, um filamento fino e flexível, semelhante a uma fímbria que se prolongava por alguns micrometros da superfície bacteriana. Este filamento tinha a tendência de se agrupar, formando uma estrutura mais grossa que parecia mediar a interação bactéria-bactéria. A fim de caracterizar esta estrutura, foi realizada a purificação e sequenciamento, observando que o tamanho e a sequência do aminoácido N terminal desta estrutura era homologa com ao gene *yagZ* encontrado no genoma de EHEC O157:H7 (HAYASHI et al., 2001; PERNA et al., 2001), *E. coli* K-12 (BLATTNER et al., 1997), UPEC (WELCH et al., 2002) e ao gene *mat* de *E. coli* associada a meningite (NMEC) (POUTTU et al., 2001). A alta semelhança e frequência entre cepas de *E. coli*, levou a denominação desta fímbria de *E. coli common pilus* (ECP).

Uma dificuldade para todos os mecanismos de secreção em bactérias Gramnegativas, é a presença de duas membranas celulares, separadas pelo espaço periplasmático que é desprovido de fonte de energia como ATP e a força próton motora. Esses mecanismos aproveitam a energia intrínseca no dobramento da proteína para iniciar a montagem e, geralmente, necessitam de fatores extrínsecos como chaperonas para prevenir a polimerização no periplasma (ALLEN; PHAN; WAKSMAN, 2009) (Figura 3). Um mecanismo de secreção bastante estudado nas últimas duas décadas é o sistema chaperona/usher (WAKSMAN; HULTGREN, 2009; ZAV'YALOV et al., 2010). As fímbrias por ele secretadas são compostas por subunidades de aproximadamente 8 nm de largura e 2 nm de comprimento, ligadas a uma base na membrana externa da bactéria. Estas fimbrias são compostas por uma subunidade majoritária, denominada pilina, seguida por uma subunidade menor terminal e flexível, denominada *tip* ou adesina, que possui o domínio de ligação ao receptor. O número de subunidades e a conformação da adesina varia de acordo com a fímbria. Todas as subunidades da pilina possuem a mesma conformação, uma porção estrutural denominada *core*, e uma extensão N-terminal (Nte). Na adesina, ao invés da Nte, há um domínio de lectina que contém o sitio de ligação ao receptor.

Cada subunidade é secretada para o periplasma pela maquinaria do sistema Sec de secreção, sendo depois estabilizadas pela ligação a chaperonas (ALLEN; PHAN; WAKSMAN, 2009), pela interação denominada complementação pela cadeia doadora (CHOUDHURY et al., 1999; SAUER et al., 1999). Além de evitar a polimerização, a ligação com chaperonas também vai evitar a degradação das subunidades no periplasma. A montagem da fímbria ocorre na membrana externa, iniciada pela ligação do usher, formando um poro por onde as subunidades serão transportadas (REMAUT et al., 2008). Durante a polimerização das subunidades a porção Nte da subunidade a ser ligada substitui a chaperona da subunidade anterior, pelo mecanismo denominado substituição da cadeia doadora (SAUER et al., 2002; ZAVIALOV et al., 2003). Cada subunidade é ligada separadamente, e são "empurradas" através do poro formado pelo usher, sendo que a primeira subunidade incorporada é a adesina, assegurando a ligação do domínio lectina com o receptor.





FONTE: Allen, Phan e Waksman, 2012.

A montagem da adesina ECP requer o funcionamento de 6 genes que compõem o operon *ecp* (Figura 4), e possui a organização de operon fimbrial do tipo chaperonina/usher.

Figura 4 -	Representação	esquemática	do	operon	ecp,	formado	pelo	gene	ecpR	е
	ecpA ao ecpE.									



FONTE: Martínez-Santos, 2012

A fimbria ECP é construída a partir da pilina, codificada pelo segundo gene do operon, *ecpA*. O primeiro gene, *ecpR*, codifica a proteína EcpR, que é classificada como a provável proteína reguladora. Os genes *ecpB* e *ecpE* são descritos como prováveis chaperonas, enquanto que o gene *ecpC* é descrito como o *usher*. A adesina, a subunidade de ligação ao receptor, é codificada pelo gene *ecpD* (MARTÍNEZ-SANTOS, 2012). Analises iniciais da sequência de *ecpR* revelaram homologia com um regulador de *E. coli* denominado NarL, enquanto que análises de EcpB, EcpC e EcpE detectaram baixa, mas significante similaridade com uma variedade de proteínas chaperonas/usher da família de fímbria CU. A identidade na sequência de tEPEC é de aproximadamente 17% com as proteínas EcpC, EcpB e EcpE já descritas. Interessantemente, tanto EcpB quanto EcpE possuem função de chaperonas, o que é incomum no sistema chaperona-usher, já que usualmente é encontrada apenas uma chaperona.

Mutantes de *ecpA* em cepas de EHEC, EPEC e EAEC são menos aderentes às células HeLa do que as cepas selvagens produtoras de ECP (AVELINO et al., 2010; RENDÓN et al., 2007; SALDAÑA et al., 2009). Scaletsky e colaboradores (2010) demonstraram a presença do gene *ecpA* em 29 cepas de aEPEC de diferentes sorogrupos. Corroborando com estes dados, Hernandes e colaboradores (2011) observaram uma alta prevalência do gene *ecpA* em cepas de aEPEC isoladas de casos de diarreia, sendo este gene o segundo mais prevalente. Estudos recentes sugerem que ECP desempenha um papel mutuo na formação de biofilme e o reconhecimento da célula hospedeira, pela perda da capacidade de cepas de NMEC de aderirem a superfícies hidrofóbicas (LEHTI et al., 2010). No entanto, não existem muitas informações sobre a prevalência e produção da fímbria ECP em aEPEC.

Em um estudo realizado por Blackburn et al. (2009) foi avaliada a prevalência do gene *ecpA* em cepas de ETEC de diferentes regiões geográficas, com ou sem os

genes que codificam os fatores de colonização (CF). Em 80% destas cepas foi identificada a presença do gene que codifica a pilina EcpA, demonstrando que este gene está distribuído entre cepas de ETEC. Também foi avaliada a produção da fímbria e identificado que 58% das cepas produzem ECP.

ECP também vem sendo implicado como um fator de adesão que contribui para o padrão de adesão agregativo (AA) de EAEC às células epiteliais (AVELINO et al., 2010). Em cepas de tEPEC, ECP parece agir sinergicamente a BFP durante a formação do padrão de adesão LA, já que anticorpos contra ECP foram capazes de reduzir significantemente a adesão às células epiteliais de um mutante em *bfpA* (SALDAÑA et al., 2009).

Ainda não está bem estabelecido qual tipo de receptor da célula hospedeira a fímbria ECP se liga. Porém, foi observado que ECP interage com resíduos de arabinose de pectina e outros componentes da parede célular de plantas, facilitando a infecção de plantas por *E. coli* (ROSSEZ et al., 2014).

A alta incidência de cepas de DEC isoladas de crianças e adultos doentes ao redor do mundo, instiga a identificação de fatores de virulência determinantes para esse quadro clínico e melhor entendendimento do mecanismo de adesão destes patógenos às células do hospedeiro. A presença do gene *ecpA* em diferentes patotipos de DEC está bem estabelecida, porém a avaliação da presença e transcrição de todos os genes que compõem o operon, assim como a produção da fímbria em aEPEC ainda necessitam ser mais estudados.
# 2 OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a presença dos genes que compõem o operon *ecp* em cepas de aEPEC isoladas de casos de diarreia, assim como a transcrição destes genes e produção da fímbria ECP em diferentes condições de cultivo.

# **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### 3 1 Cepas bacterianas

Neste trabalho foram utilizadas quatro cepas bacterianas isoladas de um estudo epidemiológico realizado em Salvador - BA, Brasil. Essas cepas foram caracterizadas como aEPEC pela presença do gene *eae* (BUERIS et al., 2007) e ausência de genes que definem outros patotipos de DEC, da sequência que hibridiza com a sonda EAFe da expressão de BFP (ABE et al., 2009). As cepas foram selecionadas por apresentarem sorotipos distintos e diferentes perfis genéticos fimbriais (Tabela 1) (ABE et al., 2009; FREITAS et al., 2008; NARA et al., 2010).

Tabela 1 - Sorotipos e perfis genéticos fimbriais das cepas de aEPEC utilizadas neste trabalho.

Сера	Sorotipo	Genes fimbriais
BA2103	O26:H11	fimA, fimH, lpfAO113, lpfA1 (A1-B1), lpfA2 (A2-B1), ecpA
BA3378	O104:H2	fimA, fimH, pilS, ecpA
BA4132	O51:H48	fimA, fimH, lpfA1 (A1-B1), lpfA2 (A2-B1), ecpA
BA4147	O55:H7	fimA, fimH, papA, lpfA1 (A1-C[F]), ecpA

#### 3 1 1 Cepas controles

Neste estudo foi utilizada como controle positivo a cepa protótipo de tEPEC E2348/69 (O127:H6) (LEVINE et al., 1985). Como controle negativo foi utilizada a cepa de tEPEC 1551-2 (ONT:H-) não produtora da fímbria ECP (HERNANDES et al., 2008).

# 3 2 Meios de cultivo

3 2 1 Luria Bertani (LB)	mg/L
Triptona	10.000
NaCl	10.000
Extrato de levedura	5.000
H <sub>2</sub> O destilada	q.s.p

Após o preparo, o meio foi autoclavado a 120°C durante 20 minutos.

# 3 2 2 Meio essencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)

Sais inorgânicos	mg/L
Cloreto de cálcio 2H2O	265,00
Nitrato férrico 9H <sub>2</sub> O	0,10
Sulfato de magnésio (anidro)	97,72
Cloreto de potássio	400,00
Cloreto de sódio	6400,00
Fosfato de sódio (anidro)	109,00

Aminoácidos	mg/L
Glicina	30,00
Hidrocloreto de L-Arginina	84,00
Dihidrocloreto de L-Cistina	62,57
L-Glutamina	584,00
Hidrocloreto de L-Histidina monohidratado	42,00
L-Isoleucina	105,00
L-Leucina	105,00
Hidrocloreto de L-Lisina	146,00
L-Metionina	30,00
L-Fenilalanina	66,00

L-Serina	42,00
L-Treonina	95,00
L-Triptofano	16,00
L-Tirosina (Sal dissódico)	103,79
L-Valina	94,00
Vitaminas	mg/L
Cloreto de Colina	4,00
D-Ca-Pantotenato	4,00
Ácido Fólico	4,00
Nicotinamida	4,00
Hidrocloreto de Piridoxina	4,00
Riboflavina	0,40
Hidrocloreto de Tiamina	4,00
i-Inositol	7,20
Outros	mg/L
D-Glicose	1000,00
Vermelho Fenol (Sal Sódico)	15,90
Piruvato de sódio	110,00

## 3 3 Cultivo de células HeLa

As células HeLa, originárias de carcinoma cervical (SCHERER; SYVERTON; GEY, 1953), foram compradas do Instituto Adolfo Lutz. Estas células foram mantidas através de cultivos sucessivos, em frascos apropriados para cultura de células contendo meio essencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) acrescido de gentamicina e de soro fetal bovino (SFB). Os frascos foram incubados a 37 °C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> e o meio de cultura trocado a cada 2 dias.

Para o sub-cultivo, após a formação da monocamada celular na superfície do frasco, a cultura foi lavada com solução PBS (salina tamponada com fosfato) e descolada com a adição de solução de associação tripsina-versene (ATV). A ATV foi

inativada com adição de meio DMEM 10% SFB (soro fetal bovino) e as células transferidas para um novo frasco.

