



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Ricardo Luís Lopes Braga

**Aspectos celulares, moleculares e ultraestruturais da interação de
Escherichia coli enteroagregativa com células não intestinais e intestinais
humanas *in vitro* e epitélio intestinal de coelhos *ex vivo***

Rio de Janeiro

2013

Ricardo Luís Lopes Braga

**Aspectos celulares, moleculares e ultraestruturais da interação de
Escherichia coli enteroagregativa com células não intestinais e intestinais
humanas *in vitro* e epitélio intestinal de coelhos *ex vivo***



Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Ana Claudia de Paula Rosa Ignacio

Rio de Janeiro

2013

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

B813 Braga, Ricardo Luís Lopes.
Aspectos celulares, moleculares e ultraestruturais da interação de
Escherichia coli enteroagregativa com células não intestinais e intestinais
humanas *in vitro* e epitélio intestinal de coelhos *ex vivo* / Ricardo Luís
Lopes Braga. – 2013.
108 f.

Orientadora: Ana Claudia de Paula Rosa Ignacio.
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro,
Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Microbiologia.

1. *Escherichia coli* – Teses. 2. Diarreia – Teses. 3. Aderências – Teses. 4.
Linhagem celular. 5. Técnicas de cultura de órgãos. I. Ignacio, Ana Claudia de
Paula Rosa. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de
Ciências Médicas. III Título.

CDU 576.851.48:616.34-008.314.4

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Ricardo Luís Lopes Braga

**Aspectos celulares, moleculares e ultraestruturais da interação de
Escherichia coli enteroagregativa com células não intestinais e intestinais
humanas *in vitro* e epitélio intestinal de coelhos *ex vivo***

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Aprovada em 27 de março 2013.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Ana Claudia de Paula Rosa Ignácio
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca Examinadora:

Prof^ª. Dra. Angela Corrêa de Freitas-Almeida
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof^ª. Dra. Alice Gonçalves Martins Gonzalez
Universidade Federal Fluminense

Prof^ª. Dra. Maria Cristina de Assis
Centro Universitário Estadual da Zona Oeste

Rio de Janeiro

2013

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, Luís e Norma, que ao abdicarem-se dos seus sonhos, não mediram esforços em prol de minha boa formação, sempre acreditando e incentivando os meus projetos, apoiando as minhas decisões durante toda a minha caminhada, e ensinando-me a trilhar o caminho do bem, da igualdade e da justiça.

Ao meu querido irmão, Leonardo, pelos laços sanguíneo e fraternal que nos une, pela amizade, cumplicidade e ensinamentos compartilhados.

A vocês, muito obrigado pelo exemplo vivo de amor, humildade e respeito.

Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha existência e saúde, que com Sua onipresença guia os meus caminhos e com Sua onipotência mantém-me perseverante e renovado na fé, permitindo a realização dos meus sonhos como de Seus planos ao alcançar novas etapas em minha vida.

Aos meus queridos pais, Luís e Norma, pelo amor incondicional e insubstituível, pelo incentivo quando tudo parecia sem sentido e impossível, pela fé que sempre depositaram em mim e por serem meus maiores exemplos de vida.

Ao meu querido irmão, Leonardo, pela atenção, dedicação e preocupação com meus projetos de vida, que mesmo distante fez-se tão imprescindível e presente, através de suas ligações telefônicas e visitas quando possíveis.

A Luiz Claudio, por todo amor, atenção, carinho, cumplicidade, pela compreensão de minhas preocupações, frustrações e ausências, como pelo incentivo constante tanto em minha vida pessoal quanto profissional.

Aos meus queridos avós, que hoje no plano celestial cuidam de mim, elevo-os em oração pelo amor e confiança que um dia, em vida, depositaram em mim.

Aos meus familiares e amigos, que mesmo não sendo citados, foram fundamentais pela amizade, momentos de descontração, incansável apoio e por fazerem-se presentes em minha vida.

A Universidade do Estado do Rio de Janeiro, ao Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, a Faculdade de Ciências Médicas e ao Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia por possibilitar a realização de um sonho.

A minha querida orientadora, Prof.^a Dra. Ana Claudia de Paula Rosa Ignacio, pela orientação, dedicação, paciência, carinho e amizade, pelo aprendizado e confiança investidos em mim, por conduzir-me com o seu conhecimento e por estimular meu interesse pela pesquisa científica.

A querida Prof.^a Dra. Ana Carolina Stumbo Machado, pela amizade, carinho, dedicação e paciência, pela gratificante colaboração na realização da microscopia de luz em parafina, como pelo suporte na aquisição de parte das imagens contidas neste trabalho.

A amiga e pós-doutoranda Ana Claudia, pela humildade e imprescindível auxílio nos meus primeiros passos e experimentos, pelas palavras de fé e perseverança, pelos conselhos sábios e incentivos em busca de meus ideais e pela assistência na realização da microscopia de luz em Epon, como pelo suporte na aquisição de parte das imagens contidas neste trabalho.

A amiga e doutoranda Paula Azevedo, pela humildade, pelo auxílio nos experimentos conjuntos, pela agradável companhia a viagem ao congresso como as idas ao Fundão, sempre acompanhadas de momentos de descontração.

A equipe do Laboratório 1, não citada anteriormente, essencial no auxílio técnico e pela boa convivência nas relações de trabalho.

Aos colegas da turma de mestrado 2011, pela amizade e companheirismo durante as aulas, pela ansiedade e nervosismo compartilhados pré-provas e pré-defesas, pelos encontros e reuniões e pelos laços de amizade formados.

A todos os professores do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia por auxiliarem na minha formação, pelos exemplos de saber e dedicação.

A todos os técnicos da Disciplina de Microbiologia e Imunologia, pela colaboração no aprendizado e na realização deste trabalho.

Aos funcionários da secretaria, especialmente ao Fábio de Araújo Pereira, pela assistência e paciência.

A pós-doutoranda Cíntia Santos e aos funcionários do Laboratório de Cirurgia Experimental da UERJ pelo auxílio na realização do experimento em coelho.

A técnica Noêmia Rodrigues, do Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer da UFRJ, pelo auxílio nas sessões de microscopia eletrônica de varredura, como pelo suporte na aquisição de parte das imagens contidas neste trabalho.

A CAPES, CNPq e FAPERJ pelo apoio financeiro.

Compartilhe o seu conhecimento. Esta é uma maneira de alcançar a imortalidade.

Dalai Lama

RESUMO

BRAGA, Ricardo Luís Lopes. **Aspectos celulares, moleculares e ultraestruturais da interação de *Escherichia coli* enteroagregativa com células não intestinais e intestinais humanas *in vitro* e epitélio intestinal de coelhos *ex vivo***. 2013. 108 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

Escherichia coli enteroagregativa (EAEC) é um patotipo emergente associado a casos de diarreia aguda ou persistente em crianças e adultos de países desenvolvidos e em desenvolvimento. É causador da diarreia persistente em pacientes HIV positivos e a segunda causa mais comum de diarreia dos viajantes. Seu padrão de aderência agregativo (AA) caracterizado pelo arranjo em “tijolos empilhados” em monocamada de células HEp-2 (carcinoma de laringe humana), está relacionado com a presença de um plasmídeo de aderência agregativa (pAA) de 60 MDa. A hipotética patogenia é representada pela heterogeneidade da categoria que abrange diversos fatores putativos de virulência envolvidos nos processos de colonização, adesão celular e citotoxicidade. O presente estudo teve como objetivos investigar a habilidade de produção do padrão AA pelas cepas EAEC nas linhagens HEp-2, Caco-2 (adenocarcinoma colo-retal humano) e T84 (carcinoma de cólon intestinal humano), a correlação entre AA e pAA em cada linhagem e analisar a interação de cepas EAEC utilizando modelo de cultura de órgão *in vitro* (IVOC). Para os dois primeiros objetivos foram utilizadas dezessete cepas EAEC, sendo 10 provenientes de crianças com diarreia aguda e sete de crianças sem diarreia. Para o último foram empregadas cinco cepas EAEC de crianças com diarreia aguda. Os ensaios de aderência foram realizados com as cepas co-incubadas com as linhagens celulares em estudo por um período de 3 e 6 horas. Entre as 17 cepas EAEC 29,4%, 41,1% e 82,3% apresentaram AA em 3 horas nas linhagens celulares HEp-2, Caco-2 e T84, respectivamente. Em 6 horas, 52,9% exibiram AA em HEp-2 e Caco-2 e 100% exibiram AA em T84. Como a linhagem T84 apresenta características fenotípicas das células do cólon e Caco-2 das células do intestino delgado, nossos resultados sugerem que EAEC pode apresentar maior tropismo pelo cólon humano. Para a pesquisa do pAA foi realizado uma reação em cadeia de polimerase (PCR). Observamos que 29,4%, 41,1% e 52,9% das cepas pAA+ apresentaram padrão AA em HEp-2, Caco-2 e T84, simultaneamente, nos testes de 3 horas. Em 6 horas, 47%, 52,9% e 70,5% das cepas pAA+ exibiram padrão AA em HEp-2, Caco-2 e T84, respectivamente. Os ensaios de aderência em tecido cultivado *in vitro* foram realizados com as cepas co-incubadas com fragmentos intestinais de íleo e cólon por um período de 6 horas. A microscopia de luz (ML) duas cepas foram mais aderentes ao cólon, uma ao íleo e duas a ambos. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) três cepas foram mais aderentes ao cólon, uma ao íleo e outra a ambos. A ML e MEV foram observados agregados bacterianos sobre o epitélio ou sobreposto ao muco. A ML ainda foi observada alterações morfológicas como extrusão celular, desorganização estrutural e destruição das vilosidades. Os resultados evidenciaram que a linhagem T84 mostrou ser mais suscetível a formação do padrão agregativo, bem como à aderência de cepas AA/pAA+, o que foi ratificado pelo maior grau de aderência a mucosa colônica no IVOC. Nossos dados indicam que estes modelos são mais eficazes para a elucidação da patogenicidade dessas cepas.

Palavras-chave: Aderência agregativa. Diarreia. EAEC. Linhagens celulares. Microscopias. Técnica de cultura de órgãos.

ABSTRACT

BRAGA, Ricardo Luís Lopes. *Cellular, molecular and ultrastructural aspects of the interaction of enteroaggregative Escherichia coli with non-intestinal and intestinal human cells in vitro and with intestinal epithelium of rabbits ex vivo*. 2013. 108 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) are an emerging pathotype associated with cases of acute or persistent diarrhea in children and adults in developed and emerging countries. It causes persistent diarrhea in HIV positive patients and it is the second most common cause of traveler's diarrhea. The aggregative adherence (AA) pattern characterized by arrangement in "stacked brick" monolayer HEp-2 (human larynx carcinoma) is related to the presence of a plasmid aggregative adherence (pAA) of 60 MDa. The hypothetical pathogenesis is represented by the heterogeneity of the category that covers a variety of putative virulence factors involved in the processes of colonization, cell adhesion and cytotoxicity. The present study aimed to investigate the ability of producing the standard AA by EAEC strains in HEp-2, Caco-2 (human colorectal adenocarcinoma) and T84 (human intestinal colon carcinoma), the correlation between AA and pAA in each strain in addition to the interaction of EAEC strains using *in vitro* organ culture model (IVOC). For the first two objectives were used seventeen EAEC strains (10 from children with acute diarrhea and seven from children without diarrhea). For the last were employed five EAEC strains from children with acute diarrhea. The adhesion assays were performed with strains co-incubated with cell lines under study for a period of 3 h and 6 h. Among the 17 strains EAEC 29.4%, 41.1% and 82.3% showed AA at 3 h in cell lines HEp-2, Caco-2 and T84, respectively. In 6 h, 52.9% EAEC strains exhibited AA in HEp-2 and Caco-2 and 100% strains exhibited AA in T84. As the line T84 has phenotypic characteristics of colon cells and Caco-2 of the cells of the small intestine, data suggested that EAEC may have a higher tropism for the human colon. PCR for detection of pAA showed 29.4%, 41.1% and 52.9% of the strains as pAA-positive showing the AA pattern in HEp-2, Caco-2 and T84 cells, simultaneously, in tests of 3 h. In 6 h, 47%, 52.9% and 70.5% of the strains pAA + exhibited AA pattern in HEp-2, Caco-2 and T84, respectively. The *in vitro* adhesion assays using cultured tissue were performed with EAEC strains co-incubated with intestinal fragments of ileum and colon over a period of 6 h. Light microscopy (LM) revealed two strains more adherent to the colon, one to the ileum and two to both. The scanning electron microscopy (SEM) showed three strains more adherent to the colon, one to the ileum and another to both. Bacterial aggregates on the epithelium or overlapping the mucus were observed by LM and SEM. LM assays also showed morphological changes such as cellular extrusion, structural disorganization and destruction of the villi. The results showed that the line T84 proved to be more susceptible to aggregative pattern formation, as well as the adherence of strains AA / pAA +, which was ratified by the higher degree of adherence to the colonic mucosa in the IVOC. Finally, data indicated that these models are more effective for elucidating the pathogenicity of these strains.

Keywords: Aggregative adherence. Diarrhea. EAEC. Cell lines. Microscopy. Organ culture technique.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Aspectos da interação de EAEC I49/3 com a linhagem celular não intestinal HEP-2 em ensaio de 6 horas de incubação observada por microscopia de luz.....	58
Figura 2 -	Aspectos da interação de EAEC I34/4 com a linhagem celular intestinal Caco-2 em ensaio de 3 horas de incubação observada por microscopia de luz.....	59
Figura 3 -	Aspectos da interação de EAEC H102/1 com a linhagem celular intestinal T84 em ensaio de 6 horas de incubação observada por microscopia de luz.....	60
Figura 4 -	Aspectos da interação de EAEC H153/5 com a linhagem celular não intestinal HEP-2 em ensaio de 3 horas de incubação observada por microscopia de luz.....	61
Figura 5 -	Percentual de cepas EAEC (n=17) com o padrão AA nas linhagens celulares HEP-2, Caco-2 e T84 após 3 ou 6 horas de incubação.....	66
Figura 6 -	Percentual de cepas EAEC pAA+ (n=17) com o padrão AA nas linhagens celulares HEP-2, Caco-2 e T84 após 3 ou 6 horas de incubação.....	70
Figura 7 -	Aspectos da interação de HB101 (A), EAEC 17-2 (B), H92/3 (C) e I49/3 (D) com mucosa do íleo do intestino de coelho <i>ex vivo</i> , após 6 horas de incubação, observados por microscopia de luz em parafina.....	72
Figura 8 -	Aspectos da interação de EAEC 17-2 (B), H92/3 (C) e I49/3 (D) com mucosa do íleo do intestino de coelho <i>ex vivo</i> , após 6 horas de incubação, observados por microscopia de luz em Epon.....	73
Figura 9 -	Aspectos da interação de HB101 (A), EAEC 17-2 (B), I18/2 (C) e I34/4 (D) com mucosa do cólon do intestino de coelho <i>ex vivo</i> , após 6 horas de incubação, observados por microscopia de luz em parafina.....	75

Figura 10 - Aspectos da interação de EAEC 17-2 (B), I18/2 (C) e I34/4 (D) com mucosa do cólon do intestino de coelho <i>ex vivo</i> , após 6 horas de incubação, observados por microscopia de luz em Epon.....	76
Figura 11 - Micrografia da interação de EAEC 042 (B) com mucosa do íleo do intestino de coelho <i>ex vivo</i> , após 6 horas de incubação, observada por microscopia eletrônica de varredura.....	78
Figura 12 - Micrografia da interação de EAEC H92/3 (A) e I49/3 (B) com mucosa do íleo do intestino de coelho <i>ex vivo</i> , após 6 horas de incubação, observada por microscopia eletrônica de varredura.....	79
Figura 13 - Micrografia da interação de EAEC 042 (B e C) com mucosa do cólon do intestino de coelho <i>ex vivo</i> , após 6 horas de incubação, observada por microscopia eletrônica de varredura.....	81
Figura 14 - Micrografia da interação de EAEC I18/2 (A) e I34/4 (B) com mucosa do cólon do intestino de coelho <i>ex vivo</i> , após 6 horas de incubação, observada por microscopia eletrônica de varredura.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Cepas clínicas de EAEC e seus respectivos sorotipos, grupos filogenéticos e marcadores.....	45
Tabela 2 -	Cepas controles de EAEC e seus respectivos sorotipos, grupos filogenéticos e marcadores.....	45
Tabela 3 -	Cepas de EAEC e seus respectivos sorotipos, grupos filogenéticos, marcadores e dias de sobrevivência de <i>Caenorhabditis elegans</i>	46
Tabela 4 -	Cepas protótipos de EAEC e seus respectivos sorotipos, grupos filogenéticos, categorias e marcadores.....	46
Tabela 5 -	Iniciadores utilizados para a pesquisa do fragmento CVD432 de pAA na reação em cadeia da polimerase (PCR).....	51
Tabela 6 -	Padrão de aderência de EAEC em células HEp-2 após 3 horas de incubação.....	62
Tabela 7 -	Padrão de aderência de EAEC em células HEp-2 após 6 horas de incubação.....	62
Tabela 8 -	Padrão de aderência de EAEC em células Caco-2 após 3 horas de incubação.....	63
Tabela 9 -	Padrão de aderência de EAEC em células Caco-2 após 6 horas de incubação.....	63
Tabela 10 -	Padrão de aderência de EAEC em células T84 após 3 horas de incubação.....	64
Tabela 11 -	Padrão de aderência de EAEC em células T84 após 6 horas de incubação.....	64
Tabela 12 -	Padrões de aderência de EAEC em células HEp-2, Caco-2 e T84, após 3 ou 6 horas de incubação.....	65
Tabela 13 -	Deteção do plasmídeo de aderência agregativa (pAA) em cepas EAEC.....	67
Tabela 14 -	Padrões de aderência de EAEC em células HEp-2, Caco-2 e T84, após 3 ou 6 horas de incubação e deteção do pAA a PCR.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS

AA -	Aderência Agregativa
AAF/I -	Fímbria de Aderência Agregativa do tipo I
AAF/II -	Fímbria de Aderência Agregativa do tipo II
AAF/III -	Fímbria de Aderência Agregativa do tipo III
AAF/IV -	Fímbria de Aderência Agregativa do tipo IV
AAFs -	Fímbrias de Aderência Agregativa
Aap -	“Anti aggregation protein”
AD -	Aderência Difusa
A/E -	“Attaching-Effacing”
AIDS -	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AL -	Aderência Localizada
AT -	Autotransportada
ATCC -	American Type Culture Collection
ATP -	Trifosfato de adenosina
BFP -	“Boundle Forming Pilus”
Caco-2 -	Linhagem celular de adenocarcinoma colo-retal humano
CDEC -	<i>Escherichia coli</i> destacando células
CLED -	Cystine Lactose Eletrolyte Deficient
DAEC -	<i>Escherichia coli</i> difusamente aderente
DEC -	<i>Escherichia coli</i> diarreio gênica
DMEM -	Meio de cultura essencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco
DNA -	Ácido desoxirribonucleico
EAEC -	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EAST1 -	Toxina termoestável 1 de <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
ECP -	Pilus Comum em <i>Escherichia coli</i>
EDTA -	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EHEC -	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC -	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasora
ELISA -	Ensaio imunoenzimático
Enf -	“EAEC non fimbrial adhesin”
EPEC -	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica

ETEC -	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
GMPC -	Guanosina monofosfato cíclico
H -	Antígeno flagelar
HeLa -	Linhagem celular de carcinoma de cérvix uterino humano
HEp-2 -	Linhagem celular de carcinoma de laringe humana
HGT -	Transferência Horizontal de Genes
HIV -	Vírus da Imunodeficiência Humana
HlyE -	Hemolisina E
HT29 -	Linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano
HUPE -	Hospital Universitário Pedro Ernesto
HUS -	Síndrome Hemolítica Urêmica
IL -	Interleucina
INF -	Interferon
IVOC -	Cultura de Órgão <i>In Vitro</i>
K -	Antígeno capsular
LPS -	Lipopolissacarídeo
LT -	Enterotoxina termolábil
MEM -	Meio de cultura essencial mínimo de Eagle
MEV -	Microscopia Eletrônica de Varredura
ML -	Microscopia de Luz
MLST -	“Multilocus Sequence Typing”
O -	Antígeno somático
OMP -	Proteína de membrana externa
pAA -	Plasmídeo de Adrência Agregativa
PAIs -	Ilhas de Patogenicidade
PAMPs -	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PBS-D -	Solução salina tamponada fosfatada modificada por Dulbecco
PCR -	Reação em Cadeia da Polimerase
Pet -	“Plasmid encoded toxin”
Pic -	“Protein involved in colonization”
PRR -	Receptores de Reconhecimento de Padrão
RGD -	Arginina-glicina-ácido aspártico
SFB -	Soro Fetal Bovino

ShET1 -	“Shigella enterotoxin 1”
SPATEs -	“Serine Protease Autotransporters of the <i>Enterobacteriaceae</i> ”
SPT -	Sem Padrão Típico
SSs -	Sistemas de Secreção
SST1 -	Sistema de Secreção do tipo I
SST5 -	Sistema de Secreção do tipo V
SST6 -	Sistema de Secreção do tipo VI
ST -	Tipo de Sequência
ST -	Enterotoxina termoestável
STa -	Enterotoxina termoestável a
Stx -	Toxina Shiga
T84 -	Linhagem celular de carcinoma de cólon humano
TBE -	Tris-Borato EDTA
TLR -	Receptor do tipo <i>Toll like</i>
TSA -	Agar Triptona de Soja
TSB -	Caldo Triptona de Soja
WHO -	Organização Mundial de Saúde

LISTA DE SÍMBOLOS

°C -	graus Celsius
µg -	micrograma
µL -	microlitro
µm -	micrômetro
ng -	nanograma
nm -	nanômetro
kb -	kilobase
KDa -	kilodalton
Kg -	kilograma
Kv -	kilovolt
mA -	miliamper
MDa -	megadalton
mg -	miligrama
mL -	mililitro
mM -	milimolar
mm -	milímetro
mm ² -	milímetro quadrado
pb -	pares de base
pH -	potencial de hidrogeniônico
U -	unidade enzimática
V -	volt
v/v -	volume / volume

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	19
1	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
1.1	<i>Escherichia coli</i>.....	20
1.1.1	<u>Síndrome diarreica.....</u>	20
1.1.1.1	Diarreia aguda.....	21
1.1.1.2	Diarreias persistente e crônica.....	21
1.1.2	<u>Patotipos.....</u>	22
1.1.3	<u>Padrões de aderência.....</u>	22
1.2	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC).....	23
1.2.1	<u>Histórico.....</u>	24
1.2.2	<u>Sorotipagem.....</u>	24
1.2.3	<u>Grupos filogenéticos.....</u>	25
1.2.4	<u>Sistemas de secreção.....</u>	26
1.2.5	<u>Fatores de virulência.....</u>	27
1.2.5.1	Cromossomais.....	27
1.2.5.2	Plasmidiais.....	29
1.2.6	<u>Biofilme.....</u>	31
1.2.7	<u>Patogênese.....</u>	32
1.2.8	<u>Epidemiologia.....</u>	33
1.2.9	<u>Diagnóstico.....</u>	35
1.2.10	<u>EAEC e sua heterogeneidade.....</u>	37
1.2.11	<u>Aderência.....</u>	38
1.2.12	<u>Modelos para estudo de interação <i>in vitro</i> por EAEC.....</u>	39
1.2.12.1	Linhagens celulares.....	39
1.2.12.2	Tecidos animais.....	40
2	OBJETIVOS.....	42
2.1	Objetivos gerais.....	42
2.2	Objetivos específicos.....	42
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.1	Meios, reagentes e soluções.....	43
3.2	Cepas bacterianas e condições de conservação.....	43

3.2.1	<u>Cepas bacterianas</u>	43
3.2.2	<u>Condições de conservação</u>	47
3.3	Condições de cultivo das cepas bacterianas	47
3.3.1	<u>Preparo dos cultivos para os ensaios de aderência e cultura de órgão <i>in vitro</i> (IVOC)</u>	47
3.3.2	<u>Preparo dos cultivos para a obtenção das suspensões de DNA para a reação em cadeia da polimerase (PCR)</u>	47
3.4	Linhagens celulares e condições de cultivo e manutenção das células	48
3.4.1	<u>Linhagens celulares</u>	48
3.4.2	<u>Condições de cultivo e manutenção das células</u>	48
3.5	Preparo dos cultivos celulares e ensaio de aderência qualitativo	49
3.5.1	<u>Preparo dos cultivos celulares</u>	49
3.5.2	<u>Ensaio de aderência qualitativo</u>	49
3.6	Caracterização molecular pela reação em cadeia da polimerase (PCR)	50
3.6.1	<u>Obtenção das suspensões de DNA como molde para a PCR</u>	50
3.6.2	<u>Pesquisa da sequência do plasmídeo de aderência agregativa (pAA) através da amplificação pela PCR</u>	50
3.6.3	<u>Análise dos produtos de amplificação por eletroforese em gel de agarose</u>	51
3.7	Modelo de cultura de órgão <i>in vitro</i> (IVOC)	52
3.7.1	<u>Seleção e preparo do coelho para experimento</u>	52
3.7.2	<u>Obtenção das amostras de tecidos</u>	52
3.7.3	<u>Ensaio de aderência em tecido cultivado <i>in vitro</i></u>	53
3.7.4	<u>Fixação dos fragmentos intestinais para as microscopias de luz (ML) em parafina e em Epon e eletrônica de varredura (MEV)</u>	53
3.7.4.1	Fixação para a microscopia de luz (ML) em parafina.....	53
3.7.4.2	Fixação para as microscopias de luz (ML) em Epon e eletrônica de varredura (MEV).....	54
3.7.5	<u>Processamento dos fragmentos intestinais para visualização as microscopias de luz (ML) em parafina e em Epon e eletrônica de varredura (MEV)</u>	54

3.7.5.1	Processamento para visualização a microscopia de luz (ML) em parafina.....	54
3.7.5.2	Processamento para visualização a microscopia de luz (ML) em Epon..	55
3.7.5.3	Processamento para visualização a microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	56
3.7.6	<u>Análises estatísticas</u>	56
4	RESULTADOS	57
4.1	Ensaio de aderência qualitativo	57
4.2	Detecção do plasmídeo de aderência agregativa (pAA) em cepas EAEC	67
4.2.1	<u>Correlação entre o padrão de aderência agregativa (AA) e a detecção do plasmídeo de aderência agregativa (pAA)</u>	68
4.3	Análise por microscopia de luz (ML) em parafina e em Epon de cortes semifinos da interação de cepas de EAEC com mucosas ileal e colônica do intestino de coelho <i>ex vivo</i>	71
4.3.1	<u>Interação de cepas de EAEC com fragmentos de mucosa ileal</u>	71
4.3.2	<u>Interação de cepas de EAEC com fragmentos de mucosa colônica</u>	74
4.4	Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) da interação de cepas de EAEC com mucosas ileal e colônica do intestino de coelho <i>ex vivo</i>	77
4.4.1	<u>Interação de cepas de EAEC com fragmentos de mucosa ileal</u>	77
4.4.2	<u>Interação de cepas de EAEC com fragmentos de mucosa colônica</u>	80
5	DISCUSSÃO	83
6	CONCLUSÕES	94
	REFERÊNCIAS	95
	ANEXO - Comissão de ética para o cuidado e uso de animais experimentais	108

INTRODUÇÃO

Em escala mundial, a diarreia é a principal causa de má nutrição e a segunda causa de morte em crianças menores de cinco anos, respondendo por 15-17 % do total de óbitos nessa faixa etária, o que corresponde a aproximadamente 1,5 milhão de óbitos anuais. A Organização Mundial de Saúde (WHO) estima que no ano de 2004, aproximadamente, 2,1 milhões de pessoas morreram vítimas de diarreia, o que corresponde a 3,7% do total de óbitos registrados. Em sua maioria, os óbitos por diarreia ocorrem em países não industrializados que apresentam renda nacional per capita inferior a U\$ 935,00 (WHO, 2010).

No Brasil, a diarreia ainda é a segunda maior causa de óbitos em crianças menores de cinco anos, respondendo por 5,5% do total de mortes nessa faixa etária. Consoante dados do Ministério da Saúde, a taxa de mortalidade por doença diarreica aguda para cada 100.000 habitantes de 2000 a 2009, na Região Sul variou de 1,21 a 2,30, na Região Sudeste variou de 1,34 a 2,07, na Região Centro-Oeste variou de 1,82 a 3,02, na Região Norte variou de 2,80 a 3,88 e na Região Nordeste variou de 3,53 a 5,89. A mortalidade está associada às condições insatisfatórias de saneamento e atenção à saúde da criança (Ministério da Saúde, 2010).

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 *Escherichia coli*

A espécie *Escherichia coli* é membro da família *Enterobacteriaceae*. Composta por bastonetes Gram-negativos, móveis ou imóveis, anaeróbicos facultativos de metabolismo fermentativo ou respiratório possuem uma plasticidade de adaptação a ambientes intestinais e extraintestinais, sendo, portanto, considerada um micro-organismo versátil e bem adaptado para as características do habitat (Torres *et al.*, 2010).

Além disso, *E. coli* é empregada como um indicador de contaminação fecal da água e dos alimentos, pois o micro-organismo é abundante nas fezes humanas e animais, e normalmente não é encontrado em outros nichos. Desde então, coliformes foi definido como um grupo de bactérias Gram-negativas, anaeróbias facultativas em forma de bastonete que fermentam a lactose para produzir ácido e gás em 48 horas a 35 °C (Torres *et al.*, 2010).

O micro-organismo geralmente coloniza o trato gastrointestinal infantil em poucas horas de vida. No entanto, *E. coli* tem uma existência dicotômica; a maioria habita o trato intestinal de mamíferos como comensais inofensivos, desempenhando importante papel na fisiologia intestinal; paradoxalmente várias linhagens evolutivas se desviaram deste nicho ancestral para se tornarem verdadeiros patógenos. O dogma atual sugere que estas últimas adquiriram elementos genéticos adicionais codificadores de fatores de virulência específicos, que permitem ao micro-organismo causar doença ao infectar um indivíduo saudável. As síndromes clínicas resultantes incluem infecções extraintestinais, tais como infecções do trato urinário, septicemias, meningites, e infecções intestinais mediadoras de diarreias (Chaudhuri *et al.*, 2010).

1.1.1 Síndrome diarreica

O trato gastrointestinal, com sua extensa superfície, representa um importante alvo para agentes infecciosos que, uma vez conseguindo suplantar as condições adversas à sua

colonização, desenvolverão um processo infeccioso que pode se traduzir em diarreia (Tomar, 2001).

A diarreia é conceituada como uma alteração de ordem intestinal caracterizada pelo aumento do número de evacuações e/ou diminuição da consistência das fezes devido à presença de água e eletrólitos (WHO, 2010).

Estudos demonstraram que pacientes com quadro diarreico podem estar infectados por mais de um patógeno sendo os mais frequentes *Salmonella* e *Escherichia coli* (Paniagua *et al.*, 2007).

