



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Ricardo Luís Lopes Braga

**Análise celular e ultraestrutural dos mecanismos de patogênese
de cepas de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) invasoras
em células intestinais *in vitro* e *ex vivo***

Rio de Janeiro

2017

Ricardo Luís Lopes Braga

**Análise celular e ultraestrutural dos mecanismos de patogênese
de cepas de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) invasoras
em células intestinais *in vitro* e *ex vivo***



Tese apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor, 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 Cláudia de Paula Rosa Ignacio

Coorientadora: Dra. Ana Cláudia Machado Pereira

Rio de Janeiro

2017

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

B813 Braga, Ricardo Luís Lopes.
Análise celular e ultraestrutural dos mecanismos de patogênese de cepas de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) invasoras em células intestinais *in vitro* e *ex vivo* / Ricardo Luís Lopes Braga. – 2017.
97 f.

Orientadora: Ana Claudia de Paula Rosa Ignacio

Coorientadora: Ana Claudia Machado Pereira

Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Escherichia coli* - Teses. 2. Diarreia - Teses. 3. Citocinas – Teses. 4. Coelho – Infecções – Teses. 5. Morte celular. I. Ignacio, Ana Claudia de Paula Rosa. II. Pereira, Ana Claudia Machado. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 576.851.48

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB/7 - 6382

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

Assinatura

Data

Ricardo Luís Lopes Braga

**Análise celular e ultraestrutural dos mecanismos de patogênese
de cepas de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) invasoras
em células intestinais *in vitro* e *ex vivo***

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

Aprovada em 14 de dezembro de 2017.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Ana Claudia de Paula Rosa Ignacio (Orientadora)
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Myriam Bandeira Vianna Cortes
Universidade Federal Fluminense

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

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

Prof. Dr. Raphael do Carmo Valente
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Rio de Janeiro

2017

DEDICATÓRIA

A Deus, pelo dom da vida e pela oportunidade de evoluir a cada dia.
Aos meus queridos pais, Luís e Norma, que ao abdicarem-se dos seus sonhos, não mediram esforços em prol de minha 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 ética 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.
Gratidão! 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 confiança que sempre depositaram em mim e por serem meus maiores exemplos de vida.

Ao meu querido irmão, Leonardo, pela amizade, atenção, dedicação e preocupação com meus projetos de vida.

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

A orientadora Prof.^a Dra. Wânia Ferraz Pereira Manfro pela amizade, dedicação e paciência, pela gratificante colaboração na realização dos ensaios de ELISA e óxido nítrico, pela avaliação conjunta dos resultados, como pelo suporte na escrita do artigo.

A co-orientadora Dra. Ana Cláudia Machado Pereira pela amizade, carinho e paciência, pelas palavras de fé e perseverança, pelos conselhos sábios e incentivos em busca de meus ideais.

Aos amigos de laboratório André Victor Barbosa, Andréa Fonseca Ferreira, Esther Helena Rondon Barretto Prado, Fabiana Cordeiro, Manuela Bernardo de Souza, Marcelly Miranda Aybal Jayme, Paula Azevedo dos Santos, Raquel Costa de Luca Rebello e Thays Araujo Gonçalves pela amizade e pelos momentos de descontração.

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

Aos colegas da turma de doutorado 2013.1 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 a Carla Veronica Freire de Freitas, pela assistência e paciência.

A Dra. Cintia Silva dos 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 das imagens contidas neste trabalho.

A CAPES pelo apoio financeiro.

Se quiser triunfar na vida, faça da perseverança a sua melhor amiga; da experiência, o seu conselheiro; da prudência, o seu irmão mais velho; e da esperança, o seu anjo da guarda.

Joseph Addison

RESUMO

BRAGA, Ricardo Luís Lopes. **Análise celular e ultraestrutural dos mecanismos de patogênese de cepas de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) invasoras em células intestinais *in vitro* e *ex vivo***. 2017. 97 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

A síndrome diarreica é considerada um grave problema de saúde pública em todo o mundo e é considerada uma das principais causas de morbidade e mortalidade nos países em desenvolvimento. A patogênese de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) permanece incerta e tem sido investigada extensivamente pela utilização de modelos *in vitro* e, em menor grau, de modelos *ex vivo*. A competência de EAEC para aderir ao epitélio intestinal do hospedeiro é um papel fundamental para a colonização e o desenvolvimento da doença. Além disso, EAEC pode invadir células intestinais e causar alterações graves no epitélio intestinal. O presente estudo investigou a interação de cepas EAEC invasoras isoladas de diarreia infantil com mucosa ileal e colônica de coelho *ex vivo*. As cepas EAEC também foram avaliadas quanto à capacidade de persistência intracelular associada à produção de citocinas na linhagem intestinal T84. A viabilidade celular e ocorrência de apoptose/necrose na linhagem T84 também foi avaliada. Os ensaios de aderência foram realizados com as cepas co-incubadas com fragmentos de intestino de coelho durante um período de 6 horas e foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A persistência intracelular e a produção de citocinas por ELISA em “sanduíche” foram avaliadas em 24 horas e as microscopias por contraste de fase e de fluorescência e citometria de fluxo foram conduzidas após 6, 16 e 24 horas de interação com células T84 infectadas. Através da MEV, observamos que todas as cepas de EAEC aderiram a ambos os sítios intestinais (íleo e cólon) com o padrão de aderência agregativo típico de “tijolos empilhados”, porém o maior grau de aderência foi observado na mucosa colônica. As taxas de sobrevivência de EAEC H92/3, I49/3 e 042 foram $1,4 \times 10^3$, $3,2 \times 10^3$ e $0,5 \times 10^3$ UFC/ mL, respectivamente. Todas as cepas EAEC testadas induziram quantidades significativas de IL-8, IL-6 e TNF- α em comparação com células T84 não infectadas. A microscopia de contraste de fase mostrou perda de viabilidade em células infectadas por períodos de 16 horas. Por microscopia de fluorescência, observamos que as células infectadas com EAEC H92/3 e I49/3 apresentaram danos nos núcleos. Além disso, por citometria de fluxo, nossos dados revelaram que EAEC provocou apoptose tardia e necrose de células T84. Esses dados mostraram que as cepas de EAEC invasoras podem ter um alto tropismo para o cólon humano. As cepas invasoras podem sobreviver dentro da linhagem celular intestinal, induzindo uma resposta imune proinflamatória e desencadeando processos apoptóticos e/ou necróticos em células T84. As diferentes vias de virulência investigadas no presente estudo contribuem para o entendimento do mecanismo de patogenicidade de EAEC invasoras.

Palavras-chave: EAEC. IVOC. Células T84. Persistência. Citocinas proinflamatórias. Morte celular.

ABSTRACT

BRAGA, Ricardo Luís Lopes. **Cellular and ultrastructural analysis of pathogenesis mechanisms of strains of invasive enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) in *in vitro* and *ex vivo* intestinal cells.** 2017. 97f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

The diarrheal syndrome is considered a serious public health problem all over the world and is considered a major cause of morbidity and mortality in developing countries. The pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) remains uncertain and has been investigated extensively by the use of *in vitro* and, to a lesser extent, *ex vivo* models. The competence of EAEC to adhere to the intestinal epithelium of the host is a key role to the colonization and disease development. Further, EAEC can invade intestinal cells and cause severe alterations in the intestinal epithelium. The present study investigated the interaction of invasive EAEC strains isolated from childhood diarrhea with rabbit ileal and colonic mucosa *ex vivo*. EAEC strains were also evaluated for the ability of intracellular persistence associated with cytokine production in the T84 intestinal line. The viability of cells and occurrence of apoptosis/necrosis in *in vitro* T84 cell line was also evaluated. The adhesion assays were performed with the strains co-incubated with fragments of rabbit intestine over a period of 6 hours and were analysed by scanning electron microscopy (SEM). The intracellular persistence and production of cytokines by sandwich ELISA were evaluated upon 24 hours and the phase contrast and fluorescence microscopy and flow cytometry were conducted after 6, 16 and 24 hours of interaction with infected T84 cells. Through SEM we observed that all EAEC strains adhered to both intestinal sites (ileum and colon) with the typical aggregative adherence pattern of “stacked bricks”, however the highest degree of adherence was observed on colonic mucosa. The survival rates of EAEC H92/3, I49/3 and 042 were 1.4×10^3 , 3.2×10^3 and 0.5×10^3 CFU/mL, respectively. All EAEC strains tested induced significant amounts of IL-8, IL-6 and TNF- α compared to uninfected T84 cells. Phase contrast microscopy showed loss of viability in cells infected for periods of 16 hours. By fluorescence microscopy, we observed that cells infected with EAEC H92/3 and I49/3 had nuclei damages. Furthermore, by flow cytometry, our data revealed that EAEC provoked late apoptosis and necrosis of T84 cells. These data showed that invasive EAEC strains may have a high tropism for the human colon. Invasive strains can survive within intestinal cell line, inducing a proinflammatory immune response and triggering apoptotic and/or necrotic processes in T84 cells. The different pathways of virulence investigated in the present study contribute to the understanding of the mechanism of pathogenicity of invasive EAEC.

Keywords: EAEC. IVOC. T84 cells. Persistence. Proinflammatory cytokines. Cell death.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Micrograph of the intestinal rabbit mucosa <i>ex vivo</i> , after 6 hours of incubation, observed by scanning electron microscopy.....	42
Figura 2 -	Micrograph of the EAEC strains interaction with intestinal rabbit mucosa <i>ex vivo</i> , after 6 hours of incubation, observed by scanning electron microscopy.....	42
Figura 3 -	Intracellular survival of EAEC H92/3, I49/3 and 042 strains on T84 cells after 24 hours of incubation.....	61
Figura 4 -	Cytokine production by infected T84 cells.....	62
Figura 5 -	T84 cells colored with 0.5% trypan solution.....	75
Figura 6 -	T84 cells died with DAPI after 16 hours of incubation with EAEC strains.....	76
Figura 7 -	Flow cytometric analysis of phosphatidylserine externalization (Annexin V binding) and cell membrane integrity (PI staining) in T84 cells infected with EAEC H92/3 and I49/3 for 6 hours.....	77
Figura 8 -	Flow cytometric analysis of phosphatidylserine externalization (Annexin V binding) and cell membrane integrity (PI staining) in T84 cells infected with EAEC H92/3 and I49/3 for 16 hours.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Enteroagregative <i>Escherichia coli</i> (EAEC) and prototype strains and their serotypes, phylogenetic groups, virulence factors and adherence patterns.....	41
Tabela 2 -	Enteroagregative <i>Escherichia coli</i> (EAEC), prototype strain and their serotypes, phylogenetic groups, virulence factors and adherence patterns.....	60
Tabela 3 -	Enteroagregative <i>Escherichia coli</i> (EAEC), prototype strain and their serotypes, phylogenetic groups, virulence factors and adherence patterns.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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
AAF/V	Fímbria de Aderência Agregativa do tipo V
AAFs	Fímbrias de Aderência Agregativa
Aap	“Anti aggregation protein”
AaT	Sistema transportador antiagregante
AggR	“Transcriptional regulator”
AIEC	<i>E. coli</i> aderente invasiva
ATs	Autotransportadas
ATCC	“American Type Culture Collection”
Caco-2	Linhagem celular de adenocarcinoma colo-retal humano
CD	Doença de Crohn
CFU	“Colony-Forming Unit”
CLED	“Cystine Lactose Eletrolyte Deficient”
DAEC	<i>E. coli</i> difusamente aderente
DAPI	“4’6’-diamidino-2-phenylindole”
DEC	<i>Escherichia coli</i> diarreioagênica
DMEM	“Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium”
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
EAST1	“EAEC heat-stable enterotoxin 1”
ECM	Componentes da matriz extracelular
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasora
ELISA	“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogênica
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigênica
ExPEC	<i>E.coli</i> extra-intestinal patogênica

FasL	Fas Ligante
FBS	“Fetal Bovine Serum”
GC	Guanilato Ciclase
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
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HlyE	Hemolisina E
HUS	Síndrome hemolítico-urêmica
IECs	Células Epiteliais Intestinais
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IVOC	Cultura de Órgão <i>In Vitro</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MOMP	Permeabilização da membrana mitocondrial externa
MUC1	Mucina transmembranar 1
NA	Não aderente
NMEC	<i>E. coli</i> causadora de meningite neonatal
NO	“Nitric Oxide”
O	Antígeno somático
OMP	Proteína de membrana externa
OMS	Organização Mundial de Saúde
pAA	Plasmídeo de Adrência Agregativa
PAIs	Ilhas de Patogenicidade
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PBS-D	“Dulbecco’s Phosphate Buffered Saline”
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
Pet	“Plasmid encoded toxin”
PI	“Propidium Iodide”
Pic	“Protein involved in colonization”

PI-IBS	Síndrome do intestino irritável pós-infecciosa
PRRs	Receptores de Reconhecimento de Padrões
ROS	Espécies reativas de oxigênio
ShET1	“Shigella enterotoxin 1”
SPATEs	“Serine Protease Autotransporters of the <i>Enterobacteriaceae</i> ”
SST5	Sistema de Secreção do tipo V
SST6	Sistema de Secreção do tipo VI
STEAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa produtora de toxina Shiga
Stx	Toxina Shiga
T84	Linhagem celular de carcinoma de cólon humano
TLRs	Receptores <i>Toll like</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
TSA	“Trypticase Soy Agar”
TSB	“Trypticase Soy Broth”
UPEC	<i>E. coli</i> uropatogênica
UTI	Infecção do trato urinário

LISTA DE UNIDADES

°C -	Graus Celsius
µg -	Micrograma
µL -	Microlitro
µm -	Micrometro
nm -	Nanômetro
KDa -	Kilodalton
Kg -	Kilograma
Kv -	Quilovolt
M -	Molar
MDa -	Megadalton
mg -	Miligrama
mL -	Mililitro
mM -	Milimolar
mm -	Milímetro
mm ² -	Milímetro quadrado
pH -	Potencial de hidrogeniônico

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	16
1	OBJETIVOS.....	39
1.1	Objetivos gerais.....	39
1.2	Objetivos específicos.....	39
2	ARTIGO 1 (PUBLICADO) - <i>EX VIVO</i> MODEL OF RABBIT INTESTINAL EPITHELIUM APPLIED TO THE STUDY OF COLONIZATION BY ENTEROAGGREGATIVE <i>ESCHERICHIA</i> <i>COLI</i>.....	40
3	ARTIGO 2 (PUBLICADO) - INTRACELLULAR PERSISTENCE OF ENTEROAGGREGATIVE <i>ESCHERICHIA COLI</i> INDUCES A PROINFLAMMATORY CYTOKINES SECRETION IN INTESTINAL EPITHELIAL T84 CELLS.....	45
4	ARTIGO 3 (A SUBMETER) - APOPTOSIS AND NECROSIS INDUCED BY ENTEROAGGREGATIVE <i>ESCHERICHIA COLI</i> INTERACTION WITH HUMAN INTESTINAL T84 CELLS.....	63
5	DISCUSSÃO.....	79
	CONCLUSÕES.....	86
	REFERÊNCIAS.....	87
	ANEXO - Comissão de ética para o cuidado e uso de animais experimentais.....	97

INTRODUÇÃO

Relevância

A síndrome diarreica representou 9% de todas as mortes entre crianças menores de cinco anos em todo o mundo no ano de 2015, o que resultou em mais de 1.400 mortes a cada dia ou cerca de meio milhão de óbitos de crianças por ano (UNICEF, 2017). Em todo o mundo, há quase 1,7 bilhão de casos de doença diarreica a cada ano, sendo a segunda principal causa de morte em crianças menores de cinco anos, levando a óbito anualmente cerca de 760 mil crianças (CHOWDHURY et al., 2015; YANG et al., 2017).

As doenças diarreicas são um grave problema de saúde pública e uma grande causa de morbidade e mortalidade em lactentes e crianças. Os países em desenvolvimento na Ásia, Oriente Médio, África e América Latina são as regiões mais afetadas tendo como desfecho óbitos relacionados principalmente às condições precárias de vida. No Irã, estima-se que ocorrem cerca de 2,5 milhões de mortes de crianças por ano (GUERRANT et al., 2015; GOMES et al., 2016; SALMANI et al., 2016; MIRI et al., 2017).

Escherichia coli enteroagregativa (EAEC) é um importante agente causador de diarreia aguda e persistente entre crianças e adultos em todo o mundo sendo o patótipo mais frequentemente detectado entre crianças de países em desenvolvimento e desenvolvidos. O estudo multicêntrico entérico global (GEMS) que compreendeu estudos de casos e controles de diarreia moderada à grave em quatro locais na África Subsaariana e três no sul da Ásia revelou que EAEC foi identificada em alta frequência entre crianças menores de cinco anos (IKUMAPAYI et al., 2017).

EAEC foi reconhecida como um importante agente bacteriano de doença diarreica aguda sendo identificada em crianças da América Latina, Ásia, África e leste da Europa mais frequentemente do que qualquer outro patógeno bacteriano. Nos Estados Unidos da América (EUA), Europa e Israel, EAEC também foi associada com doenças diarreicas em crianças, sendo nos EUA a causa bacteriana mais comum de diarreia infantil, superando *Campylobacter* e *Salmonella*. Ainda, EAEC foi o patógeno bacteriano mais prevalente em crianças hospitalizadas por diarreia aguda em regiões em desenvolvimento e industrializadas; ao passo que, entre adultos é mais prevalente em países industrializados. Nos departamentos

de emergência e clínicas ambulatoriais dos EUA, entre adultos com diarreia, EAEC foi a bactéria mais comumente identificada (ESTRADA-GARCIA et al., 2014).

Estudos epidemiológicos no mundo indicaram uma taxa de diarreia de aproximadamente 3,2 episódios por criança, estimando que 3 a 20% correspondam a diarreia persistente. Do ponto de vista da saúde pública, o impacto mais significativo da diarreia persistente por EAEC é sobre crianças de áreas menos desenvolvidas e com histórico de má nutrição. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou que 32% das crianças com menos de cinco anos de idade tem o desenvolvimento atrofiado em áreas empobrecidas, onde água e saneamento inadequados e cargas pesadas de infecções entéricas são comuns. Infelizmente, os déficits de crescimento linear que ocorrem no início da vida não são totalmente reversíveis e estes são um marcador de perda persistente de potencial humano. O colapso não só ocorre em crianças de países em desenvolvimento pobres, mas também naqueles que vivem em favelas de países de média renda (ESTRADA-GARCIA et al., 2014; PLATTS-MILLS et al., 2017; ROGAWSKI et al., 2017).

A maioria dos casos de surtos causados por *Escherichia coli* transmitidos por alimentos durante a última década foram atribuídos ao consumo de alimentos não cozidos contaminados por *E. coli* patogênica na fonte e durante o processo de preparação. O alimento inseguro microbiologicamente também apresenta grandes riscos econômicos, especialmente em um mundo globalizado. De acordo com o site da OMS, o surto *E. coli* O104:H4 causou uma perda de US\$ 1,3 bilhão para agricultores e indústrias da Alemanha e exigiu pagamentos de US\$ 236 milhões em ajuda de emergência para 22 Estados membros da União Europeia em 2011. A melhoria da qualidade do saneamento ambiental e da higiene pessoal pode ser a melhor maneira de prevenir a infecção por *E. coli* patogênica e os surtos relacionados à transmissão por alimentos (MARA et al., 2010; YANG et al., 2017).

Após os grandes surtos causados por alimentos envolvendo EAEC no Japão e na Europa, os sistemas de vigilância dos países desenvolvidos passaram a incluir a sua identificação na rotina diagnóstica. A alta prevalência de EAEC na diarreia infantil e o seu papel na diarreia persistente, inflamação intestinal e atrofia em crianças de países pobres e de países de média renda também apontam para a necessidade de estudos mais amplos desses micro-organismos. O principal obstáculo na identificação do seu mecanismo de patogênese é a heterogeneidade entre as cepas. Embora vários estudos tenham demonstrado que as cepas de EAEC estão associadas a desfechos clínicos desfavoráveis, a importância na saúde pública mundial continua a ser investigada (ESTRADA-GARCIA et al., 2014).

Escherichia coli

Desde a sua identificação em 1885 pelo pediatra alemão Theodor Escherich, *E. coli* tornou-se uma das espécies bacterianas mais exaustivamente estudadas. Quando comparadas a outros micro-organismos mais exigentes, suas cepas são fáceis de cultivar em laboratórios, são passíveis de manipulação genética e adquirem naturalmente elementos genéticos móveis, tornando a espécie notavelmente versátil e diversificada (CLEMENTS et al., 2012).

E. coli são classificadas como bacilos Gram-negativos, anaeróbicos facultativos, móveis e não formadores de esporos, pertencentes a família Enterobacteriaceae. Em sua maioria coexistem no trato gastrintestinal como simbiontes comensais inofensivos colonizando-o nas primeiras horas de vida. Durante o desenvolvimento continuam a ser os anaeróbios facultativos mais predominante dentro da microbiota do cólon do homem e dos animais endotérmicos, raramente causando doenças em indivíduos saudáveis (PHILIPSON; BASSAGANYA-RIERA; HONTECILLAS, 2013; GOMES et al., 2016).

Em determinadas circunstâncias, ocorre uma batalha no microbioma intestinal entre a microbiota normal e invasores microbianos que desenvolveram mecanismos patogênicos. Quando os patógenos se estabelecem, podem desencadear no hospedeiro desde infecções assintomáticas, infecções sintomáticas que podem alterar a barreira intestinal e funções da absorção até diarreia desidratante fatal, megacólon tóxico ou choque. As cepas de *E. coli* podem elicitar um leque de síndromes clínicas que incluem infecções intestinais e extra-intestinais (PAWLOWSKI; WARREN; GUERRANT, 2009; CLEMENTS et al., 2012; GOMES et al., 2016).

Síndrome diarreica

O trato gastrintestinal, com sua extensa superfície, representa um importante alvo para agentes patogênicos que, uma vez suplantando as condições adversas à sua colonização, desenvolverão um processo infeccioso que pode se traduzir em diarreia. A diarreia é o resultado da reversão do estado de absorção normal de água e de eletrólitos para a secreção desses elementos (TOMAR, 2001; YANG et al., 2017).

De acordo com a OMS, a diarreia é definida como a passagem de três ou mais fezes semissólidas ou líquidas por dia. Os agentes patogênicos que causam a doença diarreica são transmitidos principalmente pela via fecal-oral, através do consumo de alimentos e água contaminados (CLASEN et al., 2015; MIRI et al., 2017).

Os episódios de diarreia aguda ou persistente devido a infecções por *E. coli* diarreio gênicas (DEC) são um importante problema de saúde pública entre crianças e adultos nos países em desenvolvimento, devido à sua associação com a morbidade e a mortalidade de crianças menores de cinco anos (GOMES et al., 2016).

Diarreia aguda

A diarreia aguda é definida pelo aumento inesperado de evacuações de início abrupto e duração máxima de 14 dias, potencialmente autolimitada (WHO, 2010; SHEN et al., 2016). A administração oral de probióticos reduz em aproximadamente um dia a duração da doença diarreica aguda em crianças (FARTHING et al., 2013).

A diarreia infecciosa aguda é responsável por morbidade e mortalidade substanciais em todas as regiões do mundo e entre todas as idades, com mais de 2 milhões de óbitos ocorrendo a cada ano, particularmente entre crianças menores de cinco anos (SHEN et al., 2016).

Cada criança menor que cinco anos de idade experimenta em média 3 episódios anuais de diarreia aguda. Globalmente, nesta faixa etária, diarreia aguda é a segunda principal causa de morte (após pneumonia) e tanto a incidência quanto o risco de mortalidade por doenças diarreicas são maiores. Outras consequências diretas da diarreia em crianças incluem crescimento insuficiente, desnutrição e desenvolvimento cognitivo prejudicado em países de recursos limitados (FARTHING et al., 2013).