#### 3 4 Condições de cultivo bacteriano

As cepas bacterianas foram inicialmente cultivadas a partir de estoque congelado a – 20 °C em meio Luria Bertani (LB) a 37 °C por 16-18 h sem agitação. Em seguida, foram cultivadas nos meios LB, DMEM e DMEM pré-condicionado a 37°C sem agitação, até atingirem A<sub>600nm</sub> entre 0,5 – 0,6.

## 3 4 1 Obtenção de DMEM pré-condicionado

Para a obtenção do meio DMEM pré-condicionado, após a obtenção da monocamada de células HeLa, estas foram lavadas duas vezes com PBS e adicionado DMEM sem SFB e gentamicina, por 48 horas. O sobrenadante foi recuperado, centrifugado por 10 min a 13.000 x g e utilizado para os cultivos bacterianos no mesmo dia.

#### 3 5 Confirmação do padrão de adesão das cepas de aEPEC

Como descrito anteriormente, após a formação de monocamada celular e descolamento das células com ATV, as células foram centrifugadas a 185 x g por 5 min e ressuspensas em DMEM para contagem em câmara de Neubauer. Após contagem, as células foram distribuídas com concentração final de 5 x 10<sup>4</sup> células/poço em microplacas de 24 poços contendo lamínulas de vidro. As microplacas foram incubadas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, até confluência de 70% ou 48 horas.

Ao ser atingida a confluência de 70%, o meio de cultivo da microplaca foi retirado e adicionado 980 µL de DMEM sem antibiótico com 2% de SFB e 1% de manose. As culturas bacterianas foram cultivadas em caldo LB e 20 µL deste cultivo foram adicionados aos poços da microplaca, incubadas por 3 h a 37 °C. Após este período, os poços foram lavados 3 vezes com PBS e adicionado 1 mL do mesmo meio para manutenção de pH e nutrientes, seguido de incubação de mais 3 h a 37°C. Com o total de 6 h de incubação, os poços foram novamente lavados 3 vezes

com PBS e as células fixadas com metanol absoluto por 30 min à temperatura ambiente. Já fixadas, as células foram então coradas por 5 min com corante May Grünwald, diluído 1:2 em tampão Sorensen (8,6 mM de fosfato de potássio monobásico, 28,6 mM de fosfato de sódio dibásico). Em seguida o corante foi desprezado e acrescentada a solução corante Giemsa diluída a 1:2 em tampão Sorensen por 20 min. Após lavagem para retirada do excesso de corante, as lamínulas foram secas à temperatura ambiente, montadas em lâminas de vidro com Entellan e observadas ao microscópio óptico, com aumento de 1000X.

# 3 6 Confirmação do perfil genético fimbrial das cepas bacterianas por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para confirmar o perfil genético fimbrial descrito na Tabela 1, foram realizadas reações de PCR com as sequências dos pares de iniciadores, as temperaturas de anelamento e o tamanho dos fragmentos amplificados de cada gene, descritos na Tabela 2.

Gene	Linhagens controle	Seqüências (5´- 3´)	Temperatura anelamento (°C)	Tamanho fragmento (pb)	Referências
fimA	J96 (+) / UEL13 (–)	(F) CTG TCG GCT CTG TCC CTC AGT	65	161	Nowrouzian et al., 2005
		(R) GAT GCG GTA CGA ACC TGT CCT AA			
fimH	J96 (+) / UEL13 (–)	(F) GAC GTC ACC TGC CCT CCG GTA	63	508	Hernandes, 2006
		(R) TGC AGA ACG GAT AAG CCG TGG			
рарА	J96 (+) / UEL13 (–)	(F) CAC ATT ATC ACC ATC TTT C	53	306	Nara, 2012
		(R) TCT ATT GAT TTT GGA CAG C			
есрА	E2348/69 (+) / S. aureus ATCC (-)	(F) GCC GCT GAT GAT GGA GAA AG	56	640	Saldaña et al., 2009
		(R) GCA ACA GCC AAA AAA GAC ACC			Nara, 2012
pilS	C1096 (+) / C600 (–)	(F) GGATCCATGAGCGTCATAACCTGTTC	53	537	Freitas, 2012
		(R) AAGCTTTTAACTGTTGGTTTCCAGTTT			
pilV	C1096 (+) / C600 (–)	(F) GGATCCATGCAAAAAGACAACGATAA	53	1194	Freitas, 2012
		(R) AAGCTTTTAATTGAGCGTTACACACG			
lpfA O113	STEC50 (+) / DH5α (–)	(F) ATG AAG CGT AAT ATT ATA G	52	573	Doughty et al., 2002
		(R) TTA TTT CTT ATA TTC GAC			
lpfA1 (A1-B1)	FV10094 (+) / C600 (-)	(F) AAG TCT GTA TTT ACT GCT ATG	57	273	Torres et al., 2009
		(R) GAA ATA CAG AAC GGT CTG A			
lpfA1 (A1-C [F])	FV10106 (+) / DH5α (–)	(F) GGT TGG TGA CAA ATC CCC G	60	273	Torres et al., 2009
		(R) GAG AAC CGT CTG GCC TGT TT			
lpfA2 (A2-B1)	FV10132 (+) / C600 (–)	(F) GGTAGTCTGGCGTCGCCACAGA	60	207	Torres et al., 2009
		(R) AAT ACG AAT ACC AAC GCC G			

Tabela 2 - Condições de amplificação dos genes fimbriais para ensaios de PCR

#### 3 6 1 Extração de DNA bacteriano

As cepas bacterianas foram cultivadas em meio LB a 37 °C por 16 - 18 h sem agitação. Para a extração do DNA bacteriano, 1 mL deste cultivo foi centrifugado por 2 min a 14.500 x g. O sedimento foi ressuspenso em 500 µL de água ultrapura estéril e submetido a choque térmico, por fervura a 100 °C por 15 min, seguido porresfriamento em banho de gelo. Para a eliminação de restos bacterianos, o lisado foi centrifugado por 5 min a 14.500 x g e o sobrenadante coletado para a realização das reações de PCR.

#### 3 6 2 Detecção dos genes fimbriais por PCR

As reações foram preparadas em banho de gelo, em microtubos de polipropileno com 20 pmol de cada um dos iniciadores (*forward* e *reverse*), 2,0 mM de cloreto de magnésio, 200 µM da mistura de dNTPs (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 2,5 µL de tampão de reação de PCR 10 X (Invitrogen, EUA), 1,5 U de *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, EUA) e água ultrapura estéril para um volume final de 25 µL. Em cada reação foi adicionado 1 µL do DNA molde, obtido em extração de lise por fervura, descrito anteriormente. Em seguida, as preparações foram colocadas em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, EUA) e submetidas às condições de amplificação: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento por 1 min, extensão a 72 °C por 1 min,

Após amplificação, 5 µL de cada reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,0 % em tampão TAE (40 mM de tris-acetato; 2 mM de ácido etilenodiaminotetracético). Como marcadores de peso molecular foi utilizado *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen). A migração foi realizada sob voltagem constante de 80 V em tampão TAE. Ao término da corrida, os géis foram fotografados com o auxílio do sistema de imagem *AlphaImager*<sup>™</sup>2200 (Alpha Innotech, Alemanha).

#### 3 7 Avaliação da presença do operon *ecp* nas cepas bacterianas por PCR

Para avaliar a presença do operon *ecp* nas cepas bacterianas foram realizadas reações de PCR com as sequências dos pares de iniciadores, as temperaturas de anelamento e o tamanho dos fragmentos amplificados de cada gene, descritos na Tabela 3.

Gene	Temperatura anelamento (°C)	Mg (mM)	Produto de amplificação (pb)	Sequência dos iniciadores
есрА	56	2,0	640	(F) ACCTCGGGAAGAAAAGCAA
				(R) CAATTCCGTCCAGGAATAAA
есрВ	47	1,5	780	(F) TCTGATGTACCAGCAGGG
				(R) CTTTCAGTCCTGGGGAGA
ecpC	57	1,0	1130	(F) ACGACAATGCCTTTACGAG
				(R) CGATCCATATGAAAGCTACG
ecpD	56	1,0	760	(F) AGTTTGTGTTTGTCGAAAAC
				(R) GCCGAGGCTAACGACGA
ecpE	47	2,0	925	(F) AGTTTGTGTTGTCGAAAACA
				(R) GCCGAGGCTAACGACGA
ecpR	57	2,0	683	(F) CTGTAAAAATTATAGGTTTG
				(R) ACCAGAGCTATTGCCAGA

Tabela 3 - Condições de amplificação dos genes do operon *ecp* para ensaio de PCR.

FONTE: Vasconcellos, 2014

As reações foram preparadas em banho de gelo, em microtubos de polipropileno, com as concentrações de cloreto de magnésio descritas na Tabela 3, de acordo com cada gene, 20 pmol de cada um dos iniciadores (*forward* e *reverse*), 200 µM da mistura de dNTPs (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 2,5 µL de tampão de reação de PCR 10 X (Invitrogen), 1,5 U de *Taq DNA Polymerase*Platium (Invitrogen) e água ultrapura estéril para um volume final de 10 µL.

Após amplificação, 5 µL de cada reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,0 % em tampão TAE (40 mM de tris-acetato; 2 mM de ácido etilenodiaminotetracético). Como marcadores de peso molecular foi utilizado *1 Kb* 

*Plus DNA Ladder* (Invitrogen). A migração foi realizada sob voltagem constante de 80 V em tampão TAE. Ao término da corrida, os géis foram fotografados com o auxílio do sistema de imagem *Alphalmager*<sup>™</sup>2200 (Alpha Innotech).

## 3 8 Avaliação da transcrição do operon ecp

3 8 1 Desenho dos iniciadores para ecpE

Para a avaliação da transcrição do operon *ecp* foi necessário a síntese de novos iniciadores do gene *ecpE* devido a amplificações inespecíficas nas reações de PCR.

Para o desenho dos iniciadores foi utilizada a sequência da cepa protótipo de tEPEC E2348/69 retirada da base de dados Genbank (código do genoma: "FM180568.1" e código do gene *ecpE*: "/locus\_tag="E2348C\_0245". O programa utilizado para o desenho dos iniciadores foi *Primer Premier* 6. A sequência dos iniciadores, temperatura de anelamento e tamanho do produto de amplificação estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 - Sequência dos iniciadores e produto de amplificação do gene ecpE.

Gene	Sequência dos iniciadores	Temperatura	Produto de
		anelamento	amplificação
ecpE	(F) CGGTGGATGGTGAACTACTT	60 ° C	458 pb
	(R) CGGACAGGAATCCGTTAATCT		

3 8 2 Extração de RNA bacteriano e obtenção de cDNA

As cepas bacterianas foram cultivadas em meio LB, DMEM e DMEM précondicionado até atingir a fase intermediária do crescimento logarítmico (A<sub>600nm</sub> entre 0,5 – 0,6).Em seguida, 3 mL de cada cultivo bacteriano foram centrifugados a 4.000 x g por 5 min (Centrifugue 5402, Eppendorf, Alemanha), os sedimentos obtidos ressuspensos em 1 mL do próprio meio de cultivo e utilizados para a extração de RNA com o auxílio do *RNA Protect e RNeasy Mini kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com as recomendações do fabricante. Após a extração, os RNAs bacterianos foram submetidos à reação de digestão com DNAse, utilizando o kit *DeoxyribonucleaselAmplification Grade* (Invitrogen), a fim de digerir todo o DNA bacteriano remanescente para a obtenção de RNA sem contaminantes. As reações foram preparadas em banho de gelo, em microtubos estéreis (Axygen, Corning, Nova York, EUA), sendo adicionados 5 µL de RNA total, 1 µL de tampão de reação DNAse I, 10 U de enzima *DNAse I* e 3 µL de água DNAse/RNAse free. As preparações foram incubadas a 37 °C por 30 min e em seguida foi adicionado a cada tubo 2,5 mM de EDTA, com incubação a 75 °C por 10 min. Para visualizar se não havia contaminação com DNA, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 1% com 1 µL do material tratado.