1.1.1.1 Diarreia aguda

Caracterizada pelo início abrupto com aumento inesperado de evacuações e duração máxima de 14 dias, potencialmente autolimitada (WHO, 2010), a diarreia aguda contribuí consideravelmente para a morbidade e gastos extensivos com despesas médicas, sendo, portanto, considerada um grave problema de saúde pública.

Dentre os principais micro-organismos que causam a maioria dos relatos de diarreia aguda, figuram as bactérias, vírus e parasitas, sendo *E. coli* o principal patógeno bacteriano relacionado (Kaper, 2004).

1.2.1.1 Diarreias persistente e crônica

Com duração superior a 14 dias e inferior a três semanas, já que acima de 21 dias torna-se crônica, acomete indivíduos subnutridos, especialmente as crianças que vivem em países em desenvolvimento pela incapacidade de reparar os danos da mucosa e, assim, propensas à diarreia persistente ou crônica (Kaur *et al.*, 2010).

Ballester *et al.* (2002) descreveram que cerca de dez por cento dos episódios de doença diarreica aguda evoluem para diarreia persistente e são responsáveis por aproximadamente metade das mortes por diarreia.

1.1.2 Patotipos

Cepas de *E. coli* têm sido caracterizadas por sorotipagem, pelas manifestações clínicas das doenças que causam, pelos ensaios fenotípicos e pelos mecanismos de virulência que expressam. Atualmente, seis categorias ou patotipos de *E. coli* diarreio gênica (DEC) são reconhecidos (Estrada-Garcia & Navarro-Garcia 2012).

E. coli enterotoxigênica (ETEC) coloniza a mucosa intestinal através da adesão aos enterócitos e caracteriza-se pela produção de enterotoxinas termolábil (LT) ou termoestável (ST); *E. coli* enteropatogênica (EPEC) provoca a lesão característica "attaching-effacing" (A/E), onde há adesão íntima ao epitélio, aplainamento das microvilosidades e formação dos pedestais; *E. coli* enteroinvasora (EIEC) invade as células epiteliais semelhante a *Shigella* produzindo diarreia sanguinolenta com presença de muco e leucócitos; *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) causa a lesão característica A/E e produção da toxina Shiga (Stx) ou verotoxina; *E. coli* difusamente aderente (DAEC) demonstra padrão de adesão difusa e *E. coli* enteroagregativa (EAEC) demonstra padrão agregativo também conhecido como adesão "stacked-brick" ("tijolos empilhados") (Kaur *et al.*, 2010). As categorias ETEC, EIEC e EHEC são definidas como cepas de *E. coli* que possuem atributos de virulência específicos, incluindo diferentes toxinas, plasmídeo de invasão e fatores de colonização (Weintraub, 2007).

Outros patotipos de DEC têm sido propostos, tais como *E. coli* destacadora de células (CDEC), no entanto, seu significado permanece incerto (Kaur *et al.*, 2010).

1.1.3 Padrões de aderência

O ensaio de adesão de fase única utilizando células HEp-2, como descrito por Cravioto *et al.* (1979), tem-se revelado útil para categorização das cepas de *E. coli* com base em seus padrões de aderência. Três padrões distintos de adesão foram propostos para os patotipos de *E. coli*: localizado, difuso e agregativo. Estes três padrões de aderência definem respectivamente EPEC, DAEC e EAEC (Estrada-Garcia & Navarro-Garcia, 2012).

A aderência localizada (AL) é caracterizada pela adesão de grupos de bactérias para uma ou duas áreas da superfície celular (Scaletsky *et al.*, 1984). O principal fator responsável pelo fenótipo AL é um plasmídeo que codifica o pilus denominado “*Bundle Forming Pilus*” (BFP) exibido pelo patotipo enteropatogênico (Girón *et al.*, 1993).

A categoria difusamente aderente (DAEC) é caracterizada pela adesão de bactérias cobrindo toda a superfície da célula, o que caracteriza a aderência difusa (AD) descrita por Scaletsky *et al.* (1984).

O patotipo enteroagregativo (EAEC) é caracterizado por bactérias que aderem tanto as células HEp-2 (linhagem derivada de carcinoma de laringe humana) ou HeLa (linhagem derivada de carcinoma de cérvix uterino humano) quanto as lamínulas de vidro em um arranjo semelhante a tijolos empilhados, o que caracteriza a aderência agregativa (AA) descrita por Nataro *et al.* (1987).

1.2 *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC)

EAEC é o patotipo diarreico emergente mais recentemente identificado e descrito no grupo de *E. coli* diarreiogênica (DEC) (Nataro, 2005). Tem sido cada vez mais associado à diarreia aguda e persistente em lactentes e crianças nos países em desenvolvimento e industrializados (Estrada-Garcia & Navarro-Garcia, 2012).

Um modelo de três estágios foi proposto para a patogênese de EAEC: (i) aderência à mucosa intestinal, (ii) aumento da produção de muco com formação de biofilme e (iii) produção de toxinas e inflamação com liberação de citocinas (Kaur *et al.*, 2010). No entanto, os mecanismos precisos de virulência ainda necessitam ser elucidados para seu melhor entendimento (Joo *et al.*, 2007).

Clinicamente a doença foi definida a partir de estudos voluntariados, surtos ou casos esporádicos, e manifesta-se por diarreia secretória aquosa, muitas vezes com muco, com ou sem sangue, febre baixa, dor abdominal, náuseas e vômitos (Estrada-Garcia & Navarro-Garcia, 2012). Contudo, as variações sintomáticas da infecção devem-se a fatores como suscetibilidade genética e resposta imunológica do hospedeiro, assim como a quantidade de bactérias ingeridas pelo hospedeiro e a heterogeneidade de virulência entre as cepas (Kaur *et al.*, 2010).

Não obstante, ainda é provável que surtos e doenças diarreicas por EAEC sejam subdiagnosticadas devido à falta de familiaridade de muitos profissionais de saúde e da saúde pública com EAEC como uma possível causa da doença diarreica, e / ou porque limitadas instalações de investigação com técnicos de laboratórios treinados estão disponíveis para realizar regularmente os testes para sua identificação (Huang *et al.*, 2006).

1.2.1 Histórico

Em 1979, Cravioto *et al.* relataram que a maioria das cepas de *E. coli* enteropatogênicas (EPEC) aderiram a células HEp-2 em cultura no padrão localizado. Alguns anos mais tarde foi demonstrado que a aderência de cepas não-EPEC foi associada com diarreia. Estas foram chamadas de *E. coli* enteroaderentes (Mathewson *et al.*, 1987; Cravioto *et al.*, 1991; Weintraub, 2007).

Ao mesmo tempo, Nataro *et al.* (1987) reconheceram dois diferentes fenótipos entre as cepas enteroaderentes: difuso e agregativo. Seu grupo foi o primeiro a propor que EAEC poderia ser patogênica, após detectá-la com mais frequência nas fezes de crianças com diarreia do que nos controles.

EAEC foi então descrita pela primeira vez em 1985, reconhecida por sua distinta adesão a células HEp-2 em um padrão agregativo como tijolos empilhados. Este padrão de aderência, distinguível dos padrões de adesão manifestados por EPEC e DAEC, foi significativamente associado com diarreia entre as crianças em Santiago, Chile em 1987 (Nataro *et al.*, 1987).

1.2.2 Sorotipagem

Em 1944, Kauffman propôs um esquema para a classificação por sorotipos de *E. coli*, com base na identificação das características de superfície. A sorotipagem identifica a presença de estruturas de superfície como o antígeno somático polissacarídico O (LPS), o antígeno flagelar H e o antígeno capsular ou polissacarídico K. Essa identificação sorológica permitiu definir sorogrupos (O) e sorotipos (O:H:K), sendo de grande importância para os estudos epidemiológicos. Os genes que codificam antígenos O e H também são utilizados

como marcadores cromossômicos e sua identificação permite correlacioná-los com clones virulentos específicos (Nataro & Kaper, 1998).

As cepas de *E. coli* categorizadas como EAEC pertencem a uma gama diversificada de combinações de sorotipos O:H. No entanto, algumas cepas não expressam os antígenos O, são imóveis ou não tipáveis (Law & Chart, 1998; Regua-Manguia *et al.*, 2009).

Pelo menos 90 combinações O:H distintas foram demonstradas para conter os isolados classificados como EAEC. No entanto, alguns pertenciam ao mesmo sorogrupo das EPEC. Enquanto alguns sorogrupos, como O44, O86 e O126 são predominantemente EAEC, outros, como O128 e O111, contêm isolados que são EPEC, EHEC, ETEC bem como EAEC (Law & Chart, 1998).

1.2.3 Grupos filogenéticos

Devido a fenômenos evolutivos vários grupos bacterianos têm se separado dentro das espécies de micro-organismos. Uma estratégia que vem sendo utilizada na identificação da origem evolutiva de *E. coli* é a análise da distribuição dos marcadores de patogenicidade para a classificação dos isolados nos grupos filogenéticos. As análises filogenéticas têm demonstrado que cepas deste agente podem ser classificadas em quatro grupos principais: A, B1, B2 e D. As categorias de *E. coli* diarreio gênicas, como EAEC, estão distribuídas entre os quatro principais grupos filogenéticos. Além disso, cepas pertencentes a um determinado patotipo de *E. coli* diarreio gênicos podem ocorrer em diferentes grupos filogenéticos (Clermont *et al.*, 2000; 2001).

Clermont *et al.* (2000) desenvolveram uma técnica de PCR triplex para caracterizar os isolados de *E. coli* em grupos filogenéticos baseando-se na presença ou ausência de três candidatos a marcadores de patogenicidade, sendo dois genes: *chuA*, gene necessário para o heme transporte em *E. coli* enterohemorrágica (O157:H7) e *yjaA*, gene inicialmente identificado no genoma de *E. coli* k12, cuja função ainda é desconhecida, além de um fragmento de DNA anônimo designado TSPE4.C2. Entretanto, alguns isolados podem não ser claramente classificados por não pertencerem a um dos quatro grupos filogenéticos principais.

1.2.4 Sistemas de secreção

A secreção de proteínas é necessária para vários aspectos da fisiologia bacteriana, como a biogênese de organelas, a aquisição de nutrientes e a expressão de fatores de virulência como adesinas, toxinas e proteínas efectoras com diferentes atividades. Nos últimos anos foram identificados diversos Sistemas de Secreção (SSs) em bactérias Gram-negativas. Até o momento, são conhecidos sete, denominados sistemas de secreção do tipo I ao tipo VII (SST1 ao SST7), que são usados por patógenos de animais e plantas (Hayes *et al.*, 2010).

A complexa interação bactéria Gram-negativa e ambiente é facilitada pela secreção de numerosas macromoléculas que atravessando as duas membranas, interna e externa, da célula bacteriana são translocadas pelos SS, que podem ser mais ou menos complexos em termos de composição e regulação (Boyer *et al.*, 2009). Nas cepas EAEC dois sistemas de secreção estão, principalmente, relacionados à virulência: o SST5 e o SST6.

O sistema de secreção tipo V, secreta proteínas autotransportadas (ATs) que podem atuar como proteases, adesinas, toxinas e invasinas. Como característica, apresentam três regiões: o peptídeo sinal localizado na extremidade N-terminal da proteína; o domínio de passagem (“passenger”), que codifica, geralmente, a função de virulência; e a unidade de translocação, localizada na extremidade C-terminal da proteína, constituída pelo domínio β (“ β -barrel”), que transloca o domínio de passagem a partir da formação de um poro na membrana externa (Wells *et al.*, 2010; Navarro-Garcia & Elias, 2011). Após atravessar a membrana interna, a sequência sinal é processada originando um intermediário periplasmático. Posteriormente, a região β é inserida na membrana externa assumindo uma conformação tipo anel, que servirá de passagem para a porção ativa da molécula (o domínio de passagem). Na superfície celular, a proteína é liberada no meio extracelular através de um evento auto-proteolítico (Henderson *et al.*, 1999; Desvaux *et al.*, 2004).

As SPATEs (“Serine Protease Autotransporters of the *Enterobacteriaceae*”) são um subgrupo das proteínas ATs, que possuem o domínio serina protease que confere a capacidade de clivar diferentes substratos e estão associadas à virulência. A família SPATE foi filogeneticamente organizada em duas classes: a Classe I, que é citotóxica para as células epiteliais e a Classe II, que é variável em relação ao fenótipo, embora várias sejam conhecidas por clivar a mucina (Boisen *et al.*, 2009).

O sistema de secreção tipo VI foi recentemente descoberto e está associado a vários processos de virulência bacteriana, incluindo citotoxicidade, invasão, crescimento intracelular, sobrevivência e persistência dentro do hospedeiro (Pukatzki *et al.*, 2007). Em todos os sistemas descritos até o momento, duas proteínas foram encontradas no sobrenadante das culturas: a Hcp (hemolysin coregulated protein) ou “Hcp-like” que forma anéis hexaméricos e a VgrG (valine glycine repeat), que é semelhante a proteína da cauda do bacteriófago T4 (Filloux *et al.*, 2008).

1.2.5 Fatores de virulência

Os fatores de virulência estão envolvidos nos processos de adesão celular, colonização e citotoxicidade (Jenkins *et al.*, 2005). Muitos são codificados pelo plasmídio pAA como fímbrias, adesinas e toxinas. Um conjunto menor está presente no cromossomo de EAEC. Neste caso, segmentos de DNA contendo um conjunto de genes de virulência (ilhas de patogenicidade ou PAIs) são adquiridos de outras enterobactérias como *Shigella* ou *Yersinia*, por transferência horizontal de genes (HGT) e incorporados ao genoma de EAEC contribuindo para a virulência dessas cepas (Schubert *et al.*, 1998; Villaseca *et al.*, 2004).

1.2.5.1 Cromossomais

Os genes *pic*, *irp2* e o gene *setIA* da ilha de patogenicidade *she* são considerados como marcadores putativos de virulência que estão presentes no cromossomo de EAEC.

Pic (“protein involved in colonization”) encontra-se em *Shigella flexneri* e EAEC. É uma proteína autotransportada (AT) de 116 kDa pertencente a Classe II da família SPATE secretada pelo sistema de secreção tipo V e atua como uma mucinase com atividade mucinolítica e hemaglutinante (Kaper *et al.*, 2004 ; Boisen *et al.*, 2009). A camada de muco intestinal pode ser considerada uma barreira para o estabelecimento das infecções entéricas. A atividade mucinolítica, encontrada por muitos micro-organismos contorna essa barreira, permitindo a degradação do muco e a conseqüente colonização intestinal (Henderson *et al.*, 1999).

Uma ilha de patogenicidade de *Yersinia* contém um gene de sideróforo, *irp2*, que codifica para uma proteína necessária para a biossíntese de Yersiniabactina, relacionada à captação de ferro. Estudos demonstraram que cepas de EAEC podem hibridar com esse gene (Schubert *et al.* 1998; Czczulin *et al.* 1999). Em EAEC o gene *irp2* foi associado à produção de biofilme (Mohamed *et al.*, 2007).

Os genes *set1A* e *set1B* similares aos de *Shigella*, codificam subunidades de uma enterotoxina. O gene *set1A* foi encontrado por Czczulin *et al.* (1999) na EAEC protótipo 042 e foi associado à produção de biofilme em EAEC (Mohamed *et al.*, 2007). O produto desse gene, a toxina ShET1 (“*Shigella* enterotoxin 1”), contribui para a diarreia secretória em infecções associadas à *S. flexneri* ou à EAEC (Kaper *et al.*, 2004).

Muitos determinantes de virulência são codificados na ilha de patogenicidade *pheU*. Dois grupos de genes, os “clusters” *sci-1* e *sci-2*, que codificam proteínas envolvidas no sistema de secreção tipo VI foram encontrados em EAEC. O sistema *sci-1* é responsável pela secreção da proteína SciD, uma “Hcp-like” e codifica o gene *sciN*, essencial para a secreção de SciD e para a formação de biofilme (Aschtgen *et al.*, 2008). O sistema *sci-2* carrega o óperon *aaiA–aaiY*, que é responsável pela secreção da proteína AaiC e é controlado pelo ativador transcricional AggR (Dudley *et al.*, 2006).

Adesinas não-fimbriais também podem estar envolvidas na adesão de EAEC ao epitélio intestinal. Monteiro-Neto *et al.* (2003) relataram uma proteína de membrana externa (OMP) de 58KDa relacionada com a aderência de EAEC O111:H12 a células HEP-2, denominando-a adesina não fimbrial de EAEC (Enf – “EAEC non-fimbrial adhesin”). A análise estrutural da adesina Enf revelou que era composta de dois domínios que reúnem o tripeptídeo formado por arginina, glicina e ácido aspártico (RGD). O tripeptídeo RGD está associado com a ligação as integrinas em células eucarióticas e a diversas proteínas que compõem a matriz extracelular. Os domínios RGD também são sítios de ligação para algumas adesinas e toxinas bacterianas em receptores encontrados nas células hospedeiras, sugerindo que Enf poderia atuar como um ligante de um receptor específico na célula eucariótica (Monteiro-Neto *et al.*, 1997).

Algumas hemolisinas produzidas por EAEC também já foram relatadas. Baldwin *et al.* (1992) descreveram uma proteína de 120KDa, que mostrou homologia com a α -hemolisina de cepas de *E. coli* enteropatogênicas. A produção de α -hemolisina foi atribuída a algumas cepas, após a observação de destacamento celular em testes de aderência (Nataro *et al.*, 1995; Gomes *et al.*, 1995; Suzart *et al.*, 2001).

Recentemente, o sequenciamento genômico completo da cepa protótipo EAEC 042 detectou uma proteína codificada pelo gene *hlyE* (também conhecida como *clyA* ou *sheA*) (Chaudhuri *et al.*, 2010). A hemolisina E (*hlyE*) é uma proteína hemolítica de 34 kDa formadora de poros mediadora de efeitos citolíticos e citopáticos em culturas de células humanas, que foi identificada pela primeira vez em *E. coli* K-12. No entanto, seu papel em EAEC não foi determinado (Mueller *et al.*, 2009).

1.2.5.2 Plasmidiais

O plasmídeo de 60-65 MDa de EAEC carrega genes responsáveis pela codificação das fímbrias de aderência agregativa (AAF/I, AAF/II e AAF/III), o gene *aap*, além de duas toxinas denominadas EAST1 e Pet.

A primeira adesina de EAEC descrita foi designada fímbria de aderência agregativa tipo I ou AAF/I e foi encontrada na superfície da cepa EAEC 17-2. À microscopia eletrônica foi descrita como uma fímbria flexível, com 2 a 3 nm de diâmetro. A fímbria AAF/I está envolvida na formação de um padrão agregativo intenso e hemaglutinação de eritrócitos humanos (Nataro *et al.*, 1992).

Sua biogênese envolve uma diversidade de genes, representados pela sequência *aggA*, que codifica a subunidade estrutural; *aggC*, codificando a proteína ancoradora de membrana externa; *aggD*, codificando a chaperonina periplasmática e *aggB*, proteína com função desconhecida. Estes genes estão localizados na região 1, que está separada da região 2 por um fragmento de 9 kb no plasmídeo pAA. A região 2 contém o gene *aggR*, responsável pela ativação da transcrição de *aggA* (Savarino *et al.*, 1994). Em seguida, Garcia *et al.* (2000) demonstraram que o produto *aggB* codificado pelo cluster gênico de AAF/I de EAEC desempenharia a função de invasina.

Posteriormente foi relatada a presença da fímbria de aderência agregativa do tipo II ou AAF/II, detectada na cepa protótipo EAEC 042 (Nataro *et al.*, 1995). À microscopia eletrônica foi descrita como uma fímbria com filamentos de feixes semirrígidos de 5 nm de diâmetro. As fímbrias AAF/I e AAF/II diferem genética, fenotípica e morfologicamente (Czeczulin *et al.*, 1997). Farfan *et al.* (2008) demonstraram que a subunidade principal da fímbria AAF/II liga-se à fibronectina e a outros componentes da matriz extracelular. Essa ligação parece facilitar a colonização, invasão e/ou sinalização por patógenos intestinais.

Sua biogênese envolve uma diversidade de genes, representados pela sequência *aafA*, que codifica a subunidade estrutural; *aafD*, codificando a chaperonina periplasmática e *aggR*, responsável pela ativação da transcrição de *aafA*. Estes genes estão localizados na região 1, que está separada da região 2 por 956 pb de *aafA*. A região 2 contém *aafD*, codificando uma chaperonina silenciosa; *aafC*, codificando a proteína ancoradora de membrana externa e *aafB*, uma invasina (Elias *et al.*, 1999; Garcia *et al.*, 2000).

Em 2002, foi descrita a fímbria de aderência agregativa do tipo III ou AAF/III. Estudos de microscopia eletrônica revelaram que essa estrutura estava presente em toda a superfície bacteriana, sob a forma de filamentos longos individuais e flexíveis, que pareciam estar envolvidos na autoaglutinação, facilitando o contato entre as bactérias para a formação de agregados. Os genes responsáveis pela biogênese da fímbria AAF/III se organiza de maneira similar a AAF/I (Bernier *et al.*, 2002).

Desse modo, três fímbrias foram relacionadas com a produção do padrão AA. Os genes que as codificam estão presentes no plasmídeo pAA (Nataro *et al.*, 1992; Czczulin *et al.*, 1997; Bernier *et al.*, 2002). A subunidade principal das fímbrias AAF/I, AAF/II e AAF/III são codificadas pelos genes *aggA*, *aafA*, e *agg3A*, respectivamente. A biogênese das AAFs é controlada pelo ativador AggR (Boisen *et al.*, 2008).

Em 2008, Boisen *et al.* descreveram uma nova adesina também relacionada ao padrão de aderência agregativa, denominada Hda, em cepas EAEC isoladas na Dinamarca. Hda seria responsável pelo padrão AA em cepas EAEC, quando na ausência das três AAFs descritas até o momento, o que sugeriu a designação como AAF/IV.

O gene *aap* (“*anti aggregation protein*”), previamente conhecido como *aspU*, codifica a proteína dispersina ou anti-agregação, imunogênica, de 10,2 kDa que é secretada para o meio extracelular, onde permanece ligada ao lipopolissacarídeo (LPS) da bactéria, neutralizando a carga negativa da superfície externa e permitindo a projeção das fímbrias, que carregam uma forte carga positiva (Velarde *et al.*, 2007). A translocação da dispersina através da membrana externa está relacionada a um sistema de transporte dependente de ATP (“*ATP-binding cassette transporter system*”) referente ao sistema de secreção tipo I (SST1) (Nishi *et al.*, 2003).

A toxina EAST1 (“EAEC heat-stable enterotoxin 1”), codificada pelo gene *astA*, é um peptídeo de baixo peso molecular (4,1 KDa) com 38 aminoácidos e apresenta homologia com a enterotoxina termoestável a (STa) de ETEC, sendo capaz de induzir aumento na concentração de GMPc intracelular, podendo ocasionar a diarreia secretora (Savarino *et al.*, 1993). O gene *astA* foi primeiramente localizado na cepa protótipo 17-2 e posteriormente

identificado em cepas EAEC, na flora normal e em outras categorias patogênicas de *E. coli* (Savarino *et al.*, 1996).

A toxina termolábil Pet (“*Plasmid encoded toxin*”) é uma proteína autotransportada (AT) de 104 KDa (Eslava *et al.*, 1998) pertencente a Classe I da família SPATE secretada pelo sistema de secreção tipo V e atua como uma enterotoxina e citotoxina (Sanchez *et al.*, 2009; Boisen *et al.*, 2009). Dados sugeriam que o efeito citotóxico de Pet era decorrente do rearranjo do citoesqueleto da célula eucariótica e da clivagem de espectrina, uma proteína do citoesqueleto (Canizalez-Roman & Navarro-Garcia, 2003; Nataro, 2005). Atualmente, sabe-se que Pet é uma toxina alteradora do citoesqueleto, uma vez que induz sua contração, perda de fibras de estresse de actina e liberação de contatos focais em monocamadas de células HEp-2, seguido por completo arredondamento celular e descolamento (Estrada-Garcia & Navarro-Garcia, 2012).

1.2.6 Biofilme

Biofilmes são comunidades bacterianas aprisionadas em uma matriz polimérica associadas a superfícies bióticas ou inertes. Após a adesão, multiplicação e colonização bacteriana da superfície, há a formação de microcolônias, intercaladas por canais preenchidos por fluido que dificultam a penetração de antimicrobianos, tornando o tratamento da infecção mais complexo. Em adição, a capacidade de constituir um biofilme também pode proteger os micro-organismos da ação do sistema imune resultando em infecção persistente (Costerton *et al.*, 1999; Mohamed *et al.*, 2007).

Cepas EAEC caracteristicamente aumentam a secreção de muco na mucosa, com o aprisionamento das bactérias em um biofilme bactéria-muco (Nataro & Kaper, 1998). Estudos em animais e em cultura *in vitro* mostram que EAEC sobrevive dentro da camada de muco, explicando porque os indivíduos infectados, especialmente as crianças nos países em desenvolvimento com desnutrição pré-existente, podem desenvolver fezes mucóides, desnutrição e colonização persistente com diarreia prolongada (Huang *et al.*, 2006).

A produção de biofilme foi relacionada a genes comuns em EAEC: *aggA*, *aggR*, e *aap*, onde os produtos desses genes são responsáveis pela capacidade de aderência a mucosa intestinal e formação de biofilme. Os genes *fis* e *yafK*, após ativação de *aggR* também mostraram-se importantes para a formação de biofilme (Mohamed *et al.*, 2007).

Recentemente, um gene que codifica a proteína Shf de 32,8 kDa, foi localizado em um dos três quadros de leitura aberta entre *aafC* e *aatA* da cepa protótipo 042, e também tem sido implicado na formação de biofilme (Fujiyama *et al.*, 2008; Estrada-Garcia & Navarro-Garcia, 2012).

1.2.7 Patogênese

Em 1992, Tzipori *et al.* realizando testes com porcos gnotobióticos infectados com EAEC sugeriram que a bactéria é aderente aos tecidos intestinais em uma forma agregativa em associação com uma camada de muco espesso. Posteriormente, Nataro *et al.* (1995) confirmaram que o mecanismo de adesão ao muco era um importante fator do processo patogênico de EAEC.

Em linhagens celulares, cepas de EAEC provocam efeitos citotóxicos sobre as células T84 cultivadas *in vitro*, como vesiculação das células, perda das microvilosidades, vacuolização subnuclear, rompimento seguido de morte celular e esfoliação das células da monocamada. Os danos foram mais acentuados em áreas onde EAEC foram aderentes às células (Nataro *et al.*, 1996; Nataro *et al.*, 1998).

Modelos de estudo em humanos e animais indicam que EAEC é capaz de se ligar ao epitélio jejunal, ileal e colônico. A microscopia eletrônica de mucosa intestinal pediátrica infectada com EAEC revela bactérias em uma camada de muco espesso acima da borda em escova intacta dos enterócitos (Hicks *et al.*, 1996). No cólon, EAEC recruta mediadores inflamatórios e produz efeitos citotóxicos tais como vesiculação de microvilosidades, abertura das criptas e aumento da extrusão de células epiteliais (Huang *et al.*, 2006).

A resposta inflamatória gastrointestinal já foi documentada em pacientes infectados com EAEC e correlaciona-se com níveis elevados de citocinas fecais e marcadores inflamatórios em fezes de crianças e adultos com diarreia, incluindo a interleucina (IL)-1ra, IL-1 β , IL-8, interferon (INF)- α , lactoferrina, leucócitos fecais e sangue oculto (Greenberg *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2004b; Cennimo *et al.*, 2009; Mercado *et al.*, 2011). Acredita-se ainda que a produção excessiva de muco nas infecções por EAEC contribua para uma persistência deste micro-organismo no hospedeiro (Nataro *et al.*, 1998; Kaper *et al.* 2004).

A patogênese de EAEC, apesar de ainda incerta devido a sua complexidade, foi sugerida em um modelo de três estágios: no primeiro há a adesão da bactéria à mucosa

intestinal e à camada de muco, mediada pelas fímbrias AAF, pela produção da mucinase pic e da dispersina aap, que ajudam na penetração das bactérias na camada de muco; no segundo ocorre um aumento da secreção de muco estimulada pelas bactérias que ficam embebidas na camada de muco formando um biofilme, o que poderia favorecer a colonização persistente com diarreia prolongada; e no terceiro sucede a produção de toxinas e a resposta inflamatória envolvidas nos danos causados à mucosa intestinal (Kaur *et al.* 2010).

1.2.8 Epidemiologia

EAEC é atualmente reconhecida como uma causa de doença diarreica aguda entre crianças e jovens residentes em todas as regiões do mundo e viajantes de países industrializados que visitam regiões menos desenvolvidas, e também tem sido associada com diarreia aguda e persistente em pacientes de países em desenvolvimento infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e com surtos de origem alimentar de gastroenterite em residentes dos países industrializados. Além disso, tem sido relacionada com a doença diarreica persistente em crianças em todo o mundo e com grandes consequências para a saúde pública, originando deficiências de crescimento e diminuição do desenvolvimento intelectual em crianças subnutridas de países em desenvolvimento (Estrada-Garcia & Navarro-Garcia, 2012).

Em 1987 no Chile, Nataro *et al.* foram os pioneiros na realização de estudos com o objetivo de verificar a prevalência de EAEC em 154 crianças diarreicas e 66 saudáveis, onde resultados demonstraram que o isolamento de cepas EAEC era mais frequente no grupo diarreico. Mais tarde, em 1995, em um estudo voluntariado observou-se que a cepa protótipo, 042, causou diarreia em três dos cinco adultos infectados evidenciando o seu potencial diarreiogênico (Nataro *et al.*, 1995).

Dados epidemiológicos atuais ratificam a associação de EAEC com doença diarreica aguda em crianças, principalmente no Brasil, em países latino-americanos, asiáticos, africanos e países europeus menos desenvolvidos. A diarreia persistente em crianças também foi relacionada a regiões em desenvolvimento como industrializadas (Estrada-Garcia & Navarro-Garcia, 2012).

Durante a década de 80, EAEC foi associada com doença diarreica aguda em viajantes para o México (Mathewson *et al.*, 1985). Consoante, Du Pont (2009) as maiores taxas de

diarreia dos viajantes são observadas na América Latina, na África e no subcontinente indiano, sendo EAEC o segundo mais frequente patótipo isolado. No entanto, recentemente, foi relatado que ETEC e EAEC foram mais frequentemente isolados de viajantes do sudoeste da Ásia do que *Vibrio parahaemolyticus* (Ahn *et al.*, 2011).

A diarreia também tem sido sugerida como uma importante causa de morbidade nos imunocomprometidos. Uma vasta gama de agentes patogênicos é implicada na associação entre AIDS e diarreia e, em muitos casos, um agente causador não foi encontrado. Relatos de casos originalmente chamaram a atenção para o fato de que EAEC poderia ser recuperada a partir de fezes diarreicas de pacientes HIV positivos (Okeke & Nataro, 2001). Um estudo sugeriu que EAEC fosse a provável causa de diarreia em pacientes com AIDS quando nenhum outro agente diarreogênico fosse encontrado (Wanke *et al.*, 1998).