EAEC tem sido identificada como causa comum de doença diarreica aguda em crianças e adultos em unidades de internação e de emergência em todo os EUA (KAUR; CHAKRABORTI; ASEA, 2010; PHILIPSON; BASSAGANYA-RIERA; HONTECILLAS, 2013). Outros patógenos bacterianos importantes como causa de diarreia aguda incluem *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) e *Shigella* (PAWLOWSKI; WARREN; GUERRANT, 2009).

Recentemente, foi realizado em Shenzhen, na China, um estudo prospectivo de um ano quanto à etiologia da diarreia aguda em um hospital sentinela. A infecção bacteriana foi a principal causa de diarreia, superando a infecção viral e parasitária. Entre as bactérias, DEC, *Salmonella* sp. e *Campylobacter jejuni* foram os agentes mais frequentemente identificados (SHEN et al., 2016).

Diarreia persistente

A diarreia persistente é geralmente definida como a passagem de fezes amolecidas por mais de 2 semanas, com progressão para diarreia crônica a partir de 4 semanas. Há três causas de diarreia persistente ou crônica: infecção persistente; infecção recorrente, o que ocorre principalmente em regiões de recursos limitados com más condições higiênicas; e síndrome do intestino irritável pós-infecciosa (PI-IBS) após a eliminação do agente infeccioso. A morbidade à longo prazo, é devida provavelmente a má absorção de nutrientes essenciais causada pelo embotamento das vilosidades, ruptura do epitélio e inflamação da submucosa (PAWLOWSKI; WARREN; GUERRANT, 2009; DUPONT, 2016).

Nos países em desenvolvimento, os parasitas, principalmente os protozoários, são os agentes infecciosos comumente causadores da diarreia persistente; entre os patógenos bacterianos destacam-se, especialmente entre as crianças, *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e *E. coli* enteroagregativa (EAEC). Nos países desenvolvidos *Clostridium difficile* é reconhecido como uma causa de diarreia persistente. Outras bactérias patogênicas que causam a diarreia persistente incluem cepas dos gêneros *Shigella*, *Campylobacter* e *Salmonella*. Em pacientes imunocomprometidos, infecções por vírus e micobactérias atípicas também devem ser consideradas (PAWLOWSKI; WARREN; GUERRANT, 2009; DUPONT, 2016).

Patotipos

Com base na sua associação clínica, ensaios fenotípicos e fatores de virulência, tradicionalmente esses micro-organismos patogênicos são divididos em pelo menos seis categorias diferentes de DEC que têm sido associadas com diarreia e doença gastrointestinal

em humanos. São elas: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC) (CLEMENTS et al., 2012; ESTRADA-GARCIA et al., 2014; GOMES et al., 2016).

Recentemente dois outros patotipos foram propostos para inclusão de grupos emergentes expandindo a categoria de DEC para oito patotipos. *E. coli* aderente invasiva (AIEC) representa um grupo de isolados encontrados na mucosa ileal de pacientes com Doença de Crohn (CD), que não possuem os fatores de virulência clássicos encontrados em outros patotipos de *E. coli* que causam infecção diarreioagênica, mas está associada à doença inflamatória do intestino. *E. coli* enteroagregativa produtora de toxina Shiga (STEAEC) associada ao surto de *E. coli* que resultou em muitos casos de síndrome hemolítico-urêmica (HUS) na Alemanha em 2011 (ARENAS-HERNÁNDEZ; MARTÍNEZ-LAGUNA; TORRES, 2012; CLEMENTS et al., 2012; GOMES et al., 2016).

Além das infecções entéricas, as infecções por *E. coli* extra-intestinais patogênicas (ExPEC) acometem o homem e são principalmente do trato urinário (causada por *E. coli* uropatogênica, UPEC) e sépsis/meningite (meningite neonatal causada por *E. coli*, NMEC) (CLEMENTS et al., 2012).

***Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC)**

EAEC foi primeiramente descrita por Nataro e colaboradores, em 1987, a partir da identificação de cepas de *E. coli* oriundas de crianças chilenas apresentando diarreia. Essas cepas exibiam um padrão de aderência típico quando submetidas a ensaios de interação com células da linhagem HEp-2 (carcinoma de laringe humana). Desde então, EAEC é definida pela sua aderência agregativa (AA) ou fenótipo de "tijolos empilhados" em células HEp-2, enquanto na mucosa intestinal forma um biofilme com bactérias envoltas numa camada de muco espesso (CLEMENTS et al., 2012; ESTRADA-GARCIA et al., 2014).

Desde a sua descoberta, cientistas têm estudado a resposta do hospedeiro a EAEC com o objetivo de identificar os fatores patognomônicos implicados na formação da lesão no intestino e doenças entéricas relacionadas. Em uma meta-análise que utilizou toda a literatura publicada de 1987 a 2006, EAEC foi identificada como responsável por doenças diarreicas, entre muitas subpopulações diferentes em regiões em desenvolvimento e industrializadas do

mundo, sendo o agente causador de diarreia em crianças, adultos, indivíduos imunocomprometidos e viajantes (PHILIPSON; BASSAGANYA-RIERA; HONTECILLAS, 2013). O aumento alarmante da atenção a EAEC levou a sua inclusão em 2002 na lista da categoria B do Instituto Nacional de Saúde de organismos infecciosos de importância potencial como arma de bioterrorismo (HUANG et al., 2004).

EAEC promove estrategicamente uma resposta inflamatória na mucosa do intestino do hospedeiro independentemente da ausência ou presença de diarreia. A infiltração de células imunitárias inatas, o rompimento da barreira epitelial e o aumento da produção de muco explicam os sintomas mais comumente relatados como diarreia aquosa, com ou sem sangue e muco, dor abdominal, náuseas, febre e vômito. No entanto, a resposta inflamatória por vezes não é suficiente para facilitar a depuração de patógenos, resultando em danos prolongados ao tecido hospedeiro (PHILIPSON; BASSAGANYA-RIERA; HONTECILLAS, 2013; ESTRADA-GARCIA et al., 2014; GOMES et al., 2016). De fato, EAEC pode persistir subclínicamente facilitando um estado inflamatório crônico que pode prejudicar a absorção de nutrientes e o desenvolvimento da parede intestinal (OKHUYSEN; DUPONT, 2010). O local de colonização preferencial são o íleo terminal e o cólon. O tempo de incubação varia de 8 a 52 horas (HEBBELSTRUP JENSEN et al., 2014).

Fatores de virulência e Patogenia

Desde que os fatores de virulência são codificados majoritariamente em plasmídeos, bacteriófagos e ilhas de patogenicidade, os atributos patogênicos são facilmente transferidos para novas cepas emergentes, ratificando a ampla plasticidade genética e a heterogeneidade de EAEC (JAFARI; ASLANI; BOUZARI, 2013; PHILIPSON; BASSAGANYA-RIERA; HONTECILLAS, 2013; GOMES et al., 2016).

Estes micro-organismos desencadeiam a patogenia por uma complexa estratégia coordenada em múltiplos estágios. Esses estágios requerem fatores de colonização e adesão eficazes seguido de proteínas efetoras ou toxinas que podem ser secretadas para o meio ou injetadas na célula hospedeira. Como resultado, há a destruição das microvilosidades intestinais que culmina na secreção de água e diarreia (ARENAS-HERNÁNDEZ; MARTÍNEZ-LAGUNA; TORRES, 2012; CLEMENTS et al., 2012).

De acordo com os estudos epidemiológicos, o grande número de fatores de virulência e a combinação destes, fornece a variedade necessária para a ocorrência de doenças clínicas em sítios específicos. É plausível que a exposição do hospedeiro e a imunidade desempenhem um papel importante na sua patogenicidade. Atualmente, a natureza mosaica dos genomas de EAEC descritos até o presente momento parece ratificar que a patogenicidade seja muito dependente da condição do hospedeiro e do ambiente que o circunda (HEBBELSTRUP JENSEN et al., 2017).

Um modelo de três estágios é proposto para a patogênese de EAEC: (i) a adesão no padrão AA à mucosa intestinal é facilitada pelas adesinas sendo o primeiro passo na colonização bacteriana do intestino; (ii) uma vez aderida, células epiteliais são estimuladas a produzir uma camada de muco espesso acima dos enterócitos formando um biofilme; e (iii) secreção de enterotoxinas e citotoxinas putativas provocam uma intensa resposta inflamatória no hospedeiro (PHILIPSON; BASSAGANYA-RIERA; HONTECILLAS, 2013; HEBBELSTRUP JENSEN et al., 2014; GOMES et al., 2016; YANG et al., 2017).

Adesinas

Adesinas fimbriais e afimbriais são responsáveis pela AA, mas os genes que codificam para este fenômeno ocorrem em baixa prevalência, o que é indicativo de uma elevada diversidade de adesinas responsáveis pelo padrão característico. Um repertório em expansão de proteínas da membrana externa (OMP) não estruturais, que variam de 18-58 KDa, foram demonstradas em diferentes sorotipos isolados de EAEC que contribuem para a colonização, autoagregação e formação de biofilmes. A diversidade de perfis OMP observados demonstra a heterogeneidade de adesinas neste patotipo (MONTEIRO-NETO et al., 2003; JAFARI; ASLANI; BOUZARI, 2013).

As adesinas estruturais até agora identificadas em diferentes cepas EAEC são conhecidas coletivamente como fímbrias de aderência agregativa (AAFs) e são um componente importante para a patogênese de EAEC, auxiliando o micro-organismo na colonização do intestino (CHATTAWAY et al., 2013; HAVT et al., 2017). Cinco variantes da principal subunidade estrutural de AAF foram descritas: AggA (AAF/I), AafA (AAF/II), Agg3A (AAF/III), Agg4A (AAF/IV) e Agg5A (AAF/V). Os genes que codificam estas fímbrias estão localizados no plasmídeo de Aderência Agregativa (pAA) de 60-65 MDa e sua

biogênese emprega a via de secreção chaperona-Usher. Pertencentes à família de adesinas Afa/Dr, a estrutura AAF compreende uma subunidade principal (A) e uma subunidade putativa menor (B). (NATARO et al., 1992; CZEZULIN et al., 1997; BERNIER; GOUNON; LE BOUGUENEC, 2002; BOISEN et al., 2008; JONSSON et al., 2015; BOLL et al., 2017). Jonsson e colaboradores, em 2015, observaram que AAF/V apresenta um fenótipo aderente significativamente melhor que AAF/III, com o qual compartilha genes acessórios. Além disso, um pili de tipo IV cujo gene está localizado em um plasmídeo de grupo de incompatibilidade IncII é mostrado ser responsável pela AA de EAEC atípicas as células epiteliais e as superfícies abióticas (^aDUDLEY et al., 2006).

Recentemente, ^aJonsson e colaboradores, em 2017, otimizaram um ensaio da PCR multiplex AAF anteriormente descrito, com alvo para todas as fímbrias e testaram uma coleção dinamarquesa de 162 isolados clínicos de EAEC. Curiosamente, 3% das cepas abrigavam genes que codificavam duas das subunidades de pilina, *agg3A* e *agg5A*, codificados por um novo plasmídeo, pAA^{C700-09}, que abriga um conjunto de genes AAF/III completo e um agrupamento de genes AAF/V truncado. Além dos genes fimbriais, os isolados continham vários genes de virulência não encontrados no plasmídeo pAA previamente descrito.

As interações diretas entre EAEC e o epitélio intestinal são provavelmente restritas às superfícies apicais das células. As fímbrias ligam-se aos componentes da matriz extracelular (ECM) das células epiteliais intestinais, tais como laminina, colágeno IV, citoqueratina 8 e fibronectina. No entanto, uma vez que nenhum desses componentes está presente na superfície apical do epitélio saudável, outros receptores ainda não identificados provavelmente medeiam o contato bacteriano inicial. A autoagregação contribui para o padrão AA, onde a aderência a células epiteliais também envolve interações entre bactérias (HEBBELSTRUP JENSEN et al., 2014; YÁÑEZ et al., 2016; BOLL et al., 2017).

Estudos recentes abordando aspectos estruturais e funcionais de AAF/V demonstraram uma alteração estrutural de *Agg5A*, que torna a proteína deficiente na ligação à fibronectina, bem como a outras moléculas de ECM, sugerindo uma adaptação evolutiva a um receptor hospedeiro alternativo (^bJONSSON et al. 2017).

Como as duas variáveis de fímbria (AAF/III e AAF/V) têm diferentes especificações de ligação, as variantes podem ser favoravelmente expressas em ambientes específicos. Esta relação foi demonstrada para cepas uropatogênicas de *E. coli* e sua capacidade de alternar entre a expressão de fímbria de tipo 1 e de fímbria P ao colonizar o trato urinário inferior e superior, respectivamente (^aJONSSON et al., 2017).

A fim de promover a colonização e a difusão, EAEC secreta uma proteína de baixo peso molecular denominada dispersina (codificada pelo gene *aap*). A proteína de superfície hidrofóbica carregada positivamente se liga de forma não-covalente à superfície celular bacteriana neutralizando a carga negativa do lipopolissacarídeo (LPS) e permitindo a projeção das fímbrias (SHEIKH et al., 2002). Assim, a dispersina, translocada pelo sistema transportador antiagregante (AaT), auxilia nas propriedades de aderência e permite que as bactérias escapem das restrições do biofilme, diminuindo a autoagregação bacteriana e permitindo a sua dispersão ao longo da mucosa intestinal (JAFARI; ASLANI; BOUZARI, 2013; ESTRADA-GARCIA et al., 2014; HEBBELSTRUP JENSEN et al., 2014).

O regulador global *aggR*, codificado pelo grande plasmídeo de virulência (pAA), é de grande importância para propriedades de aderência e patogênese de EAEC, onde cepas que o possuem são conhecidas como EAEC típicas. O gene *aggR* é um ativador transcricional que promove a expressão de ambos fatores de virulência, cromossômicos e plasmidiais, incluindo AAFs e dispersina (HEBBELSTRUP JENSEN et al., 2014; YANG et al., 2017).

Toxinas

Após a etapa de adesão, há a produção de várias toxinas. Os efeitos citotóxicos de EAEC envolvem a secreção de SPATEs (*Serine Protease Autotransporters of the Enterobacteriaceae*), subgrupo de proteínas autotransportadas (ATs) via Sistema de Secreção Tipo V (SST5), que possuem o domínio serina protease conferindo a capacidade de clivar diferentes substratos. A família SPATE está organizada em duas classes filogeneticamente distintas: classe I, citotóxica a células epiteliais, incluem proteínas codificadas pelos genes *pet*, *sigA* e *sat*; e classe II, não citotóxica, variável em relação ao fenótipo, conferindo efeitos diversos. Esta classe inclui as proteínas codificadas pelos genes *pic* e protease extracelular de *Shigella* (*SepA*) (BOISEN et al., 2009; LIMA et al., 2013; HEBBELSTRUP JENSEN et al., 2014).

A toxina EAST1 (*EAEC heat-stable enterotoxin 1*) de 4,1 kDa codificada pelo gene *astA* localizado no plasmídeo pAA, não SPATE, detectada inicialmente em EAEC 17-2 e agora associada a outras cepas de DEC está relacionada com a diarreia induzida por enteropatógenos (MÉNARD; DUBREUIL, 2002). EAST1 se liga ao domínio extracelular da Guanilato Ciclastase (GC) na membrana apical do enterócito, induzindo altos níveis de produção

de GMPc dentro das células que inibem o sistema de transporte Na^+/Cl^- . A redução significativa da absorção de eletrólitos e água a partir do intestino nas pontas das vilosidades resulta em secreção elevada de água em células da cripta, o que sugere que a toxina promova a fase inicial de diarreia aquosa observada em muitos pacientes (TELLI et al., 2010).

A toxina Pet (*Plasmid encoded toxin*) de 104 kDa localizada no plasmídeo pAA, SPATE classe I, é uma proteína de alta toxicidade em células epiteliais humanas resultando em dano celular estrutural. Após internalização através de endocitose mediada por receptor, por meio de tráfico retrógrado, é entregue ao citoplasma hospedeiro, onde é clivada a proteína de ligação a actina, espectrina, interrompendo o citoesqueleto de actina e causando arredondamento e descolamento/destacamento celular (ESLAVA et al., 1998; NAVARRO-GARCÍA et al., 1999; ROCHA-RAMIREZ et al., 2016). Esta proteína é altamente imunogênica e ambos os isótopos de anticorpos IgG e IgM específicos para Pet têm sido detectados em crianças convalescentes (JAFARI; ASLANI; BOUZARI, 2013).

Sat, como o seu homólogo Pet, acredita-se que cliva a proteína intracelular espectrina e causa danos ao citoesqueleto de junções entre as células epiteliais intestinais. Da mesma forma, SigA, SPATE, em grande parte associada a patogênese de *Shigella flexneri* é capaz de induzir a degradação de alfa-fodrina causando alterações morfológicas em células. Curiosamente, embora moderadamente prevalente em EAEC, SepA é a SPATE mais fortemente associada com a doença diarreica grave, embora o seu papel na patogênese permanece não caracterizado (GUIGNOT et al., 2007; PHILIPSON; BASSAGANYA-RIERA; HONTECILLAS, 2013).

Ilhas de patogenicidade

Diferentes ilhas de patogenicidade (PAIs) foram identificadas em EAEC. Espécies de *Shigella* apresentam a ilha de patogenicidade *she* que é encontrada em algumas cepas EAEC codificando as SPATEs Pic e ShET1 (HEBBELSTRUP JENSEN et al., 2014). Pic (“Protein involved in colonization”) é uma proteína de 109,8 kDa localizada no cromossomo, SPATE classe II, e parece ter um papel central na colonização. Possuindo atividade mucinolítica e hemaglutinante é capaz de penetrar a camada de muco intestinal e, eventualmente, promover o crescimento de EAEC, a partir da utilização de nutrientes de mucina (HENDERSON et al., 1999; HARRINGTON et al., 2009). Além de induzir a hipersecreção de muco intestinal com aumento do número de células caliciformes também é imunogênica (CLEMENTS et al.,

2012; JAFARI; ASLANI; BOUZARI, 2013). Recentemente, foi descoberto que Pic medeia a evasão imunológica através da clivagem direta das proteínas do complemento, reduzindo significativamente sua ativação pelas três vias (clássica, da lectina e alternativa), favorecendo a invasão e aumentando a gravidade dos distúrbios causados por EAEC (ABREU et al., 2015; HAVT et al., 2017).

A toxina ShET 1 (“*Shigella* enterotoxin 1”) é membro da família de toxinas AB₅, consistindo de uma única proteína SetA de 22 kDa associada a um pentâmero de cinco subunidades B de 7 kDa, que parece induzir a secreção intestinal através de AMPc e GMPc, porém muito da bioquímica e do mecanismo de ação ainda são desconhecidos (JAFARI; ASLANI; BOUZARI, 2013; PHILIPSON; BASSAGANYA-RIERA; HONTECILLAS, 2013).

Dois ilhas de patogenicidade associadas a ExPEC, a ilha de alta patogenicidade de *Yersinia* e a ilha de patogenicidade *hly* também foram encontradas em isolados de EAEC (HEBBELSTRUP JENSEN et al., 2014). Na primeira, um gene de sideróforo, *irp2*, codifica uma proteína necessária a biossíntese de Yersiniabactina, relacionada à captação de ferro (SCHUBERT et al. 1998; CZEZULIN et al. 1999). Em EAEC, *irp2* foi associado à produção de biofilme (MOHAMED et al., 2007). Na segunda, o gene *hlyE*, codifica uma proteína hemolítica de 34 KDa, identificada pela primeira vez em *E. coli* K-12, e detectada no genoma de EAEC O42 (CHAUDHURI et al., 2010). A oligomerização da proteína configura uma toxina formadora de poros, causando efeitos citolíticos e citopáticos nas células cultivadas (JAFARI; ASLANI; BOUZARI, 2013).

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 (SST6) 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).

Biofilme

A formação de biofilmes em superfícies bióticas e abióticas é um fenótipo multifatorial em EAEC (JAFARI; ASLANI; BOUZARI, 2013). A capacidade de formar

biofilme está intimamente relacionada a persistência bacteriana e muitas infecções crônicas estão associadas a produção de biofilme (TELLI et al., 2010). Para melhorar a colonização, EAEC cerca-se com células de biofilme e recruta células bacterianas formando micro colônias intercaladas dentro de canais cheios de líquido, permitindo que as bactérias evadam o sistema imune local e evitando o transporte de fatores antibacterianos, incluindo antimicrobianos (PHILIPSON; BASSAGANYA-RIERA; HONTECILLAS, 2013; HEBBELSTRUP JENSEN et al., 2014).

Quando o intestino é colonizado por EAEC, há secreção de muco excessiva seguida pela formação de biofilme. A formação do biofilme é uma importante característica de sua patogenicidade e se dá principalmente no cólon; no entanto, a formação de biofilme no intestino delgado também foi relatada (HICKS; CANDY; PHILLIPS, 1996). Por isso, tem sido proposto que as alterações celulares no hospedeiro durante a infecção por EAEC resulte em anomalias digestivas da absorção causadas pelas bactérias formadoras de biofilme, prolongando a diarreia (ARENAS-HERNÁNDEZ; MARTÍNEZ-LAGUNA; TORRES, 2012).

Em vários estudos, a expressão de AAF demonstrou ser essencial para a formação de biofilme. Outros fatores envolvidos na formação de biofilme incluem o gene *shf* associado a produção de biofilme em EAEC 042. Ainda são de importância na formação de biofilme os genes *yafK* e *fis*, provavelmente devido ao seu envolvimento na regulação da expressão de AAF. Além disso, em estudos epidemiológicos, o gene *aatA* localizado no plasmídeo, que codifica o transportador de dispersina; o gene *set1A*; e o gene *aggR* têm sido associados com a formação de biofilme (HEBBELSTRUP JENSEN et al., 2014; HEBBELSTRUP JENSEN et al., 2017).

Epidemiologia

O reservatório de EAEC ainda não foi determinado, embora a maior prevalência em humanos e pacientes saudáveis sugira que seja o homem (OUNDO et al., 2008; WANG et al., 2017). Estudos recentes demonstraram que EAEC foi raramente isolada de fontes animais e não há dados conclusivos apontando que os animais são reservatórios potenciais ou hospedeiros acidentais devido ao contato próximo com seres humanos (PUÑO-SARMIENTO et al., 2013; GOMES et al., 2016; WANG et al., 2017).

Recentemente, um estudo sobre a colonização de EAEC e STEC (ou EHEC) em galinhas e humanos no sul do Vietnã, dada o grande grau de sobreposição entre os ambientes agrícolas e domésticos das fazendas de "quintal", concluiu que a população humana é o reservatório mais provável dos genes *aggR* e *stx* (Toxina Shiga) transportados por *E. coli* do que a população de frango, ratificando que o homem seja provavelmente o reservatório principal de EAEC no cenário estudado (TRUNG et al., 2016).

A transmissão de EAEC é frequentemente descrita como sendo de origem alimentar ou através da água contaminada, e acredita-se ser transmitida pela via fecal-oral (JIANG et al., 2002; GOMES et al., 2016). Um estudo investigou a sobrevivência de EAEC na água potável, onde bactérias foram adicionadas a diferentes fontes de água mineral. Sua viabilidade foi mantida por até 60 dias a temperaturas normais de armazenamento. A sobrevivência das bactérias foi prolongada em água mineral em comparação com água de nascente, sugerindo que as maiores quantidades de Ca^{+2} e Mg^{+2} em água mineral, induziram competência genética (VASUDEVAN et al., 2003). EAEC também foi detectada na água da superfície de riachos, rios e drenos em Brisbane, na Austrália (SIDHU et al., 2013) e em amostras de água de locais aquáticos em Bangladesh (AKTER et al., 2013).