A pureza do RNA obtido para cada amostra foi quantificada por espectrofotômetro, por leitura de absorbâncias em comprimentos de onda de 260 e 280 nm (Ultrospec 2100 pro, Amersham / Biosciences, EUA).

Ao término da digestão, os cDNAs foram sintetizados utilizando a mesma concentração de RNA para cada cepa, com o kit *SuperScrip III First-Strand Synthesis Systems for RT-PCR* (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante. A seguir, as preparações foram colocadas em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems) e submetidas a 25 °C por 10 min, 50 °C por 50 min, seguido de 85 °C por 5 min.

3 8 3 Análise da transcrição dos genes do operon ecp.

Após a obtenção do cDNA a partir do RNA bacteriano, as amostras foram submetidas ao ensaio de PCR. As sequências de iniciadores, as temperaturas de anelamento e o tamanho dos fragmentos amplificados de cada gene estão descritos nas Tabelas 3 e 4. Após amplificação, 5 µL de cada reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% e fotografados com o auxílio do sistema de imagem *AlphaImager*™2200 (Alpha Innotech).

Como controle da integridade dos cDNA foram utilizados iniciadores para o gene constitutivo *rpoA*. O produto de amplificação e a sequência dos iniciadores utilizados estão descritos na Tabela 5.

Gene	Sequência dos iniciadores	Temperatura	Produto de
		anelamento	amplificação
rpoA	(F) AGTCAATTCCAGATCGTCA	60 ° C	656 pb
	(R) GTATTCTGCTCTCATCGAT		

Tabela 5 - Sequência dos iniciadores e produto de amplificação do gene rpoA.

FONTE: Freitas, 2012

#### 3 9 Avaliação da produção de ECP por ensaio de imunofluorescência

Para o ensaio de imunofluorescência as cepas bacterianas foram cultivadas como descrito anteriormente. Após o período de incubação, as cepas foram centrifugadas por 5 min a 900 x g e o sedimento fixado em lâminas de vidro com p-formaldeído 4% a 4 °C por 18 horas. As lâminas foram lavadas duas vezes com PBS, bloqueadas com 10% de soro de cabra em PBS (PBS-SC) por 1 h a temperatura ambiente, seguido de incubação com anticorpo de coelho anti-EcpA diluído 1:1000 em PBS-SC a 4 °C por 18 h. As lâminas foram novamente lavadas duas vezes com PBS e incubadas com soro de cabra anti-IgG de coelho conjugado ao FITC, diluído 1:500 em PBS-SC a temperatura ambiente por 1 h. Após a incubação, as lâminas foram lavadas duas vezes com PBS e montadas com *antifade vectashield* (Vector Laboratories, California, EUA), para manter a fluorescência, e lamínulas de vidro. A imunofluorescência foi visualizada no Microscópio de imunofluorescência Zeiss com aumento de 1000 X e Microscópio confocal de varredura a laser (LSM 510 META, Zeiss)

O soro de coelho anti-EcpA utilizado nos ensaios foi gentilmente cedido pelo Dr. Jorge A Girón, da Universidade da Florida, Estados Unidos.

#### 4 RESULTADOS

O objetivo inicial do trabalho era avaliar a importância de adesinas fimbriais no padrão de adesão ALL de cepas de aEPEC. Por esse motivo foi de extrema importância confirmar o padrão de adesão das cepas de aEPEC selecionadas para o trabalho, assim como o perfil genético fimbrial das mesmas.

## 4 1 Confirmação do padrão de adesão das cepas de aEPEC

Para confirmar a classificação das cepas de aEPEC selecionadas como padrão de adesão ALL, foi realizado o ensaio de interação bacteriana com células HeLa.

Na Figura 5 pode ser observada a presença de agrupamentos bacterianos frouxos sobre as células, nos ensaios realizados com as quatro cepas, o que caracteriza o padrão de adesão ALL. Como controle positivo foi utilizada a cepa E2348/69 com o padrão de adesão AL com ensaio de interação em 3 h.

Figura 5 - Ensaio de Interação bacteriana com células epiteliais HeLa, com período de 6 h de incubação (3 h + 3 h).



A: BA2103 B: BA3378 C:BA4132 D:BA4147 E: E2348/69F: Controle de células HeLa sem infecção com cepas bacterianas. Aumento de 1000X.

#### 4 2 Confirmação do perfil genético fimbrial

Além de confirmar o padrão ALL das cepas de aEPEC selecionadas, foi necessário confirmar o perfil genético fimbrial previamente descrito por Freitas (2008) e Nara (2012), a fim de garantir a variabilidade fimbrial entre as cepas a serem estudadas. Para isso, foi pesquisada por PCR a presença dos genes que codificam a fímbria do tipo I (*fim A* e *fim H*), fímbria Pil (*pi/S* e *pi/V*), fímbria ECP (*ecpA*), fímbria P (*papA*) e fímbria LPF com suas variantes (*IpfA1 (A1-B1), IpfA1 (A1-C*<sub>*IFJ*</sub>), *IpfA2 (A2-B1)* e *IpfA*<sub>0113</sub>).

Como observado na Figura 6, todas as cepas apresentam os genes que representam as fímbrias ECP (384 pb) e do tipo I (161 e 508 pb), pela presença de produtos de amplificação nas canaletas 1, 2 e 3, respectivamente. O gene *pilS* (canaleta 9 - 537 pb), que codifica a proteína estrutural da fímbria Pil, foi encontrado apenas na cepa BA3378, enquanto que as variantes da fímbria LPF (canaletas 5 a 8 - 273, 273, 207 e 573 pb respectivamente) foram observadas diferencialmente em cada cepa. Tanto o gene *pilV* (canaleta 10 - 1194 pb) quanto o gene *papA* (canaleta 11 - 306 pb) não foram observados em nenhuma das cepas.





**A:** BA2103 **B:** BA3378 **C:** BA4132 **D:** BA4147 **PM.**Padrão de peso molecular (1 Kb Plus) **1:** *ecpA* **2:** *fimA* **3:** *fimH* **4:** *lpfA1* (A1 - B1) **5:** *lpfA1* (A1 - C<sub>[F]</sub>) **6:** *lpfA2* (A2 - B1) **7:** *lpfA*<sub>0113</sub> **8:** *pilS* **9:** *pilV* **10:** *papA.* 

A Tabela 6 apresenta o perfil genético fimbrial das cepas de aEPEC observado a partir dos ensaios de PCR.

Tabela 6 - Perfil genético fimbrial das cepas de aEPEC.

Сера	Genes fimbriais
BA2103	fimA, fimH, ecpA, lpfA1 (A1-B1), lpfA2 (A2-B1), lpfA <sub>0113</sub>
BA3378	fimA, fimH, pilS, ecpA
BA4132	fimA, fimH, ecpA, lpfA1 (A1-B1), lpfA1 (A1-C <sub>[F]</sub> ), lpfA2 (A2-B1)
BA4147	fimA, fimH, ecpA, lpfA1 (A1-C <sub>[F]</sub> )

Em um estudo realizado por Nara (2012) foi avaliada a presença de genes codificadores de adesinas fimbriais utilizando 63 cepas de aEPEC com diferentes sorotipos e padrões de adesão. Neste estudo, foi observada a presença do gene *ecpA* em 100% das cepas testadas. Apesar da alta prevalência, o número de cepas de aEPEC que apresentaram os genes que codificam a fimbria do tipo I (fim A e fimH) não chegou a 100%.

Como foi confirmado que todas as cepas de aEPEC selecionadas para o presente trabalho apresentam o gene *ecpA*, a fímbria ECP foi selecionada para a avaliação da transcrição dos genes que a codificam e sua produção em diferentes condições de cultivo bacteriano.

#### 4 3 Avaliação da presença do operon ecp nas cepas bacterianas

Para avaliar a transcrição do operon *ecp*, determinamos a presença dos cinco genes que compõem este operon nas cepas de aEPEC. Na Figura 7 são observados os produtos de amplificação dos ensaios de PCR, referente aos genes do operon *ecp* (canaletas 1 a 5), o que determina que todas as cepas estudadas apresentam o operon completo.

Figura 7- Perfil eletroforético das reações de PCR para amplificação dos genes do operon *ecp* nas cepas de aEPEC.



A: BA2103, B: BA3378, C: BA4132, D: BA4147. PM: Padrão de peso molecular (1 Kb Plus) 1:ecpA 2:ecpB 3:ecpC 4:ecpD 5:ecpE.

Além dos genes que compõem o operon, foi avaliada a presença do gene regulador do operon*ecp*, *ecpR*. Na Figura 8 são observados (canaletas 1 a 6) produtos de amplificação de 683 pb, o que determina que todas as cepas apresentam o gene *ecpR*, inclusive o controle negativo 1551-2.

Figura 8 - Perfil eletroforético das reações de PCR para amplificação do gene ecpR nas cepas de aEPEC.



**PM:** Padrão de peso molecular (1 Kb Plus) **1:** BA2103 **2:** BA3378 **3:** BA4132 **4:** BA4147 **5:** E2348/69 **6:** 1551-2.

A cepa 1551-2 foi selecionada para ser utilizada como controle negativo por ser uma EPEC atípica não produtora da fímbria ECP. Para avaliar se esta cepa não possuia nenhum dos genes do operon *ecp*, foi realizada uma reação de PCR com todos os genes que compõem o operon. Na Figura 9 não são observados os produtos de amplificação referente aos genes *ecpA*, *ecpB*, *ecpC* e *ecpD* (canaletas 1 a 4), o que determina que estes não estão presentes nesta cepa de aEPEC. Nas canaletas 5 e 6 são observados fragmentos de amplificação de 458 e 683 pb, o que determina que esta cepa de aEPEC apresenta os genes que codificam *ecpE*, chaperona e o gene regulador *ecpR*.

Figura 9 - Perfil eletroforético das reações de PCR para amplificação dos genes do operon *ecp* na cepa 1551-2.



PM: Padrão de peso molecular (1 Kb Plus), 1: ecpA, 2: ecpB, 3: ecpC, 4: ecpD, 5: ecpE, 6: ecpR.

Com os resultados obtidos foi possível determinar que todas as cepas possuem todos os genes do operon *ecp* e seu regulador, e assim avaliar a transcrição deste operon em diferentes condições de cultivo.

#### 4 4 Avaliação da transcrição do operon ecp e do gene regulador

A avaliação da transcrição do operon *ecp* foi iniciada com as cepas bacterianas cultivadas em meio LB. Após a extração do RNA e obtenção do cDNA, foi realizada uma reação de PCR como gene *rpoA* para determinar a integridade do material genético.

Com a observação de produtos de amplificação de 656 pb (Figura 10), foi possível determinar que o cDNA de todas as cepas analisadas estava íntegro e poderiam ser utilizados nas próximas reações de PCR.

Figura 10 - Perfil eletroforético das reações de PCR utilizando o cDNA originado do cultivo bacteriano em meio LB para amplificação do gene *rpoA*.