Estudos europeus em crianças indicam que EAEC também pode ser a principal causa de doença diarreica em países desenvolvidos, bem como em desenvolvimento (Presterl *et al.*, 1999; Knutton *et al.*, 2001). Em um hospital da Cidade do México dois surtos de diarreia letal grave em enfermarias de desnutrição provocaram a morte de cinco pacientes por diarreia persistente (Eslava *et al.*, 1993) Em uma ala neonatal sérvia um surto por EAEC foi claramente implicado envolvendo 19 bebês (Cobeljic *et al.*, 1996). No maior surto até então relatado, 2.697 crianças japonesas em 16 escolas que comeram a merenda escolar infectada tiveram diarreia grave e a EAEC foi encontrada em 10% dos casos (Itoh *et al.*, 1997).

Vários outros surtos, tanto em crianças quanto em adultos têm sido descritos no Reino Unido (Smith *et al.*, 1997; Spencer *et al.*, 1999), Índia (Pai *et al.*, 1997) e França (Boudailliez *et al.*, 1997; Morabito *et al.*, 1998). Em um ano de estudo sueco prospectivo sobre enteropatógenos em pacientes adultos com diarreia e controles saudáveis, 105 de 760 pacientes com diarreia foram positivos para DEC. EAEC estava presente em 16 casos e foi o segundo isolado mais comum entre DEC superado apenas pela ETEC (Svenungsson *et al.*, 2000).

Recentemente, na Alemanha sucedeu um surto de origem alimentar de diarreia sanguinolenta e síndrome hemolítica urêmica (HUS), principalmente entre adultos do gênero feminino, previamente saudáveis (Frank *et al.*, 2011). A cepa implicada no surto foi identificada como uma *E. coli* enteroagregativa do sorotipo O104: H4 produtora de toxina Shiga e causou diarreia sanguinolenta em mais de 4.000 pessoas, a maioria adultos de 16 países; pelo menos 850 desenvolveram HUS e 50 indivíduos morreram (Grad *et al.*, 2012).

Um estudo no Brasil identificou que a infecção por EAEC é a causa mais comum de diarreia em crianças e estava mais frequentemente associada à diarreia em crianças com

menos de dois anos de idade (Araujo *et al.*, 2007). No Recife, Wanke *et al.* (1991) ressaltaram a importância de EAEC nos quadros de diarreia persistente. No Nordeste, a doença diarreica causada por EAEC tem sido associada à má-nutrição e a problemas no desenvolvimento, onde crianças doentes e assintomáticas infectadas com esse micro-organismo apresentam taxa de crescimento abaixo do normal (Lima *et al.*, 1992). Em São Paulo, Scaletsky *et al.* (2002b) associaram EAEC à diarreia aguda em crianças menores que um ano de idade. Regua-Mangia *et al.* (2004) relataram uma alta incidência de EAEC em isolados de fezes de crianças provenientes do Rio de Janeiro. Essas apresentavam quadros diarreicos agudo ou persistente e eram da faixa etária abaixo dos três anos de idade.

O isolamento de cepas EAEC em água e alimentos contaminados indica que a transmissão da bactéria se dá pela rota fecal-oral (Itoh *et al.*, 1997). Em Guadalajara, no México, 44% dos molhos utilizados em restaurantes continham EAEC viáveis (Adachi *et al.*, 2002). Na Itália, dois surtos consecutivos afetaram 24 indivíduos e aparentemente a contaminação estava ligada ao consumo de queijos não pasteurizados (Scavia *et al.*, 2008). EAEC também foi isolada de fontes não humanas no Brasil onde Morais *et al.* (1997) descreveram o isolamento de EAEC provenientes de mamadeiras e Falcão *et al.* (1999) a partir de gelo. Nos países industrializados, pesquisas demonstram o isolamento frequente em amostras de fezes de indivíduos que apresentaram quadros diarreicos (Nataro *et al.*, 1998).

1.2.9 Diagnóstico

A sorotipagem proposta por Kauffman no ano de 1944, em muitos casos, torna-se impraticável pela natureza agregativa de EAEC, e a fração que pode ser sorotipada ao pertencer a uma ampla gama de sorotipos O:H, tornou a sorotipagem pouco usual como ferramenta para o diagnóstico de EAEC (Jafari *et al.*, 2012).

Assim sendo, em 1990 foi desenvolvida uma sonda de DNA a partir do pAA, conhecida como CVD432 ou, atualmente, aderência agregativa (AA). Baudry *et al.* (1990) testaram os fragmentos derivados empiricamente a partir dos plasmídeos das cepas 17-2 e 042, onde encontrou ser 89% sensível e 99% específico para EAEC. Ainda com base nesta sonda, em 1995 um ensaio de PCR foi desenvolvido por Schmidt *et al.* (1995).

Recentemente, Nishi *et al.* (2003) evidenciaram que o fragmento sonda CVD432, na verdade, corresponde ao gene *aatA*, o qual faz parte de um cluster de cinco genes

(*aatPABCD*) que codificam as proteínas do sistema do tipo ABC de secreção. Entretanto, até hoje é utilizada como um marcador molecular em estudos epidemiológicos (Kaur *et al.*, 2010).

Em 1993, a formação de uma película em caldo Muller-Hinton, derivada de seu fenótipo de agregação foi descrita como um método prático para identificação de EAEC (Albert *et al.*, 1993; Iwanaga *et al.*, 2002). Do mesmo modo, a capacidade de formação de biofilmes sobre superfícies de poliestireno ou vidro também foi descrita (Wakimoto *et al.*, 2004).

Quanto a detecção de genes da toxina EAST 1 usando sondas de DNA ou PCR é improvável que seja de utilização para a detecção de EAEC, dada a elevada incidência de toxina presente em outros grupos de *E. coli* (Savarino *et al.*, 1996; Law & Chart, 1998). Similarmente, a proteína Pet está presente em isolados de EAEC que são avirulentos em voluntários, não sendo específica para os isolados virulentos (Law & Chart, 1998).

Um PCR, um PCR multiplex e um ensaio de PCR em tempo real para detectar genes de virulência de EAEC e uma região do plasmídeo correspondente à sonda de DNA, estão também disponíveis (Amar *et al.*, 2004). Apesar disso, a indefinição genotípica permanece devido à heterogeneidade das cepas de EAEC, o que pode explicar em parte, a variada sensibilidade destas técnicas (Sarantuya *et al.*, 2004).

Assim sendo, o padrão-ouro para identificação de EAEC continua sendo o ensaio de aderência a células HEp-2 (Nataro & Kaper, 1998), que identifica o fenótipo agregativo de "tijolos empilhados". Entretanto, este método possui várias limitações para sistemas de vigilância e grandes estudos epidemiológicos de pacientes ou alimentos porque é trabalhoso, dispendioso, apenas realizado em laboratórios que cultivem as linhagens celulares, requer treinamento pessoal e não faz distinção entre cepas patogênicas e não patogênicas de EAEC (Estrada-Garcia & Navarro-Garcia, 2012).

Todavia, outros testes de diagnóstico vêm sendo propostos e incluem um ensaio imunoenzimático (ELISA) para a detecção quantitativa de imunoglobulina A secretória para EAEC (Sutjita *et al.*, 2000) e padrões de resposta de citocinas a enteropatógenos em que um padrão específico pode tornar-se uma assinatura distintiva do micro-organismo (Greenberg *et al.*, 2002).

1.2.10 EAEC e sua heterogeneidade

A investigação de cepas EAEC torna-se complicada pela diversidade deste grupo. Regua-Manguia *et al.* (2009) observaram uma alta variedade de sorotipos na população estudada. Variadas formas de adesão agregativa têm sido descritas. Algumas cepas aderem somente a células HEp-2, enquanto outras aderem as células HEp-2 e as lamínulas de vidro (Yamamoto *et al.*, 1992; Iwanaga *et al.*, 2002). Um padrão colméia de adesão agregativa tem sido descrito (Paul *et al.* 1994). Além do mais, nenhum fator de virulência foi comum a todas as EAEC (Okeke & Nataro, 2001).

Além disso, a aparente heterogeneidade torna-se o principal obstáculo na identificação do mecanismo de sua patogênese. EAEC tem sido claramente associada com diarreia em alguns indivíduos, mas em muitos outros, parecem causar infecções subclínicas ou colonização intestinal. Estas bactérias exercem uma complexa interação imune entre agente patogênico-hospedeiro, onde a resposta inflamatória à infecção por EAEC é dependente do sistema imune inato do hospedeiro e da cepa em questão (Kaur *et al.*, 2010).

Consoante Adachi *et al.* (2002) a análise do DNA plasmidial revelou um alto grau de heterogeneidade entre os isolados infectantes de EAEC e entre as estirpes de casos com infecções sequenciais, indicando a presença de múltiplas cepas que circulam na população levando a infecções recorrentes. Além disso, outros estudos (Nataro *et al.*, 1995; Czczulin *et al.*, 1999; Okeke *et al.*, 2000) indicam que as estirpes de EAEC representam um grupo heterogêneo, de *Escherichia coli* diarreiogênica (DEC) que compartilham o característico padrão de aderência agregativa para células HEp-2, mas diferem pelas propriedades de virulência que possuem, bem como por sua eletroforese em gel de campo pulsado (Adachi *et al.*, 2001) e conteúdo de DNA plasmidial.

Recentemente, Okeke *et al.* (2010) confirmaram a heterogeneidade de EAEC por análise molecular filogenética, onde foram identificados 96 tipos de sequência (ST) utilizando MLST (“Multilocus Sequence Typing”). Entre as 150 cepas EAEC testadas, 64% pertenciam a 16 complexos de STs e 40% pertenciam a três grupos principais de STs. Entre eles, o complexo ST10 foi o mais comum em EAEC associado com diarreia em crianças com idade superior a um ano.

1.2.11 Aderência

Em 1996, Nataro *et al.* demonstraram que a presença do pAA é um pré-requisito para a expressão do efeito citotóxico intenso em cultura de células. A falta do plasmídeo determina não somente menor aderência, como também efeitos tóxicos reduzidos, sugerindo que o plasmídeo poderia conter sequências codificadoras de citotoxinas ou que a expressão destas poderia ser regulada por genes plasmidiais.

É notória que uma etapa decisiva na patogênese de quase todos os patógenos entéricos seja a colonização da mucosa gastrintestinal, que é mediada por fatores específicos de aderência. As adesinas, codificadas pelo plasmídeo pAA, contribuem para o padrão de aderência agregativa (AA) de EAEC (Boisen *et al.*, 2008). O plasmídeo pAA contém diversos supostos fatores de virulência e as cepas que o carregam são chamadas de EAEC típicas (Cerna *et al.*, 2003; Aslani *et al.*, 2011). Dados atuais sugerem que tanto cepas carreadoras do pAA quanto cepas que não o possuem podem ser patogênicas (Joo *et al.*, 2007).

Três fímbrias foram relacionadas com a produção do padrão AA, sendo denominadas fímbrias de aderência agregativa I, II e III (AAF/I, AAF/II e AAF/III, respectivamente). Os genes que as codificam estão presentes no plasmídeo pAA e a biogênese das fímbrias AAF é controlada pelo ativador AggR (Nataro *et al.*, 1992; Czeczulin *et al.*, 1997; Bernier *et al.*, 2002).

A maioria das cepas EAEC não expressa nenhuma das fímbrias conhecidas, apesar da presença do regulador AggR e de outros genes associados ao plasmídeo pAA, o que sugere a existência de fímbrias e adesinas ainda não identificadas que podem estar envolvidas na produção do fenótipo AA (Czeczulin *et al.*, 1999). Estudo recente com cepas mutantes de EAEC, que não expressam AAF, mas que ainda apresentaram aderência, corroboraram para que outras adesinas fimbriais e afimbriais estejam presentes (Avelino *et al.*, 2010).

Como vemos, a aderência agregativa de EAEC é um fenótipo multi-fatorial. De fato, em cepas EAEC desprovidas de AAFs, um pilus comum em *E. coli* (ECP), uma estrutura fimbrial expressa pela maior parte dos patótipos de *E. coli*, desempenha um importante papel como estrutura adesiva (Avelino *et al.*, 2010).

Deste modo, as adesinas exercem um papel chave no processo de adesão e a capacidade invasora de determinadas cepas é dependente da aderência. O potencial de invasão de EAEC não está claramente determinado, mas em trabalho realizado pelo nosso grupo

algumas cepas de EAEC foram internalizadas em células epiteliais intestinais cultivadas *in vitro* e persistiram por longo período intracelularmente. Esta comprovação pode representar *in vivo*, o estabelecimento de um reservatório para a colonização persistente e consequente contribuição para a persistência da diarreia em alguns casos. Ao mesmo tempo em que intracelularmente, as bactérias permanecem protegidas do sistema imune do hospedeiro bem como da intervenção terapêutica, possibilitando assim a multiplicação e/ou disseminação célula a célula (Pereira *et al.*, 2008).

1.2.12 Modelos para estudo de interação *in vitro* por EAEC

A capacidade de EAEC aderir ao intestino do hospedeiro representa, sem dúvida, um importante fator de colonização e virulência. No entanto, mecanismos patogênicos adicionais provavelmente serão necessários para a produção dos sintomas de diarreia (Navarro-Garcia & Elias, 2011). Na tentativa de elucidar, sua patogenicidade tem sido investigada a partir de variados modelos.

1.2.12.1 Linhagens celulares

A cultura de células é um modelo amplamente estudado de interação *in vitro*. Células HEp-2 e HeLa têm sido utilizadas na identificação do padrão agregativo (Benjamin *et al.*, 1995; Abe *et al.*, 2001). Adicionalmente, linhagens celulares intestinais humanas Caco-2 e T84 também têm sido empregadas. As células Caco-2 (adenocarcinoma colo-retal humano) expressam enzimas características da borda em escova, aproximando-se fenotipicamente das células epiteliais do intestino delgado, ao passo que as células T84 (carcinoma de cólon humano) são fenotipicamente similares às células colônicas (Nataro *et al.*, 1996).

A morfologia das linhagens intestinais é caracterizada pela presença de microvilosidades apicais e junções intercelulares (Murakami & Masui, 1980). As características funcionais englobam a expressão de moléculas como hidrolases, transportadores de hexoses, aminoácidos, dipeptídeos, receptores hormonais, transporte

transepitelial. Além disso, produzem moléculas envolvidas nas interações intercelulares e entre as células e a matriz (Rousset, 1986).

Experimentos realizados com o objetivo de observar a interação de EAEC 236 (O111:H12) e da cepa protótipo 042, com células Caco-2 revelaram uma associação bactéria-célula e bactéria-bactéria e alterações morfológicas celulares não foram observadas. No mesmo estudo, a interação com células T84 também foi avaliada e constatou-se que as cepas eram capazes de apresentar interação bactéria-célula e bactéria-bactéria mais densa, além de alterações celulares severas, incluindo vacuolização, destruição das microvilosidades e perda do conteúdo citoplasmático (Abe *et al.*, 2001). Alterações similares em T84 já haviam sido reportadas por Nataro *et al.* (1996) em um estudo com a cepa protótipo 042.

De tal modo, as células T84 polarizadas têm sido utilizadas como um modelo favorável para adesão e mediação do dano ao tecido por citotoxinas. Por outro lado, as células Caco-2, quando não propiciam a adesão, parecem ser úteis na modelagem dos componentes da indução de IL-8 associados ao processo inflamatório (Okeke & Nataro, 2001).

1.2.12.2 Tecidos animais

O estudo de cultura de órgão *in vitro* (IVOC) a partir de biópsias do cólon humano, provavelmente fornece o mais próximo paralelo à infecção de seres humanos e proporciona valiosos conhecimentos da patogenicidade (Nataro *et al.*, 1996). Já em 1992, Knutton *et al.* revelaram a capacidade de aderência e produção de efeitos citotóxicos a mucosa colônica, a partir de cepas provenientes de crianças com diarreia aguda.

Em 1996, Hicks *et al.* avaliaram a interação de cepas de EAEC pertencentes a variados sorogrupos com cultura de fragmentos de tecidos intestinais (jejuno, íleo e cólon) provenientes de crianças. Foi observado que as cepas aderiram a diversas partes do tecido de modo distinto e algumas expressavam toxicidade. Nesses fragmentos, as bactérias aderidas apresentavam-se em associação com uma fina camada de muco acima dos enterócitos. Os efeitos citotóxicos apresentaram-se intensos no cólon, com vesiculação das microvilosidades, aumento da extrusão de células do epitélio e alargamento das criptas. Foi então sugerido que danos decorrentes à mucosa intestinal poderiam contribuir para a doença diarreica persistente.

No mesmo ano, Nataro *et al.* (1996) demonstraram os efeitos tóxicos em cultura de tecidos intestinais derivados do jejuno, íleo e cólon de crianças, a partir da interação com a cepa protótipo 042, onde a maior toxicidade foi observada nos espécimes colônicos.

A aderência de cepas de EAEC a fragmentos de jejuno e cólon obtidos de pacientes pediátricos também foi demonstrada por Abe *et al.* (2001). As cepas não foram capazes de invadir as células dos fragmentos de jejuno. Entretanto, no cólon, a cepa 236 (O111:H12) mostrou-se capaz de invadir as células epiteliais da mucosa, destruindo o tecido e favorecendo a penetração e invasão de células presentes na submucosa. Uma plausível explicação foi associada à produção de uma ou mais toxinas que, inicialmente, teriam causado um dano à superfície da mucosa favorecendo, posteriormente, um processo de invasão secundário a camada subsequente (Abe *et al.*, 2001).

Recentemente, a aderência de três cepas EAEC a mucosa ileal e colônica de pacientes pediátricos e adultos submetidos a cirurgias intestinais e à colonoscopias, respectivamente, foi avaliada. Todas as bactérias foram capazes de aderir a ambas as regiões na configuração típica de tijolos empilhados, onde foram visualizadas sobre grande quantidade de muco e, às vezes, sobre o epitélio intacto. Em algumas áreas, provável achatamento de vilosidades foi constatado. Além disso, foi possível observar sobre a superfície intestinal, estruturas fimbriais bacterianas que poderiam estar relacionadas ao processo de adesão (Andrade *et al.*, 2011).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Deste modo, o presente estudo teve como objetivo geral avaliar a participação de amostras de EAEC de origens diversas no processo de interação com células não intestinais e intestinais humanas *in vitro* e epitélio intestinal de coelhos *ex vivo*, observando aspectos celulares, moleculares e ultraestruturais. Neste sentido, foram desenvolvidos os seguintes objetivos específicos:

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar qualitativamente o padrão de interação bacteriana com linhagens celulares humanas não intestinais HEp-2, representativas de laringe e intestinais Caco-2 e T84, fenotipicamente representativas do íleo e do cólon, respectivamente, cultivadas *in vitro*;
- Determinar a presença do plasmídeo de aderência agregativa (pAA) e correlação com o padrão de aderência agregativa (AA);
- Avaliar aspectos celulares e ultraestruturais da interação bacteriana utilizando o cultivo de órgão *in vitro* (IVOC), a partir de tecido intestinal ileal e colônico de coelho *ex vivo*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Meios, reagentes e soluções

Os meios de cultivo e reagentes foram obtidos em sua forma desidratada e preparados conforme a indicação do fabricante. Exceto quando especificado, os meios de cultura utilizados foram de procedência Difco (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) ou Merck (Merck S.A., Rio de Janeiro, RJ, Brasil). O preparo dos meios e soluções foi realizado com água destilada ou ultra-pura (Milli-Q).

Os sais utilizados foram de procedência Merck (Merck S.A - Rio de Janeiro, RJ) e os demais reagentes foram de procedência Sigma (Sigma Chemical, Co., St. Louis, MO, USA) ou Gibco- BRL (Invitrogen, Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, USA). Quando necessária, a leitura do pH das soluções foi realizada em fitas colorimétricas (Merck S.A - Rio de Janeiro, RJ).

Os reagentes e materiais utilizados nos experimentos de microscopia eletrônica de varredura foram de procedência EMS (Electron Microscopy Sciences, Inc. - Washington, PA, USA).

3.2 Cepas bacterianas e condições de conservação

3.2.1 Cepas bacterianas

As cepas de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) foram procedentes de crianças atendidas no serviço de Pediatria do Hospital Universitário Pedro Ernesto da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (HUPE-UERJ) no período de julho de 1990 a abril de 1993, e isoladas das fezes de crianças de área urbana, menores que dois anos de idade com doença diarreica aguda ou saudáveis sem diarreia. A diarreia foi definida como a ocorrência de uma ou mais eliminação de fezes líquidas em um período de 24 horas (Rosa *et al.*, 1998).

As cepas clínicas foram isoladas de fezes de crianças que apresentavam sintomas de diarreia aguda e frequentavam a unidade ambulatorial ou encontravam-se internadas nas

enfermarias pediátricas do HUPE, ao passo que as cepas controles foram isoladas de fezes de crianças saudáveis não hospitalizadas, que não apresentavam sintomas gastrintestinais. (Rosa *et al.*, 1998). Das 17 cepas empregadas no presente estudo, dez pertenciam ao grupo clínico e sete ao grupo controle (Tabelas 1 e 2).

A caracterização quanto ao padrão de aderência às células HEp-2 foi verificado por Rosa *et al.* (1998). Dentre as cepas que produziram o fenótipo agregativo, apenas em testes de aderência de 6 horas de incubação foi possível verificar o padrão típico de tijolos empilhados.

A sorotipagem das cepas foi realizada pela Dra. Kinue Irino, do Instituto Adolpho Lutz, São Paulo, segundo as recomendações em Edwards & Ewing (1972). O sorotipo O:H é representativo do antígeno somático polissacarídico O e do antígeno flagelar H, respectivamente. A denominação NT ou R refere-se, respectivamente, ao sorogrupo não tipável ou rugoso. Já a categorização por grupos filogenéticos (A, B1, B2 e D) foi realizada por Nogueira (2004) (Tabelas 1 e 2).

As cepas também foram caracterizadas quanto a presença de marcadores putativos de virulência como o plasmídeo pAA (plasmídeo de aderência agregativa) e os genes *aggA* (fímbria de aderência agregativa I), *aafA* (fímbria de aderência agregativa II), *agg3A* (fímbria de aderência agregativa III), *aggR* (regulador transcricional), *aap* (dispersina, antiga *aspU*), *astA* (EAST1 - enterotoxina termoestável de EAEC), *fyuA* e *irp2* (genes envolvidos na captura de ferro), *pet* (“plasmid encoded toxin”) e *pic* (“protein involved in colonization”). (Rosa *et al.*, 1998; Dias, 1999; Yoshida, 2001; Yoshida & Pereira, 2002; Nogueira, 2004) (Tabelas 1 e 2).

Para os ensaios de aderência e reação em cadeia da polimerase (PCR) todas as cepas em estudo foram avaliadas (Tabelas 1 e 2). No entanto, para o ensaio de cultura de órgão *in vitro* (IVOC), apenas cinco cepas foram selecionadas a partir de dados obtidos em nosso laboratório referentes ao tempo de sobrevivência do nematódeo *Caenorhabditis elegans* infectado com as cepas de EAEC. Apenas as cepas em que o tempo de sobrevivência do verme foi igual ou superior a 8 e igual ou inferior a 10 dias foram selecionadas (França *et al.*, 2013) (Tabela 3).

As cepas protótipos utilizadas encontram-se referenciadas na Tabela 4. Como controle positivo para os ensaios de aderência e PCR foi utilizada a cepa EAEC 042, isolada de criança com diarreia em surto no Peru (Nataro *et al.*, 1985); e como controle negativo a cepa *E. coli* DH5 α (Sambrook *et al.*, 1989). Para o ensaio de IVOC, além da cepa 042, foi utilizada como controle positivo a cepa EAEC 17-2, isolada em surto no Chile (Vial *et al.*, 1988); e como controle negativo a cepa HB101 (Boyer & Roulland-dussoix, 1969).

Tabela 1: Cepas clínicas de EAEC e seus respectivos sorotipos, grupos filogenéticos e marcadores

Cepa	Sorotipo	Grupo filogenético	Marcadores
H9/3	O113:H12	A	pAA, <i>aggR</i> , <i>aap</i> , <i>fyuA</i> , <i>irp2</i> , <i>pet</i>
H19/2	OR:H16	A	pAA, <i>aggR</i> , <i>aap</i> , <i>astA</i> , <i>fyuA</i> , <i>irp2</i> , <i>pet</i> , <i>pic</i>
H80/3	O119:H17	D	pAA, <i>fyuA</i> , <i>irp2</i> , <i>pic</i>
H92/3	O86:H18	D	pAA, <i>aggA</i> , <i>aggR</i> , <i>aap</i> , <i>fyuA</i> , <i>irp2</i> , <i>pic</i>
H102/1	O86:H11	D	pAA, <i>agg3A</i> , <i>aggR</i> , <i>aap</i> , <i>fyuA</i> , <i>irp2</i>
H153/5	OR:H21	B1	pAA
I18/2	O86:H11	D	pAA, <i>aggR</i> , <i>aap</i> , <i>fyuA</i> , <i>irp2</i>
I29/3	ONT:H11	D	pAA, <i>aggR</i> , <i>aap</i> , <i>fyuA</i> , <i>irp2</i> , <i>pic</i>
I34/4	O111:H21	D	pAA, <i>agg3A</i> , <i>aggR</i> , <i>aap</i> , <i>astA</i> , <i>fyuA</i> , <i>irp2</i> , <i>pet</i> , <i>pic</i>
I49/3	O26:H27	A	pAA, <i>agg3A</i> , <i>aggR</i> , <i>aap</i> , <i>astA</i> , <i>irp2</i> , <i>pet</i> , <i>pic</i>

pAA, plasmídeo de aderência agregativa; *aggR*, regulador transcricional; *aap*, dispersina antiga *aspU*; *fyuA* e *irp2*, genes envolvidos na captura de ferro; *pet*, “plasmid encoded toxin”; *astA*, EAST1 - enterotoxina termoestável de EAEC; *pic*, “protein involved in colonization”; *aggA*, fímbria de aderência agregativa I; *agg3A*, fímbria de aderência agregativa III.

Tabela 2: Cepas controles de EAEC e seus respectivos sorotipos, grupos filogenéticos e marcadores

Cepa	Sorotipo	Grupo filogenético	Marcadores
C2/4	O153:H2	A	pAA, <i>agg3A</i> , <i>aggR</i> , <i>aap</i> , <i>fyuA</i> , <i>irp2</i> , <i>pic</i>
C29/2	O9:H10	A	pAA, <i>aggR</i> , <i>aap</i> , <i>astA</i> , <i>fyuA</i> , <i>irp2</i> , <i>pet</i> , <i>pic</i>
C43/1	O152:H8	B1	pAA, <i>fyuA</i> , <i>irp2</i> , <i>pet</i> , <i>pic</i>
C44/5	ONT:H23	D	pAA, <i>aap</i> , <i>astA</i> , <i>fyuA</i> , <i>irp2</i>
C46/3	ONT:H30	A	pAA, <i>aap</i> , <i>pic</i>
C52/2	ONT:H27	B1	pAA, <i>aggA</i> , <i>fyuA</i> , <i>irp2</i> , <i>pic</i>
C55/4	ONT:H10	B1	pAA, <i>aggR</i> , <i>aap</i> , <i>fyuA</i> , <i>irp2</i> , <i>pet</i> , <i>pic</i>

pAA, plasmídeo de aderência agregativa; *agg3A*, fímbria de aderência agregativa III; *aggR*, regulador transcricional; *aap*, dispersina antiga *aspU*; *fyuA* e *irp2*, genes envolvidos na captura de ferro; *pic*, “protein involved in colonization”; *astA*, EAST1 - enterotoxina termoestável de EAEC; *pet*, “plasmid encoded toxin”; *aggA*, fímbria de aderência agregativa I.

Tabela 3: Cepas de EAEC e seus respectivos sorotipos, grupos filogenéticos, marcadores e dias de sobrevivência de *Caenorhabditis elegans*

Cepa	Sorotipo	Grupo filogenético	Marcadores	Dias de sobrevivência de <i>C. elegans</i>
I49/3	O26:H27	A	pAA, <i>agg3A</i> , <i>aggR</i> , <i>aap</i> , <i>astA</i> , <i>irp2</i> , <i>pet</i> , <i>pic</i>	8
H92/3	O86:H18	D	pAA, <i>aggA</i> , <i>aggR</i> , <i>aap</i> , <i>fyuA</i> , <i>irp2</i> , <i>pic</i>	9
I18/2	O86:H11	D	pAA, <i>aggR</i> , <i>aap</i> , <i>fyuA</i> , <i>irp2</i>	9
I34/4	O111:H21	D	pAA, <i>agg3A</i> , <i>aggR</i> , <i>aap</i> , <i>astA</i> , <i>fyuA</i> , <i>irp2</i> , <i>pet</i> , <i>pic</i>	9
H102/1	O86:H11	D	pAA, <i>agg3A</i> , <i>aggR</i> , <i>aap</i> , <i>fyuA</i> , <i>irp2</i>	10

pAA, plasmídeo de aderência agregativa; *agg3A*, fímbria de aderência agregativa III; *aggR*, regulador transcricional; *aap*, dispersina antiga *aspU*; *astA*, EAST1 - enterotoxina termoestável de EAEC; *fyuA* e *irp2*, genes envolvidos na captura de ferro; *pet*, “plasmid encoded toxin”; *pic*, “protein involved in colonization”; *aggA*, fímbria de aderência agregativa I.

Tabela 4: Cepas protótipos de EAEC e seus respectivos sorotipos, grupos filogenéticos, categorias e marcadores

Cepa	Sorotipo	Grupo filogenético	Categoria	Marcadores
042	O44:H18	D	EAEC	pAA, <i>aafA</i> , <i>aggR</i> , <i>aap</i> , <i>astA</i> , <i>fyuA</i> , <i>irp2</i> , <i>pet</i> , <i>pic</i>
17-2	O3:H2	A	EAEC	pAA, <i>aggA</i> , <i>aggR</i> , <i>astA</i> , <i>fyuA</i> , <i>irp2</i> , <i>pet</i> , <i>pic</i>
DH5 α	-	-	<i>E. coli</i> k-12	-
HB101	-	-	Híbrida de <i>E. coli</i> B e <i>E. coli</i> K-12	-

pAA, plasmídeo de aderência agregativa; *aafA*, fímbria de aderência agregativa II; *aggR*, regulador transcricional; *aap*, dispersina antiga *aspU*; *astA*, EAST1 - enterotoxina termoestável de EAEC; *fyuA* e *irp2*, genes envolvidos na captura de ferro; *pet*, “plasmid encoded toxin”; *pic*, “protein involved in colonization”; *aggA*, fímbria de aderência agregativa I.

3.2.2 Condições de conservação

As cepas foram estocadas em tubos de plástico com rosca contendo 1 mL de Caldo Trypticase Soja (TSB, Merck) com glicerol 20% (v/v) e mantidas em temperatura de -20°C e -70°C. Alíquotas dos tubos do estoque mantido a temperatura de -20°C eram utilizadas para a realização dos testes e os tubos mantidos a -70°C constituíam o estoque permanente.