Outra possível rota de transmissão de EAEC são os alimentos contaminados e sua manipulação. No México, EAEC é o agente patogênico mais comum isolado a partir de alimentos (KOO et al., 2008). Uma pesquisa identificou manipuladores de alimentos, especialmente em hotéis turísticos, como portadores primários de EAEC e mais de 65% dos isolados foram resistentes a múltiplas drogas, o que representa uma ameaça significativa a saúde pública (OUNDO et al., 2008). Ainda, a falta de saneamento, condições de superlotação e instituições como creches aumentam a propensão de EAEC se disseminar pelo contato direto pessoa a pessoa devido à má higiene (PAWLOWSKI; WARREN; GUERRANT, 2009; PHILIPSON; BASSAGANYA-RIERA; HONTECILLAS, 2013).

Os estudos sobre a etiologia da diarreia infantil nos países em desenvolvimento revelaram que EAEC é altamente prevalente, inclusive no Brasil (HICKS; CANDY; PHILLIPS, 1996; STEINER et al., 1998; LIMA et al., 2013; HAVT et al., 2017). EAEC foi detectada pelo ensaio de células HEp-2 e pela sonda AA em crianças de uma favela urbana brasileira. As crianças EAEC-positivas tiveram retardo de crescimento e aumento dos níveis de marcadores fecais da inflamação independente das manifestações clínicas (STEINER et al., 1998). Em outro estudo, em Mali, com crianças entre 0 a 59 meses EAEC apresentou alta taxa de portadores assintomáticos. Após 1 ano de vigilância, EAEC foi encontrada como a única DEC em 60 crianças com diarreia e 61 sem diarreia (BOISEN et al., 2012).

A prevalência de EAEC na etiologia de episódios diarreicos nos países industrializados é elevada. EAEC foi detectada como o terceiro micro-organismo mais isolado em crianças com diarreia (2%), depois de *Salmonella* (13,4%) e EHEC (3,1%). Em um estudo nacional de vigilância conduzido de 1993-1996 e de 2008-2009 no Reino Unido, aproximadamente 3,3% das doenças infecciosas intestinais foram associadas a EAEC a partir da amplificação quantitativa pela PCR de um produto correspondente à sonda CVD432 (CHATTAWAY et al., 2013).

A diarreia também tem sido sugerida como uma importante causa de morbidade nos indivíduos imunocomprometidos. Um estudo suíço conduzido entre 1996 e 1998 investigou a doença diarreica relacionada com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), onde EAEC foi detectada pelo ensaio de células HeLa, sonda CVD432 e iniciadores da PCR complementares à sonda. Dos 7 pacientes HIV⁺ que apresentaram diarreia, 4 sofreram diarreia persistente ou crônica intermitente (DURRER et al., 2000). Em estudo realizado no Senegal, EAEC foi detectada por PCR correspondente à sonda CVD432 em 19,6% dos 158 pacientes infectados pelo HIV com diarreia e em 1,8% dos 160 pacientes infectados pelo HIV sem diarreia. Nesse estudo, EAEC foi definida como um patógeno oportunista (GASSAMA-SOW et al., 2004).

A diarreia do viajante é definida como a presença de três ou mais fezes de pouca consistência a líquida em 24 horas, além de apresentar pelo menos um dos seguintes sintomas: dor abdominal tipo cólica, tenesmo, náuseas, vômitos e febre. Está associada principalmente em viajantes de países com alto nível socioeconômico que viajam por diferentes razões para países de baixa ou média renda (VILA et al., 2016).

EAEC é a segunda causa mais comum de diarreia dos viajantes após ETEC e sua prevalência em endemia e epidemia está se tornando bem reconhecida (CLEMENTS et al., 2012; HEBBELSTRUP JENSEN et al., 2014; VILA et al., 2016). A maioria dos doentes têm doença autolimitada, porém pode ser incapacitante até 24-48 horas impactando negativamente os planos de viagem. Apesar de menos de 1% necessitar hospitalização, estudos demonstram que complicações entéricas e extra-intestinais de longo prazo não são descartadas, onde 4-11% desenvolvem PI-IBS. Destino é o fator de risco mais importante para o desenvolvimento de diarreia do viajante. As regiões com maior risco são África, sul da Ásia, América Latina e Oriente Médio. Fatores de risco adicionais incluem idade, imunossupressão, susceptibilidade genética, antecedentes de patologia gástrica e de doença inflamatória intestinal (YATES, 2005; PAWLOWSKI; WARREN; GUERRANT, 2009; VILA et al., 2016; TRIBBLE, 2017).

Inúmeros surtos de gastroenterite ligados a EAEC têm sido relatados. Em uma enfermaria do berçário neonatal sérvio, EAEC foi detectada em 12 dos 19 bebês pelo ensaio de células HEp-2 e caracterizada como pertencente ao sorogrupo O4 (COBELJIC' et al., 1996). Um dos maiores surtos relatados de EAEC, além do surto alemão de 2011, ocorreu na prefeitura de Gifu, Tajimi, Japão onde 2.697 crianças desenvolveram sinais de intoxicação alimentar após consumir merenda em 16 escolas. Espécimes fecais foram recolhidas a partir de 30 crianças com diarreia severa prolongada, e 12 deram positivo para EAEC pelo ensaio de células HEp-2 e pela PCR para o gene *astA*; todas as cepas foram O não tipáveis:H10 (ITOH et al., 1997).

Em maio de 2011 na Alemanha, um grande surto de origem alimentar de *E. coli* a partir de brotos de feijão foi causado por uma cepa EAEC O104:H4 que tinha adquirido fenótipos típicos de EHEC, principalmente a produção de toxina Shiga (Stx2). A infecção com STEAEC O104:H4 resultou em alta percentagem de pacientes que desenvolveram HUS e uma taxa de mortalidade de 1%; 852 casos de HUS, resultando em 32 mortes e 3469 casos de não HUS-STEAEAC, resultando em 18 mortes (CLEMENTS et al., 2012; YANG et al., 2017).

Em junho de 2013 em Incheon, Coréia do Sul, ocorreu um surto de origem alimentar, onde EAEC foi isolada das fezes de estudantes e de um item alimentar (troteiros fritos misturados com vegetais) servido na cafeteria da escola, contaminados por alguns manipuladores de alimentos assintomáticos carregando EAEC. Este estudo caso-controle destaca e reforça a importância da preparação segura de alimentos (SHIN et al., 2015).

Surtos de infecção do trato urinário (UTI) associados a EAEC também já foram descritos na literatura. Em um estudo dinamarquês, uma cepa EAEC que também possuía genes de ExPEC promoveu um surto em Copenhaga onde 18 pacientes que sofriam de UTI estavam infectados por cepas do mesmo sorotipo O78:H10 e grupo filogenético (grupo A) (OLESEN et al., 2012). Em outro caso, uma mulher imunocomprometida apresentou infecção mista por EAEC e EPEC causando UTI e bacteremia. Embora conhecida por ocasionalmente causar UTI, EAEC não tinha sido anteriormente associada à sepse. Isso indica que os fatores de virulência associados a EAEC incrementam seu potencial para infecções extraintestinais (HERZOG; ENGELER DUSEL; HUGENTOBLER, 2014).

Diagnóstico

O diagnóstico pela sorotipagem de cepas EAEC é inadequado devido a ampla diversidade entre as cepas e o grande número de cepas "rugosas", que não expressam um antígeno O (REGUA-MANGIA et al., 2009). Além disso, a autoaglutinação causada pelo fenótipo agregativo é outro obstáculo para a sorotipagem, levando a um grande número de cepas não tipificáveis (SHEIKH et al., 2002; BOISEN et al., 2012). A sorotipagem e a tipagem filogenética de EAEC têm, portanto, relevância apenas em casos associados a surto devido à considerável diversidade genética observada entre as cepas (COBELJIC' et al., 1996; OLESEN et al., 2012; HEBBELSTRUP JENSEN et al., 2016).

O padrão AA está associado ao grande plasmídeo de 60-65 MDa que carrega diversos fatores de virulência, incluindo as AAFs e toxinas. Uma sonda de DNA denominada CVD432 (ou sonda AA) foi construída a partir do plasmídeo pAA para a detecção de EAEC por hibridização de DNA. A especificidade da sonda foi reportada como elevada, mas com diferentes sensibilidades em comparação com o ensaio de células HEP-2 (BAUDRY et al., 1990).

O padrão-ouro para a identificação de EAEC é o ensaio de aderência em células HEP-2. Entretanto esse ensaio apresenta algumas limitações: é um teste caro, requer pessoal bem treinado, é realizado apenas em laboratórios de cultivo celular e não distingue cepas patogênicas e não patogênicas (NATARO et al., 1987; HUANG et al., 2006; ESTRADA-GARCIA et al., 2014; HEBBELSTRUP JENSEN et al., 2017). O ensaio de aderência permite a classificação de EAEC em padrão AA típico ou atípico, dependendo da presença ou ausência do regulador *aggR*, respectivamente (JAFARI; ASLANI; BOUZARI, 2013; GOMES et al., 2016; HEBBELSTRUP JENSEN et al., 2017). Ensaio para quantificar a formação de biofilme também foram sugeridos como possível método de triagem para EAEC patogênicas (BANGAR; MAMATHA, 2008).

Técnicas moleculares têm sido desenvolvidas para detectar EAEC como a amplificação pela PCR de genes específicos associados à virulência (SCHMIDT et al. 1995) e a avaliação pela PCR multiplex que detecta três genes de origem plasmidial: *aggR*, *aap* e *aatA* (CORDEIRO et al., 2008). No entanto, nenhum ensaio molecular foi descrito com 100% de especificidade. A heterogeneidade genética e a virulência multifatorial de EAEC torna desafiador a diferenciação entre cepas patogênicas e não patogênicas (PHILIPSON;

BASSAGANYA-RIERA; HONTECILLAS, 2013; HEBBELSTRUP JENSEN et al., 2014; GOMES et al., 2016).

Recentemente, uma PCR multiplex foi baseada em dois genes codificados no plasmídeo e dois genes cromossômicos para aumentar a capacidade de detectar cepas EAEC típicas e atípicas. Os genes *aggR* e *aatA* e os genes *aaiA* e *aaiG* utilizados no ensaio de detecção demonstraram 94,8% de sensibilidade e 94,3% de especificidade, e o ensaio foi capaz de detectar eficazmente ambos os grupos entre *E. coli* isolados de culturas de fezes (ANDRADE; GOMES; ELIAS, 2014).

Atualmente a coleta cuidadosa do histórico do paciente e testes simples, como a análise de leucócitos fecais ou marcadores inflamatórios são utilizados no diagnóstico e seleção de terapia. O desafio atual é identificar os principais genes de virulência que definem as cepas de EAEC típicas associadas à doença e à inflamação intestinal. (PAWLOWSKI; WARREN; GUERRANT, 2009; ESTRADA-GARCIA et al., 2014).

Aderência, internalização e persistência intracelular

Uma etapa essencial da patogênese de quase todos os patógenos entéricos é a colonização da mucosa gastrintestinal, que é mediada por fatores específicos de aderência. O conhecimento dos estágios de patogenicidade foi obtido a partir de estudos de culturas celulares *in vitro*, modelos animais e pacientes infectados por EAEC (ESTRADA-GARCIA et al., 2014; HEBBELSTRUP JENSEN et al., 2014).

A morfologia das linhagens intestinais é caracterizada pela presença de microvilosidades apicais e junções intercelulares (MURAKAMI; MASUI, 1980). As células Caco-2 (linhagem celular de adenocarcinoma colo-retal humano) expressam enzimas da borda em escova, fenotipicamente próximas as células epiteliais do intestino delgado; as células T84 (linhagem celular de carcinoma de cólon humano) são fenotipicamente similares a células colônicas (NATARO et al., 1996). Em EAEC, células T84 polarizadas têm sido utilizadas como modelo mais favorável para adesão e mediação do dano ao tecido por citotoxinas (OKEKE; NATARO, 2001).

Do mesmo modo, experimentos de cultura de órgão *in vitro* (IVOC), *in vivo* e *ex vivo* indicam fortemente que EAEC pode aderir ao epitélio jejunal, ileal e colônico no padrão agregativo característico, formando biofilme forte em camada de muco, seguido de efeitos

citotóxicos e pró-inflamatórios. Os fragmentos do íleo terminal e do cólon excisado de pacientes pediátricos e adultos foram incubados com cepas de EAEC capazes de colonizar a mucosa ileal e colônica no padrão típico de “tijolos empilhados” sobre uma camada de muco espessa (ANDRADE; FREYMÜLLER; FAGUNDES-NETO, 2011; GOMES et al., 2016).

A internalização de bactérias é uma estratégia de escape do sistema imunológico do hospedeiro, permitindo a multiplicação e/ou disseminação de uma célula para outra. Esta característica pode contribuir para inflamação da mucosa e aumento da persistência do micro-organismo no epitélio prolongando a doença diarreica (SUZUKI; SASAKAWA, 2001).

Em cultura de células foi detectada a internalização de EAEC, onde bactérias foram encontradas no interior de células HeLa (linhagem celular de carcinoma de cérvix uterino humano) (BENJAMIN; FEDERMAN; WANKE, 1995), Caco-2 (WEINTRAB, 2007) e T84 (NATARO et al., 1996; ABE et al., 2001) resultando em vacuolização, destruição de microvilosidades, perda do conteúdo citoplasmático com desorganização dos tapetes celulares. Ainda, na mucosa colônica humana a cepa EAEC 236 (O111:H12) mostrou-se capaz de invadir células epiteliais e destruir o tecido favorecendo a penetração e a invasão de células presentes na submucosa (ABE et al., 2001).

Ainda, a sobrevivência de EAEC dentro de células eucarióticas, como os enterócitos, pode facilitar sua persistência na mucosa infectada, apesar da terapia antimicrobiana adequada. Estudo realizado em nosso laboratório comprovou que cepas EAEC internalizadas pelas células T84 permaneceram viáveis por até 72 horas de tratamento contínuo com amicacina. Esta característica pode representar o estabelecimento de um reservatório para a colonização persistente e, conseqüentemente, para a doença diarreica persistente causada por EAEC (PEREIRA et al., 2008).

Inflamação e produção de citocinas

Compreender as complexas interações patógeno-hospedeiro é crucial para revelar a dinâmica de doenças infecciosas. O epitélio intestinal é constantemente exposto a diferentes micro-organismos e enfrenta o desafio de coexistir pacificamente com bactérias comensais inofensivas, enquanto rapidamente responde a patógenos. A capacidade de resistir a colonização bacteriana ou a infecção é determinada por interações celulares e moleculares cuidadosamente arranjadas entre hospedeiro e patógeno na interface mucosa. A barreira

epitelial fornece a primeira linha de defesa contra micro-organismos patogênicos. Se um patógeno entérico atravessa as camadas de muco chegando à lâmina própria, padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) conservados evolutivamente expressos nas superfícies microbianas são reconhecidos pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) expressos nas superfícies basolaterais de células epiteliais intestinais (IECs), tais como os receptores Toll-Like (TLRs) (PHILIPSON; BASSAGANYA-RIERA; HONTECILLAS, 2013; YU; GAO, 2015).

Os TLRs são expressos por uma variedade de células, incluindo IECs polarizadas, onde TLR2, 4 e 5 estão localizados na membrana plasmática basolateral. Entretanto, TLR2 e 4 também foram encontrados na superfície apical de células T84 polarizadas. Sob condições homeostáticas, IEC mostra baixa expressão de TLR2 e TLR4, não respondendo aos estímulos de TLR. No entanto, em condições inflamatórias, a expressão epitelial de TLR é aumentada, o que contribui tanto para a inflamação assim como para a tolerância imunológica (KIVIT et al., 2014; YU; GAO, 2015).

Os TLRs ativam potentes respostas inatas desencadeando as vias de sinalização que regulam a transcrição de genes, levando à produção de um repertório de mediadores pró inflamatórios para orquestrar o influxo de leucócitos. Mais especificamente, a secreção de IL-8 e CXCL1 por enterócitos gera um gradiente quimiotático promovendo o recrutamento dos neutrófilos para facilitar a depuração de bactérias por meio de fagocitose. Em adição, células epiteliais produzem potentes proteínas antimicrobianas, como beta-defensinas, catelicidinas e calprotectina em resposta à estimulação de patógenos entéricos ou citocinas pró inflamatórias, as quais contribuem para a defesa contra uma infecção. Os esforços combinados das respostas imune inata e adaptativa com a influência benéfica da microbiota gastrintestinal, geralmente, contribuem para o sucesso da erradicação da doença em indivíduos saudáveis (PHILIPSON; BASSAGANYA-RIERA; HONTECILLAS, 2013).

EAEC induz a produção de IL-8 pelas células do epitélio intestinal, levando ao recrutamento e transmigração de neutrófilos, causando danos à mucosa intestinal que podem promover a colonização bacteriana. Tanto a produção de citocinas como a transmigração de neutrófilos contribuem para a patogênese de EAEC e são uma marca registrada da diarreia infecciosa inflamatória (ESTRADA-GARCIA et al., 2014).

A diarreia é o resultado de uma complexa interação patógeno-hospedeiro. Curiosamente, quase simultânea à adesão, EAEC induz uma resposta inflamatória inicial à infecção, dependente do sistema imune inato do hospedeiro e das características da cepa. A IL-8 é uma citocina responsável pela quimioatração e recrutamento de neutrófilos no local da

infecção, sendo um marcador amplamente usado para avaliação da resposta inflamatória induzida por agentes patogênicos (YÁÑEZ et al., 2016). A presença de vários fatores de virulência como flagelina, AggR, AAFs e dispersina correlaciona-se com níveis elevados de citocinas fecais, como interleucina (IL) -1ra, IL-1 β , IL-8, IFN- γ e marcadores inflamatórios que incluem lactoferrina, leucócitos fecais e sangue oculto. A interação da cepa protótipo EAEC 042 em Caco-2, induziu a produção de citocinas pró inflamatórias como a IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α ; e IL-10, uma citocina anti-inflamatória reguladora (ESTRADA-GARCIA et al., 2014).

Ainda, EAEC secreta duas toxinas Pet e Pic, ambas pertencentes à família SPATE. Enquanto Pet é um fator quimioatraente de células mononucleares, Pic tem a capacidade de diminuir a quimiotaxia e a transmigração de leucócitos. A expressão de duas moléculas com efeitos antagônicos pela mesma bactéria confirma a capacidade de alguns micro-organismos permanecerem no hospedeiro usando diferentes estratégias de sobrevivência (ROCHA-RAMIREZ et al., 2016).

Recentemente, Boll e colaboradores, em 2017, observaram que as mucinas transmembranares são receptores para as adesinas AAF de EAEC no epitélio intestinal. MUC1 é uma mucina transmembranar expressa pelos tecidos epiteliais glandulares humanos e em todo o trato gastrintestinal em baixos níveis. Este achado sugere que MUC1 desempenha um papel único e crítico na mediação das respostas inflamatórias do hospedeiro à EAEC e pode atuar como um sensor de infecção bacteriana que recruta células hospedeiras para montagem de uma resposta inflamatória.

Em um estudo recente da resposta imune, GUPTA e colaboradores, em 2016, avaliaram a interação de EAEC em biópsias mucosas duodenais de crianças usando o modelo de IVOC, mimetizando condições *in vivo*. A infecção com EAEC mostrou uma regulação positiva da expressão de IL-8, IL-1 β , IL-6, TNF- α e TLR-5 em comparação ao controle.

Apoptose e necrose celular

De modo a colonizar o hospedeiro, bactérias devem exibir a capacidade de aderir às células epiteliais, componente integrante do sistema imune das mucosas. Além disso, a internalização bacteriana pode conduzir à libertação de moléculas associadas a patógenos

ativando receptores de reconhecimento inatos e, por conseguinte, a indução de respostas imunes inatas (NIEMANN; SCHUBERT; HEINZ, 2004; CAMPODÓNICO et al., 2008).

A capacidade de bactérias aderir e invadir as células hospedeiras e induzir apoptose ou necrose sugerem que estes mecanismos podem ser considerados fatores contribuintes para o desenvolvimento da doença por micro-organismos invasores. Espécies de diversos gêneros da família Enterobacteriaceae desencadeiam a morte celular das células do hospedeiro após a invasão bacteriana. A apoptose e a necrose constituem os principais mecanismos de morte celular programada do hospedeiro. Cada tipo de morte é caracterizado por alterações morfológicas particulares e vias de sinalização moleculares distintas (COSTA et al., 2011).

A apoptose, também denominada morte celular programada, está comumente envolvida na infecção bacteriana e na patogênese. Durante a infecção bacteriana, fatores de virulência produzidos e secretados a partir de agentes patogênicos desencadeiam sinais apoptóticos. Em geral, células sofrem apoptose através de duas vias principais, a via extrínseca ou a via intrínseca (LIN et al., 2010; LAI et al., 2015).

A apoptose extrínseca é a morte celular via receptor de morte que são receptores da superfície celular que pertencem a superfamília do fator de necrose tumoral (TNF) e interagem com seus ligantes para formar complexos de receptor de morte. Em diversas enterobactérias proteínas distintas servem como FasL (Fas Ligante). A apoptose intrínseca é um mecanismo de controle centralizado na via mitocondrial mediado por permeabilização da membrana mitocondrial externa (MOMP). Ambas as vias são dependentes de caspases. Enterotoxinas, invasão e endocitose de agentes patogênicos inteiros dentro das células infectadas causam sinalização apoptótica por ambas as vias (LIN et al., 2010; LAI et al., 2015).

A necrose é causada por fatores extracelulares e intracelulares, como infecções bacterianas e virais, toxinas ou traumatismo. Moléculas intracelulares como espécies reativas de oxigênio (ROS), Ca^{+2} , calpains, catepsinas, fosfolipases e ceramida estão envolvidas. Caracterizada por alterações fisiopatológicas graves, incluindo inchaço mitocondrial, perda de integridade da membrana plasmática, vazamento dos conteúdos celulares e falta de características apoptóticas típicas, como clivagem do DNA e condensação nuclear, a necrose é independente de caspases. Sob condições de apoptose deficiente, a estimulação com FasL ou TNF- α induz a morte celular com características morfológicas de necrose. Além da via de receptor de morte, a sinalização de receptores de reconhecimento de patógenos como TLR (TLRs 3 e 4) e danos extensos ao DNA podem levar à morte celular por necrose (LIN et al., 2010; LAI et al., 2015).

Justificativa

Entender as interações patógeno-hospedeiro é um desafio constante na compreensão da dinâmica de doenças infecciosas, principalmente quando se trata de uma categoria de DEC completamente heterogênea, como EAEC. Como ponto central, o mecanismo de patogenicidade de EAEC ainda parcialmente elucidado, justifica o estudo das etapas envolvidas na produção da doença diarreica.

O estudo aborda etapas importantes da patogênese de EAEC desde a sua aderência ao epitélio intestinal, sua persistência intracelular nos enterócitos até a etapa que culmina numa resposta inflamatória decorrente da ação das proteínas ejetadas pelo micro-organismo na célula hospedeira, assim como pelas citocinas produzidas pelas células intestinais como arsenal de defesa inata para debelar a infecção, gerando ainda mais inflamação tecidual. Somam-se ainda estudos visando compreender os mecanismos de morte celular programada, como a apoptose e a necrose, que pode ao mesmo tempo favorecer a disseminação de micro-organismos de célula a célula, como também eliminar o patógeno a partir da destruição da célula infectada.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivos gerais

Estudar mecanismos celulares, ultraestruturais e inflamatórios envolvidos na patogênese de cepas de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) invasoras em células intestinais *in vitro* e *ex vivo*.

1.2 Objetivos específicos

- a) Analisar a etapa de aderência pela interação de EAEC com epitélio intestinal de coelho *ex vivo* cultivado *in vitro* (IVOC);
- b) Analisar a persistência intracelular pela interação de EAEC com células intestinais T84;
- c) Avaliar a produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias pela interação de EAEC com células intestinais T84;
- d) Avaliar a produção de óxido nítrico (NO) pela interação de EAEC com células intestinais T84;
- e) Avaliar a possível indução de apoptose e/ou necrose pela interação de EAEC com células intestinais T84.