**PM:** Padrão de peso molecular (1 Kb Plus) **1**: BA2103 **2**: BA3378 **3**: BA4132 **4**: BA4147 **5**: E2348/69 **6**: 1551-2

A avaliação da transcrição do operon *ecp* foi realizada utilizando os iniciadores e tempos de anelamento descritos nas Tabelas 3 e 4. Nesta condição de cultivo bacteriano, os genes que compõem o operon *ecp* foram transcritos nas cepas BA2103 e BA4132 (Figura 11, canaletas 1 e 3, A-F). Já na cepa BA4147 foram transcritos todos os genes do operon, exceto o regulador *ecpR* (canaleta 4, A-F). Na cepa BA3378 apenas os genes *ecpA* e *ecpE* foram transcritos (canaleta 2, A-F).

Figura 11 - Perfil eletroforético das reações de PCR utilizando o cDNA originado do cultivo bacteriano em meio LB para amplificação dos genes do operon *ecp*.



A:ecpA B:ecpB C:ecpC D:ecpD E:ecpE F:ecpR PM:Padrão de peso molecular (1 Kb Plus) 1:BA2103 2:BA3378 3:BA4132 4:BA4147 5:E2348/69 6:1551-2.

Para avaliar se a transcrição do operon *ecp* é influenciada pela condição em que as cepas de aEPEC são cultivadas, a transcrição deste operon foi avaliada após cultivo bacteriano em meio DMEM.

Para avaliar a transcrição do operon *ecp* em meio DMEM foi realizada a extração do RNA e obtenção do cDNA, seguido de reação de PCR com o gene *rpoA* para determinar a integridade do material genético.

Com a observação de produtos de amplificação de 656 pb (Figura 12), foi possível determinar que todos os cDNA estavam íntegros e poderiam ser utilizados nas próximas reações de PCR.

Figura 12 - Perfil eletroforético das reações de PCR utilizando o cDNA originado do cultivo bacteriano em meio DMEM para amplificação do gene *rpoA*.



**PM:** Padrão de peso molecular (1 Kb Plus) **1**: BA2103 **2**: BA3378 **3**: BA4132 **4**: BA4147 **5**: E2348/69 **6**: 1551-2

A avaliação da transcrição do operon *ecp* foi realizada utilizando os iniciadores e tempos de anelamento descritos na Tabela 3. Nesta condição de cultivo bacteriano, todos os genes do operon *ecp* foram transcritos na cepa BA4132 (Figura 13, canaleta 3, A - F). Apesar da aparente baixa transcrição de *ecpR*, todos os genes do operon foram transcritos na cepa quando cultivada em meio DMEM (canaleta 1, A - F). O gene regulador *ecpR* passou a ser transcrito na cepa BA4147, então todos os genes do operon *ecp* passaram a ser transcritos nesta condição (canaleta 4, F). Com o cultivo realizado em DMEM, os genes *ecp B*, *ecpC* e *ecpD* passaram a ser transcritos, o que não aconteceu com o gene *ecpR* (canaleta 2, A - F).

Figura 13 - Perfil eletroforético das reações de PCR utilizando o cDNA originado do cultivo bacteriano em meio DMEM para amplificação dos genes do operon *ecp*.



A:ecpA B:ecpB C:ecpC D:ecpD E:ecpE F:ecpR PM:Padrão de peso molecular (1 Kb Plus) 1:BA2103 2:BA3378 3:BA4132 4:BA4147 5:E2348/69 6:1551-2.

Como foi observado uma transcrição diferencial do operon *ecp* quando o cultivo bacteriano foi realizado em meio LB e DMEM, também foi avaliada a transcrição em meio DMEM pré-condicionado, ou seja, com a presença de sinalizadores celulares.

Assim como nas condições de cultivo anteriores, a avaliação da transcrição do operon *ecp* foi realizada utilizando os cDNA obtidos a partir de RNA extraído do cultivo bacteriano em meio DMEM pré-condicionado. Para determinar a integridade dos cDNAs foi realizada uma reação de PCR utilizando iniciadores para o gene constitutivo *rpoA* descrito em 4 4.

Na Figura 14 são observados fragmentos de 656 pb referente ao gene *rpoA*, o que determinou que todos os cDNAs obtidos continham o gene constitutivo, possibilitando sua utilização nas próximas reações de PCR.

Figura 14 - Perfil eletroforético das reações de PCR utilizando o cDNA originado do cultivo bacteriano em meio DMEM pré-condicionado para amplificação do gene *rpoA*.



**PM:** Padrão de peso molecular (1 Kb Plus) **1**: BA2103 **2**: BA3378 **3**: BA4132 **4**: BA4147 **5**: E2348/69 **6**: 1551-2

Quando o cultivo bacteriano foi realizado em meio DMEM contendo sinalização celular, em todas as cepas o operon *ecp* completo, inclusive o gene regulador, foi transcrito (Figura 15). Surpreendentemente, na cepa utilizada como controle negativo 1551-2 o gene regulador também foi transcrito nesta condição de cultivo bacteriano.

Figura 15 - Perfil eletroforético das reações de PCR utilizando o cDNA originado do cultivo bacteriano em meio DMEM pré-condicionado para amplificação dos genes do operon *ecp*.



A:ecpA B:ecpB C:ecpC D:ecpD E:ecpE F:ecpR PM:Padrão de peso molecular (1 Kb Plus) 1:BA2103 2:BA3378 3:BA4132 4:BA4147 5:E2348/69 6:1551-2.

Para verificar se a produção da fímbria ECP também é influenciada pela condição de cultivo bacteriano, foram realizados ensaios de imunofluorescência com as cepas cultivadas nas mesmas três condições descritas anteriormente.

## 4 5 Avaliação da produção de ECP por ensaio de imunofluorescência

Após a avaliação da transcrição do operon *ecp* nas diferentes condições de cultivo, foi avaliada a produção da fímbria ECP com o cultivo bacteriano realizado no meio LB.

Apesar de nas cepas BA2103 e BA4132 o operon completo e o regulador terem sido transcritos quando estas foram cultivadas em meio LB, apenas a BA2103 produziu a fímbria, como demonstrado na Figura 16 - A e C, respectivamente.

Corroborando com os resultados demonstrados, as cepas BA3378 e BA4147 não produziram a fímbria, já que nesta condição o gene regulador não foi transcrito em ambas as cepas e o gene do *usher*, ou seja, a âncora da fímbria, não foi transcrito na cepa BA3378. Figura 16- Detecção de ECP nas cepas bacterianas cultivadas em meio LB por ensaio de imunofluorescência. Soro de coelho anti-EcpA (1:1000) e soro de cabra anti-IgG de coelho conjugado ao FITC (1:500). Aumento 1000X.



A: BA2103 B: BA3378 C: BA4132 D: BA4147 E: E2348/69 F: 1551-2.

A fim de determinar se a produção da fímbria tem o mesmo padrão da transcrição do operon *ecp*, a produção de ECP também foi avaliada com o cultivo bacteriano realizado em meio DMEM.

Nesta condição de cultivo, foi observada a produção de ECP pelas cepas BA2103, BA4132 e BA4147 (Figura 17, A, C e D, respectivamente). Apesar do gene que codifica o *usher* ser transcrito quando a cepa BA3378 foi cultivada em meio DMEM, esta cepa não produziu a fímbria (Figura 17, B).

A fim de avaliar se as condições de cultivo das cepas de aEPEC influenciavam no tamanho da população bacteriana que produz a fímbria ECP, o ensaio de imunofluorescência também foi avaliado por microscopia confocal. Na microscopia confocal é possível avaliar o ensaio de imunofluorescência de maneira diferente da microscopia de imunofluorescência normal, já que tem a capacidade de em uma mesma lâmina observar diferentes camadas do material.

Na Figura 18 é demonstrada apenas uma camada das diversas avaliadas por microscopia confocal. As cepas BA2103 e BA4132 apresentaram um maior número de bactérias produtoras da fímbria ECP (Figura 18, A e C), diferentemente da cepa BA4147 (Figura 18, D) com um menor número de bactérias produtoras da fímbria ECP.

Não foi possível avaliar a produção da fímbria ECP por microscopia confocal com o cultivo bacteriano realizado em meio LB.

Figura 17 - Detecção de ECP nas cepas bacterianas cultivadas em meio DMEM por ensaio de imunofluorescência. Soro de coelho anti-EcpA (1:1000) e soro de cabra anti-IgG de coelho conjugado ao FITC (1:500). Aumento 1000X.



A: BA2103 B: BA3378 C: BA4132 D: BA4147 E: E2348/69 F: 1551-2.

Figura 18 - Microscopia confocal para detecção de ECP nas cepas bacterianas cultivadas em meio DMEM por ensaio de imunofluorescência. Soro de coelho anti-EcpA (1:1000) e soro de cabra anti-IgG de coelho conjugado ao FITC (1:500). Aumento 1000X.



A:BA2103 B:BA3378 C:BA4132 D:BA4147 E:E2348/69 F.1551-2. 1 e 3: Foto da microscopia com filtro para FITC. 2 e 4: Foto da microscopia sem filtro para FITC.

Para avaliar se a sinalização celular poderia influenciar na produção de ECP, também foi realizado o ensaio de imunofluorescência com as bactérias cultivadas em DMEM pré-condicionado.

Com o cultivo bacteriano realizado em meio DMEM pré-condicionado, foi observada a produção de ECP pelas cepas BA2103, BA4132 e BA4147 (Figura 19, A, C e D, respectivamente). Mesmo com a transcrição do gene regulador na cepa BA3378, não foi observada a produção da fímbria (Figura 19, B).

O ensaio de imunofluorescência com cultivo bacteriano em meio DMEM précondicionado também foi observado por microscopia confocal. Nesta condição de cultivo, pode ser observada uma maior intensidade na fluorescência e uma maior população bacteriana produzindo a fímbria ECP nas três cepas produtoras: BA2103, BA4132 e BA4147 (Figura 20, A, C e D), quando comparada com o cultivo bacteriano em meios LB e DMEM. Figura 19 - Detecção de ECP nas cepas bacterianas cultivadas em meio DMEM précondicionado por ensaio de imunofluorescência. Soro de coelho anti-EcpA (1:1000) e soro de cabra anti-IgG de coelho conjugado ao FITC (1:500). Aumento 1000X.



A: BA2103 B: BA3378 C: BA4132 D: BA4147 E: E2348/69 F: 1551-2.

Figura 20 - Microscopia confocal para detecção de ECP nas cepas bacterianas cultivadas em meio DMEM pré-condicionado por ensaio de imunofluorescência. Soro de coelho anti-EcpA (1:1000) e soro de cabra anti-IgG de coelho conjugado ao FITC (1:500). Aumento 1000X.



A: BA2103 B: BA3378 C: BA4132 D: BA4147 E: E2348/69 F: 1551-2. 1 e 3: Foto da microscopia com filtro para FITC. 2e 4: Foto da microscopia sem filtro para FITC.

Na Tabela 7 estão resumidos os resultados dos ensaios de PCR avaliando a transcrição do operon *ecp* e de seu regulador com o cultivo bacteriano realizado nos meios LB, DMEM e DMEM pré-condicionado.

		BA2103	BA3378	BA4132	BA4147
-	ecpR	+	-	+	-
LB	ecpA	+	+	+	+
	ecpB	+	-	+	+
	ecpC	+	-	+	+
	ecpD	+	-	+	+
	ecpE	+	+	+	+

Tabela 7 - Transcrição do operon *ecp* com cultivo bacteriano em meios de cultivo LB, DMEM e DMEM pré-condicionado.

		BA2103	BA3378	BA4132	BA4147
-	ecpR	+	-	+	+
DMEM	ecpA	+	+	+	+
	ecpB	+	+	+	+
	ecpC	+	+	+	+
	ecpD	+	+	+	+
	ecpE	+	+	+	+

Na Tabela 8 estão descritos os resultados obtidos com os ensaios de imunofluorescência para avaliar a produção da fímbria ECP com o cultivo bacteriano realizado nos meios LB, DMEM e DMEM pré-condicionado. Foram utilizadas quantificações arbitrárias pelo sistema de cruz para determinar a população bacteriana produtora da fímbria ECP em cada uma das condições de cultivo bacteriano.