3.3 **Condições de cultivo das cepas bacterianas**

3.3.1 Preparo dos cultivos para os ensaios de aderência e cultura de órgão *in vitro* (IVOC)

As cepas foram inoculadas em 3mL de Caldo Trypticase Soja (TSB, Merck) e incubadas em estufa a 37°C por um período de 18 horas.

3.3.2 Preparo dos cultivos para a obtenção das suspensões de DNA para a reação em cadeia da polimerase (PCR)

As cepas foram semeadas em placas de Petri contendo meio Agar Trypticase Soja (TSA, Merck) e incubadas em estufa a 37°C por um período de 24 horas.

3.4 Linhagens celulares e condições de cultivo e manutenção das células

3.4.1 Linhagens celulares

As linhagens celulares utilizadas no estudo foram HEP-2 (ATCC CCL23, originária de carcinoma de laringe humana), Caco-2 (ATCC HTB37, originária de adenocarcinoma coloretal humano) e T84 (ATCC CCL248, originária de carcinoma de cólon intestinal humano).

3.4.2 Condições de cultivo e manutenção das células

A linhagem celular HEP-2 foi cultivada em frasco contendo meio de cultura essencial mínimo de Eagle (MEM; Gibco-BRL) acrescido de soro fetal bovino (SFB) 10%, L-glutamina 2,5 mM, gentamicina 50 µg/mL e fungizona 2,5 µg/mL. As células foram mantidas em estufa a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. A troca de meio e o sub-cultivo foram realizados a cada 2-3 dias.

A linhagem celular Caco-2 foi cultivada em frasco contendo meio de cultura essencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Gibco-BRL) acrescido de SFB 10%, L-glutamina 2,5 mM, gentamicina 50 µg/mL e fungizona 2,5 µg/mL. As células foram mantidas em estufa a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. A troca de meio foi realizada a cada 2-3 dias e o sub-cultivo a cada 7-8 dias.

A linhagem celular T84 foi cultivada em frasco contendo uma mistura de meio Ham F12 (Gibco-BRL) e meio de cultura essencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Gibco-BRL) na proporção 1:1, acrescido de SFB 10%, L-glutamina 2,5mM, gentamicina 50 µg/mL e fungizona 2,5 µg/mL. As células foram mantidas em estufa a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. A troca de meio foi realizada a cada 2-3 dias e o sub-cultivo a cada 7-8 dias.

Para o sub-cultivo das células, os tapetes foram recobertos com solução de tripsina-EDTA (tripsina 0,2%; EDTA 0,02% em PBS 0,01M, pH 7,2) (Bird & Forrester, 1981). Após

a remoção da solução, as células foram desprendidas suavemente por pipetagem com meio de cultura completo. A suspensão resultante foi então, dividida em dois novos frascos, que foram incubados em estufa a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ até a confluência dos tapetes celulares.

3.5 Preparo dos cultivos celulares e ensaio de aderência qualitativo

3.5.1 Preparo dos cultivos celulares

Para a realização dos ensaios de aderência os cultivos celulares foram tripsinizados como descrito no item anterior (item 3.4.2) e as células foram distribuídas em placas de cultura de células estéreis de 24 orifícios contendo lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro, previamente esterilizadas. As placas foram então incubadas em estufa a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ até a semi-confluência dos tapetes celulares.

3.5.2 Ensaio de aderência qualitativo

Os ensaios de aderência de 3 e 6 horas foram realizados com base no protocolo descrito por Rosa *et al.* (1998). Após a semi-confluência dos tapetes celulares, cada orifício foi lavado duas vezes com PBS-D e acrescido de 1 mL de meio MEM (HEp-2) ou DMEM (Caco-2 e T84) com SFB 2% e D-manose 1%, e posteriormente foram inoculados 35 µL de cultura bacteriana preparada conforme descrito no item 3.3.1, em cada orifício. A placa foi incubada por 3 horas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. As placas referentes aos ensaios de seis horas foram submetidas a duas novas lavagens com PBS-D, adição de 1 mL de meio novo MEM (HEp-2) ou DMEM (Caco-2 e T84) contendo SFB 2% e D-manose 1% e, reincubadas por mais 3 horas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂.

Finalizado o período total de incubação (3 ou 6 horas), os cultivos celulares foram lavados duas vezes com PBS-D e, em seguida, fixados com metanol por 10 minutos. Para

coloração das células foi utilizado o corante de Giemsa (1:20) em tampão fosfato 0,03M (pH 6,5) por um período de 30 minutos. As lamínulas foram lavadas com água destilada, secas, dispostas sobre lâmina de vidro com meio de inclusão rápida para microscopia (Entellan, Merck) e em seguida foram observadas em microscópio de luz. Os ensaios foram realizados em duplicata para cada linhagem celular e para cada tempo de incubação.

3.6 Caracterização molecular pela reação em cadeia da polimerase (PCR)

3.6.1 Obtenção das suspensões de DNA como molde para a PCR

Para obtenção das suspensões de DNA foram selecionadas 3 a 5 colônias isoladas, obtidas a partir do crescimento dos cultivos bacterianos conforme descrito no item 3.3.2. Em seguida, as colônias foram transferidas para microtubos previamente identificados, contendo 250 µL de água Milli-Q estéril. As suspensões bacterianas resultantes foram submetidas à fervura por 10 minutos, rapidamente resfriadas no gelo, e posteriormente, estocadas a - 20°C.

3.6.2 Pesquisa da sequência do plasmídeo de aderência agregativa (pAA) através da amplificação pela PCR

Os iniciadores empregados para a pesquisa da sequência característica de pAA e o produto da amplificação após PCR encontram-se na Tabela 5. A mistura reacional para o experimento de PCR foi elaborada em câmara UV Chamber própria para PCR (Plas Labs, Lansing, Mi, USA) dentro de microtubo de 1,5 mL estéril e foi composta de 33 µL de água Milli Q estéril, 3,75 µL de tampão Tris-HCl pH 8,4, [20 mM] e KCl [50mM], 1,25 µL de MgCl₂ [50mM], 0,5 µL de cada primer iniciador CVD432 (I e II) [500ng/µl], 1 µL de dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) [25mM] e 5 µL de enzima Taq DNA polimerase [0,5U/µL] (Invitrogen, Life Technologies, Brasil). Em seguida foram adicionados 5 µL do DNA molde extraído de cada cepa bacteriana (item 3.6.1) para obtenção de um volume final de 50 µL.

A PCR foi realizada em termociclador (PTC-100 Thermal Programmable Controller, M. J. Inc.) como descrito por Schmidt *et al.* (1995) em 30 ciclos compostos pelas etapas de desnaturação a 94°C por 40 segundos, anelamento a 53°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. Após a amplificação, os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose.

Tabela 5: Iniciadores utilizados para a pesquisa do fragmento CVD432 de pAA na reação em cadeia da polimerase (PCR)

Iniciador		Sequência 5'→3'	Sequência alvo	Produto (pb)
CVD432	I-	CTGGCGAAAGACTGTATCAT	Sequência críptica	630
	II-	CAATGTATAGAAATCCGCTGTT	CVD432 no pAA	

3.6.3 Análise dos produtos de amplificação por eletroforese em gel de agarose

Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,2% (Gibco, BRL). No preparo do gel, a agarose foi derretida em tampão TBE -1X em forno micro-ondas. O tampão TBE-1X foi preparado a partir de solução TBE-10X (Tris-Borato 90 mM, EDTA 2mM, pH 8,0). O pH do tampão foi determinado através de fitas colorimétricas.

Em seguida, foi adicionado ao gel derretido, ainda não solidificado, 6 µL do corante Syber Safe (Invitrogen). Aos amplicons foi adicionado 6 µL de azul de bromofenol (C₁₉H₁₀Br₄O₅S - Isofar). O marcador de peso molecular DNA *ladder* foi composto de 7 µl de água Milli-Q, 3 µl de azul de bromofenol e 1 µl de DNA *ladder* 100 pb (Invitrogen). Ao gel solidificado foi aplicado 10 µL da amostra em cada poço. A eletroforese foi executada a 80V e 52mA por 80 minutos, em cuba apropriada (Horizon Life Technologies). Após a corrida, o gel foi levado ao Transiluminador (Vilber Lourant) e fotografado utilizando o programa Kodak Digital Science-Electrophoresis & Analysis System 120, para verificação da presença da banda de interesse. O experimento foi realizado em duplicata.

3.7 Modelo de cultura de órgão *in vitro* (IVOC)

3.7.1 Seleção e preparo do coelho para experimento

Para o ensaio de cultura de órgão *in vitro*, foi utilizado um coelho macho da raça Nova Zelândia com peso entre 0,9 e 1,0 Kg, proveniente do biotério do Instituto Vital Brazil (Niterói, Rio de Janeiro, RJ). Antes do ensaio, suas fezes foram coletadas, semeadas em Agar Trypticase Soja (TSA, Merck), Agar Mac Conkey (Merck) e Agar CLED (Merck) e incubadas em estufa a 37°C por um período de 24 horas. Não foi observado o crescimento de micro-organismos. O coelho foi submetido a jejum alimentar por 24 horas antes dos procedimentos experimentais.

O experimento foi realizado nas dependências do Laboratório de Cirurgia Experimental (LCE-UERJ) e nas dependências do Biotério da Disciplina de Microbiologia, ambos da Faculdade de Ciências Médicas da UERJ. Os procedimentos *in vivo* foram submetidos à análise pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ, tendo sido aprovado com registro de número CEA/236/2008 (Anexo).

3.7.2 Obtenção das amostras de tecidos

Para obtenção de fragmentos do intestino representativos de íleo e de cólon, o animal foi anestesiado e sacrificado por aplicação intravenosa de Tiopentax[®] (Tiopental sódico, 10mg/Kg, Cristália, São Paulo, Brasil). Em seguida, foi realizada a tricotomia da região abdominal e, posteriormente, a assepsia do local de incisão com álcool iodado. O abdômen foi aberto para evisceração e identificação dos sítios anatômicos do trato intestinal. Em seguida, amostras de tecido foram cortadas em fragmentos de biópsia com uma área de aproximadamente 2-3 mm² e orientados com a superfície da mucosa voltada para cima.

3.7.3 Ensaio de aderência em tecido cultivado *in vitro*

O ensaio de aderência em tecido *in vitro* foi realizado conforme descrito por Knutton *et al.* (2001). Os fragmentos consoante descrito no item 3.7.2 foram aderidos em um substrato esponjoso. Os sistemas tecido-substrato foram encaixados no interior de placas de cultura de células estéreis de 6 orifícios e foram saturados com meio de cultura essencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Gibco-BRL) acrescido de soro fetal bovino (SFB) 10% e D-manose 0,5% (v/v).

Alíquota de 50 µL de cultura bacteriana preparada conforme descrito no item 3.3.1 foi adicionada à superfície mucosa de cada sítio intestinal cultivado e o conjunto foi levado para incubação em estufa a 37° C em atmosfera com 5% de CO₂ durante 6 horas. O meio de cultura foi trocado a cada 1 hora a fim de manter os níveis de pH e nutrientes estabilizados e a cada troca de meio, as placas retornaram para incubação. Após o período de cultivo, os fragmentos de tecido foram lavados três vezes com meio de cultura fresco (DMEM), com o objetivo de remover as bactérias não aderentes; e posteriormente, fixados.

3.7.4 Fixação dos fragmentos intestinais para as microscopias de luz (ML) em parafina e em Epon e eletrônica de varredura (MEV)

3.7.4.1 Fixação para a microscopia de luz (ML) em parafina

Os sistemas tecido-substrato foram lavados com salina 0,9% estéril. Após a lavagem, os fragmentos de tecido foram transferidos para placas de cultura de célula estéreis de 12 orifícios e mergulhados no fixador formol tamponado 40%.

3.7.4.2 Fixação para as microscopias de luz (ML) em Epon e eletrônica de varredura (MEV)

Os sistemas tecido-substrato foram lavados com salina 0,9% estéril e tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2. Após a lavagem, os fragmentos de tecido foram transferidos para placas de cultura de célula estéreis de 12 orifícios e mergulhados em solução de fixação contendo glutaraldeído 2,5% e formaldeído 2% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2 .

3.7.5 Processamento dos fragmentos intestinais para visualização as microscopias de luz (ML) em parafina e em Epon e eletrônica de varredura (MEV)

3.7.5.1 Processamento para visualização a microscopia de luz (ML) em parafina

Depois de fixados, os fragmentos foram retirados da solução de fixação, colocados em cassetes plásticos em recipiente de vidro e foram lavados quatro vezes em água corrente (5 minutos cada). A cada lavagem foi realizada a substituição da água. Em seguida, os fragmentos passaram por desidratação sequencial em etanol nas concentrações de 70% (1 hora), 90% (40 minutos) e 100% (2 vezes, 30 minutos cada). Durante a etapa de desidratação o recipiente de vidro com os cassetes foi agitado constantemente. Após clarificados em dois banhos de xilol (20 minutos cada) os cassetes foram secos em papel toalha, a fim de retirar o excesso de xilol e foram submetidos a infiltração com parafina líquida em estufa de 56 a 60°C (2 vezes, 30 minutos cada). Posteriormente, para a inclusão os cassetes foram abertos e os fragmentos colocados em fôrmas contendo parafina líquida. Antes de sua completa solidificação, os fragmentos foram orientados verticalmente. No dia subsequente, os blocos foram desenformados, cortados ao meio e suas bordas aparadas. Com o auxílio de micrótomo ("820" microtome - Spencer) foram realizados cortes com 5 µm de espessura. Os cortes foram estirados, transferidos para lâmina histológica e fixados à lâmina pelo calor. Para a coloração dos cortes, as lâminas foram colocadas em cestos em estufa de 56 a 60°C por 20 minutos, para que a parafina fosse derretida. Em seguida, foram desparafinadas em três banhos de xilol (3 minutos cada), hidratadas em sequência decrescente de etanol nas concentrações de 100%, 90% e 70% (3 minutos cada), receberam o último banho em água destilada (3 minutos) e

foram secas. As lâminas foram coradas pela coloração de Giemsa por 30 minutos, secas, dispostas sobre lâmina de vidro com meio de inclusão rápida para microscopia (Entellan, Merck) e em seguida foram observadas em microscópio de luz.

3.7.5.2 Processamento para visualização a microscopia de luz (ML) em Epon

Depois de fixados, os fragmentos foram retirados da solução de fixação e de cada fragmento, 3 a 6 pequenas frações de tecido foram cortados, colocados em tubos de ensaio com rosca e lavados em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2 por 1 hora. Em seguida, foram novamente lavados em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2 e água Milli-Q na proporção 1:1 por 24 horas. Após a lavagem do material, foi realizada a pós-fixação em tetróxido de ósmio 2% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2 por 1 hora. Após este período, os fragmentos foram lavados três vezes em água Milli-Q estéril (10 minutos cada) e imersos em solução de acetato de uranila a 0,5% em sacarose por 30 minutos. Posteriormente, os fragmentos foram novamente lavados duas vezes em água Milli-Q estéril (10 minutos cada), seguido de desidratação sequencial em etanol nas concentrações de 70%, 90% (1 hora para cada concentração) e 100% (24 horas). Os fragmentos foram então infiltrados duas vezes com óxido de propileno (1 hora cada), e em seguida com mistura de resina Epon (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA, USA) e óxido de propileno nas proporções de 1:1, 2:1 (2 horas para cada proporção) e 3:1 (24 horas). Em seguida, o material foi colocado em resina pura por 3 horas com tampa aberta e por mais 3 horas a vácuo em dessecador, incluído em moldes de silicone e mantido em estufa a 60°C por 72 horas.

Após a polimerização da resina, cortes semifinos com 900 nm de espessura foram obtidos com ultramicrotomo (Reichert Ultracuts S, Leica Reichert & Jung Products, Austria). Os cortes foram estirados, transferidos para lâmina histológica e fixados à lâmina por aquecimento da mesma a 70°C - 100°C em placa aquecedora (Reichert multiplate, Leica). Procedeu-se a coloração dos cortes com solução de azul de toluidina 1% por 2 minutos e os cortes semifinos foram observados em microscópio de luz.

3.7.5.3 Processamento para visualização a microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Depois de fixados, os fragmentos foram retirados da solução de fixação e lavados três vezes em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2 (10 minutos cada). Posteriormente, os fragmentos em tubos passaram por desidratação sequencial em etanol nas concentrações de 30%, 50%, 70%, 90% (10 minutos para cada concentração) e 100% (3 vezes, 10 minutos cada). Os fragmentos foram então transferidos para cestas e submetidos à câmara do aparelho de secagem (Bal-Tec CPD 030) pelo método de ponto crítico do gás carbônico, para ser efetuada a substituição do etanol absoluto por gás carbônico. Em seguida, com o auxílio de um microscópio estereoscópico, os fragmentos foram orientados com as vilosidades para cima, colocados em um suporte porta-amostra para varredura, e aderidos com fita adesiva dupla face. Após a montagem, os fragmentos foram submetidos ao metalizador (Balzers Union FL-9496) para deposição de fina camada de ouro, tornando-os condutores. As observações foram realizadas no Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer (UFRJ) em microscópio eletrônico de varredura (Quanta 250), operando a 15Kv.

3.7.6 Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada através do teste de Fisher utilizando o programa de estatística Graph-Pad Prism (Graph Pad Software, Inc. San Diego, CA) (Cass, 2000).

4 RESULTADOS

4.1 Ensaio de Aderência Qualitativo

Dezessete cepas de EAEC foram submetidas ao ensaio de aderência qualitativo em células não intestinais (HEp-2) e intestinais (Caco-2 e T84) por um período de 3 e 6 horas de incubação. A ausência de padrão típico (SPT) caracterizou-se pela aderência discreta de bactérias em cadeia, coexistindo com bactérias aos pares e isoladas sobre o tapete celular e a lamínula de vidro, sem a formação de agregados bacterianos típicos (Figura 1). A aderência agregativa (AA) foi caracterizada pela aderência de bactérias associadas às células como à lamínula de vidro formando grandes agregados bacterianos semelhantes a “tijolos empilhados” em vários pontos do tapete celular (Figuras 2 e 3). A aderência difusa (AD) foi definida pela adesão de bactérias que se encontravam dispersas e bem distribuídas sobre as células e a lamínula de vidro cobrindo toda a superfície (Figura 4).

Na linhagem celular HEp-2 (não intestinal), os resultados obtidos revelaram que 29,41 % das cepas exibiram padrão AA em células HEp-2 em 3 horas (Tabela 6) e 52,94 % em 6 horas (Tabela 7). Na linhagem intestinal Caco-2, 41,18 % apresentaram padrão AA em 3 horas (Tabela 8) e 52,94 % em 6 horas (Tabela 9). Em contrapartida, na linhagem intestinal T84, 82,35 % exibiram padrão AA em 3 horas (Tabela 10) e 100 % em 6 horas (Tabela 11). A Figura 5 ratifica o aumento do número de cepas que exibiram o padrão AA, quando comparado os ensaios de 3 e 6 horas, principalmente para a linhagem T84, que atingiu 100% de cepas com padrão AA em 6 horas.

A análise comparativa dos resultados demonstrou que das dezessete cepas, apenas cinco (29,41 %) aderiram com o padrão AA nas três linhagens celulares testadas e em ambos os tempos de ensaio. Quando comparado separadamente cada tempo, cinco (29,41 %) exibiram o padrão AA e três (17,65 %) não obtiveram padrão típico nas três linhagens em 3 horas. Em compensação, em 6 horas, oito (47,06 %) apresentaram o padrão AA e nenhuma apresentou sem padrão típico, porque na linhagem celular T84 todas as cepas foram AA em 6 horas. A AD foi observada apenas em uma cepa nas linhagens celulares HEp-2 e Caco-2 no tempo de 3 horas (Tabela 12).

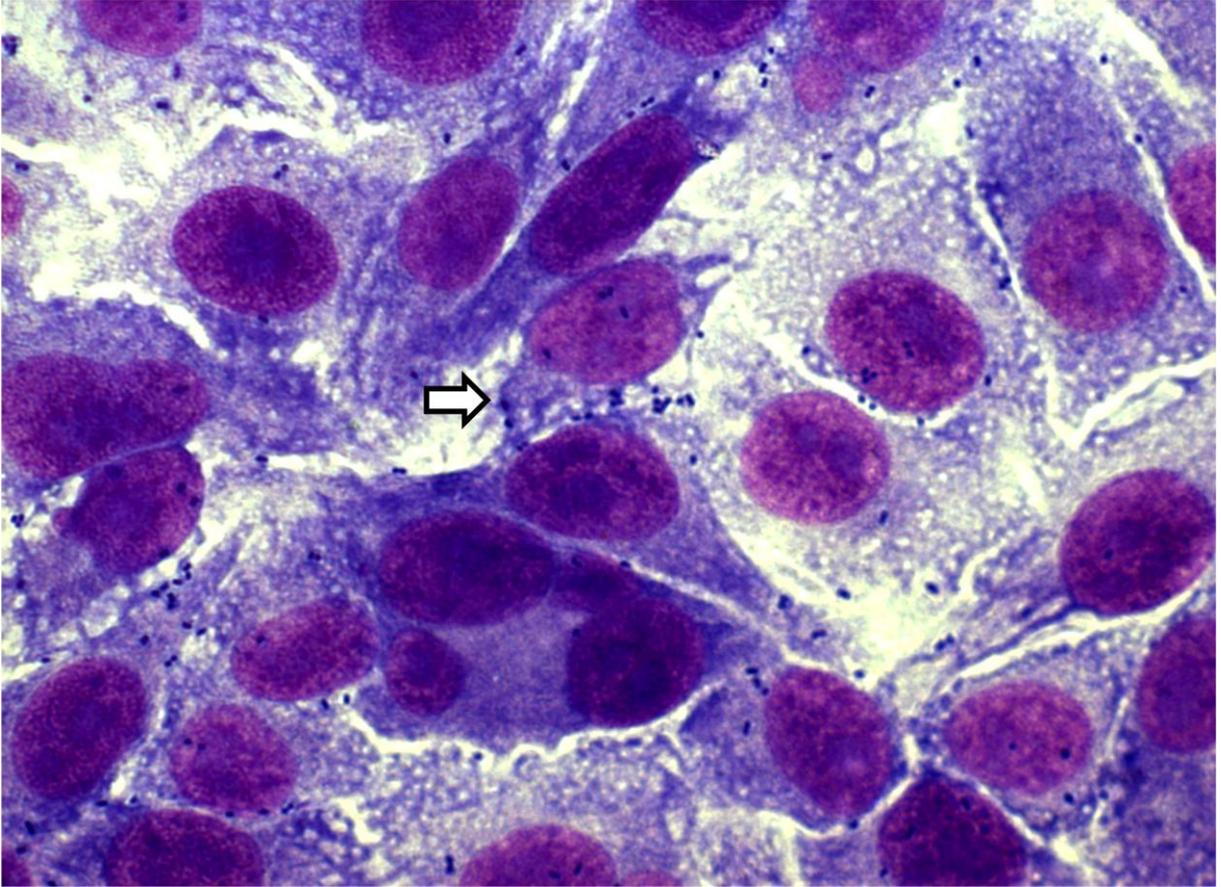


Figura 1: Aspectos da interação de EAEC I49/3 com a linhagem celular não intestinal HEP-2 em ensaio de 6 horas de incubação observada por microscopia de luz. A cepa I49/3 exibiu aderência discreta, sem padrão típico, com a presença de bactérias em cadeia coexistindo com bactérias aos pares e isoladas (⇨) sobre as células HEP-2 e a lamínula de vidro. Coloração de Giemsa. Aumento: 1000x.

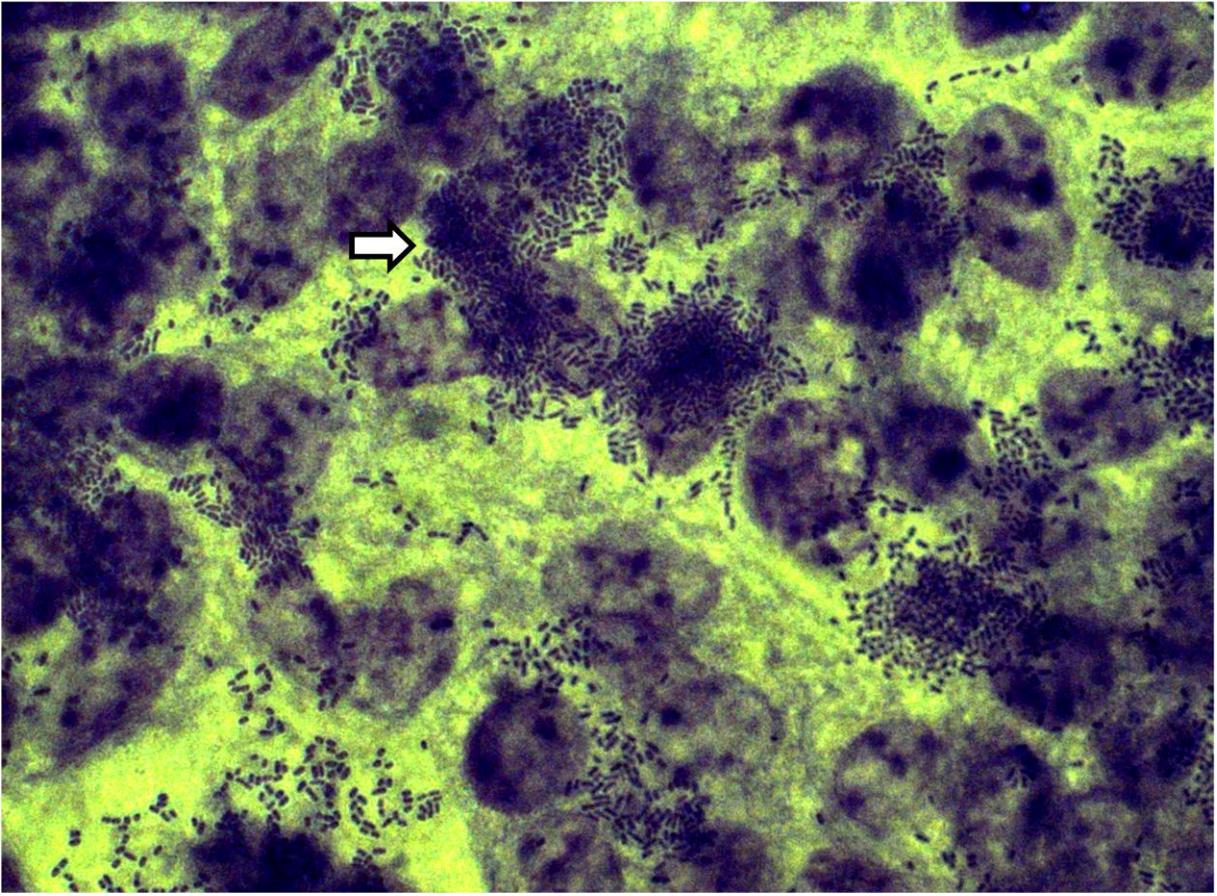


Figura 2: Aspectos da interação de EAEC I34/4 com a linhagem celular intestinal Caco-2 em ensaio de 3 horas de incubação observada por microscopia de luz. A cepa I34/4 exibiu aderência agregativa com a presença de grandes agregados bacterianos (⇨) sobre as células Caco-2 e a lamínula de vidro. Coloração de Giemsa. Aumento: 1000x.

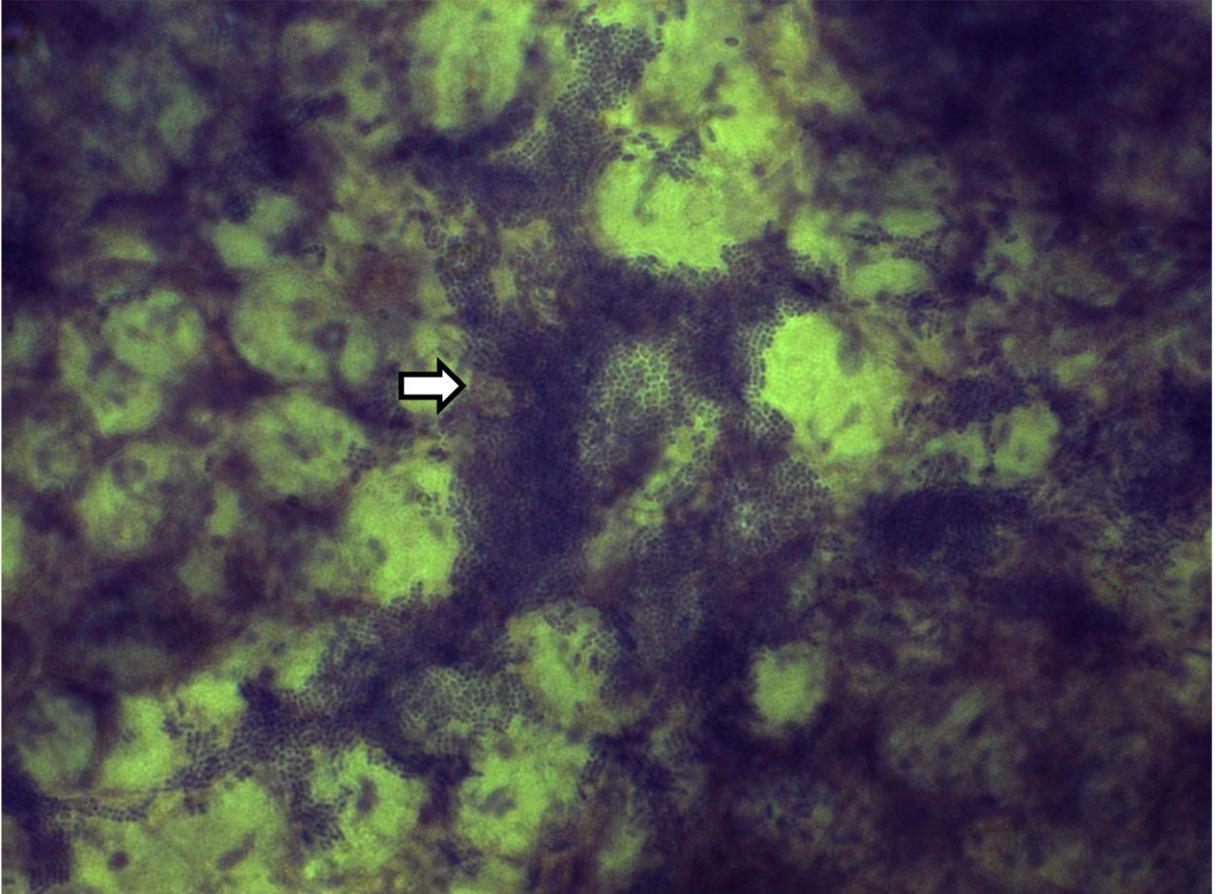


Figura 3: Aspectos da interação de EAEC H102/1 com a linhagem celular intestinal T84 em ensaio de 6 horas de incubação observada por microscopia de luz. A cepa H102/1 exibiu aderência agregativa com a presença de grandes agregados bacterianos (⇨) sobre as células T84 e a lamínula de vidro. Coloração de Giemsa. Aumento: 1000x.