2 ARTIGO 1 (PUBLICADO) - EX VIVO MODEL OF RABBIT INTESTINAL EPITHELIUM APPLIED TO THE STUDY OF COLONIZATION BY ENTEROAGGREGATIVE *ESCHERICHIA COLI*

ORIGINAL ARTICLE

AG-2016-95

dx.doi.org/10.1590/S0004-2803.20170000-12

Ex vivo model of rabbit intestinal epithelium applied to the study of colonization by enteroaggregative *Escherichia coli*

Ricardo Luís Lopes BRAGA, Ana Cláudia Machado PEREIRA, Paula Azevedo dos SANTOS, Angela Corrêa FREITAS-ALMEIDA and Ana Cláudia de Paula ROSA

Received 7/10/2016
Accepted 11/11/2016

ABSTRACT – Background – The diarrheal syndrome is considered a serious public health problem all over the world and is considered a major cause of morbidity and mortality in developing countries. The high incidence of enteroaggregative *Escherichia coli* in diarrheal syndromes classified as an emerging pathogen of gastrointestinal infections. After decades of study, your pathogenesis remains uncertain and has been investigated mainly using *in vitro* models of adhesion in cellular lines. **Objective** – The present study investigated the interaction of enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from childhood diarrhea with rabbit ileal and colonic mucosa *ex vivo*, using the *in vitro* organ culture model. **Methods** – The *in vitro* adhesion assays using cultured tissue were performed with the strains co-incubated with intestinal fragments of ileum and colon over a period of 6 hours. Each strain was tested with three intestinal fragments for each region. The fragments were analysed by scanning electron microscopy. **Results** – Through scanning electron microscopy we observed that all strains adhered to rabbit ileal and colonic mucosa, with the typical aggregative adherence pattern of “stacked bricks” on the epithelium. However, the highest degree of adherence was observed on colonic mucosa. Threadlike structures were found in greater numbers in the ileum compared to the colon. **Conclusion** – These data showed that enteroaggregative *Escherichia coli* may have a high tropism for the human colon, which was ratified by the higher degree of adherence on the rabbit colonic mucosa. Finally, data indicated that *in vitro* organ culture of intestinal mucosa from rabbit may be used to elucidate the enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis.

HEADINGS – *Escherichia coli*. Intestinal mucosa, ultrastructure. Organ culture techniques. Rabbits. Scanning electron microscopy.

INTRODUCTION

EAEC is an emerging diarrheal pathotype described in the diarrheagenic *E. coli* group (DEC) and has been characterized by the aggregative adherence (AA) pattern where bacteria adhered to the HEP-2 cells (line derived from human laryngeal carcinoma) in a similar arrangement of “stacked bricks”⁽¹⁷⁾.

Associated with cases of acute and persistent diarrheal disease EAEC affect children and adults in all regions of the world, patients in developing countries infected with human immunodeficiency virus (HIV), travelers from industrialized countries visiting less developed regions and residents of industrialized countries with foodborne gastroenteritis outbreaks⁽⁶⁾.

Several putative virulence factors are involved in the pathogenesis, which remains uncertain due to its complexity. It was suggested a three-stage model: i) adhesion of bacteria to the intestinal mucosa; ii) mucus secretion stimulated by bacteria forming a biofilm, which could favor the persistent colonization; and iii) production of toxins and inflammatory response involved in the damage to the intestinal mucosa⁽¹¹⁾.

Most of the knowledge about the interactions of bacteria and intestinal organs has been obtained from studies with human biopsies collected during surgical intervention or from samples obtained from elderly individuals at autopsy⁽⁸⁾. In order to elu-

cidate the mechanisms of EAEC pathogenesis, models of study in organ culture *in vitro* (IVOC) from intestinal fragments from different portions of the small or/and large intestines of pediatric patients^(1,2,10,18,23) and of adults^(2,15,23) have been developed. Here we propose a more feasible animal study model in order to apply our understanding on the pathogenesis mechanism of EAEC strains.

METHODS

Bacterial strains

EAEC strains were isolated from the faeces of children under two years of age with acute diarrhea coming from the urban area of Rio de Janeiro, Brazil. Diarrhea was defined as the occurrence of one or more elimination of liquid faeces in a period of 24 hours⁽²⁰⁾. As a positive control, the prototype strain EAEC 042, isolated from children with diarrhea in outbreak in Peru⁽¹⁶⁾ was used to infect the ileal and colonic fragments. As a negative control, non-infected intestinal fragments were used. The EAEC strains were previously characterised by DNA hybridization probe⁽³⁾ or by polymerase chain reaction (PCR)⁽²¹⁾ for putative virulence factors of EAEC^(7,20). Adhesion assays in intestinal cell lines after 6 hours of incubation was used to characterize the aggregative pattern (Table 1). All strains were stored at -70°C in Trypticase Soy Broth (TSB, Merck) supplemented with 20% glycerol.

Declared conflict of interest of all authors: none

Disclosure of funding: no funding received

Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Correspondence: Ana Cláudia de Paula Rosa. Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Avenida 28 de Setembro, 87, fundos, 3º andar, Vila Isabel – CEP: 20551-030 – Rio de Janeiro, RJ, Brasil. E-mail: anarosa2004@gmail.com

TABLE 1. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) and prototype strains and their serotypes, phylogenetic groups, virulence factors and adherence patterns

Strains	Serotype ^a	Phylogenetic Group	Virulence factors ^b	Adherence Patterns ^c	
				Caco-2	T84
H92/3	O86:H18	D	pAA*, <i>aggA</i> , <i>aggR</i> , <i>aap</i> , <i>fyuA</i> , <i>irp2</i> , <i>pic</i>	AA	AA
I18/2	O86:H11	D	pAA*, <i>aggR</i> , <i>aap</i> , <i>fyuA</i> , <i>irp2</i>	AA	AA
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>	AA	AA
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>	NA	AA
042	O44:H18	D	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>	AA	AA

^aO, somatic antigen polysaccharide; H, flagellar antigen. ^bpAA, aggregative adherence plasmid; *aggA*, aggregative adherence fimbriae I; *aggR*, transcriptional regulator; *aap*, dispersin; *fyuA* and *irp2*, genes involved in iron caption; *pic*, protein involved in colonization; *agg3A*, aggregative adherence fimbriae III; *astA*, thermostable protein; *pet*, plasmid encoded toxin; *aafA*, aggregative adherence fimbriae II. ^cdetection by hybridization with DNA probe. ^c AA, aggregative adherence; NA, non-adherence.

Rabbit selection and preparation

New Zealand white male rabbits (1.0-1.5 kg) supplied by bioterium of Institute Vital Brazil (Rio de Janeiro, RJ) were used to obtain intestinal tissue for experiments. Previously, rabbit faeces were collected, seeded in TSA (Difco lab), Mac Conkey agar (Merck) and CLED agar (Merck) and incubated at 37°C for a period of 24 hours to certify that the animals were not infected with enteropathogens. Samples tested did not show growth of microorganisms. The rabbits were subjected to fasting for 24 hours before experimental procedures. They were observed for any gastrointestinal manifestations and were used only if found to be symptom-free.

Rabbit in vitro organ culture adhesion assay

To obtain intestine fragments of ileum and colon, the animals were anesthetized and euthanized by intravenous application Thiopentax (sodium thiopental, 10 mg/kg, Cristália, São Paulo, Brazil). Then the trichotomy of the abdominal region was performed and, subsequently, asepsis of the incision site with iodized alcohol. The gastrointestinal tract was exteriorized through a ventral midline incision and the mucosa was washed with saline and it was made identification of anatomical sites of the intestinal tract.

The adhesion assays were performed as previously described^(10,14) with some modifications. Briefly, 2- to 3-mm² fragments of tissues were oriented mucosal surface upward on sterile foam squares placed into a 6-well plate (about 35-mm-diameter). The foam was saturated with Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and 0.5% D-mannose. The level of DMEM medium was adjusted to cover the biopsy specimens with a thin film of medium by capillary action.

Bacterial strains were inoculated in 3 mL of TSB (Merck) and incubated for 18 hours at 37°C and aliquots of 50 µL standardized bacterial suspensions (approximately 10⁷ CFU mL⁻¹) was inoculated on the mucosal surface of the fragments and the 6-well tissue culture plate was then incubated at 37°C in an atmosphere with 5% CO₂ for 6 hours. The culture medium was changed completely every 2 hours to maintain pH and nutrient levels, without

reinoculation with the bacterial culture. After these incubation periods, biopsy samples were washed and prepared for scanning electron microscopy (SEM). EAEC strains were tested with three intestinal fragments of each intestinal region.

Tissue processing

The fragments collected were washed with 0.9% sterile saline and 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2 and fixed with 2.5% glutaraldehyde and 2% formaldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2. Later, the fragments were washed three times in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2 and dehydrated through a graded series of ethanol solutions (30%, 50%, 70%, 90% and 100%). Then, the fragments were transferred to baskets and subjected to the drying apparatus chambre (Bal-Tec CPD 030) by the critical point of carbon dioxide method, to be performed replacing absolute ethanol by carbon dioxide. Subsequently, specimens were mounted on stubs with the vili upward with the aid of a stereoscopic microscope, coated with gold in sputter (Balzers Union FL-9496) to become conductors. The observations were performed in the Ultrastructure Cellular Laboratory Hertha Meyer of the *Universidade Federal do Rio de Janeiro* (LCU, UFRJ) in scanning electron microscope (QUANTA 250, FEI) operating at 15 Kv.

Ethical considerations

The study protocol used was approved by Ethic Committee (*Comitê de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais*) of Biology Institute Roberto Alcântara Gomes of *Universidade do Estado do Rio de Janeiro* (UERJ) n° CEA/236/2008.

RESULTS

EAEC strains interaction with ileal mucosa fragments

Analysis by SEM of non-infected ileum showed that fragments presented the mucosa preserved (Figure 1A). The prototype EAEC 042 strain adhered to the ileal mucosa in the aggregative characteristic pattern of "stacked bricks" (Figure 1C).

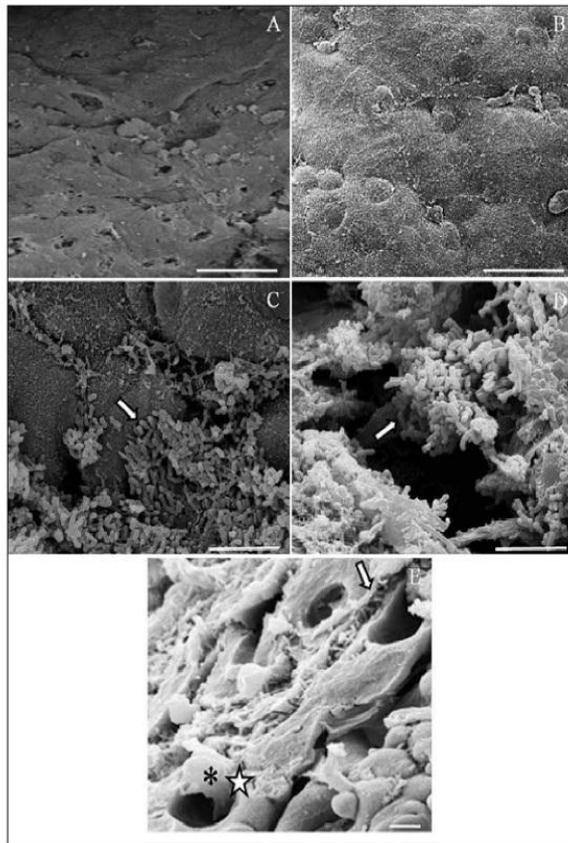


FIGURE 1. A) (1000X; bar- 10 μm), B) (1000X; bar- 10 μm), C) (5000X; bar-10 μm), D) (5000X; bar-10 μm) and E) (1000X; bar- 5 μm). Micrograph of the intestinal rabbit mucosa *ex vivo*, after 6 hours of incubation, observed by scanning electron microscopy. Mucosa preserved on the ileum (A) and on the colon (B) epithelium non-infected. Infected tissue with EAEC 042 showed large bacterial aggregates in a “stacked bricks” pattern (\rightarrow) adhered to the epithelium of the ileum (C) or forming a thick three-dimensional biofilms on the colon (D). The opened and dilated crypts (\star) with discharge of mucus (\ast) showed in the colon (E).

The intestinal fragments infected with the EAEC strains revealed bacterial aggregates as observed in cell lines Caco-2, cell line of human colorectal adenocarcinoma with phenotypic characteristics of the ileum, adhered directly on the epithelium with isolated points of mucus produced above the mucosa (Figures 2A and 2C). Although the I49/3 strain did not display the standard AA in Caco-2, this was presented in IVOC rabbit model.

Threadlike structures (Figure 2E) were found in all strains, except the positive control, in greater numbers in the ileum compared to colon fragments apparently mediating bacteria-bacteria and bacteria-epithelium interactions.

EAEC strains interaction with colonic mucosa fragments

Analysis by SEM of the colonic fragments non-infected showed mucosa preserved (Figure 1B). The prototype EAEC 042 strain adhered to the colonic mucosa in the aggregative characteristic pattern of “stacked bricks” and were able to form a thick three-dimensional biofilm (Figure 1D). Also it was observed the opening of colonic crypts with discharge of mucus (Figure 1E).

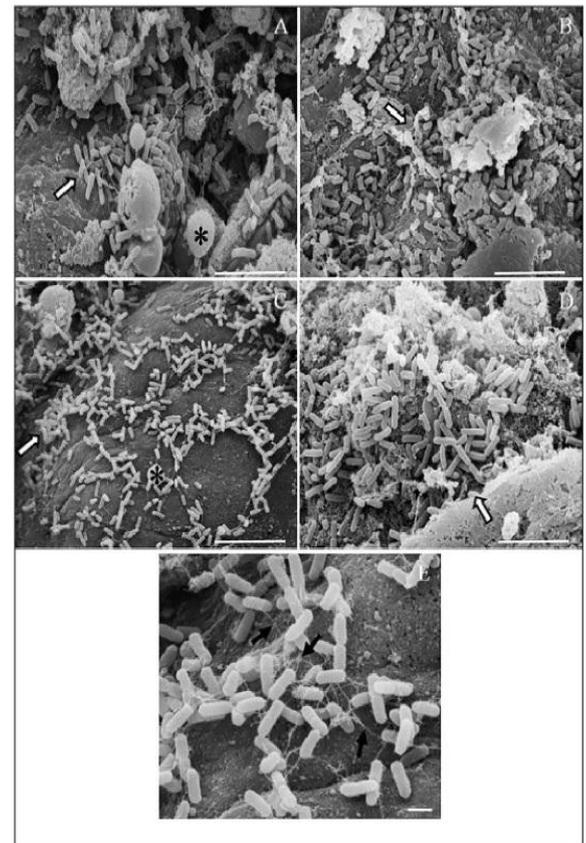


FIGURE 2. A) (3500X; bar- 10 μm), B) (3500X; bar- 10 μm), C) (3500X; bar-10 μm), D) (5000X; bar-10 μm) and E) (5000X; bar- 1 μm). Micrograph of the EAEC strains interaction with intestinal rabbit mucosa *ex vivo*, after 6 hours of incubation, observed by scanning electron microscopy. Interaction with I34/4 strain with bacterial aggregates (\rightarrow) and isolated points of mucus (\ast) above the ileum (A) and colonic (B) epithelium. Interaction with I49/3 strain with bacterial aggregates (\rightarrow) and isolated points of mucus (\ast) directly on the ileum epithelium (C) and intense adherence with large bacterial aggregates on the colonic epithelium (D). Ileal mucosa showed threadlike structures (\rightarrow) mediating the link between bacteria-bacteria and bacteria-cell (E).

The intestinal fragments infected with the EAEC strains revealed intense adherence with large bacterial aggregates as observed in cell lines T84, cell line of human colon carcinoma with phenotypic characteristics of the colon, adhered directly on the colonic epithelium (Figures 2B and 2D).

The analysis of adherent bacteria by SEM revealed the highest number of bacteria adherent in the colon fragments when compared to the ileum fragments.

DISCUSSION

Since EAEC has been isolated from several patients suffering from acute or chronic diarrhea in a number of regions of the world and from various socioeconomic strata your research is also challenging. In addition to this the genetic heterogeneity of the pathogen which considerably complicates our understanding of the pathogenicity, the therapeutic approaches and international surveillance⁽¹¹⁾.

The study of EAEC in several models, such as in the *in vitro* *in vivo* assays in animals^(22,23), in the *in vitro* organ culture in cellular lines^(1,9,18) and with human intestinal fragments^(1,2,10,15,18,23) has been widely used by more faithfully mimic the EAEC action in the host.

Thus, IVOC represents ideally a good model for study of the bacterial pathogenesis in intestinal explants which remain structurally intact for periods of hours in culture⁽¹⁰⁾. This technique has utilized human tissue biopsies, tissue fragments extracted during colonoscopy and even of animals.

In the present study, the EAEC strains challenged in the *ex vivo* rabbit model were able to adhere to both intestinal fragments, ileum and colon, in the analysis by SEM, and they formed bacterial aggregates with a similar pattern of “stacked bricks” adhered directly on the epithelium with isolated points of mucus in some strains. Still, it was possible to infer a higher number of bacteria adherent to colon fragments when compared to the ileum fragments.

Studies conducted by Yamamoto et al.⁽²³⁾ and Nataro et al.⁽¹⁸⁾ are consistent with ours. Yamamoto et al.⁽²³⁾ showed that the EAEC strain 0127:H2 exhibited lower levels of adherence in the jejunal and ileal mucosa and higher levels of adherence to colonic mucosa fixed in formalin. Already Nataro et al.⁽¹⁸⁾ from jejunal, ileum and colon mucosa explants obtained from three pediatric patients revealed that the number of bacteria adherent to colon specimens was significantly higher than the adhering bacteria to mucosal samples of small intestine.

The adhesion of EAEC to the large intestine but not to the mucosa of human small intestine, not only demonstrates that EAEC possess properties enteroadherent, but also suggests that this may be the preferred site of colonization of this pathotype. Still, the lack of adhesion to ileal mucosa could be due to a lack of receptors for EAEC⁽¹⁵⁾. Additionally, Kang et al.⁽¹³⁾ suggested that the degree of cell differentiation and maturation may also affect the receptor concentration and such differences in receptor expression may have an important role in determining the EAEC binding site.

Andrade et al.⁽²⁾ analyzing the interaction of EAEC strains with pediatric and adults human intestinal fragments of ileum and colon, demonstrated that all EAEC strains adhered to both regions evaluated on a layer of thick mucus and sometimes directly

to the mucosa. In all cases in which the strains were adherent to the mucosa in significant numbers, they did into aggregates with the pattern of “stacked bricks” similar to that observed in HEP-2 cell culture.

In the present study threadlike structures were observed in all strains, except the positive control, in greater numbers in the ileum compared to colon fragments. The *aag* and *agg3* genes encode AAF/I and AAF/III, respectively, and are long and flexible fimbriae which are involved in the cohesion of bacterial aggregates and binding with intestinal cells^(4,5). This may explain why these structures were observed in our strains and was not observed in EAEC 042 strain, which has a short and rigid fimbriae.

Our results are consistent with studies conducted by Andrade et al.⁽²⁾ that observed non-characterized fimbrial structures on bacterial surface interacted with the human ileum fragments, apparently mediating bacteria-bacteria and bacteria-cell interactions. Pereira et al.⁽¹⁹⁾ observed that bacterial aggregates forming biofilms in abiotic surface were mediated by non-bundle forming, flexible pili and that the increased adherence might be mediated by putative F pili expressed by EAEC strains. The 118/2 strain not possess any of the genes described for the fimbriae AAFs. Possibly the visualized threadlike structures could be a novel aggregative adherence fimbria variant (AAF/V) as suggested recently by Jonsson et al.⁽¹²⁾. Further investigation is needed to better understand the main role of these structures in the pathogenesis of these heterogeneous pathotype, once that a wide diversity of adhesive structures include uncharacterized nonfimbrial and fimbrial adhesins.

In conclusion, all challenged EAEC strains adhered to both intestinal fragments, with the highest tropism in the colon, ratifying the use of the IVOC model as a tool for studying the pathogenesis of this pathotype. Finally, the present study is pioneer in the use of rabbit IVOC to evaluate the pathogenic role of EAEC strains.

Authors' contributions

Braga RLL: survey execution, writing of text. Pereira ACM: survey execution; reviewing of text. Santos PA: survey execution. Freitas-Almeida AC: reviewing of text. Rosa ACP: project coordinator, reviewing of text.

Braga RLL, Pereira ACM, Santos PA, Freitas-Almeida AC, Rosa ACP. Modelo *ex vivo* de epitélio intestinal de coelho aplicado ao estudo de colonização por *Escherichia coli* enteroagregativa. Arq Gastroenterol. 2017;54(2):130-4.

RESUMO – Contexto – A síndrome diarreica é considerada um grave problema de saúde pública em todo o mundo e é considerada uma das principais causas de morbidade e mortalidade nos países em desenvolvimento. A elevada incidência de *Escherichia coli* enteroagregativa nas síndromes diarreicas a classificou como um patógeno emergente de infecções gastrointestinais. Depois de décadas de estudo, sua patogênese ainda é incerta e tem sido investigada usando principalmente modelos *in vitro* de adesão em linhagens celulares. **Objetivo** – O presente estudo investigou a interação de cepas de *Escherichia coli* enteroagregativa isoladas de diarreia infantil com mucosa ileal e colônica de coelho *ex vivo*, utilizando o modelo de cultura de órgão *in vitro*. **Métodos** – Os ensaios de adesão *in vitro* utilizando tecido cultivado foram realizados com as cepas co-incubadas com fragmentos intestinais de íleo e de cólon durante um período de 6 horas. Cada cepa foi testada em três fragmentos intestinais para cada região. Os fragmentos foram analisados por microscopia eletrônica de varredura. **Resultados** – Através da microscopia eletrônica de varredura observamos que todas as cepas aderiram a mucosa ileal e colônica de coelho, com o padrão de aderência agregativo típico de “tijolos empilhados” no epitélio. Entretanto, o maior grau de adesão foi observado na mucosa do cólon. Estruturas filiformes foram encontradas em maior número no íleo em comparação com o cólon. **Conclusão** – Esses dados mostraram que *Escherichia coli* enteroagregativa pode ter um maior tropismo para o cólon humano, o que foi ratificado pelo maior grau de aderência na mucosa do cólon de coelho. Finalmente, os dados indicaram que a cultura de órgão *in vitro* da mucosa intestinal de coelho pode ser utilizado para elucidar a patogênese de *Escherichia coli* enteroagregativa.

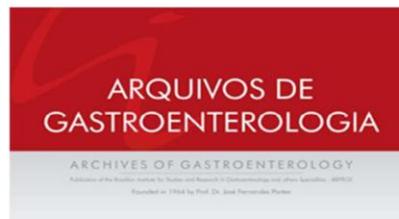
DESCRITORES – *Escherichia coli*. Mucosa intestinal, ultraestrutura. Técnicas de cultura de órgãos. Coelhos. Microscopia eletrônica de varredura.