	2103	3378	4132	4147
LB	+	-	-	-
DMEM	++	-	++	+
DMEM pré- condicionado	+++	-	++	++

Tabela 8 - Produção da fímbria ECP analisada por ensaios de imunofluorescência	а
com cultivo bacteriano nos meios LB, DMEM e DMEM pré-condicionad	do.
## **5 DISCUSSÃO**

A colonização do tecido hospedeiro por bactérias patogênicas é um processo multifatorial que envolve adesinas fimbriais e afimbriais, podendo atuar sinergicamente ou em diferentes estágios da infecção (NOUGAYREDE; FERNANDES; DONNENBERG, 2003). A superfície bacteriana é recoberta por estruturas finas e pegajosas denominadas fímbrias que permitem reconhecer superfícies abióticas, receptores do hospedeiro e também outras bactérias (KLINE et al., 2009; PROFT; BAKER, 2009). Essas interações definem os passos iniciais da colonização e também a formação de biofilmes, conferindo proteção a pressões externas, como compostos antibacterianos e mecanismos de limpeza do hospedeiro (CROXEN; FINLAY, 2010). Os estudos realizados com fímbrias deixam claro que estas desempenham papel biológico similar em bactérias comensais, já que também necessitam colonizar sítios específicos e garantir a adesão (NORMARK, 1989; OLSE'N; JONSSON; SCHILLING, 2001).

A adesão de EPEC ao enterócito é mediada por intimina, e a interação de intimina com seu receptor Tir desencadeia a lesão histopatológica A/E (JERSE et al., 1990; KENNY et al., 1997). Por outro lado, o plasmídeo EAF, presente somente nas cepas de tEPEC, codifica a fímbria BFP, uma fímbria do tipo IV que medeia a adesão bacteriana às células hospedeiras e confere o padrão de adesão localizado (LA) *in vitro* (DONNENBERG et al., 1992; GIRÓN et al., 1991). Além disto, foi descrito sua importância na interação bactéria-bactéria (GIRÓN; HO; SCHOOLNIK, 1991; TOBE; SASAKAWA, 2001) e seu papel como fator de virulência (BIEBER et al., 1998).

Por não apresentarem o pEAF e, portanto, não produzirem a fímbria BFP, as aEPEC necessitam de mecanismos distintos para aderirem às células hospedeiras. Uma grande variedade de genes codificadores de adesinas já foi descrita em cepas de aEPEC, que podem estar relacionadas ao processo de adesão bacteriana. As adesinas Efa1 (*EHEC factor adhesin*) e LifA (*Lymphocyte inhibitory factor*) são exemplos de adesinas produzidas por aEPEC quando em contato com as células hospedeiras (BADEA et al., 2003). A produção das adesinas fimbriais curli e T1P foram descritas, respectivamente, em 2,8% e 59% entre 71 cepas de aEPEC estudadas, respectivamente (HERNANDES et al., 2011). A importância da fímbria LPF na adesão a células hospedeiras de ovelhas e porcos de cepas do sorogrupo

O157:H7 foi demonstrada em um estudo realizado por Jordan et al. (2004). Em vários estudos foi demonstrada a presença de genes fimbriais possivelmente relacionadosà adesão de aEPEC às células hospedeiras (GOMES et al., 2011; HERNANDES et al., 2011; SCALETSKY et al., 2010).

Em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa analisando o perfil genético fimbrial de 72 cepas de aEPEC, foi avaliada a presença de genes codificadores de fimbrias de diferentes patotipos de *E. coli* diarreiogênica (FREITAS, 2008; NARA, 2012). Nesses estudos foi observada a presença dos genes que codificam as fímbrias T1P, P, Pil, ECP e LDA e a ausência de genes *bfpA, aggA, aafA*.

As cepas de aEPEC apresentam diferentes padrões de adesão *in vitro*, no entanto, o padrão de adesão localizado-*like* (ALL) é o mais prevalente (DULGUER et al., 2003; PELAYO et al., 1999; SCALETSKY et al., 1999). Na coleção de aEPEC estudada pelo nosso grupo, 29,2% das cepas apresentaram o padrão de adesão ALL (ABE et al., 2009).

O objetivo inicial do presente trabalho consistiu em investigar o papel de adesinas fimbriais no padrão de adesão ALL em quatro cepas de aEPEC pertencentes a diferentes sorotipos, com subtipo de intimina e perfil genético fimbrial distintos. Sendo assim, foram selecionadas as cepas BA2103, BA3378, BA4132 e BA4147. Para tanto, foi necessário confirmar o padrão de adesão às células HeLa e o perfil genético fimbrial. O padrão de adesão ALL, caracterizado pela presença de agrupamentos frouxos de bactérias sobre a célula, foi confirmado nas quatro cepas de aEPEC.

Para a confirmação do perfil genético fimbrial foi investigada a presença dos genes que codificam as fimbrias P, fimbria do tipo I, fímbria ECP, fímbria Pil e as variantes da fímbria LPF. Considerando-se o perfil determinado por Freitas (2008), a diversidade no perfil genético fimbrial se manteve, mas algumas alterações foram observadas, como a ausência do gene *papA* na cepa BA4147 e presença do gene *lpfA1 (A1-C*<sub>[F]</sub>) na cepa BA4132. Nas cepas BA2103, BA4132 e BA4147 os genes que codificam as fímbrias tipo I, ECP e ao menos uma variante da fímbria LPF estão presentes. Já a cepa BA3378 apresenta os genes que codificam as fímbrias tipo I, ECP e Pil.

No estudo realizado por Nara (2012) foi observado uma alta prevalência dos genes que codificam a fímbria tipo I e fímbria ECP em 63 cepas de aEPEC. No

entanto, apenas o gene *ecpA* foi observado em todas as cepas avaliadas. Os genes que codificam a fímbria ECP, principalmente o gene *ecpA* já foram detectados em diferentes grupos de DEC (BLACKBURN et al., 2009; HAYASHI et al., 2001; PERNA et al., 2001), em UPEC (WELTCH et al., 2002), em NMEC (POUTTU et al., 2001) e também em *E. coli* comensais encontradas em microbiota de humanos. A presença do gene *ecpA* foi observada em 29 cepas de aEPEC isoladas de casos de diarreia (SCALETSKY et al., 2010). Também foi avaliada a presença deste gene em cepas de EHEC, EPEC, ETEC, EIEC, EAEC, UPEC, *E. coli* patogênica de coelho e aviária, tendo sido observado que 96% das 169 cepas avaliadas apresentavam o gene *ecpA*. Os 4% restantes não possuíam nenhum dos genes que compõem o operon *ecp* (RENDÓN et al., 2007).

Essa enorme diversidade de cepas de *E. coli* que apresentam os genes codificadores de ECP, nos levou a escolher esta fímbria para analisar a presença dos cinco genes que compõem o operon e seu regulador, assim como a produção desta fímbria em diferentes condições de cultivo. Por ensaios de PCR foi observado que as quatro cepas selecionadas apresentam todos os genes que compõem o operon *ecp.* Como a cepa utilizada como controle negativo é uma aEPEC não produtora da fímbria ECP, também foram realizados ensaios de PCR a fim de avaliar se nenhum dos genes do operon está presente. Nesses ensaios foi observado que esta cepa possui os genes *ecpE* e *ecpR*, mas a presença do gene regulador e de uma das chaperonas não influencia sua utilização como controle negativo, já que a cepa não possui nenhum dos outros genes do operon *ecp*. A utilização de uma cepa de aEPEC que não contem o operon *ecp* como controle negativo é útil na realização de ensaios para avaliação da produção de ECP, já que em casos de ligações inespecíficas, estas também iriam ocorrer no controle negativo.

Após a determinação da presença do operon *ecp* completo nas quatro cepas de aEPEC estudadas, a transcrição deste operon foi avaliada após cultivo bacteriano nos meios LB, DMEM e DMEM pré-condicionado. Os ensaios de PCR foram realizados utilizando o cDNA obtido após o cultivo das cepas nas diferentes condições. Estes experimentos nos mostraram que há uma transcrição diferenciada do operon *ecp*. Isto é, quando as cepas BA2103 e BA4132 foram cultivadas em LB foi transcrito o operon completo. Já nas cepas BA3378 e BA4147 o gene regulador *ecpR* não foi transcrito, sendo que os genes *ecpB, ecpC* e *ecpE* da cepa BA3378 também não foram transcritos.

Nas cepas BA2103 e BA4132 o operon continuou sendo transcrito quando estas foram cultivadas em DMEM, enquanto a BA4147 passou a ter o operon completo transcrito quando cultivada neste meio. Já a cepa BA3378 teve cinco dos genes do operon transcritos, exceto o regulador ecpR. Estes resultados sugerem que outra proteína esteja sendo produzida, proteína essa capaz de se ligar ao promotor do operon, localizado anteriormente ao gene ecpR, possibilitando a transcrição completa dos outros cinco genes. Além da regulação específica de cada operon (BAGA et al., 1985; KLEMM, 1986), a transcrição de operon fimbriais também é afetada por reguladores globais, como o mecanismo de inibição de IHF (Integration host factor) sobre a proteína H-NS (Histone-like nucleoidstructuring protein) (CLEGG et al., 2011), que é uma proteína repressora do promotor que ativa o promotor de ecp. O regulador transcricional H-NS é uma proteína citoplasmática capaz de influenciar a expressão de muitos genes de forma direta ou indireta pela ligação ao DNA, desempenhando atividade na condensação do DNA cromossômico (DAME; WYMAN; GOOSEN, 2000; HOMMAIS et al., 2001). Em um trabalho realizado por Martinez-Santos (2012) foi observado que H-NF e IHF são essenciais para regulação negativa e positiva do promotor de *ecp* em cepas de EPEC e EHEC, respectivamente. A importância do regulador H-NF na ativação do promotor ecp pode estar relacionada com o fato de que vários genes modulados por H-NS são sensíveis a variações nas condições ambientais, como pH, osmolaridade e temperatura (ATLUNG; INGMER, 1997; BARTH et al., 1995; HOMMAIS et al., 2001; LAURENT-WINTER et al., 1997).

No entanto, quando as quatro cepas foram cultivadas em DMEM précondicionado todos os genes que compõem o operon *ecp* foram transcritos, incluindo o gene regulador. Surpreendentemente, a cepa 1551-2, utilizada como controle negativo, pois não apresenta o gene *ecpA* e não produz a fímbria ECP, também transcreveu os genes *ecpR*, o que demonstra que a sinalização celular pode ativar o gene regulador do operon.

Há uma grande necessidade de melhor caracterizar a regulação do operon *ecp* e determinar se o mecanismo de regulação EcpR/IHF/H-NS atua em conjunto com outras proteínas. Esta caracterização é importante, pois o operon *ecp* é regulado de maneira diferente em patotipos de *E. coli*, já que ECP é expresso a 37 °C em cepas de *E. coli* que causam a lesão A/E (RENDON et al., 2007; SALDAÑA et al., 2009), a 20 °C em cepas de NMEC (LEHTI et al., 2012; POUTTU et al., 2001) e na cepa laboratorial MG1655 essa expressão não ocorre (LEHTI et al., 2010).