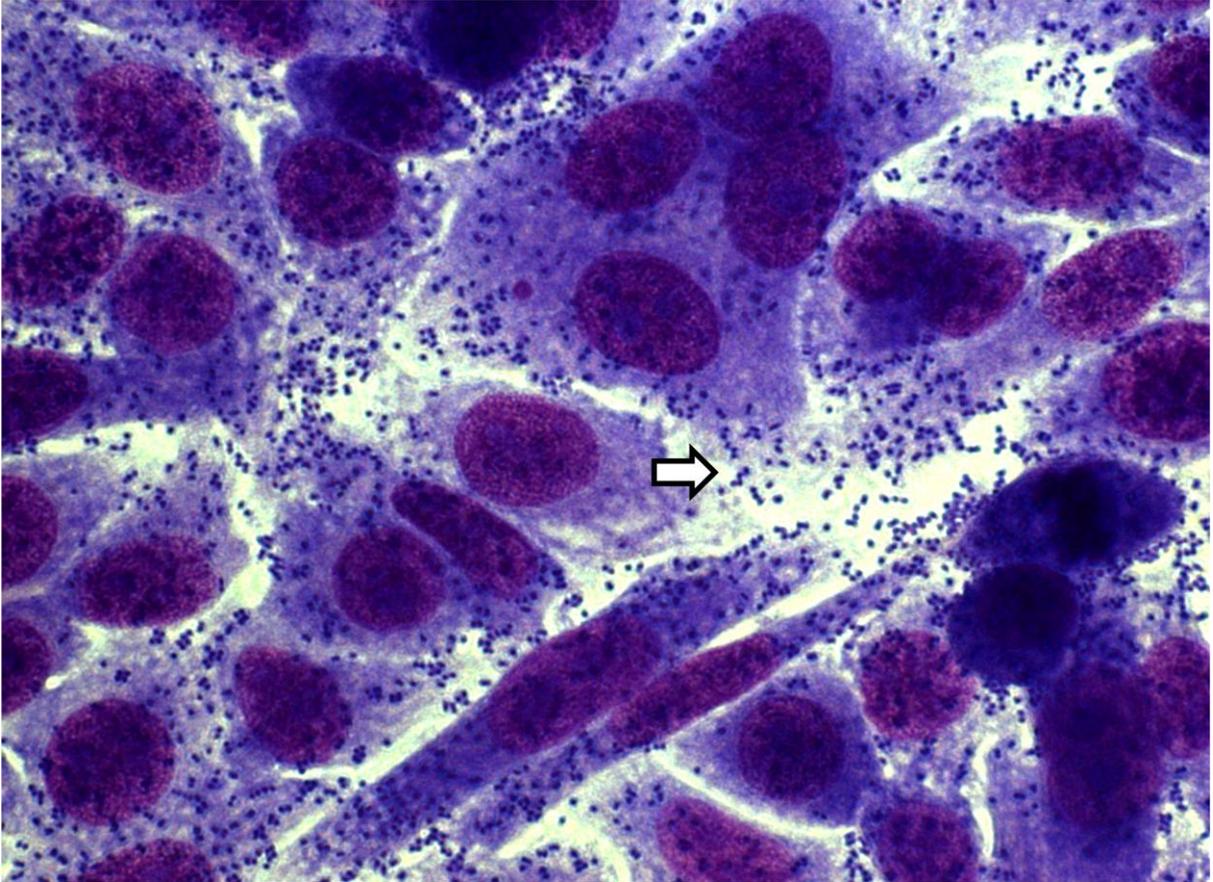


Figura 4: Aspectos da interação de EAEC H153/5 com a linhagem celular não intestinal HEP-2 em ensaio de 3 horas de incubação observada por microscopia de luz. A cepa H153/5 exibiu aderência difusa com a presença de bactérias dispersas e bem distribuídas (⇨) sobre as células HEP-2 e a lamínula de vidro. Coloração de Giemsa. Aumento: 1000x.

Tabela 6: Padrão de aderência de EAEC em células HEp-2 após 3 horas de incubação

Cepas (n=17)	Padrão de aderência		
	Agregativo (AA)	Difuso (AD)	Sem Padrão Típico (SPT)
H9/3; H19/2; H80/3; H92/3; H102/1; H153/5; I18/2; I29/3; I34/4; I49/3; C2/4; C29/2; C43/1; C44/5; C46/3; C52/2; C55/4	H9/3; H92/3; H102/1; C2/4; C55/4	H153/5	H19/2; H80/3; I18/2; I29/3; I34/4; I49/3; C29/2; C43/1; C44/5; C46/3; C52/2
TOTAL (%)	5 (29,41%)	1 (5,88%)	11 (64,71%)

Tabela 7: Padrão de aderência de EAEC em células HEp-2 após 6 horas de incubação

Cepas (n=17)	Padrão de aderência		
	Agregativo (AA)	Difuso (AD)	Sem Padrão Típico (SPT)
H9/3; H19/2; H80/3; H92/3; H102/1; H153/5; I18/2; I29/3; I34/4; I49/3; C2/4; C29/2; C43/1; C44/5; C46/3; C52/2; C55/4	H9/3; H19/2; H92/3; H102/1; I18/2; I34/4; C2/4; C44/5; C55/4	-----	H80/3; H153/5; I29/3; I49/3; C29/2; C43/1; C46/3; C52/2
TOTAL (%)	9 (52,94%)	-----	8 (47,06%)

Tabela 8: Padrão de aderência de EAEC em células Caco-2 após 3 horas de incubação

Cepas (n=17)	Padrão de aderência		
	Agregativo (AA)	Difuso (AD)	Sem Padrão Típico (SPT)
H9/3; H19/2; H80/3; H92/3; H102/1; H153/5; I18/2; I29/3; I34/4; I49/3; C2/4; C29/2; C43/1; C44/5; C46/3; C52/2; C55/4	H9/3; H92/3; H102/1; I18/2; I34/4; C2/4; C55/4	H153/5	H19/2; H80/3; I29/3; I49/3; C29/2; C43/1; C44/5; C46/3; C52/2
TOTAL (%)	7 (41,18%)	1 (5,88%)	9 (52,94%)

Tabela 9: Padrão de aderência de EAEC em células Caco-2 após 6 horas de incubação

Cepas (n=17)	Padrão de aderência		
	Agregativo (AA)	Difuso (AD)	Sem Padrão Típico (SPT)
H9/3; H19/2; H80/3; H92/3; H102/1; H153/5; I18/2; I29/3; I34/4; I49/3; C2/4; C29/2; C43/1; C44/5; C46/3; C52/2; C55/4	H9/3; H19/2; H92/3; H102/1; I18/2; I29/3; I34/4; C2/4; C55/4	-----	H80/3; H153/5; I49/3; C29/2; C43/1; C44/5; C46/3; C52/2
TOTAL (%)	9 (52,94%)	-----	8 (47,06%)

Tabela 10: Padrão de aderência de EAEC em células T84 após 3 horas de incubação

Cepas (n=17)	Padrão de aderência		
	Agregativo (AA)	Difuso (AD)	Sem Padrão Típico (SPT)
H9/3; H19/2; H80/3; H92/3; H102/1; H153/5; I18/2; I29/3; I34/4; I49/3; C2/4; C29/2; C43/1; C44/5; C46/3; C52/2; C55/4	H9/3; H80/3; H92/3; H102/1; H153/5; I18/2; I34/4; I49/3; C2/4; C43/1; C44/5; C46/3; C52/2; C55/4	-----	H19/2; I29/3; C29/2
TOTAL (%)	14 (82,35%)	-----	3 (17,65%)

Tabela 11: Padrão de aderência de EAEC em células T84 após 6 horas de incubação

Cepas (n=17)	Padrão de aderência		
	Agregativo (AA)	Difuso (AD)	Sem Padrão Típico (SPT)
H9/3; H19/2; H80/3; H92/3; H102/1; H153/5; I18/2; I29/3; I34/4; I49/3; C2/4; C29/2; C43/1; C44/5; C46/3; C52/2; C55/4	H9/3; H19/2; H80/3; H92/3; H102/1; H153/5; I18/2; I29/3; I34/4; I49/3; C2/4; C29/2; C43/1; C44/5; C46/3; C52/2; C55/4	-----	-----
TOTAL (%)	17 (100%)	-----	-----

Tabela 12: Padrões de aderência de EAEC em células HEp-2, Caco-2 e T84, após 3 ou 6 horas de incubação

Cepas	HEp-2 (3 horas)	HEp-2 (6 horas)	Caco-2 (3 horas)	Caco-2 (6 horas)	T84 (3 horas)	T84 (6 horas)
H9/3	AA	AA	AA	AA	AA	AA
H19/2	SPT	AA	SPT	AA	SPT	AA
H80/3	SPT	SPT	SPT	SPT	AA	AA
H92/3	AA	AA	AA	AA	AA	AA
H102/1	AA	AA	AA	AA	AA	AA
H153/5	AD	SPT	AD	SPT	AA	AA
I18/2	SPT	AA	AA	AA	AA	AA
I29/3	SPT	SPT	SPT	AA	SPT	AA
I34/4	SPT	AA	AA	AA	AA	AA
I49/3	SPT	SPT	SPT	SPT	AA	AA
C2/4	AA	AA	AA	AA	AA	AA
C29/2	SPT	SPT	SPT	SPT	SPT	AA
C43/1	SPT	SPT	SPT	SPT	AA	AA
C44/5	SPT	AA	SPT	SPT	AA	AA
C46/3	SPT	SPT	SPT	SPT	AA	AA
C52/2	SPT	SPT	SPT	SPT	AA	AA
C55/4	AA	AA	AA	AA	AA	AA
Protótipos						
042	AA	AA	AA	AA	AA	AA
DH5 α	SPT	SPT	SPT	SPT	SPT	SPT

AA, aderência agregativa; SPT, sem padrão típico; AD, aderência difusa.

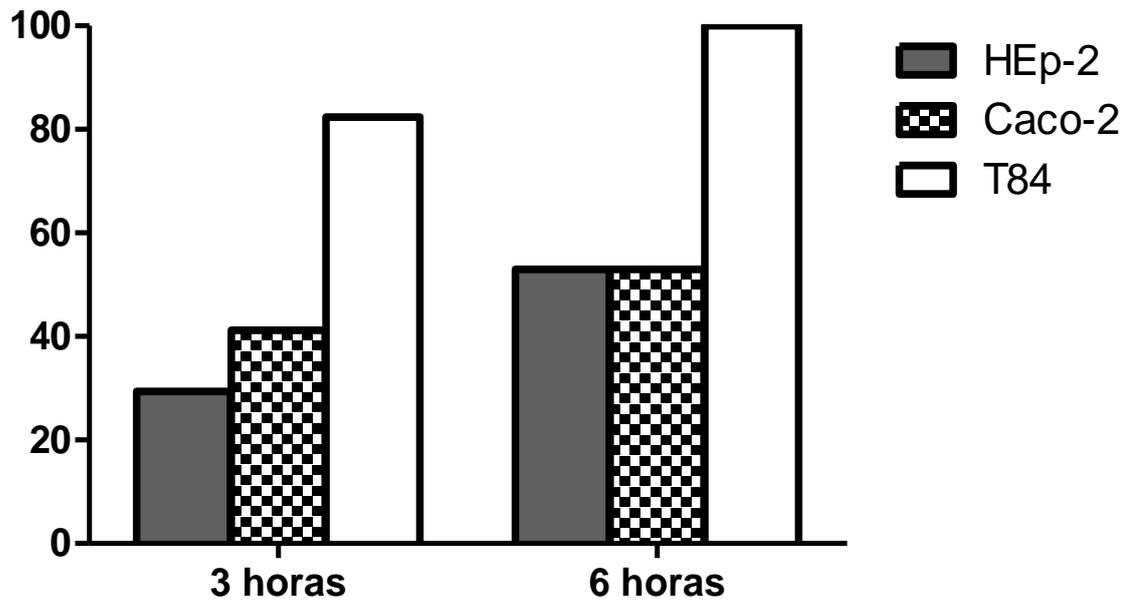


Figura 5: Percentual de cepas EAEC (n=17) com o padrão AA nas linhagens celulares HEp-2, Caco-2 e T84 após 3 ou 6 horas de incubação.

4.2 Detecção do plasmídeo de aderência agregativa (pAA) em cepas de EAEC

Dezessete cepas de EAEC foram analisadas pela técnica de PCR, para detecção do gene do plasmídeo de aderência agregativa (pAA), responsável pelo fenótipo agregativo observado nos ensaios de aderência. A positividade para o gene foi encontrada em 12 (70,59%) das cepas testadas (Tabela 13).

Tabela 13: Detecção do plasmídeo de aderência agregativa (pAA) em cepas de EAEC

	Cepas																
	H9/3	H19/2	H80/3	H92/3	H102/1	H153/5	I18/2	I29/3	I34/4	I49/3	C2/4	C29/2	C43/1	C44/5	C46/3	C52/2	C55/4
pAA	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+

+, presença do pAA; -, ausência do pAA.

4.2.1 Correlação entre o padrão de aderência agregativa (AA) e a detecção do plasmídeo de aderência agregativa (pAA)

A análise conjunta dos resultados entre a resposta fenotípica aos ensaios de aderência qualitativo e a resposta genotípica pela detecção do pAA (Tabela 14) demonstrou que 29,41 % das cepas pAA+ exibiram padrão AA em células HEp-2 em 3 horas e 47,06 % em 6 horas. Em Caco-2, 41,18 % das cepas pAA+ apresentaram padrão AA em 3 horas e 52,94 % em 6 horas. Em contrapartida, em T84, 52,94 % das cepas pAA+ exibiram padrão AA em 3 horas e 70,59 % em 6 horas. A Figura 6 ratifica o crescente aumento do número de cepas pAA+ que exibiram o padrão AA quando comparado os ensaios de 3 e 6 horas, principalmente para a linhagem T84, que apenas não atingiu seu percentual máximo em 6 horas devido a detecção de cepas pAA-.

Tabela 14: Padrões de aderência de EAEC em células HEp-2, Caco-2 e T84, após 3 ou 6 horas de incubação e detecção do pAA a PCR

Cepas	HEp-2 (3 horas)	HEp-2 (6 horas)	Caco-2 (3 horas)	Caco-2 (6 horas)	T84 (3 horas)	T84 (6 horas)	pAA* (PCR)
H9/3	AA	AA	AA	AA	AA	AA	+
H19/2	SPT	AA	SPT	AA	SPT	AA	+
H80/3	SPT	SPT	SPT	SPT	AA	AA	-
H92/3	AA	AA	AA	AA	AA	AA	+
H102/1	AA	AA	AA	AA	AA	AA	+
H153/5	AD	SPT	AD	SPT	AA	AA	-
I18/2	SPT	AA	AA	AA	AA	AA	+
I29/3	SPT	SPT	SPT	AA	SPT	AA	+
I34/4	SPT	AA	AA	AA	AA	AA	+
I49/3	SPT	SPT	SPT	SPT	AA	AA	+
C2/4	AA	AA	AA	AA	AA	AA	+
C29/2	SPT	SPT	SPT	SPT	SPT	AA	+
C43/1	SPT	SPT	SPT	SPT	AA	AA	-
C44/5	SPT	AA	SPT	SPT	AA	AA	-
C46/3	SPT	SPT	SPT	SPT	AA	AA	+
C52/2	SPT	SPT	SPT	SPT	AA	AA	-
C55/4	AA	AA	AA	AA	AA	AA	+
Protótipos							
042	AA	AA	AA	AA	AA	AA	+
DH5 α	SPT	SPT	SPT	SPT	SPT	SPT	-

AA, aderência agregativa; SPT, sem padrão típico; AD, aderência difusa.

* +, presença do pAA; -, ausência do pAA.

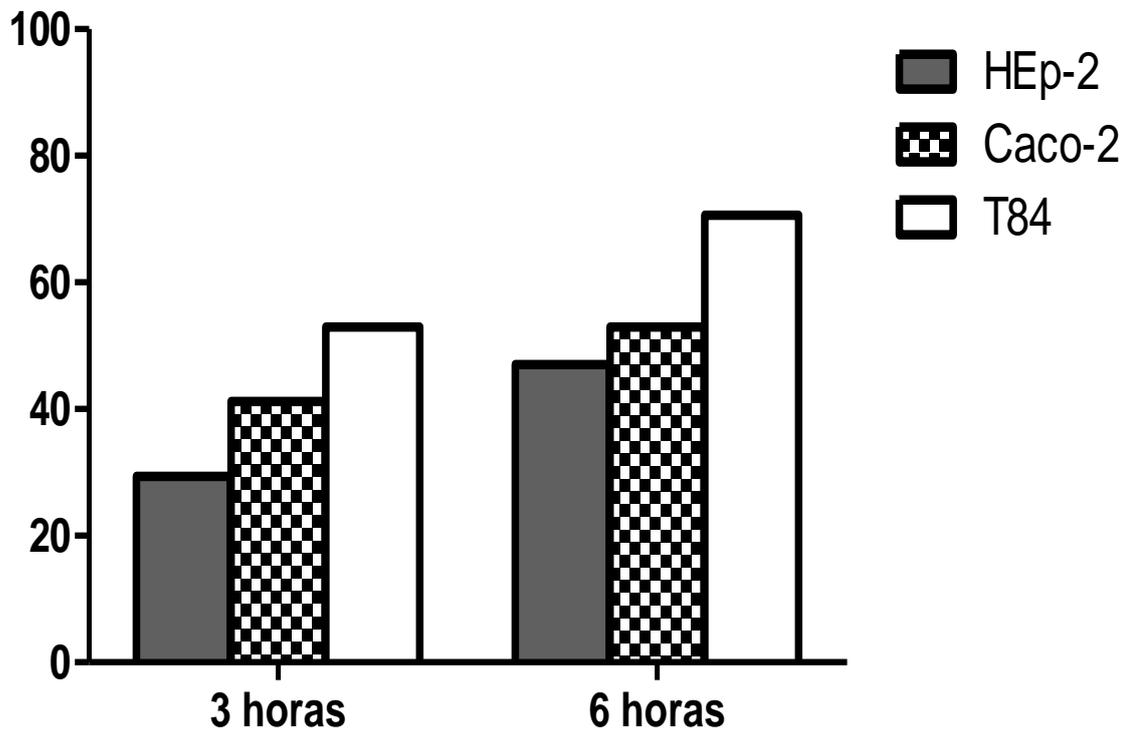


Figura 6: Percentual de cepas EAEC pAA+ (n=17) com o padrão AA nas linhagens celulares HEp-2, Caco-2 e T84 após 3 ou 6 horas de incubação.

4.3 Análise por microscopia de luz (ML) em parafina e em Epon de cortes semifinos da interação de cepas de EAEC com mucosas ileal e colônica do intestino de coelho *ex vivo*

Cinco cepas (H92/3, H102/1, I18/2, I34/4 e I49/3) de EAEC foram submetidas ao ensaio de aderência em tecido de íleo e de cólon, a partir do modelo de cultura de órgão *in vitro* (IVOC) por um período de 6 horas de incubação.

4.3.1 Interação de cepas de EAEC com fragmentos de mucosa ileal

Como controles negativos foram utilizados um fragmento de tecido representativo do íleo não inoculado (Figura 8A) e a cepa HB101 (Figura 7A). A mucosa ileal de ambos apresentou-se com arquitetura vilositária parcialmente preservada, sendo que na cepa HB101 foi observada a presença de raras bactérias.

Como controles positivos foram utilizadas as cepas protótipos de EAEC 042 e 17-2 (Figuras 7B e 8B). Ambos os controles aderiram à mucosa ileal no padrão agregativo característico de “tijolos empilhados” próximos às vilosidades cujo epitélio se destacou como as áreas de destruição com áreas de extrusão celular, que foram mais significativas em 17-2.

As cinco cepas de EAEC foram capazes de aderir no padrão agregativo as áreas de esboço de vilosidades que apresentaram o epitélio parcialmente arrancado ou destruído com áreas de extrusão celular. A visualização de muco acima da região epitelial não foi constatada em todas as cepas. Foi sugerida uma aderência com maior intensidade à mucosa ileal em três cepas: H92/3 (Figuras 7C e 8C), I49/3 (Figuras 7D e 8D) e H102/1.

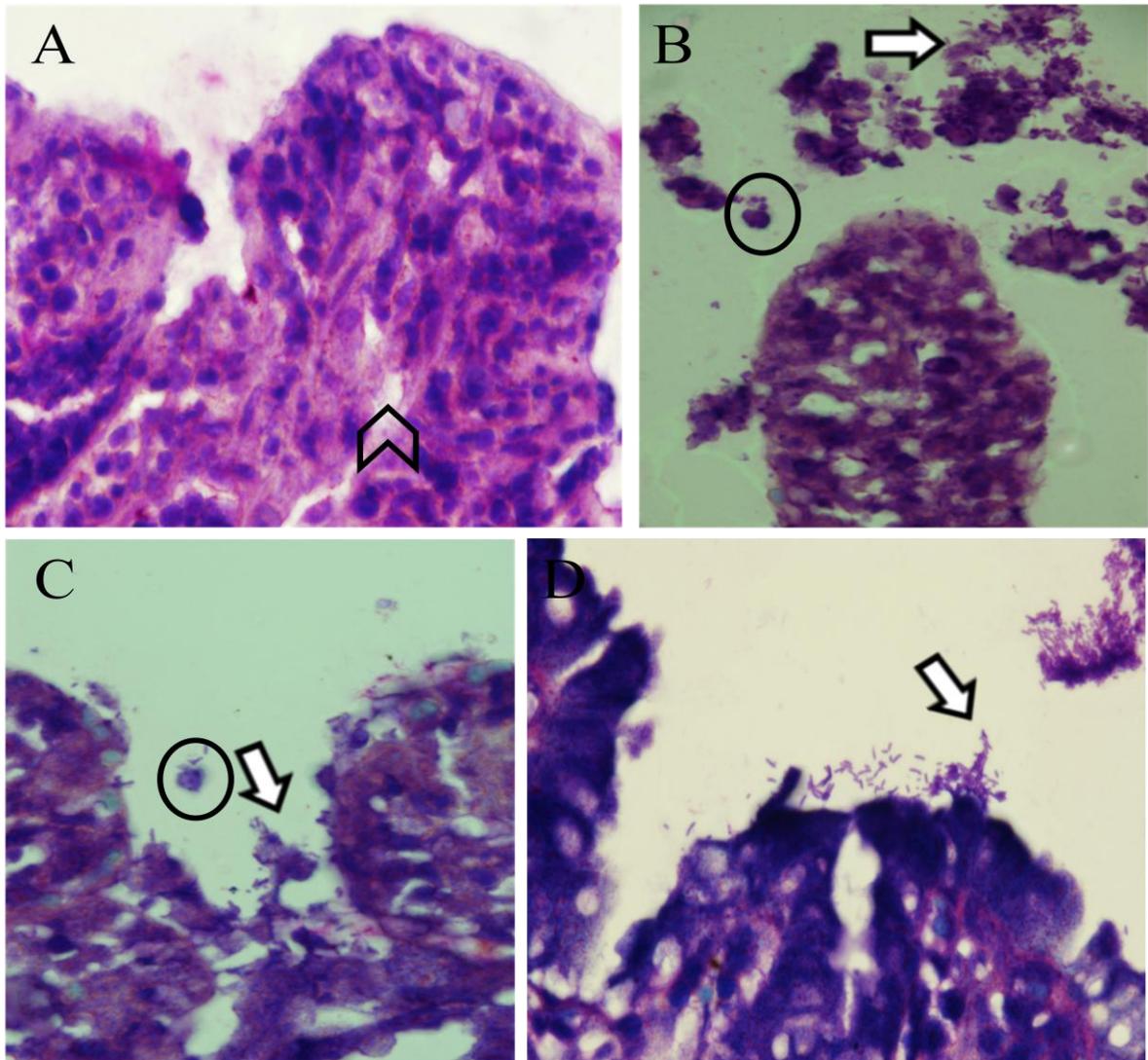


Figura 7: Aspectos da interação de HB101 (A), EAEC 17-2 (B), H92/3 (C) e I49/3 (D) com mucosa do íleo do intestino de coelho *ex vivo*, após 6 horas de incubação, observados por microscopia de luz em parafina. Mucosa ileal parcialmente preservada com linfático central (⚡) dando sustentação à vilosidade (A). Mucosa ileal com agregados bacterianos (⇨) na luz intestinal e aderidos às vilosidades com presença de extrusão celular (○) (B, C e D). Coloração de Giemsa. Aumento: 1000x.

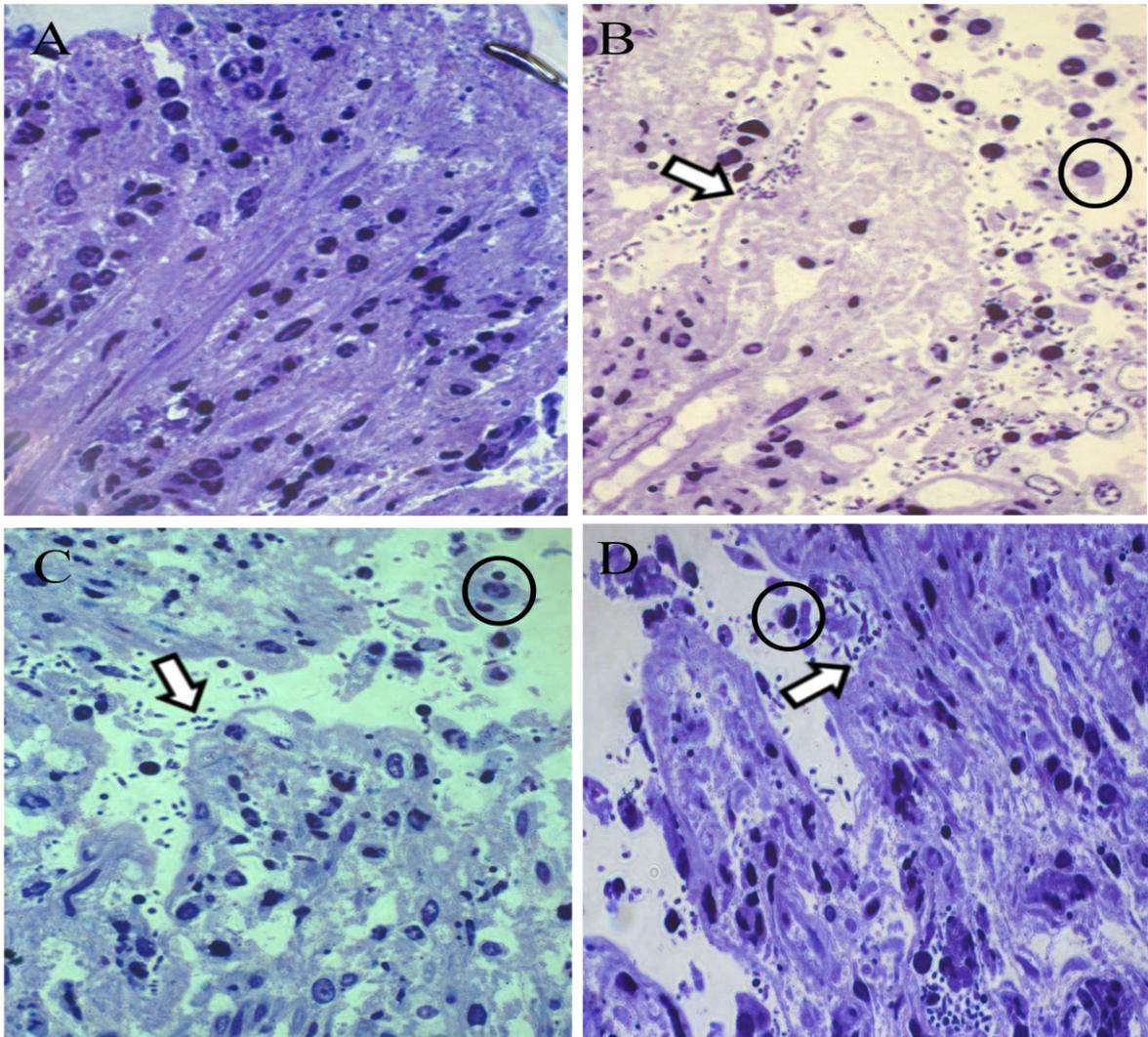


Figura 8: Aspectos da interação de EAEC 17-2 (B), H92/3 (C) e I49/3 (D) com mucosa do íleo do intestino de coelho *ex vivo*, após 6 horas de incubação, observados por microscopia de luz em Epon. Mucosa ileal parcialmente preservada (A). Mucosa ileal com agregados bacterianos (⇨) na luz intestinal e próximos as vilosidades, com presença de extrusão celular (○) (B, C e D). Coloração: Azul de Toluidina. Aumento: 1000x.

4.3.2 Interação de cepas de EAEC com fragmentos de mucosa colônica

Como controles negativos foram utilizados um fragmento de tecido representativo do cólon não inoculado (Figura 10A) e a cepa HB101 (Figura 9A). A mucosa colônica de ambos apresentou-se com arquitetura vilositária preservada e grande número de células caliciformes permeando enterócitos sem anormalidades aparentes, sendo que na cepa HB101 foi observada a presença de raras bactérias.

Como controles positivos foram utilizadas as cepas protótipos de EAEC 042 e 17-2 (Figuras 9B e 10B). Ambos os controles aderiram à mucosa colônica no padrão agregativo característico de “tijolos empilhados” próximo às vilosidades preservadas como ao muco acima da região do epitélio com áreas de extrusão celular, que foram mais significativas em 17-2.

As cinco cepas de EAEC foram capazes de aderir no padrão agregativo as vilosidades preservadas como ao muco acima da região do epitélio com áreas de extrusão celular. A visualização de muco acima da região epitelial foi constatada em todas as cepas. Em algumas, foi possível verificar o desprendimento de muco de células caliciformes. Foi sugerida uma aderência com maior intensidade à mucosa colônica em quatro cepas: I18/2 (Figuras 9C e 10C), I34/4 (Figuras 9D e 10D), I49/3 e H102/1.