REFERENCES

1. Abe CM, Knutton S, Pedrosa 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.
2. 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;48:199-204.
3. 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;161:1249-51.
4. Bernier C, Gounon P, Le Bouguéne 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;70:4302-11.
5. Czeżulin JR, Balepur S, Hicks S, Phillips A, Hall R, Kothary MH, et al. Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 1997;65:4135-45.
6. Estrada-Garcia T, Navarro-Garcia F. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathotype: a genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012;66:281-98.
7. 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 Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS One.* 2013;8:e69971.
8. Gerritsen J, Smidt H, Rijkers GT, de Vos WM. Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. *Genes Nutr.* 2011;6:209-40.
9. 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;7:1565-78.
10. Hicks S, Candy DC, Phillips AD. Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa *in vitro*. *Infect Immun.* 1996;64:4751-60.
11. Jensen BH, Olsen KEP, Struve C, Krogfelt KA, Petersen AM. Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27:614-30.
12. Jonsson R, Struve C, Boisen N, Mateiu RV, Santiago AE, Jenssen H, et al. Novel aggregative adherence fimbria variant of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 2015;83:1396-405.
13. Kang G, Pulimood AB, Mathan MM, Mathan VI. Enteroaggregative *Escherichia coli* infection in a rabbit model. *Pathology.* 2001;33:341-6.
14. Knutton S, Lloyd DR, McNeish AS. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. *Infect Immun.* 1987;55:69-77.
15. 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;60:2083-91.
16. 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;48:378-83.
17. 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;6:829-31.
18. 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;64:4761-8.
19. Pereira AL, Silva TN, Gomes AC, Araújo AC, Giugliano LG. Diarrhea-associated biofilm formed by enteroaggregative *Escherichia coli* and aggregative *Citrobacter freundii*: a consortium mediated by putative F pili. *BMC Microbiol.* 2010;10:57.
20. 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;47:781-90.
21. 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;33:701-5.
22. 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;60:5302-6.
23. Yamamoto T, Endo S, Yokota T, Echeverria P. Characteristics of adherence of enteroaggregative *Escherichia coli* to human and animal mucosa. *Infect Immun.* 1991;59:3722-39.

3 **ARTIGO 2 (PUBLICADO) - INTRACELLULAR PERSISTENCE OF ENTEROAGGREGATIVE *ESCHERICHIA COLI* INDUCES A PROINFLAMMATORY CYTOKINES SECRETION IN INTESTINAL EPITHELIAL T84 CELLS**

Arquivos de Gastroenterologia



Intracellular persistence of enteroaggregative *Escherichia coli* induces a proinflammatory cytokines secretion in intestinal epithelial T84 cells

Journal:	<i>Arquivos de Gastroenterologia</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Areas of Expertise:	EAEC, Cytokine

SCHOLARONE™
Manuscripts

Only

Intracellular persistence of enteroaggregative *Escherichia coli* induces a proinflammatory cytokines secretion in intestinal epithelial T84 cells

A persistência intracelular de *Escherichia coli* enteroagregativa induz a secreção de citocinas pró-inflamatórias em células epiteliais intestinais T84

Ricardo Luís Lopes Braga, Ana Claudia Machado Pereira, Andréa Fonseca Ferreira, Ana Cláudia de Paula Rosa, Wânia Ferraz Pereira-Manfro

Ricardo Luís Lopes Braga: survey execution, writing of text

Ana Claudia Machado Pereira: survey execution

Andréa Fonseca Ferreira: survey execution

Ana Cláudia de Paula Rosa: project coordinator, designed the research

Wânia Ferraz Pereira-Manfro: designed the research, writing of text

Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Avenida 28 de Setembro, 87 - Fundos, 3º andar, Vila Isabel, RJ, Brasil. CEP: 20.551-030, Brazil. Tel + 55 (021) 2868-8280; fax +55 (021) 2868-8376 E-mail: waniafpm@gmail.com

Não há conflito de interesse e subsídio.

Apoio financeiro: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e SR-2/UERJ.

Abstract

Background - The competence of enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) to adhere to the intestinal epithelium of the host is a key role to the colonization and disease development. The virulence genes are crucial for EAEC pathogenicity, as during adherence, internalization and persistence in the host. The overwhelming majority of antigen encounters in a host occurs on the intestine surface, which is considered a part of innate mucosal immunity. Intestinal epithelial cells (IECs) can be activated by microorganisms and induce an immune response. **Objective** - The present study investigated the interaction of invasive EAEC strains with T84 intestinal epithelial cell line in respect to bacterial invasiveness, persistence and cytokines production. **Methods** - We evaluated intracellular persistence of invasive EAEC strains (H92/3, I49/3 and the prototype 042) and production of cytokines by sandwich ELISA in T84 cells upon 24 hours of infection. **Results** - The survival rates of the prototype 042 was 0.5×10^3 CFU/mL while survival of I49/3 and H92/3 reached 3.2×10^3 CFU/mL and 1.4×10^3 CFU/mL, respectively. Infection with all EAEC strains tested induced significant amounts of IL-8, IL-6 and TNF- α compared to uninfected T84 cells. **Conclusion** - These data showed that infection by invasive EAEC induce a proinflammatory immune response in intestinal epithelial T84 cells.

Headings: cell culture; enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC); persistence; proinflammatory cytokines.

Resumo

Antecedentes - A competência de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) para aderir ao epitélio intestinal do hospedeiro é um papel fundamental para a colonização e o desenvolvimento da doença. Os genes de virulência são cruciais para a patogenicidade de EAEC, como durante a aderência, a internalização e a persistência no hospedeiro. A grande maioria dos encontros de antígenos em um hospedeiro ocorre na superfície do intestino, que é considerada parte da imunidade inata da mucosa. As células epiteliais intestinais (IECs) podem ser ativadas por micro-organismos e induzir uma resposta imune. **Objetivo** - O presente estudo investigou a interação de cepas invasoras de EAEC com a linhagem celular epitelial intestinal T84 em relação a invasão bacteriana, a persistência e a produção de citocinas. **Métodos** - Avaliamos a persistência intracelular de cepas invasoras de EAEC (H92/3, I49/3 e o protótipo 042) e a produção de citocinas por ELISA “sanduíche” em células T84 após 24 horas de infecção. **Resultados** - As taxas de sobrevivência da cepa protótipo 042 foi de $0,5 \times 10^3$ UFC/mL, enquanto a sobrevivência de I49/3 e H92/3 atingiu $3,2 \times 10^3$ UFC/mL e $1,4 \times 10^3$ UFC/mL, respectivamente. A infecção com todas as cepas EAEC testadas induziu quantidades significativas de IL-8, IL-6 e TNF- α em comparação com células T84 não infectadas. **Conclusão** - Estes dados mostraram que a infecção por EAEC invasoras induzem uma resposta imune pró-inflamatória em células epiteliais intestinais T84.

Descritores: cultura celular; *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC); persistência; citocinas pró-inflamatórias.

Introduction

Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) were first associated with persistent diarrhea in children in developing world. Since then, it has been widely linked with the acute and persistent diarrhea in infants and children in developing and industrialized countries, also in individuals infected with the human immunodeficiency virus (HIV). Besides, it has been recognized as a significant cause of traveler's diarrhea and in foodborne outbreaks⁽¹⁾. In Brazil, EAEC infection were identified as the most common cause of diarrhea in children younger than five years of age^(2, 3, 4).

The ability of EAEC to adhere to the intestinal epithelium of the host represents, undoubtedly, a key piece to their subsequent colonization and disease production⁽⁵⁾. Clinically, the symptoms may be watery diarrhea, often accompanied by fever, nausea and vomiting⁽⁶⁾. The variations of symptoms are due to factors such as genetic susceptibility and immune response of the host, heterogeneity of virulence among strains and the amount of bacteria ingested⁽⁷⁾.

EAEC adherence to the human intestinal mucosa requires expression of aggregative adherence fimbriae (AAFs), which promote the formation of a thick biofilm. Mucosal secretion may then be induced by the production of bacterial enterotoxins and cytotoxins⁽¹⁾. After adhering and colonizing, EAEC is able to invade intestinal cells^(8, 9, 10). Thus, the virulence genes are integral for EAEC pathogenicity which are employed by bacteria during adherence, internalization and persistence in the host, as well as mediating mucosal toxicity by induction of inflammatory responses⁽¹¹⁾.

The overwhelming majority of antigen encounters occur on the intestinal surface, which is considered a part of innate mucosal immunity. Intestinal epithelial cells (IECs) play a significant role in regulating the response to the microbiota through multiple pattern recognition receptors (PRRs) that recognize microbial-associated molecular patterns (MAMPs) and facilitate crosstalk with luminal bacteria and their antigens. Among PRRs are Toll-like receptors (TLRs) which are expressed on apical or basolateral membranes of IECs. Bacterial recognition by PRRs induces IECs activation, leading to the production of different cytokines which will orchestrate the course of infection^(12, 13).

Some cytokines, as IL-8, IL-6 and TNF- α , act recruiting and activating different cells leading to a proinflammatory immune response. On the other hand, cytokines as IL-10 acts as anti-inflammatory, downmodulating the immune response, an important mechanism in maintaining intestinal homeostasis⁽¹⁴⁾. The goal of this study was to evaluate interaction of invasive strains of EAEC with T84 intestinal epithelial cells and the production of cytokines.

Material and Methods

Bacterial strains

EAEC strains were isolated from the faeces of children under two years of age with acute diarrhea coming from the urban area of Rio de Janeiro, Brazil. Diarrhea was defined as the occurrence of one or more elimination of liquid faeces in a period of 24 hours⁽¹⁵⁾. The prototype strain EAEC 042, isolated from children with diarrhea in outbreak in Peru⁽¹⁶⁾ was included in the present study. The EAEC strains H92/3 and I49/3 were previously characterized by DNA hybridization probe or by polymerase chain reaction (PCR) for putative virulence factors of EAEC^(15, 17). Adhesion assays in the intestinal cell line T84 after 6 hours of incubation was used to characterize the aggregative pattern (Table 1). All strains were stored at -70°C in Trypticase Soy Broth (TSB, Merck) supplemented with 20% glycerol.

Cell culture

The human intestinal colon carcinoma T84 cell line (ATCC CCL248)⁽¹⁸⁾ was cultured in a 1:1 mixture of Ham F12 culture medium (Gibco-BRL) and Dulbecco's modified Eagle Minimum Essential Culture Medium (DMEM; Gibco-BRL), supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS; Gibco-BRL), 2.5 mM L-glutamine, 50 μ g/mL gentamicin and 2.5 μ g/mL fungizone. The cell line was maintained at 37°C in 5% CO₂ atmosphere. For epithelial

cell infection and intracellular persistence assays, cells were cultured in appropriate medium in 24-well plates (Nunc International, USA).

Epithelial cell infection

Infection of T84 cells with EAEC strains was performed as previously described by Harrington *et al.*⁽¹⁹⁾ with modifications. After confluence and polarization of cells, the wells were washed with Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS-D) pH 7.2, added of DMEM with 2% FBS and 1% D-mannose.

Bacterial strains were cultured in 3 ml of TSB (Merck), incubated for 18 hours at 37 °C and aliquots of 100 µL standardized bacterial suspensions (approximately 10^7 CFU ml⁻¹) was inoculated on the cell monolayers in triplicates, then the plate was centrifuged for synchronization (Eppendorf Centrifuge 5810R, Hamburg, Germany) and incubated at 37°C in 5% CO₂ atmosphere for 3 hours. Subsequently, cells were washed with PBS-D, added of DMEM with 2% FBS, 1% D-mannose and 100 µg/ml amikacin [250 mg/ml] (Teuto, Brazil) and incubated for more 21 hours. After 24 hours of incubation, the supernatant was centrifuged and immediately stored at -20°C.

Evaluation of cytokine production

The cytokines IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- α were measured in the supernatants of infected and non-infected T84 cell by a sandwich ELISA, using a commercial kit from R&D Systems (Wiesbaden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The kit contains two monoclonal antibodies specific for each cytokine, one of which is biotinylated. The reaction was then developed with streptavidin-HRP using as substrate 3,3', 5,5' tetramethylbenzidine (TMB - R&D Systems).

Nitrites

For nitric oxide (NO) assay, supernatants from T84 cultures were immediately mixed with an equal volume of Griess reagent to detect nitrites production⁽²⁰⁾.

Intracellular persistence of EAEC in T84 cells

The evaluation of intracellular persistence in T84 cells infected with EAEC strains was performed as previously described by Pereira *et al.*⁽¹⁰⁾ with modifications. After infection of the epithelial cells and 24 hours of incubation the cell monolayers were washed with PBS-D followed by lysis with 1% Triton X-100 (Riedel, Germany) in PBS-D for 30 minutes. After vigorous homogenization of each well, 200 μ l of the obtained lysate was diluted in ratio 10 in a 96-well plate and 10 μ l aliquots of each dilution were plated in TSA medium (Merck). The plates were incubated at 37°C in 5% CO₂ atmosphere for 18 hours, followed by counting the colonies, obtaining the number of colony forming unit/mL (CFU/mL) of the lysate.

Statistical analysis

Intracellular persistence assays were expressed as mean \pm one standard deviation (SD) of three experiments performed independently. Cytokine levels were expressed as mean of three experiments performed independently and standard error of the mean (SEM). The statistical analysis was calculated using a one-way ANOVA followed by multiple paired comparisons with Bonferroni error correction for ELISA and Unpaired t test for persistence assay using Graph-Pad Prism Version 5.03. Statistical significance results were considered when $p < 0.05$.

Results

Persistence of EAEC in T84 cells

The intracellular persistence of H92/3 and I49/3 EAEC strains and the prototype 042 in T84 cells were investigated after 24 hours of incubation and survival rates were approximately 1.4×10^3 , 3.2×10^3 and 0.5×10^3 CFU/mL, respectively. All strains were statistically significant ($0.01 < p < 0.05$) when compared to non-infected T84 cells (Figure 1).

Inflammatory responses of EAEC-infected T84 cells

Confluent T84 cells were infected for 24 hours with different EAEC strains. The prototype EAEC strain 042 induced a strong production of IL-8 compared to uninfected cells ($p < 0.0001$), a chemokine for neutrophils (Figure 2A). The strains H92/3 and I49/3 also induced high production of IL-8 (Figure 2A, $p < 0.0001$ and $p < 0.01$, respectively). We also evaluated the production of IL-6 by infected T84 cells. As shown in Figure 2B, all EAEC strains induced significant production of IL-6 compared to non-infected T84 cells ($p < 0.0001$). Interestingly, the strain I49/3 induced high amounts of IL-6 compared to 042 and H92/3 strains ($p < 0.0001$). In this system, we don't detect significant changes of IL-1 β secretion, independently of different strains tested (data not shown). The TNF- α response was also investigated, since this cytokine is an important cellular activator. Infection by the prototype 042 and I49/3 induced significant secretion of TNF- α ($p < 0.01$ and $p < 0.0001$, respectively) compared to uninfected T84 cells (Figure 2C). In our system, we did not detect significant differences of TNF- α levels when T84 cells were infected by H92/3 strain (Figure 2C). Infection by the different EAEC strains did not induce changes in the amount of IL-10 secretion by T84 cells (data not shown). In addition, we did not observe upregulation in nitric oxide (NO) secretion (data not shown), although these strains were able to induce high amounts of inflammatory cytokines (Figure 2).

Discussion

Diarrhoea is a leading killer of children, accounting for 9 per cent of all deaths among children under age 5 worldwide in 2015. This translates to over 1,400 young children dying each day, or about 526,000 children a year⁽²¹⁾. Common amongst the Diarrhoeagenic *Escherichia coli* (DEC) strains is the ability to colonize the intestinal mucosa, evade the immune system, multiply and cause tissue host damage⁽²²⁾.

The diarrhea caused by EAEC is the result of a complex interaction pathogen-host. In different clinical settings, the diseases induced by EAEC is accompanied by activation of an inflammatory response⁽²³⁾. The pathogenicity of bacteria frequently includes colonizing, adhesion of the intestinal tract and the ability to invade and persist within enterocytes⁽⁹⁾. A previous study in our laboratory has shown that EAEC invaded and persisted in Caco-2 and T84 cells in extended periods of incubation, 6 to 72 hours⁽¹⁰⁾. In the present study, intracellular persistence assays showed that the same EAEC strains are able to survive in T84 cells after 24 hours of incubation. The strains tested had distinct genotypes with a wide range of virulence factors and we noticed that the strain I49/3 which contain the aggregative adherence fimbriae *agg3A* gene (AAF/III) showed higher persistence levels⁽¹⁰⁾.

The mucosal surface is an important barrier to pathogens, and it can be represented by IECs in the gastrointestinal tract. Also, IECs are able to induce an inflammatory response upon infection, recruiting and activating immune cells, as neutrophils and T lymphocytes^(12, 13).

IECs respond to many inflammatory stimuli by secretion of proinflammatory cytokines and chemokines such as IL-8⁽²⁴⁾. IL-8 is one of the most important chemokines that recruits neutrophils to the site of infection⁽²⁵⁾. According to our results, Harrington *et al.*⁽¹⁹⁾ also observed upregulation of IL-8 gene in O42-infected non-polarized T84 cells. Upregulation of IL-8 by infected IECs has also been reported by others, using different systems: the hemorrhagic coli pilus of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC)⁽²⁶⁾, enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC)^(22, 27) and EAEC^(4, 11, 19, 22, 24).

Another proinflammatory cytokine is IL-6, a potent inducer of acute-phase proteins and is also known to upregulate T and B-cell maturation. Besides, TNF- α acts on endothelial cells upregulating adhesion molecules, enabling cells to migrate into inflammatory foci and

also activates neutrophils, increasing their degranulation and respiratory burst, a potent microbicidal mechanism⁽²⁵⁾. In our study T84 cells infected with EAEC strains produced IL-8, IL-6 and TNF- α .

The H92/3 and I49/3 strains and the prototype strain EAEC 042 have the AAFs and the transcriptional regulator *aggR*, which could explain the high production of IL-8, IL-6 and TNF- α by T84 infected cells, as previously observed with different EAEC also expressing *aggR*⁽²⁸⁾. Cennimo *et al.*⁽²⁸⁾ used a human intestinal adenocarcinoma cell line, HCT-8, to determine genes and cytokine responses of EAEC isolates from adult patients presenting to an urgent-care clinic in the USA. The authors inferred that *aggR*-positive EAEC elicited higher levels of IL-6, IL-8 and TNF- α compared with *aggR*-negative EAEC. Furthermore, individuals infected with EAEC containing the gene *aggR* in conjunction with the genes *aap*, *aata*, *astA*, *pet* and/or *set* were more likely to have markers of inflammation present in their stool examination. These findings suggest that one or more of these genes may be a marker for virulence and are associated with inflammation during diarrheal illness⁽²⁸⁾. The strains used in the present study have at least two at most four of these genes, ratifying our results.

Coordinated expression and upregulation of IL-8, IL-6, TNF- α and others proinflammatory cytokines were observed by Bandyopadhaya *et al.*⁽²⁹⁾ in the intestinal epithelial cell line Int407 upon *Vibrio cholerae* infection. These proinflammatory cytokines also showed increased expression in T84 cells, except for IL-6. Medeiros *et al.*⁽³⁰⁾ showed that EAEC 042 strain induced IL-8 and TNF- α expression, but not IL-6, and reduced TGF β expression, in intestinal epithelial cell line IEC-6 in the early stages (180 min) of infection. Recently, Gupta *et al.*⁽¹¹⁾ studying EAEC with different AAF types in duodenal biopsies using *in vitro* organ culture (IVOC) observed an increased expression of IL-1 β , IL-8, IL-6 and TNF- α . Our results were similar, although we didn't detect significant changes in IL-1 β secretion.

The nitric oxide (NO), that is synthesized in large amounts by the inducible NO synthase (iNOS) under pathophysiologic conditions acts as a potent effector of the innate immune system, which plays a major role in the development of inflammation and in the fight against pathogens⁽³¹⁾. It was observed NO induction by enteropathogenic bacteria as *Salmonella* Dublin⁽³²⁾ and enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC)⁽³¹⁾. Although we did not observe NO production by T84 cells infected with EAEC in our system, it may also be possible that the bacteria inhibited its production as an escape mechanism of the immune system. Further investigation would be necessary in order to elucidate this question.

Here, we reinforced that infection together with intracellular persistence of EAEC strains induce a proinflammatory response leading to intestinal inflammation that could result in diarrhea and even death.

Acknowledgements

This work was supported by CAPES, FAPERJ and SR-2/UERJ.

References

1. Jensen BH, Olsen KEP, Struve C, Kroghfelt KA, Petersen AM. Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 2014;27(3):614-630.
2. 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. Journ Infect. 2004;48:161-167.
3. 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.
4. Dias RC, Dos Santos BC, Dos Santos LF, Vieira MA, Yamatogi RS, Mondelli AL, *et al.* Diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes investigation revealed atypical enteropathogenic *E. coli* as putative emerging diarrheal agents in children living in Botucatu, São Paulo State, Brazil. APMIS. 2016;124(4):299-308.
5. Navarro-Garcia F & Elias WP. Autotransporters and virulence of enteroaggregative *E. coli*. Gut Microbes 2011; 2:13-24.

6. Estrada-Garcia T & Navarro-Garcia F. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathotype: a genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. FEMS Immunol Med Microbiol. 2012;66(3):281-298.
7. Kaur P, Chakraborti A, Asea A. Enteroaggregative *Escherichia coli*: an emerging enteric food borne pathogen. Interdiscip Perspect Infect Dis 2010:1-10.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. Gupta D, Sharma M, Sarkar S, Thapa BR, Chakraborti A. Virulence determinants in enteroaggregative *Escherichia coli* from North India and their interaction in *in vitro* organ culture system. FEMS Microbiol Lett. 2016;363(17). pii: fnw189.
12. Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. Immunity 2011;34:637-650.
13. Kinnebrew MA, Pamer EG. Innate immune signaling in defense against intestinal microbes. Immunol Rev. 2012;245:113-131.
14. Onyiah JC, Colgan SP. Cytokine responses and epithelial function in the intestinal mucosa. Cell Mol Life Sci. 2016;73(22):4203-4212.
15. Rosa ACP, Mariano AT, Pereira AMS, 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.
16. 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.

17. 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 Rio de Janeiro, Brazil. PLoS One 2013;8(7):e69971.
18. 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.
19. 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(11):1565-1578.
20. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. Anal Biochem. 1982; 126, 131-138.
21. Unicef.org [homepage on the Internet]. UNICEF Data: Monitoring the Situation of Children and Women. [updated 2017 Feb, cited 2017 Jun 8, 2017]. Available from: <https://data.unicef.org/topic/child-health/diarrhoeal-disease/>.
22. Edwards LA, Bajaj-Elliott M, Klein NJ, Murch SH, Phillips AD. Bacterial-epithelial contact is a key determinant of host innate immune responses to enteropathogenic and enteroaggregative *Escherichia coli*. Plos One 2011; 6(10):e27030.
23. Rocha-Ramírez LM, Hernández-Chiñas U, Baños-Rojas D, Xicohtencatl-Cortés J, Chávez-Berrocal ME, Rico-Rosillo G, *et al.* Pet serine protease from enteroaggregative *Escherichia coli* stimulates the inflammatory response activating human macrophages. BMC Microbiol. 2016;16:158.
24. Khan MA, Kang J, Steiner TS. Enteroaggregative *Escherichia coli* flagellin-induced interleukin-8 secretion requires Toll-like receptor 5-dependent p38 MAP kinase activation. Immunol. 2004;112(4):651-660.
25. Borish LC & Steinke JW. Cytokines and chemokines. J Allergy Clin Immunol. 2003;111:S460-S475.
26. Ledesma MA, Ochoa SA, Cruz A, Rocha-Ramírez LM, Mas-Oliva J, Eslava CA, Girón JA, Xicohtencatl-Cortés J. The hemorrhagic coli pilus (HCP) of *Escherichia coli* O157:H7 is an inducer of proinflammatory cytokine secretion in intestinal epithelial cells. Plos One. 2010;5(8):e12127.