Observando a diferença de transcrição do operon *ecp* pelas cepas de aEPEC cultivadas em diferentes condições de cultivos, também foi investigada a produção da fímbria ECP. Em estudo realizado por Freitas (2012), foi observado que o simples fato do operon estar completo em uma aEPEC, não significa que todos serão transcritos, e consequentemente, que a fímbria codificada por este operon será produzida. As condições ótimas ambientais e nutricionais para a produção de ECP podem variar entre os diferentes patotipos produtores de ECP. Em cepas de NMEC a condição ótima para produção de ECP é quando estas são cultivadas em meio LB a 20 °C (POUTTU et al., 2001), enquanto que a condição ótima para a produção de ECP por cepas de ETEC é quando estas são cultivadas em caldo PPLO a 37 °C (BLACKBURN et al., 2009).

Neste trabalho, após análise da transcrição dos genes que compõem o operon *ecp*, a produção da fímbria ECP pelas cepas de aEPEC foi avaliada por ensaios de *colony immunoblot* e *immunoblotting* com o sobrenadante recuperado de ensaio de interação bacteriana com células HeLa. Esses dois ensaios foram selecionados, respectivamente, para avaliar a produção da fímbria diretamente da colônia bacteriana ou após desnaturação para linearização da proteína. Infelizmente, apesar de exaustivas etapas experimentais, os resultados obtidos não foram reprodutíveis, o que nos fez optar pela utilização do ensaio de imunofluorescência para a avaliação da produção de ECP.

Nesses ensaios foi observado que apesar das cepas BA2103 e BA4132 quando cultivadas em LB apresentarem a transcrição completa do operon, apenas a BA2103 foi capaz de produzir a fímbria. Por outro lado, corroborando os resultados obtidos por Rendón (2007), houve uma maior produção de ECP quando as cepas de aEPEC foram cultivadas em DMEM. Nesta condição, foi observado que as cepas BA2103, BA4132 e BA4147 foram capazes de produzir a fímbria. Os meios LB e DMEM possuem composições extremamente distintas, sendo o DMEM um meio criado para mimetizar o ambiente fisiológico. A diferença de produção de ECP pelas cepas de aEPEC pressupõem que a fímbria desempenhe importante papel biológico para a bactéria, já que sua produção é alterada em condições mais similares às fisiológicas. Evidenciando a importância de ECP, quando as cepas de aEPEC foram cultivadas em DMEM pré-condicionado, ou seja, com a presença de sinalização celular, houve uma maior intensidade na reação de imunofluorescência nas três cepas produtoras de ECP, assim como intensa marcação na população bacteriana que produziu a fímbria. Corroborando com os resultados obtidos, em um trabalho realizado por Saldana et al. (2014), os autores verificaram que a maior produção de ECP a 37 °C ocorria na presença de células HeLa quando comparado com a produção da fímbria no cultivo em LB e DMEM. A cepa BA3378, mesmo tendo o operon completo transcrito quando cultivada em DMEM pré-condicionado, não foi capaz de produzir a fímbria. Este resultado sugere que regulações póstranscricionais ocorram com a cepa BA3378 nesta condição de cultivo, já que todos os genes do operon estão sendo transcritos.

Como inicialmente tínhamos como objetivo correlacionar a expressão e produção de ECP ao padrão ALL, foram realizados ensaios de interação bacteriana com células HeLa, utilizando diversas concentrações dos açúcares galactose e lactose, com o intuito de avaliar se haveria a inibição da adesão bacteriana. Estes açúcares foram selecionados pela similaridade de ECP com a fimbria P, cujo receptor é Galactose  $\alpha(1-4)$ -Galactose. Porém, apesar das diversas concentrações dos açúcares utilizadas, na presença ou ausência de manose para inibição da fimbria tipo 1, os resultados obtidos não foram conclusivos. Tanto nos ensaios de 3 horas quanto de 6 horas, houve a formação de enormes aglomerados bacterianos, impossibilitando a avaliação de alterações na adesão bacteriana. (Resultados não mostrados)

A prevalência deste gene fimbrial em *E. coli* certamente está relacionada com importantes funções biológicas, mas ainda faltam informações sobre a habilidade de aEPEC produzir a fímbria ECP. Cepas de aEPEC apresentam um vasto repertório de genes que codificam possíveis fatores de virulência, o que demonstra a importância de estudos avaliando novos fatores de virulência ou combinação dos possíveis fatores, a fim de determinar seu papel biológico na interação com a célula hospedeira. O conjunto de resultados obtidos permitemafirmar que:

- As cepas BA2103, BA3378, BA4132 e BA4147 apresentam o operon *ecp*completo;

 A transcrição do operon *ecp* é influenciada pela condição de cultivo bacteriano, sendo que, quando as cepas de aEPEC foram cultivadas em meio DMEM pré-condicionado o operon completo foi transcrito;

- A produção da fímbria ECP também foi dependentedo meio em que as cepas foram cultivadas, sendo que, o cultivo em meio DMEM pré-condicionado favoreceu maior produção da fímbria;

- Somente a cepa BA3378 não produz a fímbria ECP, mesmo tendo o operon *ecp* completamente transcrito quando cultivada em meio DMEM pré-condicionado.

## 6 CONCLUSÃO

Todas as cepas de aEPEC avaliadas possuem os genes que compõem o operon *ecp*, mas a transcrição deste operon é alterada de acordo com o meio de cultivo bacteriano.

O operon *ecp* é comumente encontrado em cepas de aEPEC. No entanto, a transcrição deste operon por aEPEC é influenciada pelas condições de cultivo bacteriano, sendo DMEM contendo sinalização celular o meio que mais favoreceu a produção da fímbria ECP. Estes resultados sugerem que ECP desempenhe um importante papel biológico em aEPEC, devido ao favorecimento de sua produção em condições mais semelhantes com as encontradas fisiologicamente.

## **REFERÊNCIAS**<sup>\*</sup>

ABBA, K. et al. Pathogens associated with persistent diarrhoea in children in low and middle income countries: systematic review. **BMC Infect. Dis**., v. 10, n. 9, p. 88, 2009.

ABE, C. M. et al. Virulence features of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* identified by the eae+ EAF-negative stx-genetic profile. **Diag. Microbiol.Infect. Dis.**, v. 64, n. 4, p. 357-365, 2009.

ADU-BOBIE, J. et al. Detection of intimins alpha, beta, gamma, and delta, four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. J. Clin.Microbiol., v. 36, p. 662–668, 1998.

AFSET, J.E.; BERGH, K.; BEVANGER, L. High prevalence of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Norwegian children with diarrhoea. **J. Med. Microbiol.**, v. 52, n. 11, p. 1015–1029, 2003.

ALLEN W.J.; PHAN, G.; WAKSMAN, G. Structural biology of periplasmic chaperones. **Adv. Protein. Chem. Struct. Biol**., v. 78, p. 51–97, 2009.

APPERLOO-RENKEMA, H.Z.; VAN DER WAAIJ, B.D.; VAN DER WAAIJ, D. Determination of colonization resistance of the digestive tract by biotyping of Enterobacteriaceae. **Epidemiol. Infect.**, v. 105, n. 2, p. 355–361, 1990.

ARAUJO, J. M. et al. Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. **J. Clin. Microbiol**., v. 45, n. 10, p. 3396-3399, 2007.

ASHWORTH, A. Treatment of severe malnutrition. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 32, n. 5, p. 516–518, 2001.

ATLUNG, T.; INGMER, H.H-NS: a modulator of environmentally regulated gene expression. **Mol. Microbiol.**, v. 24, n. 1, p. 7–17, 1997.

AVELINO, F. et al. The majority of enteroaggregative *Escherichia coli* strains produce the *E. coli* common pilus when adhering to cultured epitelialcells. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 300, p. 440–448, 2010.

BADEA, L. et al. Contribution of Efa1/LifA to the adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells. **Microb. Pathog**., v. 34, n. 5, p. 205–215, 2003.

BAGA, M. et al. Transcriptional activation of a *pap* pilus virulence operon from uropathogenic *Escherichiacoli*. **EMBO. J**., v. 4, p. 3887–3893, 1985.

BALDINI, M. M. et al. Plasmid mediated adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli.* **J. Pediatr. Gastroenterol.Nutr**., v. 2, p. 534–538,1983.

<sup>&</sup>lt;sup>\*</sup>De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BARTH, M.et al. Role for the histone-like protein H-NS in growth phase-dependent and osmotic regulation of sigma S and many sigma S-dependent genes in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol**., v. 177, n. 12, p. 3455–3464, 1995.

BAUMLER, A.J.; TSOLIS, R.M.; HEFFRON, F. The *lpf* fimbrial operon mediates adhesion of *Salmonella typhimurium* to murine Peyer's patches. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**., v. 93, p. 279–283, 1996.

BENEVIDES-MATOS, N. et al. Adherence and virulence genes of *Escherichia coli* from children diarrhoea in the Brazilian Amazon.**Braz. J. Microbiol**., v. 46, n. 1, p. 131–137, 2015.

BENZ, I.; SCHMIDT, M.A. Isolation and serologic characterization of AIDA-I, the adhesin mediating the diffuse adherence phenotype of the diarrhea-associated *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27). **Infect. Immun.**, v. 60, p. 13-18, 1992.

BERGSTROM, K.S. et al. Innate host responses to enteric bacterial pathogens: a balancing act between resistance and tolerance. **Cell Microbiol.,** v. 14, n. 4, p. 475-484, 2012.

BERNIER, C.; GOUNON, P.; LE BOUGUÉNEC, C. Identification of an aggregative adhesion fimbria (AAF) type III-encoding operon in enteroaggregative Escherichia coli as a sensitive probe for detecting the AAF-encoding operon family. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 8, p. 4302–4311, 2002.

BESSER-WIEK, D. et al. GENERAL MEETTING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY,96.,1996, **Abstracts...**Local: Editora, 1996. abstr. C-364.

BIEBER, D. et al. Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic Escherichia coli. **Science**. v. 280, n. 5372, p. 2114-2218, 1998.

BILGE, S.S. et al. Molecular characterization of a fimbrial adhesin, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **J. Bacteriol**.,v.171, n. 8, p. 4281–4289, 1989.

BILGE, S.S. et al. Transcriptional organization of the F1845 fimbrial adhesin determinant of *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 7, p. 993–1006, 1993.

BLACKBURN, D. et al. Distribution of the *Escherichia coli* common pilus among diverse strains of human enterotoxigenic *E. coli*. **J. Clin. Microbiol**., v. 47, n. 6, p. 1781-1784, 2009.

BLANCO, M. et al. Typing of intimin (*eae*) genes from enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from children with diarrhoea in Montevideo, Uruguay: identification of two novel intimin variants ( $\mu$ B and  $\xi$  R/*B*2B). **J. Med. Microbiol**., v. 55, p.1165-1174, 2006.

BLATTNER, F.R. et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. **Science**, v. 277, p. 1453–1462, 1997.

BOISEN, N. et al. New adhesin of enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF family. **Infect. Immun.,** v. 76, p. 3281–3292, 2008.

BUERIS, V. et al. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 7, p. 839-844, 2007.

BÜTTNER, D.; BONAS, U. Port of entry--the type III secretion translocon. **Trends Microbiol**., v. 10, n. 4, p. 186–192, 2002.

CAMPOS, L.C. et al. *Escherichia coli* serogroup O111 includes several clones of diarrheogenic strains with diferrent virulence properties. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 3282–3288, 1994.

CHANDRA, B.K. et al. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* as a predominant cause of paediatric nosocomial diarrhoea in India. **J. Med. Microbiol**., v. 61, p. 830–836, 2012.

CHEN, Q.; SAVARINO, S.J.; VENKATESAN, M.M. Subtractive hybridization and optical mapping of the enterotoxigenic *Escherichia coli* H10407 chromosome: isolation of unique sequences and demonstration of significant similarity to the chromosome of *E. coli* K-12. **Microbiology**, v. 152, n. 4, p. 1041–1054, 2006.