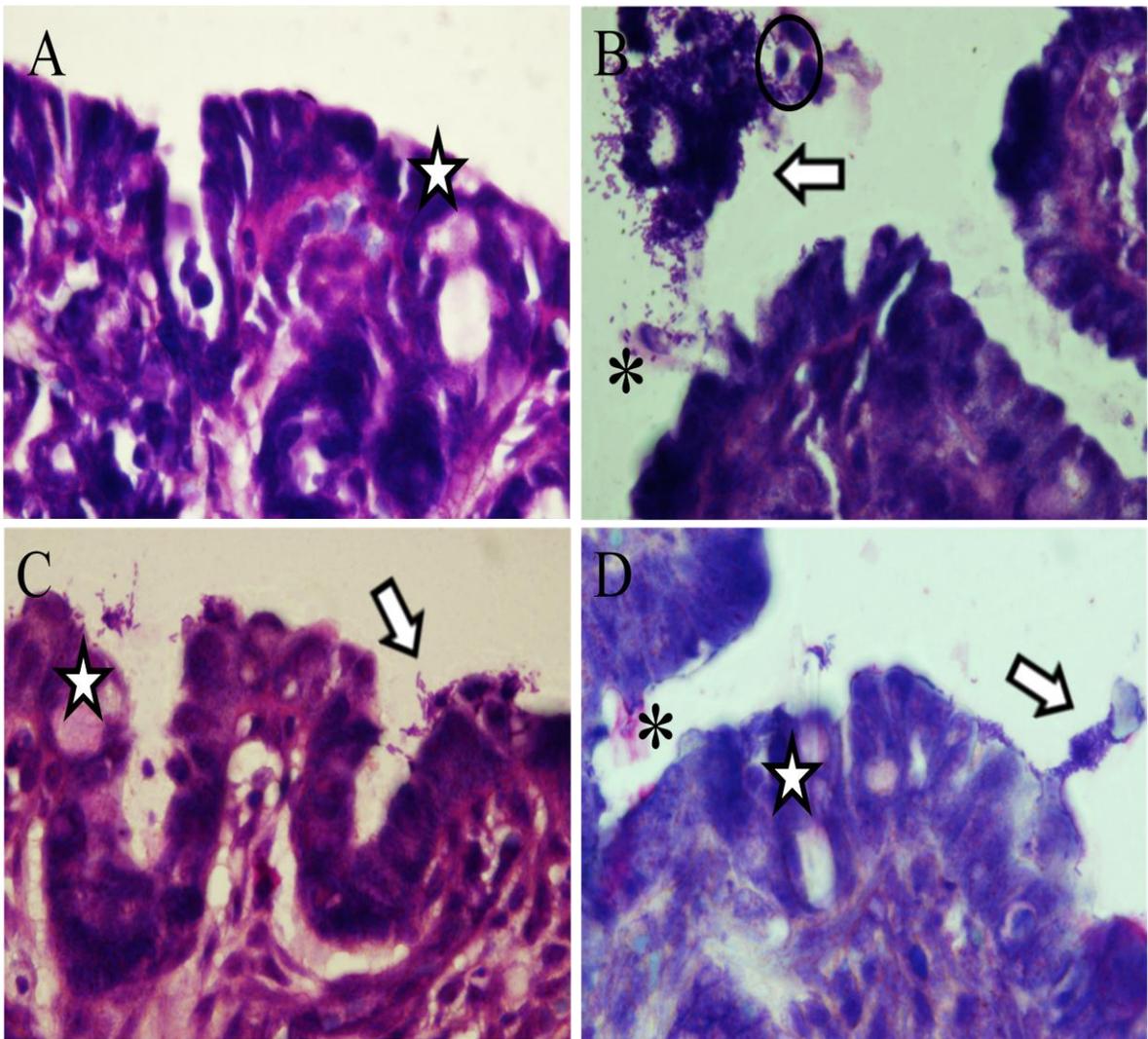


Figura 9: Aspectos da interação de HB101 (A), EAEC 17-2 (B), I18/2 (C) e I34/4 (D) com mucosa do cólon do intestino de coelho *ex vivo*, após 6 horas de incubação, observados por microscopia de luz em parafina. Mucosa colônica preservada com células caliciformes (☆) intactas (A). Mucosa colônica com agregados bacterianos (⇨) aderidos ao epitélio e na luz intestinal sobre camada de muco (*) com presença de extrusão celular (○) (B, C e D). Coloração de Giemsa. Aumento: 1000x.

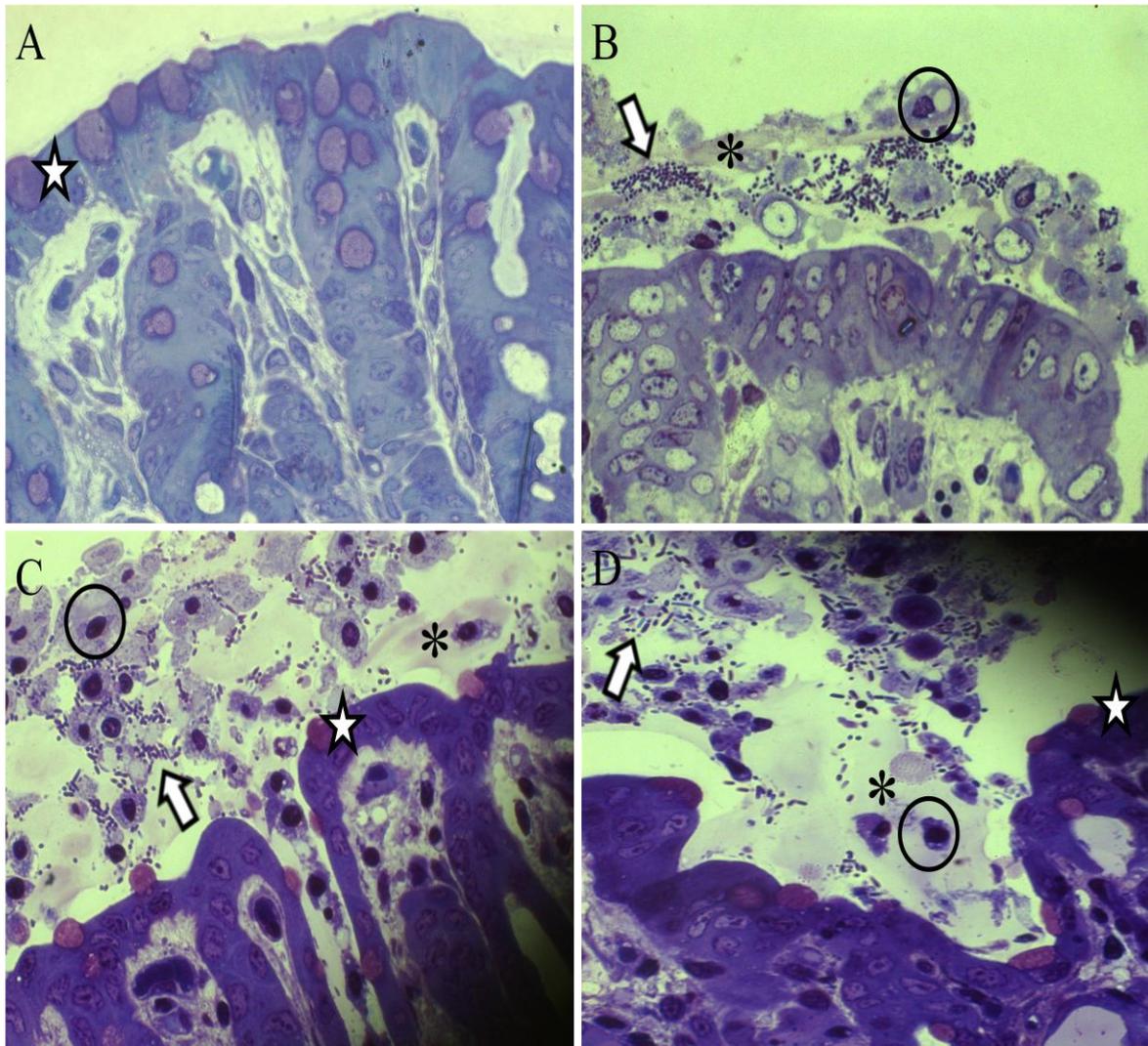


Figura 10: Aspectos da interação de EAEC 17-2 (B), I18/2 (C) e I34/4 (D) com mucosa do cólon do intestino de coelho *ex vivo*, após 6 horas de incubação, observados por microscopia de luz em Epon. Mucosa colônica preservada com células caliciformes (☆) intactas (A). Mucosa colônica com agregados bacterianos (⇔) na luz intestinal e na camada de muco (*) que recobre o epitélio, com presença de extrusão celular (○) (B, C e D). Coloração: Azul de Toluidina. Aumento: 1000x.

4.4 Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) da interação de cepas de EAEC com mucosas ileal e colônica do intestino de coelho *ex vivo*

Cinco cepas (H92/3, H102/1, I18/2, I34/4 e I49/3) de EAEC foram submetidas ao ensaio de aderência em tecido de íleo e de cólon, a partir do modelo de cultura de órgão *in vitro* (IVOC) por um período de 6 horas de incubação.

4.4.1 Interação de cepas de EAEC com fragmentos de mucosa ileal

Como controles negativos foram utilizados um fragmento de tecido representativo do íleo não inoculado e a cepa HB101. A mucosa ileal não infectada apresentou-se preservada com pontos isolados de muco (Figura 11A). O fragmento inoculado com a cepa HB101 apresentou-se preservado e foi possível observar a presença de raras bactérias (dados não mostrados).

Como controles positivos foram utilizadas as cepas protótipos de EAEC 042 (Figura 11B) e 17-2. Ambos os controles aderiram à mucosa ileal no padrão agregativo característico de “tijolos empilhados” e foram capazes de formar um espesso biofilme.

As cinco cepas de EAEC foram capazes de aderir no padrão agregativo tanto ao epitélio do íleo quanto ao muco produzido. Entretanto, a aderência com maior intensidade à mucosa ileal foi observada em duas cepas: H92/3 (Figura 12A) e I49/3 (Figura 12B).

Nas cepas I34/4 e I49/3 (Figura 12B) foi observada a presença de estruturas filiformes sugestivas de matriz extracelular.

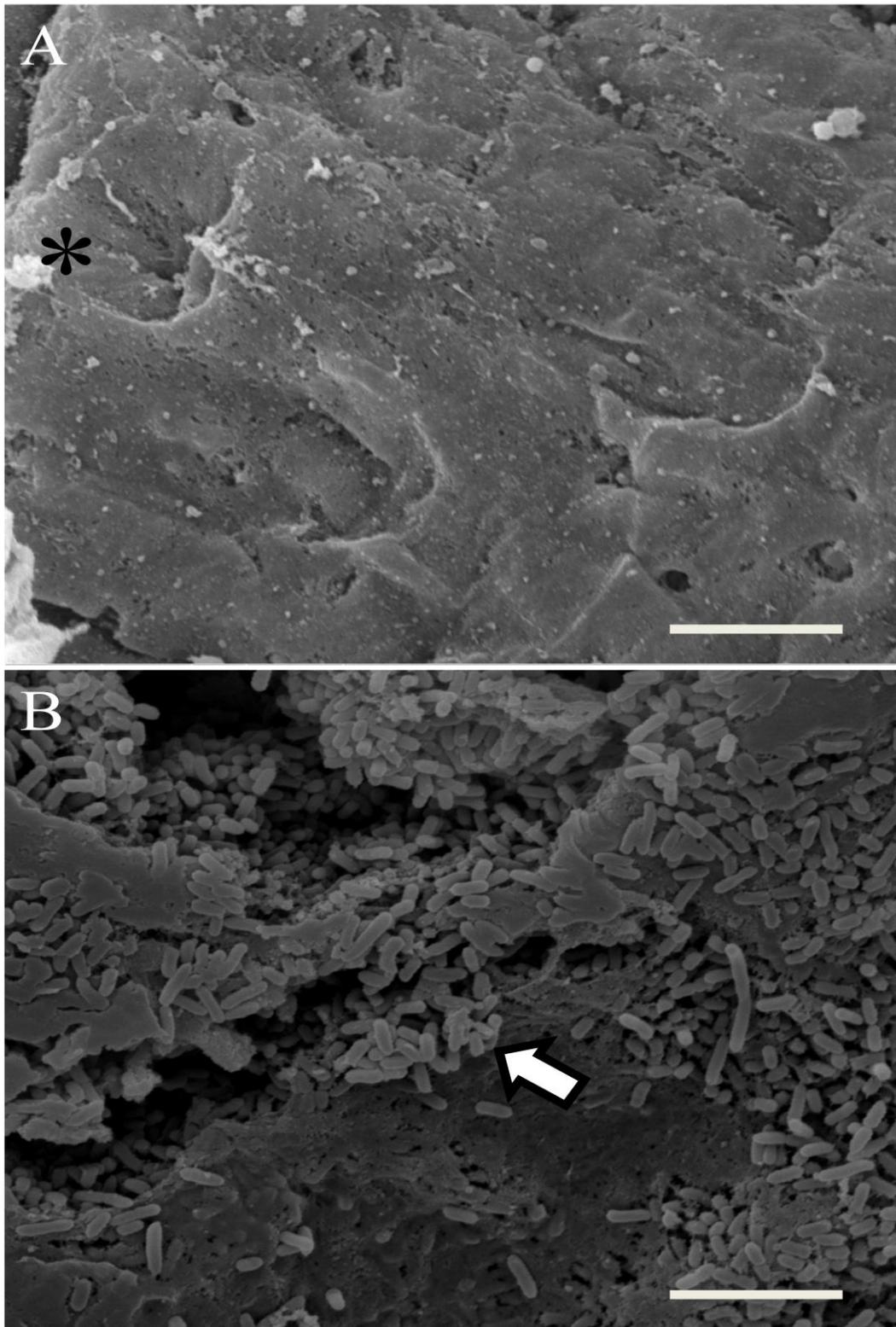


Figura 11: Micrografia da interação de EAEC 042 (B) com mucosa do íleo do intestino de coelho *ex vivo*, após 6 horas de incubação, observada por microscopia eletrônica de varredura. Mucosa ileal preservada com pontos isolados de muco (*) sobre o epitélio (A). Grandes agregados bacterianos (⇨) sobre o epitélio formando biofilme (B). (A- barra: 20 μm) e (B- barra: 10 μm).

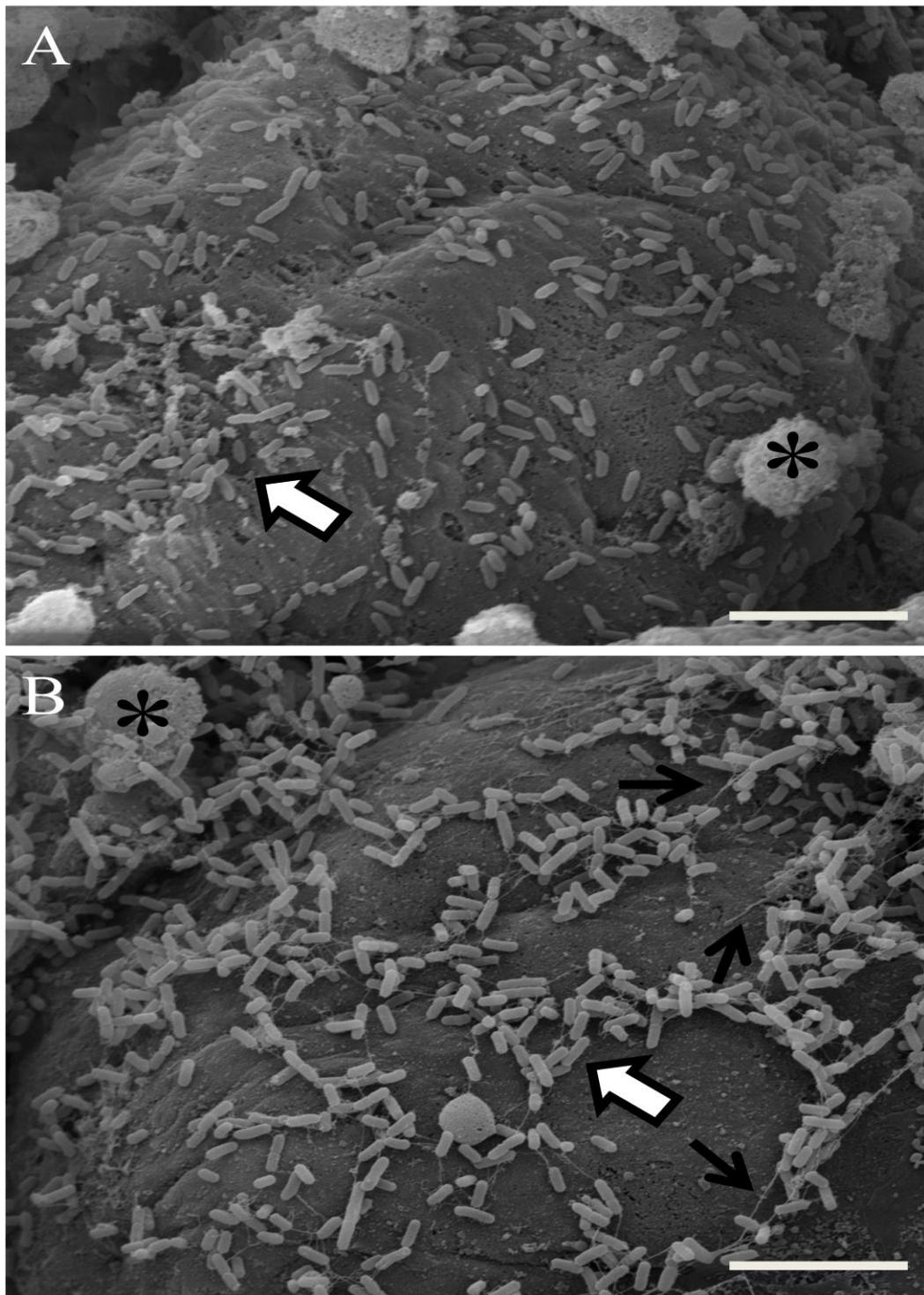


Figura 12: Micrografia da interação de EAEC H92/3 (A) e I49/3 (B) com mucosa do íleo do intestino de coelho *ex vivo*, após 6 horas de incubação, observada por microscopia eletrônica de varredura. Mucosa ileal apresentando muco (*) e agregados bacterianos (⇨) diretamente sobre o epitélio (A e B). Presença de estruturas filiformes (→) sobre a superfície epitelial (B). (A- barra: 20 μ m) e (B- barra: 20 μ m).

4.4.2 Interação de cepas de EAEC com fragmentos de mucosa colônica

Como controles negativos foram utilizados um fragmento de tecido representativo do cólon não inoculado e a cepa HB101. A mucosa colônica não infectada apresentou-se preservada com pontos isolados de muco (Figura 13A). O fragmento inoculado com a cepa HB101 apresentou-se preservado e foi possível observar a presença de raras bactérias (dados não mostrados).

Como controles positivos foram utilizadas as cepas protótipos de EAEC 042 (Figuras 13B e 13C) e 17-2. Ambos os controles aderiram à mucosa colônica no padrão agregativo característico de “tijolos empilhados” e foram capazes de formar um espesso biofilme. Foi observada a abertura das criptas colônicas (Figura 13C).

As cinco cepas de EAEC foram capazes de aderir no padrão agregativo tanto ao epitélio do cólon quanto ao muco produzido. Entretanto, a aderência com maior intensidade à mucosa colônica foi observada em quatro cepas: I18/2 (Figura 14A), I34/4 (Figura 14B), I49/3 e H102/1.

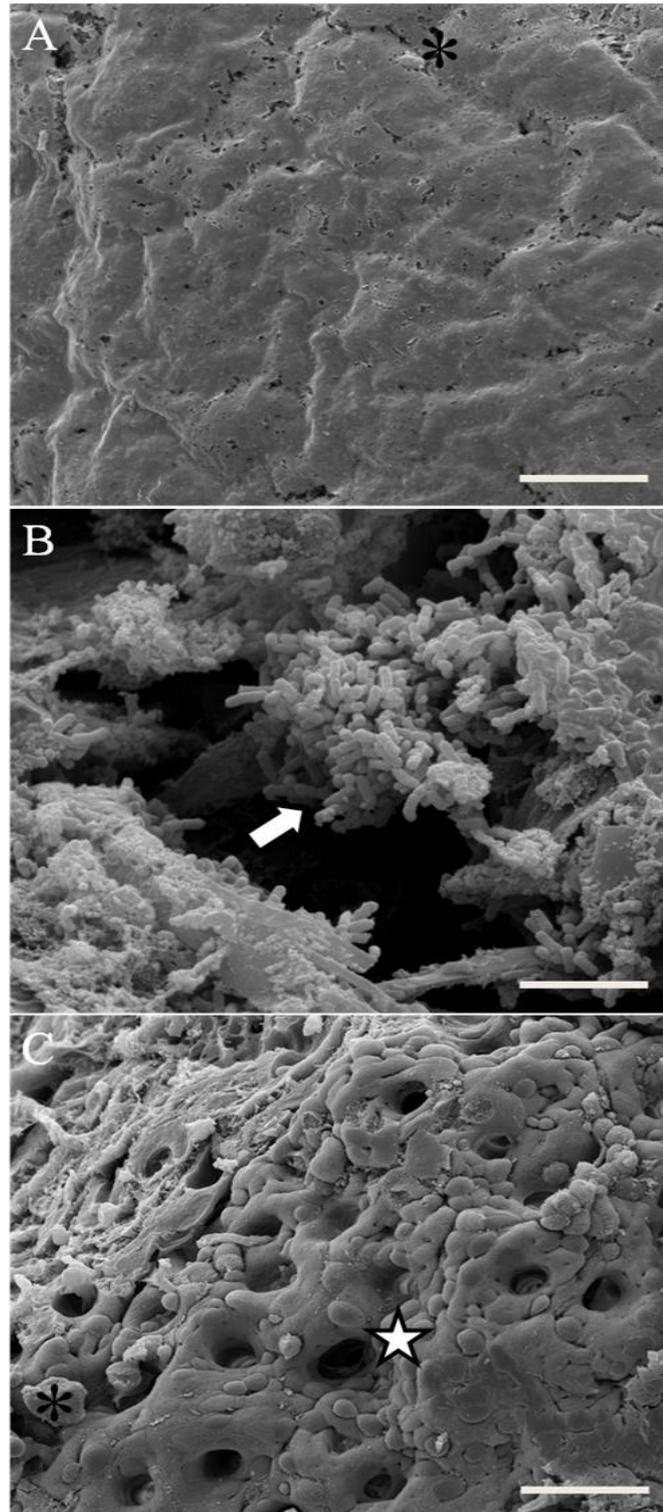


Figura 13: Micrografia da interação de EAEC 042 (B e C) com mucosa do cólon do intestino de coelho *ex vivo*, após 6 horas de incubação, observada por microscopia eletrônica de varredura. Mucosa colônica preservada com pontos isolados de muco (*) sobre o epitélio (A). Densos agregados bacterianos (⇨) sobre a camada espessa de muco formando biofilme (B). Abertura de criptas dilatadas (☆) decorrente da ação da cepa protótipo 042 (C). (A- barra: 20 μm), (B- barra: 10 μm) e (C- barra: 50 μm).

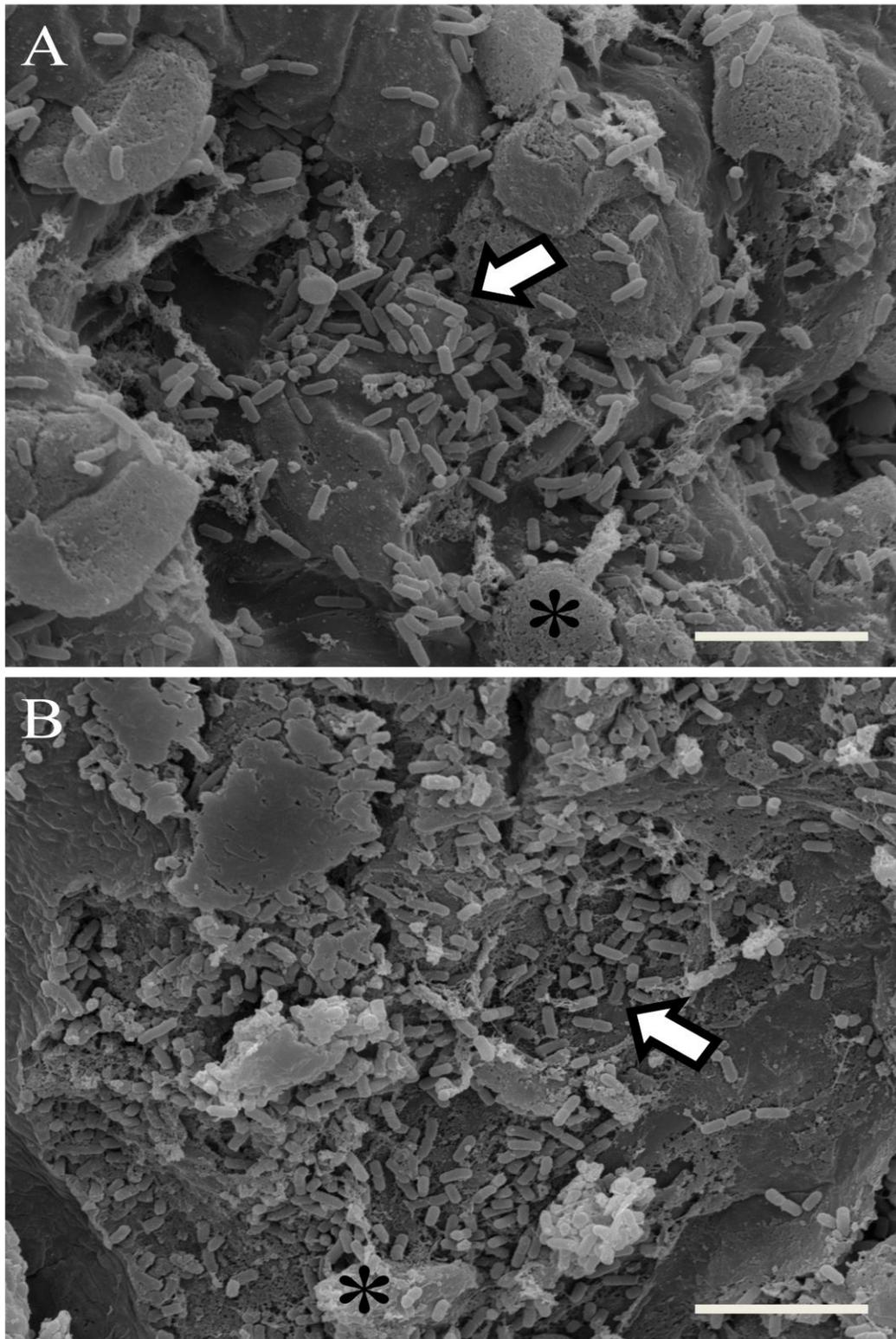


Figura 14: Micrografia da interação de EAEC I18/2 (A) e I34/4 (B) com mucosa do cólon do intestino de coelho *ex vivo*, após 6 horas de incubação, observada por microscopia eletrônica de varredura. Mucosa colônica apresentando muco (*) e agregados bacterianos (⇒) sobrepondo-se ao muco ou diretamente sobre o epitélio (A e B). (A- barra: 20 μm) e (B- barra: 20 μm).

5 DISCUSSÃO

A síndrome diarreica é considerada um grave problema de saúde pública em todo o mundo, sendo considerada uma das maiores causas de morbidade e mortalidade (WHO, 2010). Dentre os patógenos entéricos reconhecidos, EAEC tem sido isolada em nosso país, acometendo crianças, adultos e indivíduos imunocomprometidos, causando diarreia aguda ou persistente. O número crescente de investigações demonstrando a alta incidência de EAEC em síndromes diarreicas classificou-a como patógeno emergente das infecções gastrintestinais (Weintraub, 2007).

Seu mecanismo de patogênese ainda é alvo de árduo estudo e tem sido investigado por diversos autores que relataram a capacidade desses micro-organismos causarem efeitos tóxicos em células intestinais humanas cultivadas *in vitro* e mucosa humana mantidas *in vitro*, além de alterações em mucosa intestinal de animais *in vivo* (Huang *et al.*, 2004a; Nataro, 2005).

Deste modo, os modelos celulares *in vitro* desempenham uma importante ferramenta no entendimento dos eventos fisiológicos e patológicos, mimetizando as condições observadas *in vivo*. Muitas vantagens tais como acessibilidade, homogeneidade da população celular, reprodutibilidade, taxa de crescimento e, conseqüentemente, a quantidade de material para análise, torna-os objetos indispensáveis de estudo na pesquisa (Lenaerts *et al.*, 2007). A linhagem epitelial HEP-2 (carcinoma de laringe humana) é empregada até os dias atuais como padrão ouro para a detecção do padrão agregativo, como forma de diagnóstico e rastreamento epidemiológico (Nataro & Kaper, 1998). Já as linhagens intestinais Caco-2 (adenocarcinoma colo-retal humano) e T84 (carcinoma de cólon intestinal humano) são amplamente estudadas em diversas patologias relacionadas às condições inflamatórias e infecciosas do intestino, como também a adaptação a certas condições nutricionais por serem células representativas do epitélio intestinal humano (Lenaerts *et al.*, 2007).

Como sabemos o sucesso da colonização por qualquer micro-organismo deve ser antecedida indispensavelmente de uma etapa inicial e crucial de adesão à mucosa do hospedeiro. A fim de garantir o processo de colonização, patógenos bacterianos expressam várias moléculas ou estruturas capazes de promover a ligação a células hospedeiras. Assim, adesinas dependem de interações com receptores específicos da superfície da célula hospedeira ou de proteínas solúveis que atuam como uma ponte entre bactéria e hospedeiro.

Somente após esse passo decisivo o micro-organismo poderá invadir e / ou secretar toxinas, culminando no sucesso da colonização que resulta em infecção (Letourneau *et al.*, 2011).

Como exemplificação, em bactérias enteropatogênicas foram encontradas uma variedade extremamente grande e diversificada de adesinas que lhes permitem explorar uma variedade de componentes da superfície celular do hospedeiro e ocupar diferentes nichos no intestino humano (Konar *et al.*, 2012).

Em contrapartida, as células epiteliais possuem a capacidade de detectar componentes celulares bacterianos, a partir da expressão de receptores de reconhecimento de padrão (PRR, ou “*pattern recognition receptors*”) que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Estes são reconhecidos por um largo número de receptores do tipo *Toll like* (TLR) em células humanas intestinais (Furrie *et al.*, 2005).

Assim, a superfície da célula hospedeira não é uma matriz inativa e estática, mas participa ativamente da interação patógeno-hospedeiro levando a transdução de sinal na célula hospedeira. Para evadir-se da doença, é necessário prevenir essa interação (Konar *et al.*, 2012).

A linhagem HEP-2 é representativa de células epiteliais, e apesar de não possuir receptores de superfície idênticos aos encontrados nos enterócitos, há evidências do alto nível de adesão a essas células em cepas EAEC (Nataro & Kaper, 1998).

As linhagens Caco-2 e T84 apresentam diversas características estruturais e funcionais que as aproximam das células intestinais humanas, os enterócitos, sendo a primeira fenotipicamente semelhante ao intestino delgado; a segunda, ao intestino grosso (Nataro *et al.*, 1996). Durante o processo de diferenciação celular, em ambas as linhagens intestinais, mudanças morfológicas e fisiológicas são observadas. Após a confluência, organizam-se em monocamadas polarizadas e diferenciadas, expressando microvilosidades e realizando funções como o transporte de moléculas e íons. A polarização das linhagens celulares é caracterizada pela presença de junções oclusivas que separam e definem os domínios apical e basolateral da membrana plasmática (Freshney, 1994).

Em nosso estudo a etapa de aderência celular foi avaliada em todas as cepas EAEC a partir de ensaios de aderência qualitativos em células HEP-2, Caco-2 e T84 após 3 e 6 horas de incubação.

A aderência agregativa não é fácil de ser caracterizada. Algumas cepas de *E. coli* mostram clara agregação e aderência à superfície das células HEP-2 e à lamínula de vidro em torno das células. Em contrapartida, outras agregam à superfície da lamínula de vidro, mas

nenhuma ou poucas bactérias aderem a células HEp-2. A agregação e a adesão são supostamente fenômenos independentes (Iwanaga *et al.*, 2002).