27. Zhou X, Girón JA, Torres AG, Crawford JA, Negrete E, Vogel SN, Kaper JB. Flagellin of enteropathogenic *Escherichia coli* stimulates interleukin-8 production in T84 cells. *Infect Immun.* 2003;71(4):2120-2129.
28. 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(Pt 4):403-407.
29. Bandyopadhyaya A, Sarkar M, Chaudhuri K. Transcriptional upregulation of inflammatory cytokines in human intestinal epithelial cells following *Vibrio cholerae* infection. *FEBS J.* 2007;274(17):4631-4642.
30. Medeiros P, Bolick DT, Roche JK, Noronha F, Pinheiro C, Kolling GL, *et al.* The micronutrient zinc inhibits EAEC strain 042 adherence, biofilm formation, virulence gene expression, and epithelial cytokine responses benefiting the infected host. *Virulence* 2013;4(7): 624-633.
31. Vareille M, Rannou F, Thélier N, Glasser AL, de Sablet T, Martin C, Gobert AP. Heme oxygenase-1 is a critical regulator of nitric oxide production in enterohemorrhagic *Escherichia coli*-infected human enterocytes. *J Immunol.* 2008;180(8):5720-5726.
32. Cornish AS, Jijon H, Yachimec C, Madsen KL. Peroxynitrite enhances the ability of *Salmonella dublin* to invade T84 monolayers. *Shock.* 2002;18(1):93-96.

Table 1 Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC), prototype strain and their serotypes, phylogenetic groups, virulence factors and adherence patterns

Strains	Serotype ^a	Phylogenetic Group	Virulence factors ^b	Adherence Pattern ^c
H92/3	O86:H18	D	pAA*, <i>aggA</i> , <i>aggR</i> , <i>aap</i> , <i>fyuA</i> , <i>irp2</i> , <i>pic</i>	AA
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>	AA
042	O44:H18	D	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>	AA

^a O, somatic antigen polysaccharide; H, flagellar antigen

^b pAA, aggregative adherence plasmid; *aggA*, aggregative adherence fimbriae I; *aggR*, transcriptional regulator; *aap*, dispersin; *fyuA* and *irp2*, genes involved in iron caption; *pic*, protein involved in colonization; *agg3A*, aggregative adherence fimbriae III; *astA*, thermostable protein; *pet*, plasmid encoded toxin; *aafA*, aggregative adherence fimbriae II

* detection by hybridization with DNA probe

^c AA, aggregative adherence

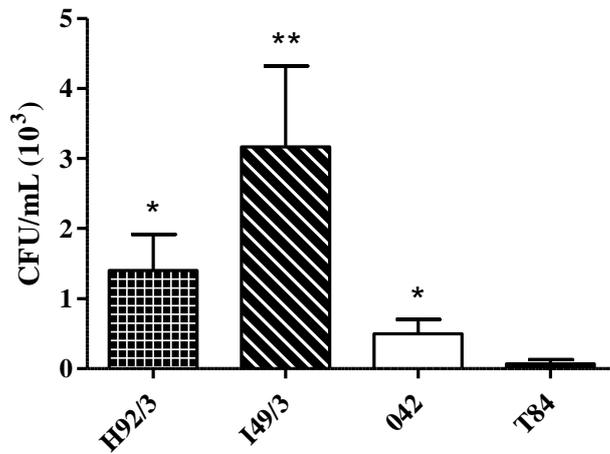


Figure 1 Intracellular survival of EAEC H92/3, I49/3 and 042 strains on T84 cells after 24 hours of incubation. The non-infected T84 cells were used as negative control of each experiment. Persistence assays were expressed as mean \pm one standard deviation of three experiments performed independently. Statistical analysis was performed by Unpaired t test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

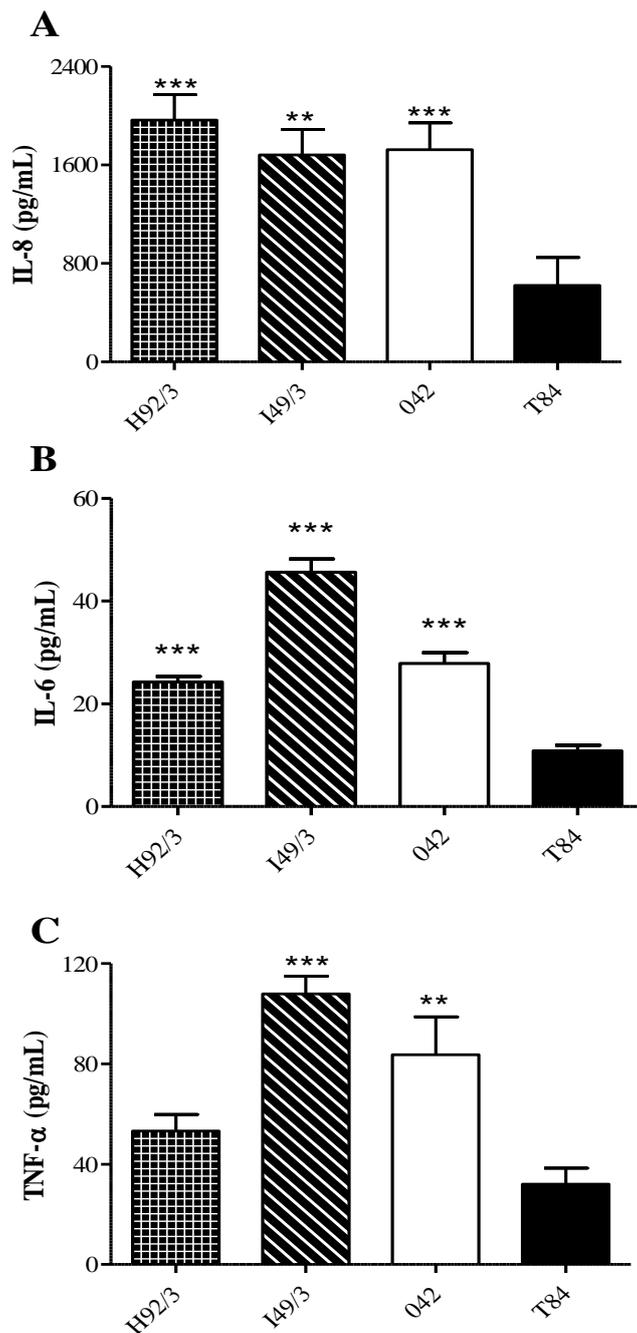


Figure 2 Cytokine production by infected T84 cells. T84 cells were infected with EAEC H92/3, I49/3 and 042 strains. After 24 hours of infection, supernatants were collected and tested for IL-8 (A), IL-6 (B) and TNF- α (C). The basal production of cytokines was measured on non-infected T84 cells. Cytokine responses were expressed as mean and SEM of three experiments performed independently. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by comparisons of pairs using Bonferroni error correction. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$.

4 ARTIGO 3 (A SUBMETER) - APOPTOSIS AND NECROSIS INDUCED BY ENTEROAGGREGATIVE *ESCHERICHIA COLI* INTERACTION WITH HUMAN INTESTINAL T84 CELLS

Apoptosis and necrosis induced by enteroaggregative *Escherichia coli* interaction with human intestinal T84 cells

Ana Claudia Machado Pereira¹, Ricardo Luís Lopes Braga¹, Prescilla Emy Nagao², Ana Cláudia de Paula Rosa¹

¹Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro

²Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Faculdade de Ciências Médicas, UERJ. Av. 28 de Setembro, 87 - Fundos, 3^o andar. Vila Isabel, RJ, Brazil. CEP: 20.551-030

Tel + 55 (021) 2868-8280; Fax +55 (021) 2868-8376

E-mail: anarosa2004@gmail.com

Abstract

Enteroaggregative *Escherichia coli* is a pathogen frequently associated with diarrheagenic syndrome. This pathotype of *E. coli* exhibit aggregative adherence in epithelial cells and contains the plasmid of aggregative adherence that carries virulence genes. Among putative virulence genes, it may be found sequences that codes for adhesins, fimbriae and toxins. Pathogenicity of EAEC includes adhesion and production of biofilm in intestinal mucosa and often inflammation. A set of EAEC strains can invade intestinal cells and cause severe alterations in morphology and disrupt intestinal epithelium. Previous study revealed invasive and persistence properties of EAEC H92/3 and I49/3 strains isolated from acute diarrhea cases. To investigate the results of bacteria invasion, we selected cells infected with the two EAEC strains and conducted phase contrast and fluorescence microscopy and flow cytometry. The aim was to evaluate viability of cells, the occurrence of apoptosis and necrosis. Phase contrast microscopy, showed loss of viability in cells infected for periods of incubation of 16 hours. By fluorescence microscopy, we observed that cells infected with EAEC H92/3 and I49/3 had nuclei damages, suggesting these strains could interact with nuclear membrane and provoke apoptosis and necrosis. Additionally, by flow cytometry, our data revealed that EAEC provoked late apoptosis and necrosis of T84 cells. These data revealed that EAEC has different virulence pathways and all of them contributes to the pathogenicity of bacteria and its success on the host environment.

Key words: adherence; apoptosis; enteroaggregative *E. coli*; T84 cells; fluorescence microscopy; invasion; pathogenesis; phase contrast microscopy; necrosis.

1. Introduction

Diarrheic diseases still are an important health problem that affects developing countries. World health organization have estimated 3 million of deaths due to diarrheic syndrome in these countries. Besides, persistent diarrhea and recurrent acute diarrhea are one of the causes of death of children under 5 years and patients with acquired immune deficiency syndrome [1, 2]. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) is a pathogen frequently associated to diarrheic syndrome. EAEC was recognized by the ability to produce the aggregative adherence pattern (AA) in human cells lines HEp-2 and HeLa. The majority of EAEC carry a high molecular weight plasmid denominated aggregative adherence plasmid (pAA). This contain several putative virulence genes that codes adhesins, fimbria and toxins. These proteins are essential to EAEC pathogenesis beings utilized in adhesion, invasion and production of a thick biofilm over the intestinal mucosa [3]. The steps involved in EAEC establishment within host include: adherence to intestinal mucosa, increased mucus production with biofilm formation and inflammation accompanied by cytokine release [4]. A pathogenicity study showed EAEC strains from acute diarrhea cases that were capable of invading intestinal cells, such as Caco-2 and T84 cells, these strains also persisted and replicated in cells. Internalization was accompanied by morphological alterations in cells [5]. An additional virulence property of EAEC might be the ability to utilize the cytoskeleton while invading cells. Often, we have seen other pathogens utilizing actin filaments, microtubules and kinases to enter and persist in cell host. Moreover, the use of kinases may be related with apoptosis in hosts cells. A study of diarrheagenic *E. coli* showed that prototype EAEC 042 caused cytotoxicity and fragmented DNA of macrophages. These suggested that EAEC not only invades host cell but also provokes death when needs to escape to nearby cells or tissues [6]. This also may contribute to immunological response improving damage in intestinal mucosa as seen in other enteric pathogen, such as *Salmonella* [7].

The aim of this study was to analyze if T84 cells infected with two invasive EAEC strains had loss of viability, nuclear alteration and evaluate the occurrence of apoptosis and necrosis.

2. Results

2.1. Reduced viability of T84 cells infected with EAEC observed by phase contrast microscopy

Through phase contrast microscopy, we evaluated the interaction of EAEC H92/3 and I49/3 with T84 cells qualitatively for 6, 16 and 24 hours of incubation. After 6 hours, we observed discreet coloring with trypan solution, exhibiting viable cells with membranes well defined. On the other hand, after 16 and 24 hours, we observed cells with nuclei well colored and irregular membranes indicating reduced cellular viability of infected cells. Non-infected cells did not show modifications any period of incubation (Figure 1).

2.2. Altered nuclei observed in T84 cells infected with EAEC by fluorescence microscopy

By fluorescence microscopy, T84 cells showed cytoplasmic and nuclei membranes with irregular morphology when they were infected with both EAEC H92/3 and I49/3 after 16 hours of incubation. We visualized also chromatin condensation within nuclear membrane, this characterized DNA fragmentation. Cells infected with EAEC H92/3 showed condensed chromatin restricted to the nuclei, this indicates that cell death may have occurred by apoptosis. A slightly different result was found in cells infected with EAEC I49/3, where the condensed chromatin seemed dispersed through the cytoplasm of cells and the morphology of the whole cell was compromised, this indicates that the mechanism of cell death might have been necrosis (Figure 2).

2.3. Apoptosis and necrosis revealed by flow cytometry

Some pathogens may induce apoptosis in infected cells through the introduction of proteins that activate caspases and trigger events that lead to death of host cell enabling the escape to near tissues. By flow cytometry, we evaluated the occurrence of apoptosis in T84

cells after interaction with EAEC H92/3 and I49/3 for 6 and 16 hours of incubation. After 6 hours of interaction, we saw that EAEC H92/3 caused the apoptosis of 33.19% of cells and only 8.95% revealed death by necrosis. EAEC I49/3 caused apoptosis of 41.01% and late apoptosis of 19.23% of cells and 3.79% was dead by necrosis. Prototype EAEC strain 042 caused the death of only 23.15% of cells by necrosis and in 6.14% of cells occurred only Annexin binding or apoptosis and in 4.83% of cells occurred the binding of Annexin and stained with propidium iodide revealing late apoptosis (Figure 3). In assays performed after 16 hours of incubation, cells infected with EAEC strain H92/3 showed 3.88% of apoptosis, 45.12% of necrosis and 47.32% of late apoptosis. Infection with I49/3 revealed 12.86% of apoptosis, 9.32% of necrosis and 77.63% of late apoptosis. Prototype strain 042 caused apoptosis in 2.46% of infected cells, 34.12% of necrosis and 14.35% of late apoptosis (Figure 4). In both periods of incubation analyzed we compared the infected monolayers with results obtained from non-infected cells and cells treated with hydrogen peroxide (H₂O₂). High number of T84 cells treated with hydrogen peroxide showed necrosis in 6 and 16 hours of incubation. We noticed that non-infected cells showed extreme sensitivity when monolayers were full of cells, the best results were obtained in monolayers with 2 days of culture, even though we had a counting for initial apoptosis.

3. Discussion

EAEC represents a heterogenic category of diarrheagenic bacteria and understanding its pathogenicity is essential to prevent persistent and acute diarrhea, specially, in children and immunocompromised. Previous studies showed that EAEC strains from both types of diarrhea cases could invade intestinal cells [5, 8]. These invasive strains may persist within cells and may be responsible for triggering programmed cell death, such as initial or late apoptosis. Besides, the presence of bacteria in the cytoplasm may result in severe alteration of cell morphology due to mobilization of cytoskeleton and the beginning of host cell death [9]. In our previous study, Pereira *et al.*, 2008, these two strains among other EAEC strains from acute diarrhea cases were characterized as invasive and persistent strains in Caco-2 and/or T84 cells. In the present study, we selected two invasive EAEC strains from acute diarrhea

cases to evaluate the ability to induce apoptosis and necrosis. The strains showed classic AA pattern and their genetic markers are listed on Table 1.

Interaction between intestinal cells and bacteria may result in reduction of cellular viability [10]. Our findings included the loss of viable cells after interaction with EAEC strains H92/3 and I49/3. Both strains tested caused death of most cells in periods of 24 hours of incubation (Figure 1). A study conducted with macrophages revealed that cells infected with EAEC 042 showed reduced viability after long periods of incubation, this reduction may be the result of several cell damages, including membranes and nucleus alterations [6]. Our finding reassures that EAEC strains from acute diarrhea cases can invade and alter normal cell functions causing death of cells, destruction of cells monolayers and detaching.

Frequently, intracellular bacteria may cause damage to eukaryotic nuclear membrane [11]. Cellular modifications, specially of nuclear membranes, were seen in T84 monolayers infected with EAEC H92/3 and I49/3 after 16 hours of incubation (Figure 2). This suggest that these strains may have interacted with cellular DNA and induced cell modifications. Infected and apoptotic cells are targeted for engulfment by incoming macrophages, thus perpetuating the cycle of cell-to-cell spread as we have seen described for systemic *Salmonella* infection [7]. Our results included alteration of the cytoplasmic membrane as the modification of nuclear membrane, both indicates that bacteria could induce apoptosis and/or necrosis in intestinal line T84, revealing the pathogenic potential of EAEC to the colon mucosa since these cells are similar to the enteric ones. A study of diarrheagenic *E. coli* showed that prototype EAEC 042 caused cytotoxicity and fragmented DNA of macrophages, plus revealed apoptosis of 50% of infected cells [6].

Invasive pathogens often are seen inducing programmed cell death, this mechanism protects the host preventing the survival of many bacteria within the host. Besides, apoptotic and necrotic cells are often phagocyted by macrophages to remove dead cells and clearance pathogens [12]. As EAEC may induce those processes this may contribute to spread EAEC to macrophages and other sites of the host because bacteria may block or induce the process when its required for their dispersion since this category of *E. coli* was seen inside cells after six hours of incubation and bacteria persisted even after 72 hours of interaction [5]. The present study revealed that while EAEC interacts with T84 cells monolayers and many cells were destroyed by apoptosis and/or necrosis (Figures 1 and 2). Modifications of cytoplasmic and nuclear membrane revealed by DAPI dyed suggested that both those processes could be occurring in infected cells.

Therefore, flow cytometry was performed in T84 cells infected with the two invasive EAEC strains and EAEC prototype strain 042. We observed that infected cells showed apoptosis on initial tests of 6 hours. We noticed apoptosis was predominant, when we compared levels of apoptosis and necrosis (Figure 3). After 16 hours, we observed that infected T84 cells showed late apoptosis and noticed necrosis was predominant in cells infected with EAEC H92/3 and apoptosis in cells infected with I49/3. All infected cells showed low level of viable cells after 16 hours of incubation (Figure 4). These findings along with other studies have shown the capacity of EAEC interfere in the normal functions of host cells, both macrophages and enterocytes [6, 13] and reveals the potential of EAEC lead to cell death which improves the virulence of microorganisms. Cells infected with prototype EAEC 042 exhibit necrosis, however the level of viable cells was significant. This event may suggest the heterogenic behavior of EAEC related to the mechanisms involved in host cell death. As seen for *Salmonella*, the induction of apoptosis may happen by association between structures of the cytoplasm, with caspases. In this model of infection: actin filaments and microtubules associated with initial proteins caspases triggers apoptosis [7, 14]. Since invasive EAEC strains could disrupt cells and alter their morphology, it may be a signal that the cytoskeleton of cells plays an important part during infection, persistence and cell death.

Additionally, we concluded that EAEC invasive strains could cause loss of viability in cells monolayers showing nuclear damage of T84 cells, condensed chromatin, apoptosis and necrosis with most of cells infected dying after late apoptosis which differs from EAEC prototype 042 that induced necrosis. Our EAEC strains have shown a set of virulence properties that include the ability of adhesion, invasion, persistence and the induction of cell death by programmed mechanisms revealing an important pathway utilized by this pathotype to remain or be dispersed in host environment.

4. Materials and methods

4.1. Bacterial strains

Two EAEC strains analyzed in the present study were isolated from cases of acute infantile diarrhea, examined in Rio de Janeiro, Brazil [15]. The EAEC were previously characterized by adherence and invasion assays and polymerase chain reactions (PCR) for putative EAEC virulence factors (Table 1). Control strain used in epithelial cell infections is also listed in Table 1. All strains were stored at -70°C in tryptic soy broth with 20% glycerol.

4.2. Cell culture

The human colon adenocarcinoma line T84 was cultured in a 1:1 mixture of Ham F12 and DMEM Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS; Gibco-BRL, USA), 5 mM glutamine and antibiotics. Cells were maintained in 5% CO₂ atmosphere at 37°C. For cell interaction assays and microscopy assays, cells were re-suspended in appropriate medium in 24-well or 6-well plates (Nunc International, USA).

4.3. Phase contrast microscopy of T84 cells stained with Trypan 0.5%

The damage caused by EAEC strains H92/3 and I49/3 to T84 cells was evaluated through phase contrast microscopy. After 6, 16 and 24 hours of infection with EAEC, T84 cells were stained with a solution containing Trypan 0.5%. Before prepare glass slides, the cells were washed with Phosphate Buffer Solution (PBS) to discard excessed stain.

4.4. Fluorescence microscopy in cells dyed with DAPI (4'6'-diamidino-2-phenylindole)

The nuclei damages of T84 cells due to infection with EAEC strains H92/3 and I49/3 were evaluated with fluorescent DAPI dye. After 16 hours of incubation with strains, cells were washed with PBS and fixed with methanol for 1 minute. Then, washing with PBS was performed and DAPI dye was added to cells for 5 minutes. After PBS washing, glass slides were prepared with tamponed glycerol.

4.5. Analysis of T84 cells by flow cytometry for apoptosis and necrosis

Flow cytometry was utilized to identify apoptosis and necrosis in cells infected with EAEC strains H92/3, I49/3 and 042. T84 cell cultivated for 48 hours in 6 well microplates containing DMEM were submitted to interaction with EAEC strains for 6 and 16h at 37°C in 5% CO₂ atmosphere. After infection cells were trypsinized, transferred to sterile tubes and centrifuged for 10 minutes. Then, cells were washed with DMEM, centrifuged again and resuspended in PBS, following cells were treated with Annexin V and propidium iodide (PI) with TACS Annexin V-FITC detection kit of apoptosis and necrosis according to the manufacturer's instructions. The samples were analyzed for the binding of annexin and the uptake of propidium iodide in FACScan flow cytometer (Becton-Dickinson Immunocytometry Systems Europe, Erembodegem, Belgium), equipped with an air-cooled 15 mW argon-ion laser operating at 488 nm. The standard filter configuration was used for data acquisition. Flow cytometric analysis was performed using the Cell-Quest software program (Becton-Dickinson). Logarithmic fluorescence intensity of Annexin V-FITC was plotted versus the fluorescence intensity of PI in a dot plot. Data from 10.000 epithelial cells were analyzed for each plot.

Acknowledgements

This study was supported by grants from FAPERJ, CNPq, CAPES, SR-2/UERJ and Programa de Núcleo de Excelência (PRONEX) of the Brazilian Ministry of Science and Technology. We are also grateful to Maria Angélica Pereira da Silva for technical assistance.

References

- [1] Kotloff KL. The burden and etiology of diarrheal illness in developing countries. *Pediatr Clin.* 2017; 64(4):799-814.
- [2] Kirk MD, Angulo FJ, Havelaar AH, Black RE. Diarrhoeal disease in children due to contaminated food. *Bull World Health Organ.* 2017; 95:233-234.
- [3] Estrada-Garcia T, Perez-Martinez I, Bernal-Reynaga R, Zaidi MB. Enterοaggregative *coli*: a pathogen bridging the North and South. *Curr Trop Med Rep.* 2014; 1(2): 88-96.
- [4] B.H. Jensen, K.E.P. Olsen, C. Struve, K.A. Krogfelt, A.M. Petersena, Epidemiology and clinical manifestations of enterοaggregative *Escherichia coli*, *Clin. Micr. Rev.* 27 (2014) 3: 614–630.
- [5] Pereira ACM, Britto-Filho JD, Jose de Carvalho J, de Luna MDG, Rosa ACP. Enterοaggregative *Escherichia coli* (EAEC) strains enter and survive within cultured intestinal epithelial cells. *Microb Pathog.* 2008;45:310-314.
- [6] Lai X, Xu J, Melgar S, Uhlin BE. An apoptotic response by J774 macrophage cells is common upon infection with diarrheagenic *Escherichia coli*. *FEMS Micr Lett.* 1999;172:29-34.
- [7] Guiney DG. The role of host cell death in *Salmonella* infections. *Curr Top Microb Immunol.* 2005; 289:131-50.