CHOUDHURY, D. et al. X-ray structure of the FimC–FimH chaperone–adhesin complex from uropathogenic *Escherichia coli*. **Science**, v.285, p. 1061–1066, 1999.

CLEGG,S.; WILSON, J.; JOHNSON, J. More than one way to control hair growth: regulatory mechanisms in enterobacteria that affect fimbriae assembled by the chaperone/usher pathway. **J. Bacteriol.**, v. 193, n. 9, p. 2081–2088, 2011,

COLLINSON, S.K. et al. Thin, aggregative fimbriae mediate binding of *Salmonella enteritidis* to fibronectin. **J. Bacteriol.**, v. 175, p. 12–18, 1993.

CONNELL, I. et al. Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**., v. 93, p. 9827–9832, 1996.

CONTRERAS, C.A. et al. Genetic diversity of locus of enterocyte effacement genes of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from Peruvian children. J. Med. Microbiol., v. 61, p. 1114–1120, 2012.

CONWAY, T.;COHEN,P.S. Commensal and Pathogenic *Escherichia coli* Metabolism in the Gut. **Microbiol. Spectr.**, v. 3, n. 3, p. 1–24, 2015.

COOKSON, A. L.; WOODWARD, M. J. The role of intimin in the adherence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 to HEp-2 tissue culture cells and to bovine gut explant tissues. **Int. J. Med.Microbiol.**, v. 292, p. 547–553, 2003.

CREPIN, V.F. et al. Polarity of enteropathogenic *Escherichia coli* EspA filament assembly and protein secretion. **J. Bacteriol**., v. 187, p. 2881–2889, 2005.

CROXEN,M.A.; FINLAY, B.B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 8, n. 1, p. 26–38, 2010.

CROXEN, M.A. et al. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev**., v. 26, n. 4, p. 822–80, 2013.

CUSUMANO, C.K.; HULTGREN, S.J. Bacterial adhesion - a source of alternate antibiotic targets. **IDrugs**., v. 12, p. 699–705, 2009.

CZECZULIN J. R. et al. Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. Infect Immun., v. 65, p. 4135–4145, 1997.

DAME, R.T.; WYMAN, C.; GOOSEN, N. H-NS mediated compaction of DNA visualized by atomic force microscopy. **Nucleic. Acids. Res.,**v. 28, p. 3504–3510, 2000.

DANIELL, S.J. et al. The filamentous type III secretion translocon of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Cell Microbiol**., v. 3, p. 865–871, 2001.

DANIELL, S.J. et al. 3D structure of EspA filaments from enteropathogenic *Escherichia coli.* **Mol. Microbiol.**, v. 49, p. 301–308, 2003.

DONNENBERG, M.S. et al. A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic Escherichia coli associated with localized adherence. **Mol. Microbiol.**, v. 6, p. 3427–3437, 1992.

DONNENBERG, M.S.; ZHANG, H.Z.; STONE, K.D. Biogenesis of the bundle-forming pilus of enteropathogenic Escherichia coli: reconstitution of fimbriae in recombinant E. coli and role of DsbA in pilin stability--a review. **Gene.**, v. 192, n. 1, p. 33–38, 1997.

DOUGHTY, S. et al. Identification of a novel fimbrial gene cluster related to long polar fimbriae in locus of enterocyte effacement-negative strains of enterohemorrhagic Escherichia coli. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 12, p. 6761–6769, 2002.

DUDLEY, E.G. et al. Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a pheU pathogenicity island in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Mol.Microbiol**., v. 61, n. 5, p. 1267–1282, 2006.

DULGUER, M.V. et al. Atypical enteropathogenic Escherichia coli strains: phenotypic and genetic profiling reveals a strong association between enteroaggregative E. coli heat-stable enterotoxin and diarrhea. **J. Infect. Dis.,** v.188, n. 11, p. 1685–1694, 2003.

DURAND, E. et al. Structural biology of bacterial secretion systems in Gram-negative pathogens — potential for new drug targets. **Infect. Disord. Drug.Targets.**,v. 9, p. 518–547, 2009.

ELLIOTT, S.J. et al. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. **Mol. Microbiol.,** v. 28, n. 1, p. 1–4, 1998.

EVANS, D.G. et al. Plasmid-controlled colonization factor associated with virulence in *Esherichia coli* enterotoxigenic for humans. **Infect. Immun.,** v. 12, n. 3, p. 656–667, 1975.

FLORES, J.; OKHUYSEN, P.C. Enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 25, n. 1, p. 8–11, 2009.

FIVAZ, M.; VAN DER GOOT, F.G.The tip of a molecular syringe. **Trends.Microbiol.**, v. 7, n. 9, p. 341–343, 1999.

FOSTER, J.W. *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. **Nat. Rev. Microbiol**., v. 2, n. 11, p. 898–907, 2004.

FRANCIS, D.H.; COLLINS, J.E.; DUIMSTRA, J.R. Infection of gnotobiotic pigs with an *Escherichia coli* O157:H7 strain associated with an outbreak of hemorrhagic colitis. **Infect. Immun.**, v. 51, p. 953–956, 1986.

FRANKEL, G. et al. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. **Mol. Microbiol**., v. 30, p. 911–921, 1998.

FREITAS, N. C. **Pesquisa de adesinas fimbriais em isolados de Escherichia coli enteropatogênica atípica**. Trabalho de conclusão de curso. Centro Universitário Fundação Santo André, Santo André, 2008.

FRETER, R. et al. Survival and implantation of *Escherichia coli* in the intestinal tract **Infect. Immun.**, v. 39, n. 2, p. 686–703, 1983.

GAASTRA, W.; SVENNERHOLM, A. M. Colonization factors of human enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC). **Trends.Microbiol.**, v. 4, n. 11 p. 444–452, 1996.

GARMENDIA, J.; FRANKEL, G.; CREPIN V.F.Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. **Infect. Immun.,** v. 73, n. 5, p. 2573–2585, 2005.

GIRÓN, J.A. et al. Diffuse-adhering *Escherichia coli* (DAEC) as a putative cause of diarrhea in Mayan children in Mexico. **J. Infect. Dis**., v. 163, n. 3, p. 507–513, 1991.

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

GOMES, T.A. et al. Emerging enteropathogenic *Escherichia coli* strains? **Emerg. Infect. Dis.**, v. 10, n. 10, p. 1851–1855, 2004.

GOMES, T.A. et al. Adhesin-encoding genes from shiga toxin-producing *Escherichia coli* are more prevalent in atypical than in typical enteropathogenic E. coli. **J. Clin. Microbiol.,** v. 49, n. 9, p. 3334–3337, 2011.

GONÇALVES, A.G. et al. Virulence properties and clonal structures of strains of *Escherichia coli* O119 serotypes. **Infect. Immun.,**v. 65, p. 2034–2040, 1997.

HARRINGTON, S.M.; DUDLEY, E.G.; NATARO, J.P. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **FEMS Microbiol. Lett.,** v. 254, n. 1, p. 12–18, 2006.

HAYASHI, T.et al. Complet genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. **DNA Res.,**v. 8, n. 1, p. 11–22, 2001.

HERNANDES, R.T. **Estudo da aderência localizada de uma amostra de Escherichia coli enterpatogênica atípica**. 2006. 109 f. Tese (Doutorado em ciências) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, 2006.

HERNANDES, R. T. et al. The localized adherence pattern of an atypical enteropathogenic *Escherichia coli* is mediated by intimin omicron and unexpectedly promotes HeLa cell invasion. **Cell Microbiol.**, v. 10, n. 2, p. 415-425, 2008.

HERNANDES, R.T. et al. Fimbrial adhesins produced by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 77, n. 23, p. 8391–8399, 2011.

HOMMAIS, F. et al. Large scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression. By prokariotic nucleoid-associated protein, H-NS. **Mol. Microbiol**., v. 40, p. 20–36, 2001.

HUGGINS, C.; RAST, H.V. Jr Incidence of coliform bacteria in the intestinal tract of Gambusia affinis holbrooki (Girard) and in their habitat water. **J. Bacteriol**., v. 85, p. 489–490, 1963.

IDE, T.et al. Characterization of translocation pores inserted into plasma membranes by type III-secreted Esp proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Cell Microbiol**., v. 3, n. 10, p. 669–679, 2001.

JERSE,A.E.et al. 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, n. 20, p. 7839–7843, 1990.

JORDAN, D.M. et al. Long Polar Fimbriae Contribute to Colonization by *Escherichia coli* O157:H7 in vivo.**Infect. Immun.,**v. 72, n. 10, p. 6168, 2004.

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

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

KARMALI, M.A. et al. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. **Lancet**., v. 1, n. 8325, p. 619–620, 1983.

KARMALI, M. A. et al. The association between hemolytic uremic syndrome and infection by Verotoxin-producing *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis**., v. 151, p. 775–782, 1985.

KENNY, B. et al. Enteropathogenic E. coli (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. **Cell**., v. 91, n. 4, p. 511–520, 1997.

KLEMM, P. Two regulatory *fim* genes, *fimB* and *fimE*, control the phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*. **EMBO J**., v. 5, p. 1389–1393. 1986.

KLINE, K.A. et al. Bacterial adhesins in host-microbe interactions.**Cell Host.Microbe**., v. 5, n. 6, p. 580–592, 2009.

KIM, S.R.; KOMANO, T. The plasmid R64 thin pilus identified as a type IV pilus. **J. Bacteriol**., v. 179, n. 11, p. 3594–3603, 1997.

KNUTTON, S.et al. A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic Escherichia coli involved in protein translocation into epithelial cells. **EMBO J**., v. 17, n. 8, p. 2166–2176, 1998.

KONOWALCHUK, J.; SPEIRS, J.I.; STAVRIC, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*.**Infect. Immun**., v. 18, n. 3, p. 775-779, 1977.

KRESSE, A.U.; ROHDE, M.; GUZMÁN, C.A. The EspD protein of enterohemorrhagic *Escherichia coli* is required for the formation of bacterial surface appendages and is incorporated in the cytoplasmic membranes of target cells. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 9, p. 4834–4842, 1999.

LANATA, C.F. et al. Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: a systematic review. **PLoS One**., v. 8, n. 9, p. e72788, 2013.

LAURENT-WINTER, C. et al. Role of Escherichia coli histone-like nucleoidstructuring protein in bacterial metabolism and stress response--identification of targets by two-dimensional electrophoresis. **Eur. J. Biochem**., v. 244, n. 3, p. 767– 773, 1997.

LEHTI, T.A. et al. Mat fimbriae promote biofilm formation by meningitis-associated *Escherichia coli.* **Microbiology**., v. 156, p. 2408–2417, 2010.

LEHTI, T.A. et al. The response regulator RcsB activates expression of Mat fimbriae in meningitic *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 194, p. 3475–3485,2012.

LEVINE, M.M. et al. The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. **J. Infect. Dis**., v. 152, n. 3, p. 550–559, 1985.

LEVINE, M.M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. **J. Infect. Dis.**, v. 155, n. 3, p. 377–389, 1987.

LIMA, A.A. et al. Persistent diarrhea in northeast Brazil: etiologies and interactions with malnutrition. **Acta. Paediatr. Suppl.**, v. 381, p. 39–44, 1992.

MARCHOU, B. Traveller's diarrhea: epidemiology, clinical practice guideline for the prevention and treatment. **Presse. Med.**, v. 42, n. 1, p. 76–81, 2013.

MARTÍNEZ-SANTOS, V.I. et al. Transcriptional regulation of the *ecp* operon by EcpR, IHF, and H-NS in Attaching and Effacing *Escherichia coli.* **J. Bacteriol.**, v. 194, n. 18, p. 5020–5033, 2012.