No presente estudo, 52,9% (n=9) das cepas exibiram aderência agregativa e 47% (n=8) foram classificadas como sem padrão típico após 6 horas de incubação. A cepa H153/5 exibiu aderência difusa em 3 horas e sem padrão típico em 6 horas. Vasconcellos (2009) observou que 78,1% das cepas apresentaram o padrão agregativo, 7,3% o padrão difuso e 14,6% não aderiram às células HEp-2 após 6 horas de incubação.

Estudos anteriores realizados em nosso laboratório também demonstraram que alguns isolados EAEC não aderiam com o padrão agregativo típico em linhagens celulares epiteliais nos tempos de 3 horas de incubação, apesar de carregarem sequências gênicas de pAA e/ou fimbrias AAFs (França, 2007; Pereira *et al.*, 2008).

Cepas EAEC reativas com a sonda CVD432 incapazes de aderir em células epiteliais cultivadas já foram descritas (Gioppo *et al.*, 2000). Esta incapacidade de aderir em células HEp-2 pode ser resultado da perda do fator mediador da adesão após o isolamento da amostra, ou mesmo a falta de receptores para as adesinas na linhagem HEp-2 (Nataro & Kaper, 1998).

Em outro estudo, 118 cepas EAEC aderiram a células HEp-2 no padrão agregativo e 79 foram não aderentes (Jenkins *et al.*, 2007). Em contrapartida, Knutton *et al.* (1992) avaliando a aderência de 44 cepas de EAEC em células HEp-2 e Caco-2, observaram que todas as cepas foram capazes de aderir às células exibindo padrão agregativo típico.

Com resultados tão discordantes pode-se inferir que, embora a adesão a células HEp-2 e HeLa venha sendo utilizada como o ensaio padrão ouro para a detecção das três categorias de DEC, as variações nos padrões AA e AL ocasionalmente reportadas, sugerem que o melhor método de identificação destes micro-organismos no ambiente de pesquisa clínica ainda permanece controverso (Gomes *et al.*, 1998).

Quando avaliada a linhagem intestinal Caco-2, resultados semelhantes aos obtidos para a linhagem epitelial HEp-2 foram encontrados nos ensaios de 6 horas de incubação. Em um estudo comparativo realizado por Kirov *et al.* (1995) foi observado, em ensaios quantitativos, percentuais semelhantes de aderência às células HEp-2 e às células Caco-2 em *Aeromonas sp.*

Apesar disso, resultados um pouco distantes foram encontrados por França (2007), onde 75% das cepas testadas exibiram aderência agregativa após 6 horas de incubação; e por Sobieszczanska *et al.* (2007), onde 76,5% dos casos clínicos e 63,6% dos controles mostraram um padrão de aderência agregativa e apenas uma minoria das cepas EAEC apresentou um padrão de aderência indefinido ou foram não-aderentes.

A linhagem intestinal T84 foi a mais suscetível à formação do padrão de aderência agregativo. No presente estudo, 100% (n=17) das cepas exibiram aderência agregativa após 6 horas de incubação, e mesmo considerando o período de 3 horas, T84 ainda foi a linhagem com o maior percentual agregativo, superando inclusive os resultados de 6 horas para HEp-2 e Caco-2 com 82,3% (n=14).

A carência de ensaios de aderência com a linhagem intestinal T84 disponíveis na literatura não permitiu comparações mais concisas com estudos anteriores. Entretanto nossos resultados sugerem, assim como Nataro *et al.* (1996), que T84 seja estudada e avaliada com mais constância como ferramenta e modelo, a fim de que mecanismos da patogênese de EAEC ainda pouco esclarecidos sejam elucidados.

Em relação à cepa protótipo EAEC 042, observamos que a mesma aderiu às células HEp-2, Caco-2 e T84. Nossos dados estão em discordância com aqueles obtidos por Nataro *et al.* (1996) que não observaram a aderência de EAEC 042 a células Caco-2, mas somente a células T84. Todavia, Abe *et al.* (2001) expuseram resultados semelhantes aos nossos, observando a aderência dessa cepa nas duas linhagens, sendo mais intensa em células T84. Variação nos resultados em diferentes ocasiões pode estar relacionada a fatores como número de passagens da cultura celular ou variações na metodologia.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) para a pesquisa do plasmídeo de aderência agregativa (pAA) foi realizada em todas as cepas EAEC, a fim de detectar o gene responsável pelo fenótipo agregativo observado nos ensaios de aderência, a partir da visualização da banda de interesse.

A PCR é uma poderosa técnica de biologia molecular, rápida, confiável, econômica, de fácil padronização e execução, o que permitiu sua cômoda implementação na rotina laboratorial hospitalar. Baseada na detecção dos fatores de virulência expressos por genótipos distintos atua de forma eficiente na elucidação de agentes patogênicos, que por suas características específicas estão distantes da capacidade de detecção pelas baterias de testes convencionais (Ruiz-Blázquez *et al.*, 2005).

Anteriormente ao incremento das técnicas moleculares com a introdução da PCR por Schmidt *et al.* (1995) para a identificação de cepas EAEC, a hibridização por sondas de DNA (Baudry *et al.*, 1990) era amplamente empregada e mostrava uma elevada especificidade na detecção de cepas EAEC, apesar da sensibilidade com grandes flutuações em diferentes estudos (Ruiz-Blázquez *et al.*, 2005).

Neste estudo os iniciadores da PCR utilizados para a detecção do plasmídeo (pAA) de *E. coli* enteroagregativa (EAEC) amplificam um fragmento interno da sonda de DNA

CVD432 de EAEC que é amplamente utilizada em estudos epidemiológicos (Duque *et al.*, 2002). Nos dias atuais, sabe-se que esta sonda detecta, na verdade, parte do gene *aat* que codifica uma proteína da membrana externa (AatA) facilitando a secreção da proteína dispersina (Jenkins *et al.*, 2007). Ainda, consoante Schmidt *et al.* (1995), PCR e detecção por sonda são referidos como tendo especificidade e sensibilidade semelhantes.

No presente estudo, 70,5% (n=12) das cepas foram positivas a PCR para pAA ou pCVD432 após a amplificação e a eletroforese, que permitiu a visualização do produto de interesse de 630pb.

Estudo anterior realizado em nosso laboratório demonstrou que todas as cepas EAEC testadas foram positivas para a técnica de hibridização com a sonda de DNA CVD432 (Rosa *et al.*, 1998). Em contrapartida, Gioppo *et al.* (2000), identificaram como reativos a sonda EAEC, apenas 19 (25%) dos 76 isolados que apresentaram AA no ensaio de células HEp-2, sugerindo uma fraca correlação com o fenótipo AA.

Outros estudos realizados estão em concordância com Gioppo *et al.* (2000). Moreno *et al.* (2010) estudando 98 cepas EAEC identificadas pelo ensaio de aderência em células HEp-2, encontraram 58 (59,2%) como positivas para hibridização com a sonda de DNA de EAEC. Já Scaletsky *et al.* (2002a), detectaram pela sonda CVD432, 88 dos 162 isolados com AA em células HEp-2 (sensibilidade 50,2%). Os mesmos autores verificaram ainda positividade para a sonda em 33 cepas que não apresentaram nenhum dos diferentes tipos de AA em células HEp-2 (especificidade 97,3%).

Em compensação, quando comparada a técnica molecular da PCR, Scaletsky *et al.* (2002a), identificaram que dos 162 isolados que demonstram AA em células HEp-2, 86 foram positivos para a PCR e todos esses reagiram com a sonda para EAEC. Além destes, seis isolados EAEC positivos a PCR foram negativos a sonda, e dois isolados só deram resultados positivos por sonda de DNA.

Outro estudo utilizando a PCR como ferramenta de escolha com iniciadores específicos para a sonda EAEC CVD432 apresentou resultados próximos aos nossos. Consoante Sobieszczanska *et al.* (2007), para *E. coli* que aderiram a células HEp-2 no padrão agregativo, o que correspondia a 36 pacientes clínicos e 11 controles, o patótipo EAEC foi confirmado para 33 (91,7%) casos clínicos e para todos os controles.

Em contrapartida, Thomazini *et al.* (2011) ao avaliarem a alta prevalência da aderência agregativa em cepas de *Escherichia coli* na mucosa associada a microbiota de pacientes com doenças inflamatórias intestinais, identificaram 34 (62,9%) de 54 cepas com o padrão AA em

células HEp-2. A triagem por PCR permitiu a detecção de apenas duas (3,7%) cepas como positivas para o pAA.

A ocorrência de resultados que comparam a aderência celular em células HEp-2 com as técnicas de hibridização com sondas de DNA e / ou com a PCR, inferem que a técnica de PCR permite detectar em média 88% de amostras positivas para o ensaio de aderência celular e que a PCR e a detecção por sonda, são referidas como tendo sensibilidade e especificidade semelhantes (Schmidt *et al.*, 1995). Os resultados obtidos a partir de ensaios de hibridização e PCR parecem refletir a natureza heterogênea de EAEC como já era apontado por Nataro & Kaper (1998).

Consoante Regua-Manguia *et al.* (2009), outra razão plausível para a detecção de cepas AA em linhagens celulares e pAA negativas na PCR, , poderia estar explicada na incapacidade de iniciadores específicos para amplificar genes de pAA devido a presença de mutações nos sítios de ligação do iniciador ou de genes codificando sequências distintas.

A exibição do fenótipo agregativo por cepas EAEC desprovidas das três fímbrias de aderência descritas até o momento, às linhagens celulares corrobora para a existência de fímbrias e adesinas ainda não identificadas (Czeczulin *et al.*, 1999; Avelino *et al.*, 2010; Jafari *et al.*, 2012).

Além dos modelos celulares de aderência a partir da utilização de linhagens não intestinais e intestinais, o estudo de cepas EAEC em diversos modelos, tais como nos ensaios *in vivo* em animais (Tzipori *et al.*, 1992) e de cultura de órgãos *in vitro* (IVOC) com enterócitos isolados ou linhagens celulares como HeLa, HEp-2, Caco 2, T84 e HT29 (Abe *et al.*, 2001; Harrington *et al.*, 2005), e com fragmentos intestinais (Knutton *et al.*, 1992) têm sido amplamente utilizados por mimetizarem de forma mais fidedigna a ação de EAEC no hospedeiro, onde foi observado que uma plausível explicação para a persistência da doença por EAEC envolveria os danos causados à mucosa intestinal (Andrade *et al.*, 2011).

Deste modo, a cultura de órgão *in vitro* representa de forma ideal um bom modelo para estudo a partir de explantes intestinais que permanecem estruturalmente intactos por períodos de horas em cultura (Hicks *et al.*, 1996). Essa técnica tem utilizado biópsias de tecidos humanos, fragmentos de tecidos extraídos durante colonoscopias e até mesmo de animais, como realizado em nosso estudo.

Sabe-se que as lesões do intestino delgado descritas em crianças com diarreia persistente pode ser causada por vários fatores nocivos, atuando separadamente ou em associação com deficiências nutricionais, intolerância ao leite ou alimentos, terapia com

antimicrobianos, bem como ação direta de mais de um agente enteropatogênico (Andrade *et al.*, 2011).

A fim de causar a diarreia, EAEC deve aderir às células epiteliais do intestino, formar um biofilme mucóide e induzir efeitos tóxicos sobre o intestino delgado, podendo culminar na diarreia persistente, que é muitas vezes manifestada como uma enteropatia crônica, com prejuízo da cicatrização da mucosa e capacidade diminuída da absorção digestiva (Andrade *et al.*, 2011).

No presente estudo, as cinco cepas utilizadas foram capazes de aderir a ambos os fragmentos intestinais, íleo e cólon de coelho, a análise por microscopia de luz em parafina e em Epon de cortes semifinos. Entretanto, variações no grau de aderência entre as cepas e os espécimes representativos de cada tecido foram observadas. Duas cepas foram mais aderentes ao cólon, uma cepa foi mais aderente ao íleo, e duas cepas foram aderentes a ambos na mesma intensidade. Além disso, a aderência ora foi observada sobre as vilosidades preservadas ou parcialmente destruídas, ora ao muco acima do epitélio com áreas de extrusão celular.

Estudos realizados por Vial *et al.* (1988), Kang *et al.* (2001), Andrade (2001), Pereira (2005) e França (2007) estão em concordância com os nossos resultados. Vial *et al.* (1988) e França (2007) demonstraram que cepas de EAEC induziram lesões histopatológicas no intestino de coelhos em associação com uma intensa produção de muco no duodeno, jejuno, íleo e cólon desses animais, nos modelos de alça ligada intestinal e infecção oral de coelho, respectivamente. Kang *et al.* (2001), Andrade (2001) e Pereira (2005) observaram efeitos citotóxicos como extrusão de células epiteliais e vesiculação de vilosidades, além de produção de muco nas regiões de íleo e cólon infectadas com EAEC, nos modelos de infecção oral, cultura de órgão *in vitro* e alça ligada intestinal de coelho, respectivamente.

Kaper *et al.* (2004) já haviam sugerido que a secreção de toxinas contribui consideravelmente para a desestruturação do epitélio intestinal, podendo elicitar extrusão celular, vacuolização e alterações no metabolismo dos enterócitos e do citoesqueleto.

Assim como Andrade (2001), o modelo de IVOC das cepas estudadas demonstrou por microscopia de luz, lesões significativas causadas pelos agregados bacterianos em "pilhas de tijolos" em ambas as regiões avaliadas. Entretanto, as lesões observadas no íleo pareceram mais intensas que as observadas no cólon, provavelmente pela fragilidade e projeção das vilosidades ileais, o que poderia facilitar o descolamento do epitélio, predispondo a lesões significativas em menor espaço de tempo.

Quanto ao tecido não inoculado e a cepa controle negativo HB101 utilizada, nossos resultados demonstram que a mucosa ileal apresentou-se com a arquitetura vilositária

parcialmente preservada, enquanto a mucosa colônica apresentou-se preservada e sem anormalidades aparentes, com um grande número de células caliciformes permeando os enterócitos. Na cepa HB101 ainda foram observadas raras bactérias. Já no que se refere às cepas protótipos 042 e 17-2, ambas foram capazes de aderir no padrão de tijolos empilhados a ambos os fragmentos intestinais, íleo e cólon de coelho, sobre as vilosidades parcialmente destruídas do íleo ou preservadas do cólon, como ao muco acima do epitélio com áreas de extrusão celular, que foram mais evidentes em 17-2.

Assim como observamos para HB101, leitões desafiados com *E. coli* k-12 não desenvolveram doença clínica nem mostraram evidência de quaisquer alterações de mucosa no modelo de infecção oral (Tzipori *et al.*, 1992).

Quanto às cepas protótipos, estudos realizados por Tzipori *et al.* (1992), Kang *et al.* (2001) e Andrade (2001) corroboram para nossos achados. Tzipori *et al.* (1992) ao desafiar leitões oralmente com a cepa 17-2 observaram por histopatologia, múltiplas camadas de bactérias agregadas no padrão característico, revestindo a superfície do epitélio e incorporada em um muco de gel semelhante a matriz. Kang *et al.* (2001) relataram que alterações máximas foram observadas no íleo terminal, onde os coelhos infectados com a cepa 17-2 tinham numerosas bactérias aderidas focalmente, muitas das quais dispostas em filas sobre o epitélio. Em nível de cólon proximal, as bactérias aderentes também foram observadas, embora sobre a superfície epitelial intacta. Já Andrade (2001) ao utilizar a cepa 042 demonstrou alterações aparentemente menos intensas, mas também significativas no íleo e no cólon de coelhos infectados.

No presente estudo, as cinco cepas EAEC utilizadas foram capazes de aderir a ambos os fragmentos intestinais, íleo e cólon de coelho, a análise por microscopia eletrônica de varredura. Entretanto, variações no grau de aderência entre as cepas e os espécimes representativos de cada tecido foram observadas. Três cepas foram mais aderentes ao cólon, uma cepa foi mais aderente ao íleo, e a última cepa foi aderente a ambos na mesma intensidade. Além disso, a aderência ora foi observada em sua maioria aderida ao muco, ora a superfície intacta do epitélio.

Estudos realizados por Knutton *et al.* (1992), Yamamoto *et al.* (1991) e Nataro *et al.* (1996) são consistentes aos nossos. Knutton *et al.* (1992) ao analisarem uma coleção de 44 cepas EAEC isoladas de crianças com diarreia na Índia e no Reino Unido mostraram que todas as cepas aderiram ao cólon, mas não à mucosa duodenal. Uma variação no nível de aderência para cada cepa foi observada, apesar de todas elas apresentarem níveis significativos de aderência. Yamamoto *et al.* (1991) mostraram que a cepa EAEC 0127: H2

exibiu baixos níveis de adesão nas mucosas jejunal e ileal e altos níveis de adesão à mucosa colônica fixada em formalina. Já Nataro *et al.* (1996) a partir de explantes de mucosa de jejuno, íleo e cólon obtidos de três pacientes pediátricos revelaram que o número de bactérias aderentes às espécimes de cólon foi significativamente maior do que a das bactérias aderentes a amostras de mucosa do intestino delgado.

Dessa forma, Knutton *et al.* (1992) inferem que a adesão de EAEC ao intestino grosso, mas não a mucosa do intestino delgado humano, não só demonstra que EAEC possui propriedades de enteroaderência humana, como também sugere que este possa ser o sítio preferencial de colonização deste patotipo de *E. coli* em humanos diarreicos. Entretanto, os autores também ressaltam que a ausência de aderência à mucosa ileal pode ser reflexo da deficiência de receptores para EAEC no indivíduo estudado. Ao mesmo tempo, Kang *et al.* (2001) sugerem que o grau de diferenciação celular e de maturação também podem afetar a concentração de receptores. Estas diferenças na expressão do receptor pode ter um papel essencial na determinação do local de ligação de EAEC.

Em contrapartida, Hicks *et al.* (1996) ao examinarem a interação entre EAEC e o intestino humano, a partir de diferentes regiões de mucosa intestinal pediátrica (jejuno, íleo e cólon) identificaram que das cinco cepas selvagens, duas aderiram a todos os níveis intestinais, uma aderiu ao jejuno e ao íleo, outra aderiu apenas ao íleo e a última aderiu ao íleo e ao cólon. Porém, assim como sugerem nossos resultados, a maioria das bactérias foi associada com a camada de muco acima da mucosa intestinal e poucas foram encontradas em estreita associação com a superfície mucosa. Em alguns casos, EAEC aderiu em grandes grupos que obscureciam a vista da superfície subjacente epitelial.

Mais recentemente, Andrade *et al.* (2011) ao avaliarem a interação de três cepas selvagens com fragmentos intestinais de íleo e cólon excisados a partir de pacientes pediátricos e adultos submetidos a procedimentos cirúrgicos intestinais e à colonoscopia, respectivamente, demonstraram que todas as cepas aderiram a ambas as regiões avaliadas sobre uma camada de muco espesso e, por vezes, diretamente na mucosa. Os autores revelaram que EAEC pode colonizar tanto a mucosa do intestino delgado quanto a mucosa do cólon, mas pode haver variações entre as diferentes cepas EAEC. Ainda fora observado que todos os casos em que as cepas foram aderentes à mucosa em números significativos, fizeram-no em agregados com o padrão de tijolos empilhados semelhante ao observado em cultura de células HEp-2.

Como se sabe, os micro-organismos muitas vezes podem construir e viver dentro de uma superfície associada a comunidades multicelulares conhecidas como biofilmes. Uma

importante semelhança entre eles é que a sua integridade estrutural criticamente depende de uma matriz extracelular produzida pelas suas células constituintes, as quais contribuem significativamente para a organização da comunidade. Assim como nossos resultados em que foi observado nas cepas I34/4 e I49/3 a presença de estruturas filiformes sugestivas de matriz extracelular, Branda *et al.* (2005) observaram estruturas similares em cepa selvagem de *Pseudomonas aeruginosa* por microscopias eletrônica de varredura e transmissão.

Quanto ao tecido não inoculado e a cepa controle negativo HB101 utilizada, nossos resultados demonstram que tanto a mucosa ileal quanto colônica apresentaram-se preservadas com pontos isolados de muco para ambas, sendo que na cepa HB101 ainda foram observadas raras bactérias. Já no que se refere às cepas protótipos 042 e 17-2, ambas foram capazes de aderir no padrão de tijolos empilhados e formar biofilmes a ambos os fragmentos intestinais, íleo e cólon de coelho. Em nível de cólon, ainda foi observado à abertura de criptas.

No que se refere à formação do biofilme por essas cepas, a grande afinidade destas bactérias para o biofilme que cobre o epitélio sugere que a aderência ao muco represente um importante papel na colonização bacteriana. De fato, conforme estudo da propriedade definidora de EAEC, a aderência agregativa parece representar as fases iniciais da formação de biofilme em meio de crescimento rico. Este biofilme de EAEC tem aspectos únicos e parece ser dependente das AAFs ou estruturas funcionalmente semelhantes (Andrade *et al.*, 2011).

Assim como observamos, Hicks *et al.* (1996) não ressaltaram nenhuma adesão significativa da cepa HB101 ao íleo quanto ao cólon, porém no cólon foi notado algum arredondamento das células e perda de muco a partir das células caliciformes.

Quanto às cepas protótipos, estudos realizados por Hicks *et al.* (1996), Nataro *et al.* (1996) e Czczulin *et al.* (1999) corroboram para nossos achados. Hicks *et al.* (1996) ao infectarem mucosa intestinal pediátrica de jejuno, íleo e cólon com a cepa 17-2 revelaram a presença de bactérias fortemente incrustadas sobre a superfície da mucosa de cada espécime intestinal testada, onde provocou a extrusão de células epiteliais. Além disso, no cólon a abertura de cripta e a vesiculação de microvilosidades foram observadas. Consoante Nataro *et al.* (1996) a cepa protótipo 042 provocou lesões semelhantes. Já Czczulin *et al.* (1999) observaram os mesmos resultados reproduzidos por Nataro *et al.* (1996) na mucosa jejunal e colônica infectada com a cepa 042, ao passo que no mutante afimbrial os efeitos foram substancialmente reduzidos.

Cabe ressaltar que, em nossos estudos as alterações citotóxicas observadas *in vitro* ocorreram dentro de 6 horas da inoculação de EAEC, o que pode não ser o caso *in vivo*. Além

disso, *in vivo* as bactérias devem penetrar a barreira de muco sobrejacente à mucosa, a fim de atingir o próprio epitélio, o que diverge do modelo de cultura de órgão *in vitro* (IVOC), onde as mucosas desafiadas foram diretamente expostas a uma dose elevada de bactérias sem os efeitos de diluição de secreções intestinais ou gástricas que pode desempenhar um importante papel *in vivo*. Tal fato sugere que a produção de muco em excesso observada em amostras inoculadas com EAEC pode ser uma resposta inflamatória a uma infecção, uma vez que esta quantidade excessiva de produção de muco não foi observada nos fragmentos controles (Hicks *et al.*,1996).

Em resumo, a perpetuação do processo diarreico em pacientes com EAEC estaria relacionada ao desarranjo provocado no íleo, levando as deficiências enzimáticas e a consequente má absorção de nutrientes. Adicionado da produção excessiva de muco estimulada pela presença destas bactérias que levaria a formação de um espesso biofilme também poderia haver alteração da absorção dos nutrientes, agindo como uma barreira ao contato dos nutrientes com a mucosa. Ainda, a destruição e o destacamento da superfície epitelial levariam a lesões e a danos na absorção quando no intestino delgado, além da penetração de antígenos, que seria um fator perpetuador do processo. Em ambas as regiões, íleo e cólon, poderia haver internalização bacteriana e com isto a potencialização dos danos provocados. Em decorrência dessa última etapa, as lesões levariam a eliminação de fezes com muco e sangue (Andrade, 2001).

6 CONCLUSÕES

- A presença de diferentes padrões de aderência frente às linhagens celulares HEp-2, Caco-2 e T84, representativas da laringe, íleo e cólon humano, respectivamente, ratificam a heterogeneidade do patotipo.
- A maior susceptibilidade da linhagem celular T84 a formação do padrão agregativo eleva-a como o novo padrão ouro para a identificação do patotipo como ferramenta diagnóstica e epidemiológica.
- A presença de cepas pAA negativas a PCR indica que tal metodologia não deva ser utilizada como ferramenta confirmatória para o diagnóstico de EAEC.
- A formação do padrão agregativo ao ensaio fenotípico em linhagens celulares humanas por cepas pAA negativas mesmo na ausência de genes codificadores das fímbrias de aderência agregativa (AAFs) descritas, sugere a existência de outras adesinas fimbriais e/ou afimbriais.
- A interação de EAEC com a mucosa intestinal de coelho *ex vivo* a partir da análise por microscopias de luz e eletrônica de varredura de fragmentos ileais e colônicos permitiu inferir que todas as cepas aderiram a ambos os fragmentos. Entretanto, o maior grau de aderência foi verificado no cólon.
- Todos os fragmentos intestinais desafiados pelas cepas de EAEC apresentaram maior quantidade de muco quando comparados com os controles negativos. Este achado sugere uma capacidade de estímulo da produção de muco pela mucosa intestinal infectada.
- Nossos resultados contribuíram para reforçar o potencial patogênico das cepas clínicas de EAEC desafiadas no modelo de cultura de órgão *in vitro*, ao mesmo tempo em que a diversidade dos fatores putativos de virulência que cada uma delas alberga parece influenciar nos diferentes mecanismos possíveis de indução de lesões na mucosa intestinal, ratificando com isto a heterogeneidade destes agentes.

REFERÊNCIAS

- Abe CM, Knutton S, Pedroso MZ, Freymüller E, Gomes, TAT. An enteroaggregative *Escherichia coli* strain of serotype O111:H12 damages and invades cultured T84 cells and human colonic mucosa. *FEMS Microbiol Lett.* 2001; 203:199-205.
- Adachi JA, Ericsson CD, Jiang Z-D, Dupont MW, Pallegar SR, Dupont HL. Natural history of enteroaggregative and enterotoxigenic *Escherichia coli* infection among US travelers to Guadalajara, Mexico. *J Infect Dis.* 2002; 185(11): 1681-1683.
- Adachi JA, Jiang Z-D, Mathewson JJ, Verenkar MP, Thompson S, Martinez-Sandoval F, Steffen R, Ericsson CD, Dupont HL. Enteroaggregative *Escherichia coli* as a major etiologic agent in traveler's diarrhea in 3 regions of the world. *Clin Infect Dis.* 2001; 32:1706-1709.
- Ahn JY, Chung J-W, Chang K-J, You MH, Chai JS, Kang YA, Kim S-H, Jeoung H, Cheon D, Jeoung A, Choi ES. Clinical characteristics and etiology of traveler's diarrhea among Korean travelers visiting South-East Asia. *J Korean Med Sci.* 2011; 26: 196-200.
- Albert MJ, Qadri F, Haque A, Bhuiyan A. Bacterial clump formation at the surface of liquid culture as a rapid test for identification of enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Clin Microb.* 1993; 31:1397-1399.
- Amar CF, East C, Maclure E, Mclauchlin J, Jenkins C, Duncanson P, Wareing DR. Blinded application of microscopy, bacteriological culture, immunoassays and PCR to detect gastrointestinal pathogens from faecal samples of patients with community-acquired diarrhoea. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2004; 23:529-534.
- Andrade, JAB. Estudo ultraestrutural da interação de amostras de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) com mucosa intestinal humana preservada *in vitro*: sugestão de invasão como fator de virulência [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2001.
- Andrade JAB, Freymüller E, Fagundes-Neto U. Adherence of enteroaggregative *Escherichia coli* to ileal and colonic mucosa: an *in vitro* study utilizing the scanning electron microscopy. *Arq Gastroenterol.* 2011; 48(3):199-204.
- Araujo JM, Tabarelli GF, Aranda KRS, Fabbriotti SH, Fagundes-Neto U, Mendes CMF, Scaletsky ICA. Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. *J Clin Microbiol.* 2007; 45(10):3396-3399.
- Aschtgen M-S, Bernard CS, Bentzmann SD, Lloubes R, Cascales E. SciN is an Outer Membrane Lipoprotein Required for Type VI Secretion in Enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2008; 190:7523-7531.
- Aslani MM, Alikhani MY, Zavari A, Yousefi R, Zamani AR. Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) clinical isolates and their antibiotic resistance pattern. *Int J Infect Dis.* 2011; 15:e136-e139.
- Avelino F, Saldaña Z, Islam S, Montero-Neto V, Dall'Agnol M, Eslava CA, Girón JA. The majority of enteroaggregative *Escherichia coli* pilus when adhering to cultured epithelial cells. *Med Microbiol.* 2010; 300(7):440-448.

- Baldwin TJ, Knutton S, Sellers L, Manjarrez-Hernandez HA, Aitken A, Williams PH. *Escherichia coli* strains secrete a heat-labile toxin antigenically related to *E. coli* hemolysin. *Infect Immun.* 1992; 60: 2092-2095.
- Ballester D, Escobar AMU, Grisi SJFE. Diarreia persistente: revisão dos principais aspectos fisiopatogênicos, fatores de risco e implicações terapêuticas. *Pediatrics (São Paulo)* 2002; 24:112-121.
- Baudry B, Savarino SJ, Vial P, Kaper JB, Levine MM. A sensitive and specific DNA probe to identify enteroaggregative *Escherichia coli*, a recently discovered diarrheal pathogen. *J Infect Dis.* 1990; 161(6):1249-1251.
- Benjamin P, Federman M, Wanke CA. Characterization of an invasive phenotype associated with enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 1995; 63:3417-3421.
- Bernier C, Gounon P, Lebouguenec, 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.* 2002; 70:4302-4311.
- Bhan MK, Raj P, Levine MM, Kaper JB, Bhandari N, Srivastava R, Kumar R, Sawazal S. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with persistent diarrhea in a cohort of rural children in India. *J Infect Dis.* 1989; 159:1061-1064.
- Bhatnagar S, Bhan MK, Sommerfelt H, Sazawal S, Kumar R, Saini S. Enteroaggregative *Escherichia coli* may be a new pathogen causing acute and persistent diarrhoea. *Scand J Infect Dis.* 1993; 25:579-583.
- Bird BR & Forrester FT. Basic laboratory techniques in cell culture. U. S. Health Human Services 1981; PHS - CDC, Atlanta.
- Boisen N, Ruiz-Perez F, Scheutz F, Krogfelt KA, Nataro JP. Short report: high prevalence of serine protease autotransporter cytotoxins among strains of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Am J Trop Med Hyg.* 2009; 80(2):294-301.
- Boisen N, Struve C, Scheutz F, Krogfelt KA, Nataro JP. New adhesin of Enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF family. *Infect Immun.* 2008; 76:3281-3292.
- Boudailliez B, Berquin P, Mariani-Kurkdjian P, Ilef D, Cuvelier B, Capek I, Tribout B, Bingen E, Piussan C. Possible person-to-person transmission of *Escherichia coli* O111-associated hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 1997; 11:36-39.
- Boyer F, Gwennaele F, Berthod J, Vandenbrouck Y, Attree I. Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide *in silico* analysis: what can be learned from available microbial genomic resources? *BMC Genomics* 2009; 10(10):1-14.
- Branda SS, Vik A, Friedman L, Kolter R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.* 2005; 13(1):20-26.
- Canizalez-Roman A & Navarro-Garcia F. Fodrin CaM-binding domain cleavage by Pet from enteroaggregative *Escherichia coli* leads to actin cytoskeletal disruption. *Mol Microbiol.* 2003; 48:947-958.