- [8] Abe CM, Knutton S, Pedroso MZ, Freymuller 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.
- [9] Konar M, Ghosh S. Enteroaggregative *Escherichia coli* induced increase in intracellular calcium concentration modulates cytoskeletal F-actin rearrangement and bacterial entry in INT-407 cells. *Microb Pathog.* 2012; 52(5):278-284.
- [10] Moal VL, Servina AL. Pathogenesis of human enterovirulent bacteria: lessons from cultured, fully differentiated human colon cancer cell lines. *Microb Mol Biol Rev.* 2013; 77(3):380-439.
- [11] Miao EA, Leaf IA, Treuting PM, Mao DP, Dors M, Sarkar A, Warren SE, Wewers MD, Aderem A. Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. *Nat Immun.* 2010; 11:1136-1142.
- [12] Poon IKH, Hulett MD, Parish CR. Molecular mechanisms of late apoptotic/necrotic cell clearance. *Cell Death Diff.* 2010; 17 (3):381-397.
- [13] Priya A, Kaur K, Bhattacharyya S, Chakraborti A, Ghosh S. Cell cycle arrest and apoptosis induced by enteroaggregative *Escherichia coli* in cultured human intestinal epithelial cells. *J Med Microb.* 2017; 66:217-225.
- [14] Hardy JA, Serrano BP, Eron SJ. Phosphorylation regulates apoptotic caspase function through diverse molecular mechanisms. *The FASEB J.* 2017; 31(1): 602-603.
- [15] Rosa ACP, Mariano AT, Pereira AMS, 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.

Table 1 Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC), prototype strain and their serotypes, phylogenetic groups, virulence factors and adherence patterns

Strains	Serotype ^a	Phylogenetic Group	Virulence factors ^b	Adherence Pattern ^c
H92/3	O86:H18	D	pAA*, <i>aggA</i> , <i>aggR</i> , <i>aap</i> , <i>fyuA</i> , <i>irp2</i> , <i>pic</i>	AA
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>	AA
042	O44:H18	D	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>	AA

^a O, somatic antigen polysaccharide; H, flagellar antigen

^b pAA, aggregative adherence plasmid; *aggA*, aggregative adherence fimbriae I; *aggR*, transcriptional regulator; *aap*, dispersin; *fyuA* and *irp2*, genes involved in iron caption; *pic*, protein involved in colonization; *agg3A*, aggregative adherence fimbriae III; *astA*, thermostable protein; *pet*, plasmid encoded toxin; *aafA*, aggregative adherence fimbriae II

* detection by hybridization with DNA probe

^c AA, aggregative adherence

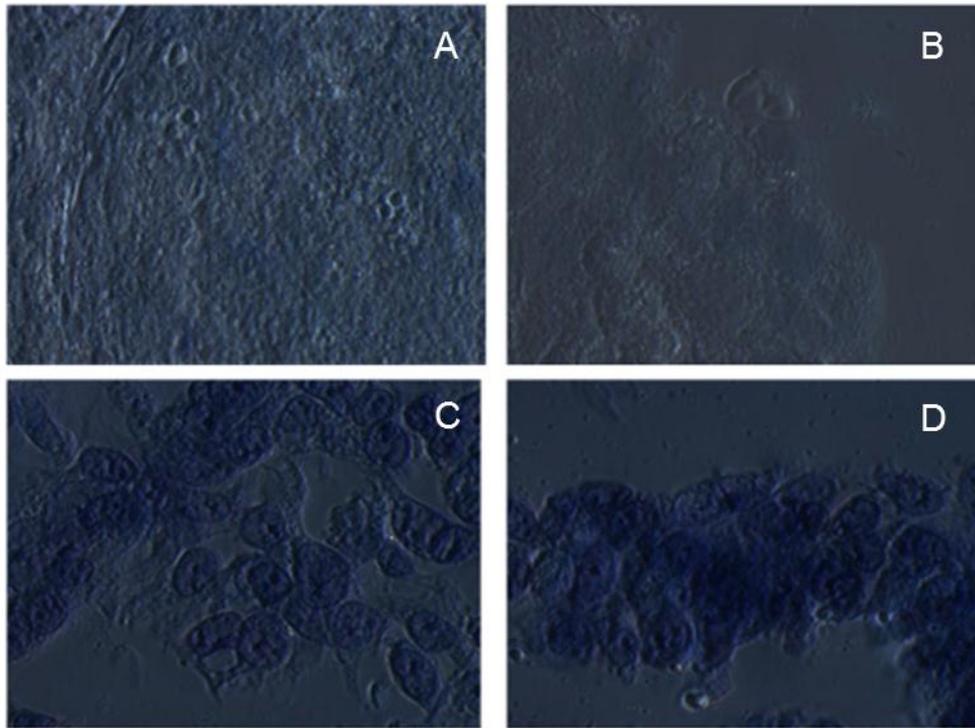


Figure 1. T84 cells colored with 0.5% trypan solution. Aspect of non-infected cells (A). Cells after interaction with EAEC I49/3 for 6, 16 and 24 hours of incubation, respectively (B, C and D). 1000X.

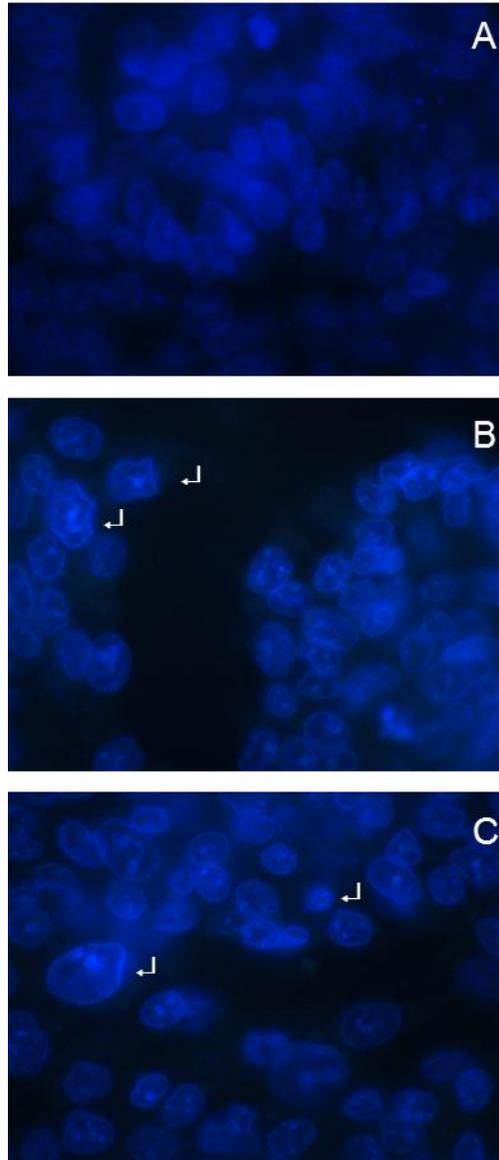


Figure 2. T84 cells died with DAPI after 16 hours of incubation with EAEC strains. Aspect of non-infected cells (A). Cells after interaction with EAEC H92/3 (B) and EAEC I49/3 (C) revealed nuclei with irregular aspect and condensed structures spread within nuclear membrane (↵). 1000X.

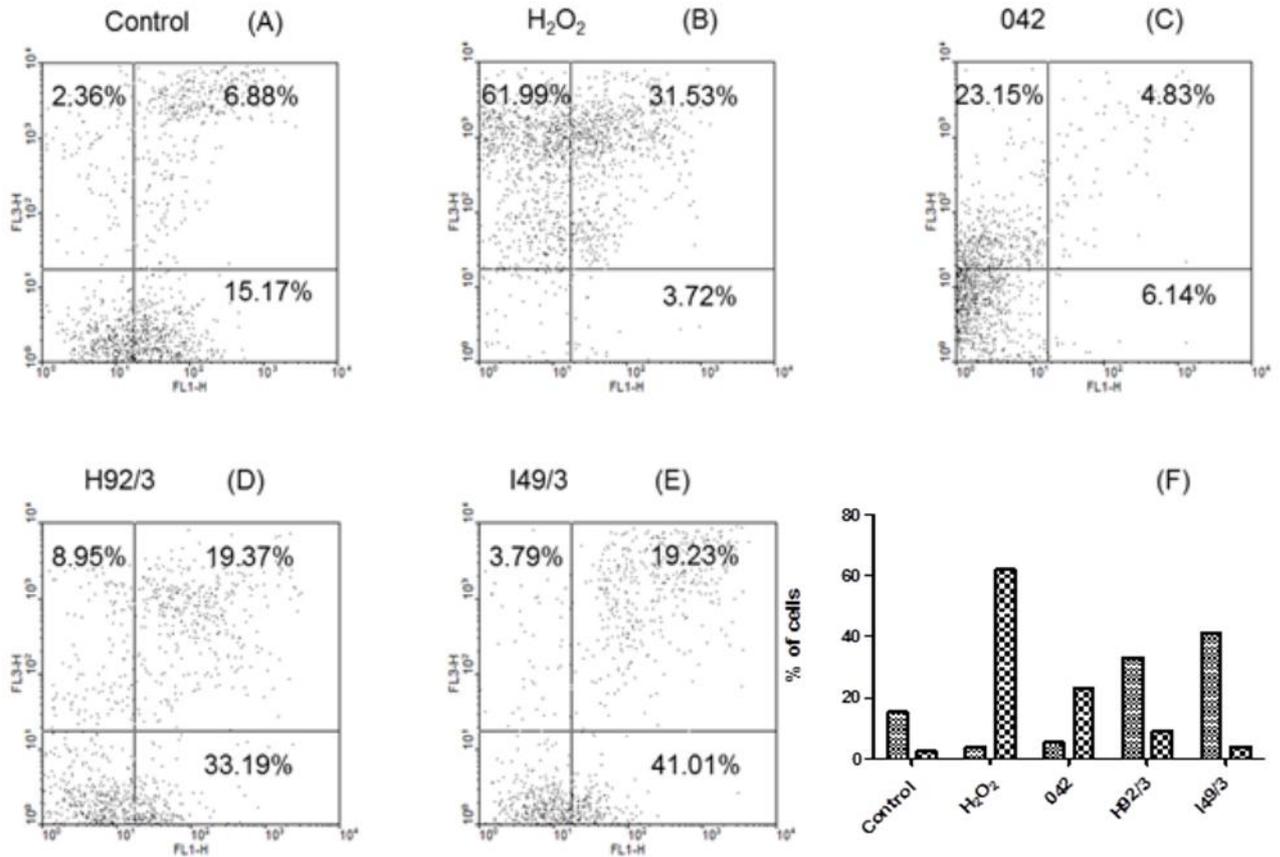


Figure 3. Flow cytometric analysis of phosphatidylserine externalization (Annexin V binding) and cell membrane integrity (PI staining) in T84 cells infected with EAEC H92/3 and I49/3 for 6 hours. (A) Control population; (B) H₂O₂ (positive control); (C) EAEC prototype 042; (D) EAEC H92/3; (E) EAEC I49/3; (F) Percentage of apoptotic () and necrotic () cells. The density plots combine Annexin V-FITC and PI fluorescence and show the viable cell population in the lower left quadrant (AnnexinV⁻/PI⁻), the early apoptotic cells in the lower right quadrant (AnnexinV⁺/PI⁻), the late apoptotic cells in the upper right quadrant (AnnexinV⁺/PI⁺), and the necrotic cells in the upper left quadrant (AnnexinV⁻/PI⁺).

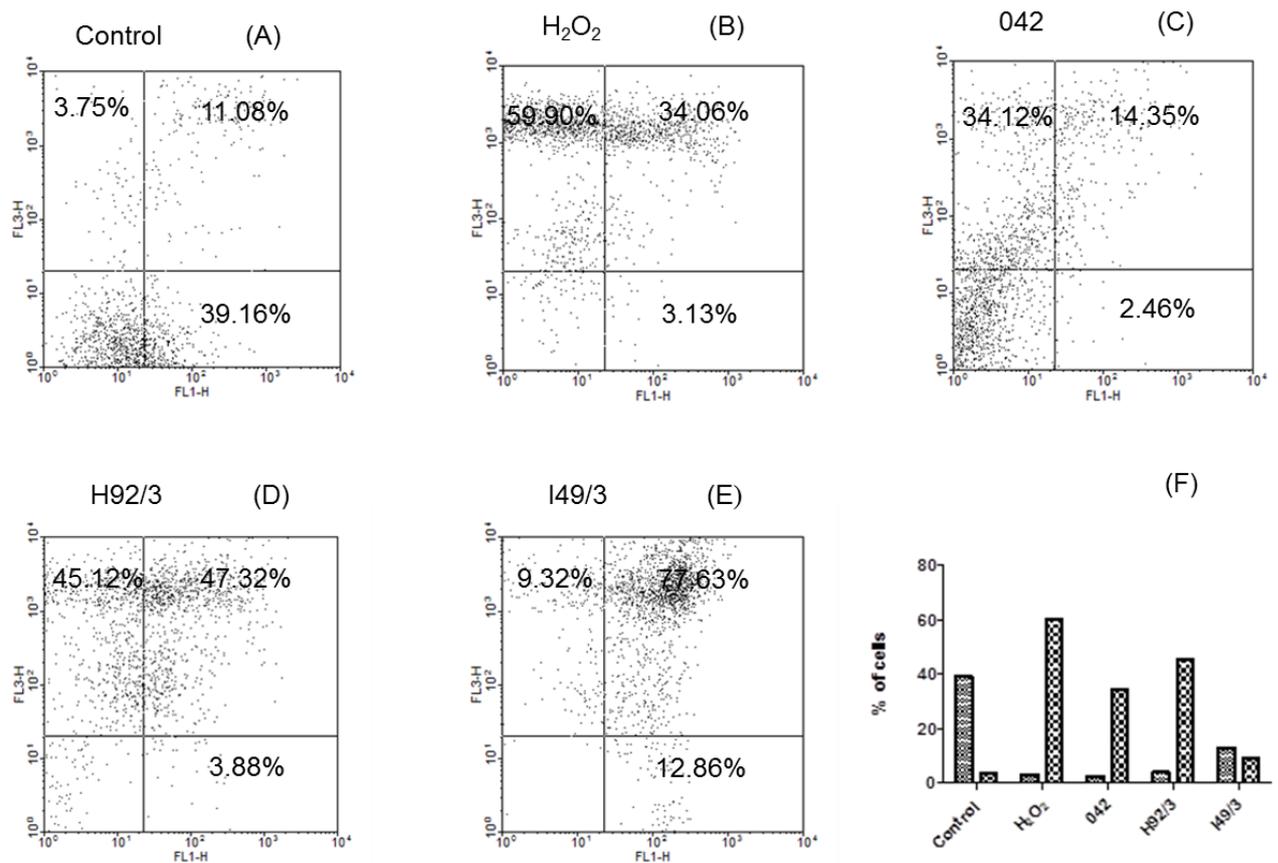


Figure 4. Flow cytometric analysis of phosphatidylserine externalization (Annexin V binding) and cell membrane integrity (PI staining) in T84 cells infected with EAEC H92/3 and I49/3 for 16 hours. (A) Control population; (B) H₂O₂ (positive control); (C) EAEC prototype 042; (D) EAEC H92/3; (E) EAEC I49/3; (F) Percentage of apoptotic (▨) and necrotic (■) cells. The density plots combine Annexin V-FITC and PI fluorescence and show the viable cell population in the lower left quadrant (AnnexinV⁻/PI⁻), the early apoptotic cells in the lower right quadrant (AnnexinV⁺/PI⁻), the late apoptotic cells in the upper right quadrant (AnnexinV⁺/PI⁺), and the necrotic cells in the upper left quadrant (AnnexinV⁻/PI⁺).

5 DISCUSSÃO

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 essa etapa o micro-organismo poderá invadir e/ou secretar toxinas, culminando no sucesso da colonização que resulta em infecção (LETOURNEAU et al., 2011).

Além dos modelos de aderência tradicionais a partir da utilização de linhagens celulares, o estudo de EAEC em modelos *in vitro/in vivo* em animais (YAMAMOTO et al., 1991; TZIPORI et al., 1992) e em IVOC em linhagens celulares (NATARO et al., 1996; ABE et al., 2001; HARRINGTON et al., 2005) ou em fragmentos intestinais humanos (YAMAMOTO et al., 1991; KNUTTON et al., 1992; HICKS; CANDY; PHILLIPS, 1996; NATARO et al., 1996; ABE et al., 2001; ANDRADE; FREYMÜLLER; FAGUNDES-NETO, 2011) têm sido amplamente utilizados por mimetizarem mais fidedignamente a ação de EAEC no hospedeiro (ANDRADE; FREYMÜLLER; FAGUNDES-NETO, 2011).

Deste modo, IVOC representa idealmente um bom modelo para o estudo da patogênese bacteriana em explantes intestinais que permanecem estruturalmente intactos por períodos de horas em cultura (HICKS; CANDY; PHILLIPS, 1996). Esta técnica tem utilizado biópsias de tecidos humanos, fragmentos de tecidos extraídos durante colonoscopias e até mesmo de animais.

No presente estudo, as cepas de EAEC desafiadas no modelo de coelho *ex vivo* conseguiram aderir a ambos os fragmentos intestinais, íleo e cólon, na análise por MEV e formaram agregados bacterianos com um padrão similar de "tijolos empilhados" aderidos diretamente ao epitélio com pontos isolados de muco em algumas cepas. Ainda assim, foi possível inferir um maior número de bactérias aderentes a fragmentos de cólon quando comparados aos fragmentos de íleo.

Estudos realizados por Yamamoto e colaboradores, em 1991, Knutton e colaboradores, em 1992, e Nataro e colaboradores, em 1996, são consistentes aos nossos. Yamamoto e colaboradores, em 1991, mostraram que a cepa EAEC O127:H2 exibiu níveis mais baixos de adesão à mucosa jejunal e ileal e maiores níveis de aderência à mucosa colônica fixada em formalina. Knutton e colaboradores, em 1992, ao analisarem uma coleção de cepas EAEC mostraram que todas as cepas aderiram ao cólon, mas não à mucosa

duodenal. Já Nataro e colaboradores, em 1996, dos explantes de mucosa do jejuno, do íleo e do cólon obtidos de pacientes pediátricos revelaram que o número de bactérias aderentes aos espécimes colônicos era significativamente maior do que o de bactérias aderentes aos espécimes do intestino delgado.

A adesão de EAEC ao intestino grosso, mas não à mucosa do intestino delgado humano, não só demonstra que EAEC possui propriedades enteroaderentes, mas também sugere que este pode ser o sítio preferencial de colonização deste patotipo. Entretanto, a falta de adesão à mucosa ileal pode ser reflexo da deficiência de receptores para EAEC (KNUTTON et al., 1992). Além disso, Kang e colaboradores, em 2001, sugeriram que o grau de diferenciação e de maturação celular também podem afetar a concentração de receptores e estas diferenças na expressão destes podem ter um papel crucial na determinação da região de ligação de EAEC.

Andrade e colaboradores, em 2011, analisando a interação de EAEC com fragmentos intestinais pediátricos e adultos de íleo e de cólon, demonstraram que todas as cepas aderiram a ambas as regiões avaliadas em uma camada de muco espessa e às vezes diretamente sobre a mucosa. Em todos os casos em que as cepas foram aderentes à mucosa em números significativos, fizeram-no em agregados com o padrão característico de "tijolos empilhados" semelhante ao observado em cultura de células HEp-2.

No presente estudo, foram observadas estruturas filiformes em todas as cepas, exceto o controle positivo, em maior número nos fragmentos de íleo em comparação com os de cólon. Os genes *aag* e *agg3* que codificam AAF/I e AAF/III, respectivamente, são fimbrias longas e flexíveis envolvidas na coesão de agregados bacterianos e na ligação com células intestinais (CZECZULIN et al., 1997; BERNIER; GOUNON; LE BOUGUENEC, 2002). Isso pode explicar porque essas estruturas foram observadas em nossas cepas e não foram encontradas na cepa EAEC 042, que tem uma fimbria curta e rígida.

Nossos resultados são consistentes com os estudos conduzidos por Andrade e colaboradores, em 2011, que observaram estruturas fimbriais não caracterizadas na superfície bacteriana que interagiram com os fragmentos de íleo humano, aparentemente mediando as interações entre bactérias-bactérias e bactérias-células. Pereira e colaboradores, em 2010, observaram que os agregados bacterianos que formam biofilmes na superfície abiótica foram mediados por pili flexível não formador de feixes e que o aumento da aderência pode ser mediado pelo pili F putativo expresso pelas cepas de EAEC. A cepa I18/2 não possui nenhum dos genes descritos para as fimbrias AAFs. Possivelmente, as estruturas visualizadas como filamentos poderiam ser uma nova variante de fimbria de aderência agregativa (AAF/V) como

sugerido recentemente por Jonsson e colaboradores, em 2015. Investigações mais aprofundadas são necessárias para melhor compreender o papel dessas estruturas na patogênese desse patótipo heterogêneo, já que uma grande diversidade de estruturas adesivas inclui adesinas afimbriais e fimbriais não caracterizadas.

Com base nos resultados obtidos pelo presente estudo consideramos que o modelo de interação com mucosa intestinal *ex vivo* de coelho representa uma ferramenta apropriada para a análise abrangente da virulência de EAEC. Novos estudos serão necessários para avaliar aspectos relacionados à invasão, persistência e ativação da resposta inflamatória utilizando esse modelo.

Uma característica comum entre as categorias de DEC é a capacidade de colonizar a mucosa intestinal, evadir do sistema imunológico, se multiplicar e causar danos ao tecido do hospedeiro (EDWARDS et al., 2011). A diarreia é o resultado de uma complexa interação patógeno-hospedeiro, e em diferentes contextos clínicos, as doenças induzidas por EAEC são acompanhadas pela ativação de uma resposta inflamatória (ROCHA-RAMÍREZ et al., 2016).

A patogenicidade das bactérias frequentemente inclui colonização, adesão ao trato intestinal e a capacidade de invadir e persistir dentro dos enterócitos (ABE et al., 2001). Um estudo anterior realizado em nosso laboratório demonstrou que EAEC invadiu e persistiu em células Caco-2 e T84 em períodos prolongados de incubação, de 6 a 72 horas (PEREIRA et al., 2008). No presente estudo, os ensaios de persistência intracelular mostraram que as mesmas cepas de EAEC são capazes de sobreviver em células T84 após 24 horas de incubação. As cepas testadas tiveram genótipos distintos com uma ampla gama de fatores de virulência e notamos que a cepa EAEC I49/3 que contém o gene *agg3A* da fimbria de aderência agregativa (AAF/III) apresentou maiores níveis de persistência (PEREIRA et al., 2008).

O epitélio intestinal contém grande parte do sistema imunológico presente no corpo humano e está constantemente exposto a muitos antígenos, que são derivados, entre outros, de alimentos e micro-organismos, incluindo a microbiota comensal ou patógenos invasores. Aproximadamente, 70% das células do sistema imunológico estão presentes no intestino e estão continuamente discriminando entre antígenos inofensivos e patogênicos (KIVIT et al., 2014).

A superfície da mucosa é uma barreira importante aos agentes patogênicos e pode ser representada por IECs no trato gastrintestinal. Além disso, as IECs são capazes de induzir uma resposta inflamatória após a infecção, recrutando e ativando células imunes, como neutrófilos e linfócitos T (KAWAI; AKIRA, 2011; KINNEBREW; PAMER, 2012).

As IECs respondem a muitos estímulos inflamatórios por secreção de citocinas e quimiocinas pró inflamatórias, como IL-8 (KHAN; KANG; STEINER, 2004). A IL-8 é uma das citocinas mais importantes que recruta neutrófilos para o local da infecção (BORISH; STEINKE, 2003). De acordo com nossos resultados, Harrington e colaboradores, em 2005, também observaram a regulação positiva do gene IL-8 em células T84 não-polarizadas infectadas com EAEC 042.

A regulação positiva de IL-8 por IECs infectadas também foi relatada por outros autores, utilizando diferentes sistemas: o pilus de EHEC (LEDESMA et al., 2010), EPEC (ZHOU et al., 2003; EDWARDS et al., 2011) e EAEC (KHAN; KANG; STEINER, 2004; HARRINGTON et al., 2005; EDWARDS et al., 2011; GUPTA et al., 2016; DIAS et al., 2016).