McDANIEL, T. K. et al. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.,** v. 92, p. 1664–1668, 1995.

McGUCKIN, M.A. et al. Mucin dynamics and enteric pathogens. **Nat. Rev. Microbiol**., v. 9, n. 4, p. 265-278, 2011.

McWILLIAMS, B.D.; TORRES, A.G. Enterohemorrhagic Escherichia coli Adhesins. **Microbiol. Spectr.**, v. 2, n. 3, 2014.

MELLIES, J.L. et al. Ler of pathogenic *Escherichia coli* forms toroidal protein–DNA complexes.**Microbiol**., v. 157, n. 4, p. 1123–1133, 2011.

MORA, A. et al. HeLa-cell adherence patterns and actin aggregation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga-toxin-producing *E. coli* (STEC) strains carrying different eae and tir alleles. **Int. Microbiol.,** v. 12, n. 4, p. 243–251, 2009.

MOON, H. W. et al. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. **Infect. Immun.**, v. 41, p. 1340–1351, 1983.

MOORE, S.R. et al. Prolonged episodes of acute diarrhea reduce growth and increase risk of persistent diarrhea in children. **Gastroenterol.**, v.139, n. 4, p. 1156–1164, 2010.

MOREIRA, C.G. et al. Role of type I fimbriae in the aggregative adhesion pattern of enteroaggregative *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett**., v. 226, n. 1, p. 79–85, 2003.

NAKAGAWA, K. Biological significance and metabolic activation of vitamin K. **Yakugaku Zasshi**., v. 133, n. 12, p. 1337–1341, 2013.

NAKHJAVANI, F.A. et al. Molecular analysis of typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from children with diarrhoea. **J. Med. Microbiol.**, v. 62, p. 191–195, 2013.

NARA, J. M. et al. Differentiation of typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* using colony immunoblot for detection of *bundle-forming pilus* expression. **J. App.Microbiol.**, v. 109, n. 1, p. 35-43, 2010.

NARA, J. M. Adesinas fimbriais em *Escherichia coli* enteropatogênica atípica: prevalência e proteômica. 2012. 148 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

NATARO, J. P. et al. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **Pediatr. Infect. Dis. J.,** v. 6, p. 829–831, 1987.

NATARO, J. P. et al. Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative Escherichia coli mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. **Infect. Immun.,** v. 60, p. 2297–2304, 1992.

NATARO, J. P. et al. *AggR*, a transcriptional activator of aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli*. **J.Bacteriol.**,v. 176, p. 4691–4699, 1994.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol.Ver**., v. 11, n. 1, p. 142–201, 1998.

NETER, E. O. et al. Demonstration of antibodies against enteropathogenic *Escherichia coli* in sera of children of various ages. **Pediatrics.**, v. 16, p. 801–808, 1955.

NOUGAYRÈDE, J.P.; FERNANDES, P.J.; DONNENBERG, M.S. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. **Cell Microbiol.**, v. 5, n. 6, p. 359–372, 2003.

NOWICKI, B. et al. The Dr hemagglutinin, afimbrial adhesins AFA-I and AFA-III, and F1845 fimbriae of uropathogenic and diarrhea-associated *Escherichia coli* belong to a family of hemagglutinins with Dr receptor recognition. **Infect. Immun.**,v. **58**, **n.** 1, p. 279–281, 1990.

NOWROUZIAN, F.L. et al. Effect of human milk on type 1 and P-fimbrial mRNA expression in intestinal Escherichia coli strains. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 40, n. 1, p. 74–80, 2005.

O'BRIEN, A.D. et al. Production of Shigella dysenteriae type 1 -like cytotoxin by *Escherichia coli*. J. Infect. Dis., v. 146, p. 763-769, 1982.

O'BRIEN, A. D. et al. *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a Shigella dysenteriae 1 (Shiga) like cytotoxin. **Lancet**., v. 26, n. 1, p. 702, 1983.

O'BRIEN, A. D.; LA VECK, G. D. Purification and characterization of a Shigella dysenteriae 1-like toxin produced by Escherichia coli. **Infect. Immun.**, v. 40, p. 675–683, 1983.

OLSÉN, A.; JONSSON, A.; NORMARK, S. Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. **Nature**, v. 338, n. 6217, p. 652 – 655, 1989.

PALMER, C. et al. Development of the human infant intestinal microbiota. **PLoS Biol**., v. 5, n. 7, p. e177, 2007.

PATON, J. C.; PATON, A. W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, p.450–479.1998.

PELAYO, J.S. et al. Virulence properties of atypical EPEC strains. J. Med. Microbiol., v. 48, n. 1, p. 41–49, 1999.

PERNA, N.T.et al.Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Nature**, v. 409, n. 6819, p. 529–533, 2001.

PIVA, I.C., et al. Virulence markers of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from children and adults with diarrhea in Brasília, Brazil. **J. Clin. Microbiol**., v. 41, n. 5, p. 1827–1832, 2003.

POUTTU, R. et al. matB, a common fimbrillin gene of *Escherichia coli*, expressed in a genetically conserved, virulent clonal group. **J. Bacteriol**., v.183, n. 16, p. 4727–4736, 2001.

PROFT, T.; BAKER, E.N. Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria - structure, assembly and their role in disease. **Cell Mol. Life. Sci.**, v. 66, n. 4, p. 613–635, 2009.

QADRI, F. et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 18, n. 3, p. 465–483, 2005.

REMAUT, H. et al. Fiber formation across the bacterial outer membrane by the chaperone/usher pathway. **Cell**, v. 133, p. 640–652, 2008.

RENDÓN, M.A. et al. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 104, p. 10637–10642, 2007.

RILEY, L. W. et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **N. Engl. J. Med.**, v. 308, p. 681–685, 1983.

RILEY, L. W. The epidemiologic, clinical, and microbiological features of hemorrhagic colitis. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 41, p. 383–407, 1987.

RODRIGUES, J. et al. Clonal structure and virulence factors in strains of Escherichia coli of the classic serogroup O55. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 2680–2686, 1996.

ROSSEZ, Y. et al. *Escherichia coli* common pilus (ECP) targets arabinosyl residues in plant cell walls to mediate adhesion to fresh produce plants. **J. Biol. Chem.**, v. 289, n. 49, p. 34349–34365, 2014.

SAHL, J.W.et al. A comparative genomic analysis of diverse clonal types of enterotoxigenic Escherichia coli reveals pathovar-specific conservation. **Infect. Immun.**, v. 79, n. 2, p. 950–960, 2011.

SALDAÑA, Z. et al. Synergistic role of curli and cellulose in cell adherence and biofilm formation of attaching and effacing *Escherichia coli* and identification of Fis as a negative regulator of curli. **Environ. Microbiol.**, v. 11, p. 992–1006, 2009.

SAMPAIO, S.C.F., et al. Analysis of the Virulence of an Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Strain In Vitro and In Vivo and the Influence of Type Three Secretion System. **BioMed. Research International.**, v. 2014, p.9, 2014.

SAUER, F.G. et al. Structural basis of chaperone function and pilus biogenesis. **Science**, v. 285, p. 1058–1061, 1999

SAUER, F.G. et al. Chaperone priming of pilus subunits facilitates a topological transition that drives fiber formation. **Cell**, v. 111, p. 543–551, 2002.

SCALETSKY, I. C.; SILVA, M. L.; TRABULSI, L. R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infect. Immun.**, v. 45, n. 2, p. 534-536, 1984.

SCALETSKY, I.C. et al. A localized adherence-like pattern as a second pattern of adherence of classic enteropathogenic Escherichia coli to HEp-2 cells that is associated with infantile diarrhea. **Infect. Immun.,** v. 67, n. 7, p. 3410–3415, 1999.

SCALETSKY, I.C. et al. Adherence factors in atypical enteropathogenic Escherichia coli strains expressing the localized adherence-like pattern in HEp-2 cells. **J. Clin. Microbiol**., v. 48, n. 1, p. 302–306, 2010.

SCHERER, W.F.; SYVERTON, J.T.; GEY, G.O. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. **J Exp. Med.**, v. 97, n. 5, p. 695–710, 1953.

SCHILLING, J.D.; MULVEY, M.A.; HULTGREN, S.J. Structure and function of Escherichia coli type 1 pili: new insight into the pathogenesis of urinary tract infections. **J. Infect. Dis.**, v. 183, p. S36-40, 2001.Suppl. 1.

SERVIN, A.L. Pathogenesis of Afa/Dr Diffusely Adhering *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev., v. 18, p. 264–292, 2005.

TOBE, T.; SASAKAWA, C. Role of bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli* in host cell adherence and in microcolony development. **CellMicrobiol.**, v. 3, n. 9, p. 579–585, 2001.

TORRES, A.G. et al. Identification and characterization of *lpfABCC'DE*, a fimbrial operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Infect. Immun**., v. 70, p. 5416–5427, 2002.

TORRES, A.G. et al. Genes related to long polar fimbriae of pathogenic Escherichia coli strains as reliable markers to identify virulent isolates. **J. Clin. Microbiol**., v. 47, n. 8, p. 2442–2451, 2009.

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

TURNER, S.M. et al. Phylogenetic comparisons reveal multiple acquisitions of the toxin genes by enterotoxigenic *Escherichia coli*strains of different evolutionary lineages. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, p. 4528–4536, 2006.

UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND (UNICEF). **Pneumonia and diarrhoea:** tackling the deadliest diseases for the world's poorest children. 77 p New York: UNICEF, 2012.

VAN DER VELDEN, A.W. et al. Multiple fimbrial adhesins are required for full virulence of *Salmonellatyphimurium* in mice. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 2803–2808, 1998.

VASCONCELLOS, F. M. Estudo do Padrão de adesão agregativa de Escherichia coli do sorotipo O142:H34. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

VIEIRA, M.A.M., et al. 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.

WAKSMAN, G.; HULTGREN, S.J. Structural biology of the chaperone-usher pathway of pilus biogenesis. **Nat. Rev. Microbiol**., v. 7, n. 11, p. 765–774, 2009.

WEINTRAUB, A. Enteroaggregative Escherichia coli: epidemiology, virulence and detection. **J. Med. Microbiol**., v. 56, n. 1, p. 4–8, 2007.

WEISS-MUSZKAT, M. et al. Biofilm formation by and multicelular behavior of *Escherichia coli* O55:H7, an atypical enteropathogenic strain. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 76, p. 1545–1554, 2010.

WELCH, R.A. et al. Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic Escherichia coli. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.,** v.99, n. 26, p. 17020–17024, 2002.

WILSON, R.K. et al. Role of EscF, a putative needle complex protein, in the type III protein translocation system of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Cell Microbiol**., v.3, p. 753–762, 2001.

WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANIZATION (WGO). Diarreia aguda em adultos e crianças: uma perspectiva mundial. **Global guidelines and cascade**., p. 25, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Children: reducing mortality. **Fact Sheet**, n. 178, Set. 2014. Disponível em: <a href="http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs178/en/index.html">http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs178/en/index.html</a> Acesso em: 09 Set. 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Diarrhoeal disease the world health.n.330,Abr.2013.Disponívelem:<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/index.html>Acessoem:09Set. 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO); UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND. **Diarrhoea**: why children are still dying and what can be done. New York: WHO Press, 2009.68 p.

ZAVIALOV, A.V., et al. Structure and biogenesis of the capsular F1 antigen from Yersinia pestis: preserved folding energy drives fiber formation. **Cell**, v. 113, p. 587–596, 2003.

ZAV'YALOV, V. et al. Adhesive organelles of Gram-negative pathogens assembled with the classical chaperone/usher machinery: structure and function from a clinical standpoint. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 34, p. 317–378, 2010.