- Cennimo D, Abbas A, Huang DB, Chiang T. The prevalence and virulence characteristics of enteroaggregative *Escherichia coli* at an urgent-care clinic in the USA: a case-control study. *J Med Microbiol.* 2009; 58:403-407.
- Cerna JF, Nataro JP, Estrada-Garcia T. Multiplex PCR for detection of three plasmid-borne genes of enteroaggregative *Escherichia coli* strains. *J Clin Microbiol.* 2003; 41:2138-2140.
- Chan KN, Phillips AD, Knutton S, Smith HR, Walker-Smith JA. Enteroaggregative *Escherichia coli*: another cause of acute and chronic diarrhoea in England? *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1994; 18:87-91.
- Chaudhuri RR, Sebahia M, Hobman JL, Webber MA, Leyton DL, Goldberg MD, *et al.* Complete genome sequence and comparative metabolic profiling of the prototypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain 042. *Plos One* 2010; 5:e8801.
- Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66:4555-4558.
- Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. The *Yersinia* high-pathogenicity island is highly predominant in virulence-associated phylogenetic groups of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 2001; 196:153-157.
- Cobeljic M, Miljkovic-Selimovic B, Palmovic-Todosijevec D, Velikovic Z, Lepsanovic, Z, Zec N, *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with an outbreak of diarrhoea in a neonatal nursery ward. *Epidem Infect.* 1996; 117:11-16.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284:1318-1322.
- Cravioto A, Gross RJ, Scotland SM, Rowe B. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr Microbiol.* 1979; 3:95-99.
- Cravioto A, Tello A, Navarro A, Ruiz J, Villafan H, Uribe F, Eslava C. Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea. *Lancet* 1991; 337:262-264.
- Czeczulin JR, Balepur S, Hicks S, Phillips A, Hall R, Kothary MH, Navarro-Garcia F, Nataro JP. Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 1997; 65:4135-4145.
- Czeczulin JR, Whittam TS, Henderson IR, Navarro-Garcia F, Nataro JP. Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 1999; 67:2692-2699.
- Desvaux M, Parham NJ, Henderson IR. The autotransporter secretion system. *Res Microbiol.* 2004; 155(2):53-60.
- Dias FC. Detecção de toxina termo-estável (EAST-1) em *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) isoladas de crianças com diarreia aguda e controles na cidade do Rio de Janeiro. Resumo da 9ª Semana de Iniciação Científica. Rio de Janeiro: Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 1999; p.102.

- Dudley EG, Thomson NR, Parkhill J, Morin NP, Nataro JP. Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a *pheU* pathogenicity island in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 2006; 61:1267-1282.
- Dupont HL & Ericsson CD. Drug therapy: prevention and treatment of traveler's diarrhea. *New Engl J of Med*. 1993; 328(25):1821-1827.
- Dupont HL. Systematic review: the epidemiology and clinical features of travellers diarrhoea. *Aliment Pharmacol Ther*. 2009; 30:187-196.
- Duque SDS, Silva RM, Sabra A, Campos LC. Primary fecal culture used as template for PCR detection of diarrheagenic *E. coli* virulence factors. *J Microbiol Methods* 2002; 51:241-246.
- Dutta P, Cappello R, Navarro-García F, Nataro JP. Functional comparison of serine protease autotransporters of *Enterobacteriaceae*. *Infect Immun*. 2002; 70:7105-7113.
- Elias WP, Czczulin JR, Henderson IR, Trabulsi LR, Nataro JP. Organization of biogenesis genes for aggregative adherence fimbria II defines a virulence gene cluster in enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1999; 181:1779-1785.
- Eslava C, Navarro-Garcia F, Czczulin JR, Henderson IR, Cravioto A, Nataro JP. Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 1998; 66:3155-3163.
- Eslava C, Villaseca J, Morales R, Navarro A, Cravioto A. Identification of a protein with toxigenic activity produced by enteroaggregative *Escherichia coli* [Abstract]. Abstracts of the General Meeting of the American Society for Microbiology; 1993. Washington: The Society; 1993. Abstract B105:44.
- Estrada-Garcia T & Navarro-Garcia F. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathotype: a genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012; 1-18.
- Falcão JP, Gomes TAT, Dias AMG, Falcão DP. Virulence markers found in *Escherichia coli* strains isolated from ice. In: Abstracts of the 99th General meeting of the American Society for Microbiology, Chicago, 1999; 526.
- Farfan MJ, Inman KG, Nataro JP. The major pilin subunit of the AAF/II fimbriae from enteroaggregative *Escherichia coli* mediates binding to extracellular matrix proteins. *Infect Immun*. 2008; 76:4378-4384.
- Filloux A, Hachani A, Bleves S. The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. *Microbiology* 2008; 154:1570-1583.
- Fogh J & Trempe G. Human tumor cells *in vitro*. Plenum Press, 1975; 115-141.
- França FLS. Interação de cepas de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) com células intestinais humanas cultivadas *in vitro* e com mucosa intestinal de coelhos infectados por via oral *in vivo* [dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade do Estado do Rio de Janeiro; 2007.
- França FLS, Wells TJ, Browning DF, Nogueira RT, Sarges FS, Pereira AC, *et al*. Genotypic and phenotypic characterisation of enteroaggregative *Escherichia coli* from children in Brazil. 2013. Unpublished.

Frank C, Werber D, Cramer JP, Askar M, Faber M, Heiden MAD, *et al.* Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *N Engl J Med.* 2011; 365:1771-1780.

Frech SA, Dupont HL, Bourgeois AL, Mckenzie R, Belkind-Gerson J, Figueroa JF, *et al.* Use of a patch containing heat-labile toxin from *Escherichia coli* against traveller's diarrhoea: a phase II, randomised, doubleblind, placebo-controlled field trial. *Lancet* 2008; 371 (9629):2019-2025.

Freshney RI. Culture of animal cells. A manual of basic technique. Ed. Wiley-Liss, 3th Edition, 1994.

Fujiyama R, Nishi J, Imuta N, Tokuda K, Manago K, Kawano Y. The *shf* gene of a *Shigella flexneri* homologue on the virulent plasmid pAA2 of enteroaggregative *Escherichia coli* 042 is required for firm biofilm formation. *Curr Microbiol.* 2008; 56(5):474-480.

Furrie E, Macfarlane S, Thomson G, Macfarlane GT. Toll-like receptors-2, -3 and -4 expression patterns on human colon and their regulation by mucosal-associated bacteria. Blackwell Publishing Ltd. 2005; 115:565-574.

Garcia MI, Jouve M, Nataro JP, Gounon P, Le Bouguenec C. Characterization of the AfaD-like family of invasins encoded by pathogenic *Escherichia coli* associated with intestinal and extra-intestinal infections. *FEBS Lett.* 2000; 479:111-117.

Gioppo NMR, Elias WP, Vidotto MC, Linhares RE, Saridakis HO, Gomes TA, *et al.* Prevalence of HEp-2 cell-adherent *Escherichia coli* and chain-like adherent *E. coli* isolated from children with and without diarrhoea, in Londrina, Brazil. *FEMS Microbiol Lett.* 2000; 190:293-298.

Girón JA, Ho ASY, Schoolnik GK. Characterization of fimbriae produced by enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1993; 175:7391-7403.

Glandt M, Adachi JA, Mathewson JJ, Jiang Z-D, Dicesare D, Ashley D, *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* as a cause of traveller's diarrhea: clinical response to ciprofloxacin. *Clin Infect Dis.* 1999; 29(2):335-338.

Gomes TAT, Abe CM, Marques LRM. Detection of HeLa cell-detaching activity and alpha-hemolysin production in enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from feces of Brazilian children. *J Clin Microbiol.* 1995; 33:3364.

Gomes TAT, Vieira MAM, Abe CM, Rodrigues D, Griffin PM, Ramos SRTS. Adherence patterns and adherence-related DNA sequences in *Escherichia coli* isolates from children with and without diarrhea in São Paulo city, Brazil. *J Clin Microbiol.* 1998; 36:3609-3013.

Grad YH, Lipsitch M, Feldgarden M, Arachchi HM, Cerqueira GC, Fitzgerald M, *et al.* Genomic epidemiology of the *Escherichia coli* O104:H4 outbreaks in Europe, 2011. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109:3065-3070.

Greenberg DE, Jiang Z-D, Steffen R, Verenker MP, Dupont HL. Markers of inflammation in bacterial diarrhea among travelers, with a focus on enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenicity. *J Infect Dis.* 2002; 185(7):944-949.

- Haider K, Faruque SM, Shahid N. Enteroaggregative *Escherichia coli* infections in Bangladeshi children: clinical and microbiological features. *J Diarrheal Dis Res.* 1991; 9:318-322.
- Harrington SM, Dudley EG, Nataro JP. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. *FEMS Microbiol Lett.* 2006; 254(1):12-18.
- Harrington SM, Strauman MC, Abe CM, Nataro JP. Aggregative adherence fimbriae contribute to the inflammatory response of epithelial cells infected with enteroaggregative *Escherichia coli*. *Cell Microbiol.* 2005; 7:1565-1578.
- Henderson IR, Czczulin J, Eslava C, Noriega F, Nataro JP. Characterization of Pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 1999; 67:5587-5596.
- Henderson IR, Navarro-Garcia F, Desvaux M, Fernandez RC, Ala'Aldeen D. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Reviews* 2004; 68(4):692-744.
- Hicks S, Candy DC, Phillips AD. Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa *in vitro*. *Infect Immun.* 1996; 64:4751-60.
- Huang DB, Dupont HL, Jiang ZD, Carlin L, Okhuysen PC. Interleukin-8 response in an intestinal HCT-8 cell line infected with enteroaggregative and enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004b; 11:548-551.
- Huang DB, Mohanty A, Dupont HL, Okhuysen PC, Chiang T. A review of an emerging enteric pathogen: Enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Med Microbiol.* 2006; 55:1303-1311.
- Huang DB, Okhuysen PC, Jiang ZD, Dupont HL. Enteroaggregative *Escherichia coli*: an emerging enteric pathogen. *Am J Gastroenterol.* 2004a; 99:383-389.
- Infante RM, Ericsson CD, Jiang Z-D, Ke S, Steffen R, Riopel L, Sack DA, Dupont HL. Enteroaggregative *Escherichia coli* diarrhea in travelers: response to rifaximin therapy. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2004; 2(2):135-138.
- Itoh Y, Nagano I, Kunishima M, Ezaki T. Laboratory investigation of enteroaggregative *Escherichia coli* O untypable:H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness. *J Clin Microbiol.* 1997; 35:2546-2550.
- Iwanaga M, Song T, Higa N, Kakinohana S, Toma C, Nakasone N. Enteroaggregative *Escherichia coli*: incidence in Japan and usefulness of the clump-formation test. *J Infect Chemother* 2002; 8:345-348.
- Jafari A, Aslani MM, Bouzari S. *Escherichia coli*: a brief review of diarrheagenic pathotypes and their role in diarrheal diseases in Iran. *Iranian J Microbiol.* 2012; 4(3):102-117.
- Jenkins C, Chart H, Willshaw GA, Cheasty T, Tompkins DS. Association of putative pathogenicity genes with adherence characteristics and fimbrial genotypes in typical enteroaggregative *Escherichia coli* from patients with and without diarrhoea in the United Kingdom. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2007; 26(12):901-906.

- Jenkins C, Van Ijperen C, Dudley EG, Chart H, Willshaw GA, Cheasty T, Smith HR, Nataro JP. Use of a microarray to assess the distribution of plasmid and chromosomal virulence genes in strains of enteroaggregative *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett. 2005; 253:119-124.
- Joo LM, Macfarlane-Smith LR, Okeke IN. Error-prone DNA repair system in enteroaggregative *Escherichia coli* identified by subtractive hybridization. J Bacteriol. 2007; 189:3793-3803.
- Kang G, Pulimood AB, Mathan MM, Mathan VI. Enteroaggregative *Escherichia coli* infection in a rabbit model. Pathology 2001; 33:341-346.
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. Nature Rev. 2004; 2:123-140.
- Kaur P, Chakraborti A, Asea A. Enteroaggregative *Escherichia coli*: an emerging enteric food borne pathogen. Interdiscip Perspect Infect Dis 2010; 1-10.
- Kirov SM, Hayward LJ, Nerrie MA. Adhesion of *Aeromonas* sp. to cell lines used as models for intestinal adhesion. Epidemiol Infect. 1995; 115:465-473.
- Knutton S, Shaw RK, Bhan MK, Smith HR, McConnell MM, Cheasty T, *et al.* Ability of enteroaggregative *Escherichia coli* strains to adhere *in vitro* to human intestinal mucosa. Infect Immun. 1992; 60:2083-2091.
- Knutton S, Shaw R, Phillips AD, Smith HR, Willshaw GA, Watson P, Price E. Phenotypic and genetic analysis of diarrhea-associated *Escherichia coli* isolated from children in the United Kingdom. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2001; 33:32-40.
- Konar M, Sachin O, Priya A, Ghosh S. Identification of key proteins of cultured human intestinal cells involved in interaction with enteroaggregative *Escherichia coli*. FEMS Immunol Med Microbiol. 2012; 66:177-190.
- Law D & Chart H. Enteroaggregative *Escherichia coli*. J Appl Microbiol. 1998; 84:685-697.
- Lenaerts K, Bowman FG, Lamers WH, Renes J, Mariman CE. Comparative proteomic analysis of cell lines and scrapings of the human intestinal epithelium. BMC Genomics 2007; 8:91.
- Letourneau J, Levesque C, Berthiaume F, Jacques M, Mourez M. *In vitro* assay of bacterial adhesion onto mammalian epithelial cells. J Vis Exp. 2011; 51:e2783.
- Leung KY, Siame BA, Snowball H, Mok Y-K. Type VI secretion regulation: crosstalk and intracellular communication. Curr Opin Microbiol. 2010; 14:1-7.
- Lima AA, Fang G, Schorling JB, Albuquerque L, MC Auliffe JF, Mola S, Leite R, Guerrant RL. Persistent diarrhea in Northeast Brazil: etiologies and interactions with malnutrition. Acta Paediatr Suppl. 1992; 381:39-44.
- Mathewson JJ, Johnson PC, Dupont HL, Morgan DR, Thornton SA, Wood LV, Ericsson CD. A newly recognized cause of traveler's diarrhea: enteroadherent *Escherichia coli*. J Infect Dis. 1985; 151:471-475.

- Mathewson JJ, Oberhelman RA, Dupont HL, Javier de la Cabada F, Garibay EV. Enteroadherent *Escherichia coli* as a cause of diarrhea among children in Mexico. *J Clin Microbiol.* 1987; 25:1917-1919.
- Mercado EH, Ochoa TJ, Ecker L, Cabello M, Durand D, Barletta F, Molina M, Gil AI, Huicho L, Lanata CF, Cleary TG. Fecal leukocytes in children infected with diarrheagenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 2011; 49:1376-1381.
- Mohamed JA, Huang DB, Jian, Z-D, Dupont HL, Nataro JP, Belkind-Gerson J, Okhuysen PC. Association of putative enteroaggregative *Escherichia coli* virulence genes and biofilm production in isolates from travelers to developing countries. *J Clin Microbiol.* 2007; 45:121-126.
- Monteiro-Neto V, Bando SY, Moreira-Filho CA, Girón JA. Characterization of an outer membrane protein associated with haemagglutination and adhesive properties of enteroaggregative *Escherichia coli* O111:H12. *Cell Microb.* 2003; 5(8):533-547.
- Monteiro-Neto V, Campos LC, Ferreira AJ, Gomes TA, Trabulsi LR. Virulence properties of *Escherichia coli* O111:H12 strains. *FEMS Microbiol Lett.* 1997; 146:123-128.
- Morabito S, Karch H, Mariani-Kurkdjian P, Schmidt H, Minelli F, Bingen E, Caprioli A. Enteroaggregative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111 :H2 associated with an outbreak of hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol.* 1998; 36:840-842.
- Morais TB, Gomes TA, Sigulem DM. Enteroaggregative *Escherichia coli* in infant feeding bottles. *Lancet* 1997; 349:1448-1449.
- Moreno ACR, Filho AF, Gomes TDAT, Ramos STS, Montemor LPG, Tavares VC, Filho LDS, Irino K, Martinez MB. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010; 66:50-57.
- Mueller M, Grauschopf U, Maier T, Glockshuber R, Ban N. The structure of a cytolytic alpha-helical toxin pore reveals its assembly mechanism. *Nature* 2009; 459:726-730.
- Murakami H & Masui H. Hormonal control of human colon carcinoma cell growth in serum-free medium. *Proc Natl Acad Sci USA,* 1980; 77:3464-3468.
- Nataro JP. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. *Curr Opin Gastroenterol.* 2005; 21:4-8.
- Nataro JP, Deng Y, Cooksno S, Cravioto A, Savarino SJ, Guers LD, Levine MM, Tacket O. Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated in volunteers. *J Infect Dis.* 1995; 171:465-468.
- Nataro JP, Deng Y, Maneval DR, Germam AL, Martin WC, Levine MM. Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *E. coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. *Infect Immun.* 1992; 60:2297-2304.
- Nataro JP, Hicks S, Phillips AD, Vial PA, Sears CL. T84 cells in culture as a model for enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. *Infect Immun.* 1996; 64:4761-4768.
- Nataro JP & Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 1998; 11:142-201.

- Nataro JP, Kaper JB, Robins-Browne R, Prado V, Vial PA, Levine MM. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Pediatr Infect Dis J*. 1987; 6: 829-831.
- Nataro JP, Scaletsky ICA, Kaper JB, Levine MM, Trabulsi LR. Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 1985; 48:378-383.
- Nataro JP, Steiner T, Guerrant RL. Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis*. 1998; 4:251-261.
- Navarro-Garcia F & Elias WP. Autotransporters and virulence of enteroaggregative *E. coli*. *Gut Microbes* 2011; 2:13-24.
- Nishi J, Sheikh J, Mizuguchi K, Luisi B, Burland V, Boutin A, Rose DJ, Blattner FR, Nataro JP. The export of coat protein from enteroaggregative *Escherichia coli* by a specific ATP-binding cassette transporter system. *J Biol Chem*. 2003; 278:45680-45689.
- Nogueira RT. Diversidade genética, filogenia, resistência a antimicrobianos e fatores de virulência em cepas de *Escherichia coli* enteroagregativa [dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade do Estado do Rio de Janeiro; 2004.
- Okeke IN, Lamikanra A, Czeizulin J, Dubovsky F, Kaper JB, Nataro JP. Heterogeneous virulence of enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from children in southwest Nigeria. *J Infect Dis*. 2000; 181:252-260.
- Okeke IN & Nataro JP. Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Lancet Infect Dis*. 2001; 1:304-313.
- Okeke IN, Wallace-Gadsden F, Simons HR, Matthews N, Labar AS, Hwang J, Wain J. Multi-locus sequence typing of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from Nigerian children uncovers multiple lineages. *Plos One* 2010; 5:e14093.
- Pai M, Kang G, Ramakrishna BS, Venkataraman A, Muliylil J. An epidemic of diarrhoea in South India caused by enteroaggregative *Escherichia coli*. *Indian J Med Res*. 1997; 106:7-12.
- Paniagua GL, Monroy E, García-González O, Alonso J, Negrete E, Vaca S. Two or more enteropathogens are associated with diarrhoea in Mexican children. *Annals Clin Microbiol Antimicrob*. 2007; 6:17-24.
- Paul M, Tsukamoto T, Ghosh AR. The significance of enteroaggregative *Escherichia coli* in the etiology of hospitalized diarrhoea in Calcutta, India and the demonstration of a new honeycombed pattern of aggregative adherence. *FEMS Microbiol Lett*. 1994; 117:319-325.
- Pereira ACM. *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC): interação com células intestinais humanas cultivadas *in vitro* e mucosa intestinal de coelho *in vivo* [dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade do Estado do Rio de Janeiro; 2005.
- Pereira ACM, Britto-Filho JD, Jose de Carvalho J, de Luna MDG, Rosa ACP. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) strains enter and survive within cultured intestinal epithelial cells. *Microb Pathog*. 2008; 45:310-314.
- Presterl E, Nadrchal R, Wolf D, Rotter M, Hirschl AM. Enteroaggregative and enterotoxigenic *Escherichia coli* among isolates from patients with diarrhea in Austria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1999; 18:209-212.

Pukatzki S, Ma AT, Revel AT, Sturtevant D, Mekalanos JJ. Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:15508-15513.

Pukatzki S, Ma AT, Sturtevant D, Krastin B, Sarracino D, Nelson WC, Heidelberg J, Mekalanos JJ. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the Dictyostelium host model system. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:1528-1533.

Reed GH. Dairy, food and environmental sanitation. Foodborne Illness (Part 8) *Escherichia coli*; 1994; 14(6):329-330.

Regua-Mangia AH, Gomes TAT, Vieira MAM, Andrade JRC, Irino K, Teixeira LM. Frequency and characteristics of diarrhoeagenic *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhoea in Rio de Janeiro, Brazil. *J Infect.* 2004; 48:161-167.

Regua-Manguia AH, Comes TAT, Vieira MAM, Irino K, Teixeira LM. Molecular typing and virulence of enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhoea in Rio de Janeiro city, Brazil. *J Med Microbiol.* 2009; 58:414-422.

Rosa ACP, Mariano AT, Pereira MAS, Tibana A, Gomes TAT, Andrade JRA. Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* isolated from infants with acute diarrhea and healthy controls in Rio de Janeiro, Brasil. *J Med Microbiol.* 1998; 47:781-790.

Rousset M. The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie* 1986; 68:1035-1040.

Ruiz-Blázquez J, Vargas M, Nataro JP, Vila J, Brustenga JG. Validación de la técnica de PCR para la detección de *Escherichia coli* enteroagregativa causante de diarrea del viajero. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2005; 23(8):479-481.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a Laboratory Manual. 2nd ed., New York: Cold Spring Harbor, 1989.

Sanchez-Betancourt M & Navarro-Garcia F. Pet secretion, internalization and induction of cell death during infection of epithelial cell by enteroaggregative *Escherichia coli*. *Microbiol.* 2009; 155:2895-2906.

Sarantuya J, Nishi J, Wakimoto N, Erdene S, Nataro JP, Sheikh J, *et al.* Typical enteroaggregative *Escherichia coli* is the most prevalent pathotype among *E. coli* strains causing diarrhea in Mongolian children. *J Clin Microbiol.* 2004; 42:133-139.

Savarino SJ, Fasano A, Watson J, Martin BM, Levine MM, Guandalini S, Guerry P. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:3093-3097.

Savarino SJ, Fox P, Yikang D, Nataro JP. Identification and characterization of a gene cluster mediating enteroaggregative *Escherichia coli* aggregative adherence fimbria I biogenesis. *J Bacteriol.* 1994; 176:4949-4957.

Savarino SJ, Veigh A, Watson J, Molina J, Cravioto A, Echeverria P, Bhan MK, Levine MM, Fasano A. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Infect Dis.* 1996; 173:1019-1022.

- Scaletsky ICA, Fabbriotti SH, Aranda KR, Morais MB, Fagundes-Neto U. Comparison of DNA hybridization and PCR assays for detection of putative pathogenic enteroadherent *Escherichia coli*. J Clin Microbiol. 2002a; 40(4):1254-1258.
- Scaletsky ICA, Fabbriotti SH, Silva SOC, Morais MB, Fagundes-Neto U. HEp-2-adherent *Escherichia coli* strains associated with acute infantile diarrhea, São Paulo, Brazil. Emerg Infect Dis. 2002b; 8:855-858.
- Scaletsky ICA, Silva MLM, Trabulsi LR. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. Infect and Immun. 1984; 45:534-536.
- Scavia G, Staffolani M, Fisichella S, Striano G, Colletta S, Ferri G, Escher M, Minelli F, Caprioli A. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with a foodborne outbreak of gastroenteritis. J Med Microbiol. 2008; 57(9):1141-1146.
- Schmidt H, Knop C, Franke S, Aleksic S, Heesemann J, Karch H. Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. J Clin Microbiol. 1995; 33:701-705.
- Schubert S, Rakin A, Karch H, Carniel E, Heesemann J. Prevalence of the “High-Pathogenicity Island” of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. Infect Immun. 1998; 66(2):480-485.
- Scotland SM, Smith HR, Said B, Willshaw GA, Cheasty T, Rowe B. Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated in Britain as enteroaggregative or as members of a subclass of attaching-and-effacing *E. coli* not hybridising with the EPEC adherence-factor probe. J Med Microbiol. 1991; 35:278-283.
- Scotland SM, Willshaw GA, Smith HR, Said B, Stokes N, Rowe B. Virulence properties of *Escherichia coli* strains belonging to serogroups O26, O55, O111 and O128 isolated in the United Kingdom in 1991 from patients with diarrhoea. Epidemiol Infect. 1993; 111:429-438.
- Sheikh J, Hicks S, Dall’Agnol M, Phillips AD, Nataro JP. Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. Mol Microbiol. 2001; 41:983-997.
- Smith HR, Cheasty T, Rowe B. Enteroaggregative *Escherichia coli* and outbreaks of gastroenteritis in UK. Lancet 1997; 350:814-815.
- Sobieszczanska BM, Osek J, Wasko-Czopnik D, Dworniczek E, Jermakow K. Association of enteroaggregative *Escherichia coli* with irritable bowel syndrome. Clin Microbiol Infect. 2007; 13:404-407.
- Spencer J, Smith HR, Chart H. Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from outbreaks of diarrhoeal disease in England. Epidemiol Infect. 1999; 123:413-421.
- Sutjita M, Bouckenoghe AR, Adachi JÁ, Jiang ZD, Mathewson JJ, Ericsson CD, Dupont HL. Intestinal secretory immunoglobulin A response to enteroaggregative *Escherichia coli* in travelers with diarrhea. Clin Diagn Lab Immunol. 2000; 7(3):501-503.
- Suzart S, Guth BEC, Pedroso MZ, Okafor UM, Gomes TAT. Diversity of surface structures and virulence genetic markers among enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) strains with and without the EAEC DNA probe sequence. FEMS Microbiol. 2001; 201:163-168.

Svenungsson B, Lagergren A, Ekwall E, Evengard B, Hedlund KO, Karnell A, Lofdahl S, Svensson L, Weintraub A. Enteropathogens in adult patients with diarrhea and healthy control subjects: a 1-year prospective study in a Swedish clinic for infectious diseases. *Clin Infect Dis.* 2000; 30:770-778.

Thomazini CM, Samegima DAG, Rodrigues MAM, Victoria CR, Rodrigues J. High prevalence of aggregative adherent *Escherichia coli* strains in the mucosa-associated microbiota of patients with inflammatory bowel diseases. *Int J Med Microbiol.* 2011; 301:475-479.

Tomar BS. Intestinal infections. *Indian J Pediatr.* 2001; 68:S8-18.

Torres AG, Arenas-Hernández MMP, Martínez-Laguna Y. Overview of *Escherichia coli*. *Pathog Escherichia coli in Latin America*, 2010; 1-7.

Tzipori S, Montanaro J, Robins-Browne RM, Vial P, Gibson R, Levine MM. Studies with enteroaggregative *Escherichia coli* in the gnotobiotic piglet gastroenteritis model. *Infect Immun.* 1992; 60:5302-5306.

Van HR, Michiels CW. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Res Microbiol.* 2005; 156(5-6):626-633.

Vasconcellos FM. Padrão de adesão agregativa e formação de biofilme em *Escherichia coli* enteroagregativa típica e atípica: papel da proteína Shf [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2009.

Velarde JJ, Varney KM, Inman KG, Farfan M, Dudley E, Fletcher J, *et al.* Solution structure of the novel dispersin protein of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 2007; 66:1123-35.

Vial PA, Robins-Browne R, Lior H, Prado V, Kaper JB, Nataro JP, *et al.* Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. *J Infect Dis.* 1988; 158:70-79.

Vila J, Vargas M, Henderson IR, Gascon J, Nataro JP. Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in travelers diarrhea strains. *J Infect Dis.* 2000; 182:1780-1783.

Villaseca JM, Hernández U, Sainz-Espuñes TR, Rosario C, Eslava C. Enteroaggregative *Escherichia coli* an emergent pathogen with different virulence properties. *Rev Latinoam Microbiol.* 2004; 47(3-4):140-159.

Wakimoto N, Nishi J, Sheikh J, Nataro JP, Sarantuya J, Iwashita M, Manago K, Tokuda K, Yoshinaga M, Kawano Y. Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for enteroaggregative *Escherichia coli*. *Am J Trop Med Hyg.* 2004; 71:687-690.

Wanke CA, Gerrior J, Blais V, Mayer H, Acheson D. Successful treatment of diarrheal disease associated with enteroaggregative *Escherichia coli* in adults infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis.* 1998; 178:1369-1372.

Wanke CA, Schorling JB, Barrett LJ, Desouza MA, Guerrant RL. Potential role of adherence traits of *Escherichia coli* in persistent diarrhea in an urban Brazilian slum. *Pediatr Infect Dis J.* 1991; 10:746-751.

Weintraub A. Enteroaggregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. J Med Microbiol. 2007; 56:4-8.

Wells TJ, Totsika M, Schembri MA. Autotransporters of *Escherichia coli*: a sequence-based characterization. Microbiol. 2010; 156:2459-2469.

Yamamoto T, Endo S, Yokota T, Echeverria P. Characteristics of adherence of enteroaggregative *Escherichia coli* to human and animal mucosa. Infect Immun. 1991; 59(10):3722-3739.

Yamamoto T, Koyama Y, Matsumoto M, Sonoda E, Nakayama S, Uchimura M, *et al.* Localized, aggregative, and diffuse adherence to HeLa cells, plastic and human small intestines by *Escherichia coli* isolated from patients with diarrhea. J Infect Dis. 1992; 166:1295-1310.

Yoshida CH. Propriedades de virulência em *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC). Resumo da 10ª Semana de Iniciação Científica. Rio de Janeiro: Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2001; p.104.

Yoshida CH & Pereira ACM. Detecção de fatores de virulência em *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) isoladas de crianças com diarreia aguda e controles saudáveis. Resumo da 11ª Semana de Iniciação Científica. Rio de Janeiro: Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2002; p.86.

ANEXO - Comissão de ética para o cuidado e uso de animais experimentais

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCÂNTARA GOMES
COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **CEA/236/2008** sobre "**Estudo da expressão de fímbrias de aderência agregativa (AAF's) de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) e sua importância na interação e invasão com células epiteliais intestinais**", sob a responsabilidade de **Ana Cláudia de Paula Rosa**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA), em **10/07/2008**. Este certificado expira em **10/07/2010**.

Rio de Janeiro, 10 de julho de 2008.

A handwritten signature in red ink, appearing to read 'Antonio Carlos da Silva', is written over a horizontal line.

Prof. Antonio Carlos da Silva
Coordenador – CEA/IBRAG/UERJ