Outra citocina pró inflamatória é a IL-6, um potente indutor de proteínas de fase aguda e também conhecida por regular positivamente a maturação das células T e B. Além disso, o TNF- α atua sobre células endoteliais regulando positivamente as moléculas de adesão, permitindo que as células migrem para focos inflamatórios e também ativa os neutrófilos, aumentando a degranulação e a explosão respiratória, um potente mecanismo microbicida (BORISH; STEINKE, 2003). Em nosso estudo, as células T84 infectadas com cepas de EAEC produziram IL-8, IL-6 e TNF- α .

As cepas EAEC H92/3 e I49/3 e a cepa protótipo EAEC 042 possuem as AAFs e o regulador transcricional *aggR*, o que poderia explicar a alta produção de IL-8, IL-6 e TNF- α por células infectadas com T84, como observado anteriormente em diferentes cepas de EAEC também expressando *aggR* (CENNIMO et al., 2009). Cennimo e colaboradores, em 2009, usaram uma linhagem celular de adenocarcinoma intestinal humano, HCT-8, para determinar genes e respostas a citocinas de isolados de EAEC obtidos de pacientes adultos que se apresentaram a uma clínica de atendimento de emergência nos EUA. Os autores inferiram que EAEC positiva ao *aggR* provocou níveis mais elevados de IL-6, IL-8 e TNF- α em comparação com EAEC *aggR*-negativa. Além disso, os indivíduos infectados com EAEC contendo o gene *aggR* em conjunto com os genes *aap*, *aatA*, *astA*, *pet* e/ou *set* foram mais propensos a ter marcadores de inflamação presentes no exame de fezes. Esses achados sugerem que um ou mais desses genes podem ser um marcador de virulência e estão associados à inflamação durante a doença diarreica (CENNIMO et al., 2009). As cepas utilizadas no presente estudo possuem pelo menos dois, no máximo quatro desses genes ratificando nossos resultados.

A expressão coordenada e a regulação positiva de IL-8, IL-6, TNF- α e outras citocinas pró inflamatórias foram observadas por Bandyopadhaya e colaboradores, em 2007, na linhagem de células epiteliais intestinais Int407 após a infecção por *Vibrio cholerae*. Essas citocinas pró inflamatórias também mostraram expressão aumentada em células T84, com exceção de IL-6. Medeiros e colaboradores, em 2013, mostraram que a cepa EAEC 042 induziu a expressão de IL-8 e TNF- α , mas não de IL-6 e expressão reduzida de TGF β , na linhagem de células epiteliais intestinais IEC-6 nos primeiros estágios (180 minutos) de infecção. Recentemente, Gupta e colaboradores, em 2016, estudando EAEC com diferentes tipos de AAFs em biópsias duodenais utilizando o modelo de IVOC observaram uma expressão aumentada de IL-1 β , IL-8, IL-6 e TNF- α . Nossos resultados foram semelhantes, embora não tenhamos detectado alterações significativas na secreção de IL-1 β .

O óxido nítrico (NO), que é sintetizado em grandes quantidades pela atividade da NO sintase induzível (iNOS) sob condições fisiopatológicas, atua como um potente efetor do sistema imune inato, que desempenha um papel importante no desenvolvimento da inflamação e na defesa contra patógenos (VAREILLE et al., 2008). Observou-se a indução de NO por bactérias enteropatogênicas como *Salmonella* Dublin (CORNISH et al., 2002) e EHEC (VAREILLE et al., 2008). Embora não tenha sido observada a produção de NO por células T84 infectadas por EAEC em nosso sistema, também pode ser possível que a bactéria iniba sua produção como um mecanismo de escape do sistema imunológico. Investigações mais aprofundadas são necessárias para elucidar esta questão.

Estudos anteriores mostraram que as cepas de EAEC de diarreia aguda e persistente poderiam invadir células intestinais (ABE et al., 2001; PEREIRA et al., 2008). As cepas de EAEC invasoras podem persistir no interior das células intestinais e podem ser responsáveis por desencadear a morte celular programada, como a apoptose inicial ou tardia. Além disso, a presença de bactérias no citoplasma pode resultar em alterações severas da morfologia celular devido à mobilização do citoesqueleto e ao início do processo de morte da célula hospedeira (KONAR; GHOSH, 2012). Um estudo anterior realizado em nosso laboratório, demonstrou que cepas EAEC provenientes de casos de diarreia aguda foram caracterizadas como invasoras e persistentes em células Caco-2 e/ou T84 (PEREIRA et al., 2008). No presente estudo, selecionamos duas cepas invasoras EAEC H92/3 e I49/3 para avaliar a capacidade de induzir apoptose e necrose.

A interação entre células intestinais e bactérias pode resultar na redução da viabilidade celular (MOAL; SERVINA, 2013). Nossos achados incluíram a perda de células viáveis após a interação com as cepas de EAEC H92/3 e I49/3. Ambas as cepas testadas provocaram a

morte das células no período de 24 horas de incubação. Um estudo realizado com macrófagos revelou que as células infectadas com EAEC 042 apresentaram viabilidade reduzida após longos períodos de incubação, a qual pode ser consequência de danos celulares à membrana citoplasmática e nuclear (LAI et al., 1999). Nossos dados ratificam que as cepas de EAEC de casos de diarreia aguda podem invadir e alterar as funções celulares normais, causando a morte celular, a destruição de monocamadas de células e o destacamento celular.

Frequentemente, bactérias intracelulares podem causar danos à membrana nuclear eucariótica (MIAO et al., 2010). As modificações celulares, especialmente das membranas nucleares, foram observadas em monocamadas de células T84 infectadas com EAEC H92/3 e I49/3 após 16 horas de incubação. Isso sugere que essas cepas podem ter interagido com o DNA celular e induziram a modificações celulares. As células infectadas e apoptóticas são alvo de fagocitose por macrófagos, assim perpetuando o ciclo de disseminação célula a célula como descrito para a infecção sistêmica por *Salmonella* (GUINEY, 2005). Nossos resultados incluíram alteração da membrana citoplasmática e modificação da membrana nuclear, ambas indicam que as bactérias podem induzir apoptose e/ou necrose na linhagem celular intestinal T84, revelando o potencial patogênico de EAEC na mucosa colônica, uma vez que essas células são semelhantes aos enterócitos. Um estudo de DEC demonstrou que a cepa protótipo EAEC 042 causou citotoxicidade e fragmentação do DNA de macrófagos, além de apoptose em 50% das células infectadas (LAI et al., 1999).

Os patógenos invasores frequentemente induzem morte celular programada, este mecanismo protege o hospedeiro evitando a sobrevivência de muitas bactérias dentro da célula hospedeira. Além disso, as células apoptóticas e necróticas geralmente são fagocitadas por macrófagos para remover células mortas e a depuração de patógenos (POON; HULETT; PARISH, 2010). Como as cepas de EAEC podem induzir esses processos, isso pode contribuir para o espalhamento das bactérias para os macrófagos e outros sítios do hospedeiro porque as bactérias podem bloquear ou induzir apoptose/necrose quando necessário para a sua dispersão, já que esta categoria de *E. coli* foi vista dentro das células após 6 horas de incubação e persistiram após 72 horas de interação (PEREIRA et al., 2008). O presente estudo revelou que enquanto EAEC interage com monocamadas de células T84, muitas células foram destruídas por apoptose e/ou necrose. As modificações da membrana citoplasmática e nuclear reveladas por marcação com DAPI sugeriram que ambos os processos poderiam estar ocorrendo em células infectadas.

Assim, a citometria de fluxo foi realizada em células T84 infectadas com as duas cepas de EAEC invasoras e a cepa protótipo EAEC 042. Observamos que as células

infectadas apresentaram apoptose nos ensaios iniciais de 6 horas e que a apoptose foi predominante, quando comparamos os níveis de apoptose e necrose. Após 16 horas, observamos que as células T84 infectadas apresentaram apoptose tardia, porém a necrose foi predominante nas células infectadas por EAEC H92/3 e a apoptose nas células infectadas por EAEC I49/3. Todas as células infectadas apresentaram baixo nível de células viáveis após 16 horas de incubação. Esses achados, juntamente com outros estudos, demonstraram a capacidade de EAEC interferir nas funções normais das células hospedeiras, ambos macrófagos e enterócitos (LAI et al., 1999; PRIYA et al., 2017) e revela o potencial de EAEC de induzir a morte celular aumentando a virulência dos micro-organismos. As células infectadas com a cepa protótipo EAEC 042 exibiram necrose, entretanto, o nível de células viáveis foi significativo. Este evento pode sugerir o comportamento heterogêneo de EAEC em relação aos mecanismos envolvidos na morte das células hospedeiras. Como visto para *Salmonella*, a indução de apoptose pode ocorrer pela associação entre as estruturas ou proteínas presentes no citoplasma, como caspases. Neste modelo de infecção: filamentos de actina e microtúbulos associados a proteínas iniciais das caspases desencadeiam a apoptose (GUINEY, 2005; HARDY; SERRANO; ERON, 2017). Uma vez que as cepas EAEC invasoras podem romper as células e alterar a sua morfologia, pode ser um sinal de que o citoesqueleto das células desempenha um papel importante durante a infecção, persistência e morte celular.

Adicionalmente, concluímos que as cepas de EAEC invasoras podem causar perda da viabilidade em monocamadas de células, demonstrando danos ao núcleo de células T84, como por exemplo, a cromatina condensada, a apoptose e a necrose, com a maioria das células infectadas apresentando apoptose tardia; entretanto, difere da cepa protótipo EAEC 042 que induziu necrose. Nossas cepas de EAEC demonstraram um conjunto de propriedades de virulência que incluem a capacidade de adesão, invasão, persistência e indução de mecanismos de morte celular programada que revelam uma importante via utilizada por este patótipo para permanecer ou se dispersar nas células do hospedeiro.

CONCLUSÕES

- a) O modelo pioneiro de IVOC em coelho é ideal como ferramenta para o estudo e a investigação dos mecanismos de patogênese de EAEC, ainda pouco elucidados, uma vez que se aproxima das condições *in vivo*;
- b) Embora todas as cepas aderiram a ambos os fragmentos intestinais, íleo e cólon, o maior tropismo pelo epitélio colônico de coelho indica o sítio preferencial de aderência de EAEC para manifestação da doença;
- c) A persistência de EAEC em linhagem celular intestinal T84 simula a sua sobrevivência intracelular *in vivo* nos enterócitos, que contribui para a manutenção da bactéria no intestino, possivelmente influenciando a evolução do quadro diarreico para diarreia persistente e/ou crônica;
- d) A regulação positiva de mediadores inflamatórios, como as citocinas IL-8, IL-6 e TNF- α , demonstra o arsenal de defesa inata inicialmente estabelecido em linhagem celular intestinal T84 para debelar a infecção por EAEC no intestino, resultando em inflamação;
- e) Em nosso sistema a ausência de alterações significativas quanto a dosagem de óxido nítrico em linhagem celular intestinal T84 demonstra que EAEC pode inibir sua produção como um mecanismo estratégico de escape do sistema imunológico para a sua sobrevivência;
- f) A perda da viabilidade celular e as modificações das membranas citoplasmática e nuclear observadas em linhagem celular intestinal T84 demonstram que EAEC pode desencadear processos apoptóticos e/ou necróticos, ratificando seu comportamento heterogêneo em relação aos mecanismos de morte, do mesmo modo que revela seu potencial de incremento de virulência.

REFERÊNCIAS

- ABE, C. M. et al. An enteroaggregative *Escherichia coli* strain of serotype O111:H12 damages and invades cultured T84 cells and human colonic mucosa. *FEMS Microbiol Lett.*, v. 203, p. 199-205, 2001.
- ABREU, A. G. et al. The serine protease pic from enteroaggregative *Escherichia coli* mediates immune evasion by the direct cleavage of complement proteins. *J Infect Dis.*, v. 212, p. 206-215, 2015.
- AKTER, S. et al. Prevalence and distribution of different diarrhoeagenic *Escherichia coli* virulotypes in major water bodies in Bangladesh. *Epidemiol. Infect.*, v. 141, p. 2516-2525, 2013.
- ANDRADE, F. B.; GOMES, T. A. T.; ELIAS, W. P. A sensitive and specific molecular tool for detection of both typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Microbiol Methods.*, v. 106, p. 16-18, 2014.
- ANDRADE, J. A. B.; 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.*, v. 48, n.3, p. 199-204, 2011.
- ARENAS-HERNÁNDEZ, M. M. P.; MARTÍNEZ-LAGUNA, Y.; TORRES, A. G. Clinical implications of enteroadherent *Escherichia coli*. *Curr Gastroenterol Rep.*, v. 14, n.5, p. 386-394, 2012.
- ASCHTGEN, M. S. et al. SciN is an outer membrane lipoprotein required for type VI secretion in enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Bacteriol.*, v. 190, p. 7523-7531, 2008.
- BANDYOPADHAYA, A.; SARKAR, M.; CHAUDHURI, K. Transcriptional upregulation of inflammatory cytokines in human intestinal epithelial cells following *Vibrio cholerae* infection. *FEBS J.*, v. 274, n. 17, p. 4631-4642, 2007.
- BANGAR, R.; MAMATHA, B. Identification of enteroaggregative *Escherichia coli* in infants with acute diarrhea based on biofilm production in Manipal, South India. *Indian J Med Sci.*, v. 62, p. 8-12, 2008.
- BAUDRY, B. et al. A sensitive and specific DNA probe to identify enteroaggregative *Escherichia coli*, a recently discovered diarrheal pathogen. *J Infect Dis.*, v. 161, p. 1249-1251, 1990.
- BENJAMIN, P; FEDERMAN, M; WANKE, C. A. Characterization of an invasive phenotype associated with enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun.*, v. 63, p. 3417-3421, 1995.
- BERNIER, C.; GOUNON, P.; LE BOUGUENEC, C. Identification of an aggregative adhesion fimbriae (AAF) type III-encoding operon in enteroaggregative *Escherichia coli* as a

- sensitive probe for detecting the AAF-encoding operon family. *Infect Immun.*, v. 70, p. 4302-4311, 2002.
- BOISEN, N. et al. New adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF family. *Infect Immun.*, v. 76, p. 3281-3292, 2008.
- BOISEN, N. et al. Short report: high prevalence of serine protease autotransporter cytotoxins among strains of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Am J Trop Med Hyg.*, v. 80, n. 2, p. 294-301, 2009.
- BOISEN, N. et al. Genomic characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* from children in Mali. *J Infect Dis.*, v. 205, p. 431-444, 2012.
- BOLL, E. J. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* adherence fimbriae drive inflammatory cell recruitment via interactions with epithelial MUC1. *MBio.*, v. 8, n. 3, p. pii: e00717-17, 2017.
- BORISH, L. C.; STEINKE, J. W. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol.*, v. 111, p. S460-S475, 2003.
- CAMPODÓNICO, V. L. et al. Airway epithelial control of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *Trends Mol Med.*, v. 14, p. 120-133, 2008.
- CENNIMO, D. et al. The prevalence and virulence characteristics of enteroaggregative *Escherichia coli* at an urgent-care clinic in the USA: a case-control study. *J Med Microbiol.*, v. 58, n. Pt 4, p. 403-407, 2009.
- CHATTAWAY, M. A. et al. Investigating the link between the presence of enteroaggregative *Escherichia coli* and infectious intestinal disease in the United Kingdom, 1993 to 1996 and 2008 to 2009. *Euro Surveill.*, v. 18, n. 37, p. pii=20582, 2013.
- CHAUDHURI, R. R. et al. Complete genome sequence and comparative metabolic profiling of the prototypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain 042. *Plos One*, v. 5, p. e8801, 2010.
- CHOWDHURY, F. et al. Diarrheal illness and healthcare seeking behavior among a population at high risk for diarrhea in Dhaka, Bangladesh. *PLoS One*, v. 10, p. e0130105, 2015.
- CLASEN, T. F. et al. Interventions to improve water quality for preventing diarrhoea. *Cochrane Database Syst Rev.*, n. 10, p. 1-201, 2015.
- CLEMENTS, A. et al. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes*, v. 3, n. 2, p. 71-87, 2012.
- COBELJIC', M. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with an outbreak of diarrhoea in a neonatal nursery ward. *Epidemiol Infect.*, v. 117, p. 11-16, 1996.
- CORDEIRO, F. et al. Evaluation of a multiplex PCR for identification of enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.*, v. 46, p. 828-829, 2008.

- CORNISH, A. S. et al. Peroxynitrite enhances the ability of *Salmonella dublin* to invade T84 monolayers. *Shock.*, v. 18, n. 1, p. 93-96, 2002.
- COSTA, A. F. E. et al. Group B *Streptococcus* serotypes III and V induce apoptosis and necrosis of human epithelial A549 cells. *Intern J Mol Med.*, v. 27, p. 739-744, 2011.
- CZECZULIN, J. R. et al. Aggregative adherence fimbriae II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun.*, v. 65, p. 4135-4145, 1997.
- CZECZULIN, J. R. et al. Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. *Infect Immun.*, v. 67, p. 2692-2699, 1999.
- DIAS, R. C. et al. Diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes investigation revealed atypical enteropathogenic *E. coli* as putative emerging diarrheal agents in children living in Botucatu, São Paulo State, Brazil. *APMIS.*, v. 124, n. 4, p. 299-308, 2016.
- DUDLEY, E. G. et al. An IncII plasmid contributes to the adherence of the atypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain C1096 to cultured cells and abiotic surfaces. *Infect Immun.*, v. 74, p. 2102-2114, 2006.
- DUDLEY, E. G. et al. Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a *pheU* pathogenicity island in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.*, v. 61, p. 1267-1282, 2006.
- DUPONT, H. L. Persistent diarrhea. A clinical review. *JAMA.*, v. 315, n. 24, p. 2712-2723, 2016.
- DURRER, P. et al. Intestinal infection due to enteroaggregative *Escherichia coli* among human immunodeficiency virus-infected persons. *J Infect Dis.*, v. 182, p. 1540-1544, 2000.
- EDWARDS, L. A. et al. Bacterial epithelial contact is a key determinant of host innate immune responses to enteropathogenic and enteroaggregative *Escherichia coli*. *PLoS One.*, v. 6, p. e27030, 2011.
- ESLAVA, C. et al. Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun.*, v. 66, p. 3155-3163, 1998.
- ESTRADA-GARCIA, T. et al. Enteroaggregative *coli*: a pathogen bridging the north and south. *Curr Trop Med Rep.*, v. 1, n.2, p. 88-96, 2014.
- FARTHING, M. et al. Acute diarrhea in adults and children: a global perspective. *J Clin Gastroenterol.*, v. 47, p. 12-20, 2013.
- GASSAMA-SOW, A. et al. Characterization of pathogenic *Escherichia coli* in human immunodeficiency virus-related diarrhea in Senegal. *J Infect Dis.*, v. 189, p. 75-78, 2004.
- GOMES, T. A. T. et al. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Braz J Microbiol.*, v. 47, n. Suppl 1, p. 3-30, 2016.

- GUERRANT, R. L. et al. Diarrhea in developed and developing countries: magnitude, special settings, and etiologies. *Cochrane Database Syst Rev.*, n.10, p. CD004794, 2015.
- GUIGNOT, J. et al. The secreted autotransporter toxin, Sat, functions as a virulence factor in Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* by promoting lesions in tight junction of polarized epithelial cells. *Cell Microbiol.*, v. 9, p. 204-221, 2007.
- GUINEY, D. G. The role of host cell death in *Salmonella* infections. *Curr Top Microb Immunol.*, v. 289, p. 131-150, 2005.
- GUPTA, D. et al. Virulence determinants in enteroaggregative *Escherichia coli* from North India and their interaction in *in vitro* organ culture system. *FEMS Microbiol Lett.*, v. 363, n. 17, p. pii: fnw189, 2016.
- HARDY, J. A.;SERRANO, B. P.; ERON, S. J. Phosphorylation regulates apoptotic caspase function through diverse molecular mechanisms. *FASEB J.*, v. 31, n. 1, p. 602-603, 2017.
- HARRINGTON, S. M. et al. Aggregative adherence fimbriae contribute to the inflammatory response of epithelial cells infected with enteroaggregative *Escherichia coli*. *Cell Microbiol.*, v. 7, p. 1565-1578, 2005.
- HARRINGTON, S. M. et al. The Pic protease of enteroaggregative *Escherichia coli* promotes intestinal colonization and growth in the presence of mucin. *Infect Immun.*, v. 77, p. 2465-2473, 2009.
- HAVT, A. et al. Prevalence and virulence gene profiling of enteroaggregative *Escherichia coli* in malnourished and nourished Brazilian children. *Diagn Microbiol Infect Dis.*, v. 89, n.2, p. 98-105, 2017.
- HEBBELSTRUP JENSEN, B. et al. Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.*, v. 27, n. 3, p. 614-630, 2014.
- HEBBELSTRUP JENSEN, B. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* in daycare-a 1-year dynamic cohort study. *Front Cell Infect Microbiol.*, v. 6, p. 75, 2016.
- HEBBELSTRUP JENSEN, B. et al. Genetic virulence profile of enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from Danish children with either acute or persistent diarrhea. *Front Cell Infect Microbiol.*, v. 7, p. 230, 2017.
- HENDERSON, I. R. et al. Characterization of pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun.*, v. 67, p. 5587-5596, 1999.
- HERZOG, K.; ENGELER DUSEL, J.; HUGENTOBLER, M. Diarrheagenic enteroaggregative *Escherichia coli* causing urinary tract infection and bacteremia leading to sepsis. *Infect.*, v. 42, p. 441-444, 2014.
- HICKS, S.; CANDY, D. C.; PHILLIPS, A. D. Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa *in vitro*. *Infect Immun.*, v. 64, p. 4751-4760, 1996.

HUANG, D. B. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli*: an emerging enteric pathogen. *Am J Gastroenterol.*, v. 99, p. 383-389, 2004.

HUANG, D. B. et al. A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Med Microbiol.*, v. 55, p. 1303-1311, 2006.

IKUMAPAYI, U. N. et al. Identification of subsets of enteroaggregative *Escherichia coli* associated with diarrheal disease among under 5-year-old children from rural Gambia. *Am J Trop Med Hyg.*, Aug 7, 2017. doi: 10.4269/ajtmh.16-0705. [Epub ahead of print].

ITOH, Y. et al. Laboratory investigation of enteroaggregative *Escherichia coli* O untypeable:H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness. *J Clin Microbiol.*, v. 35, p. 2546-2550, 1997.

JAFARI, A.; ASLANI, M. M.; BOUZARI, S. Enteroaggregative *Escherichia coli*, a heterogeneous, underestimated and under-diagnosed *E. coli* pathotype in Iran. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.*, v. 6, n. 2, p. 71-79, 2013.

JIANG, Z. D. et al. Rate of occurrence and pathogenic effect of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in international travelers. *J Clin Microbiol.*, v. 40, p. 4185-4190, 2002.

JONSSON, R. et al. Novel aggregative adherence fimbria variant of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun.*, v. 83, p. 1396-1405, 2015.

JONSSON, R. et al. A novel pAA virulence plasmid encoding toxins and two distinct variants of the fimbriae of Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Front Microbiol.*, v. 8, p. 263, 2017.

JONSSON, R. et al. Structural and functional studies of *Escherichia coli* aggregative adherence fimbriae (AAF/V) reveal a deficiency in extracellular matrix binding. *Biochim Biophys Acta.*, v. 1865, n. 3, p.304-311, 2017.

KANG, G. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* infection in a rabbit model. *Pathology*, v. 33, n. 3, p. 341-346, 2001.

KAUR, P.; CHAKRABORTI, A.; ASEA, A. Enteroaggregative *Escherichia coli*: an emerging enteric food borne pathogen. *Interdiscip Perspect Infect Dis.*, p. 1-10, 2010.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 2011, v. 34, p. 637-650, 2011.

KHAN, M. A.; KANG, J.; STEINER, T. S. Enteroaggregative *Escherichia coli* flagellin-induced interleukin-8 secretion requires Toll-like receptor 5-dependent p38 MAP kinase activation. *Immunology.*, v. 112, n. 4, p. 651-660, 2004.

KINNEBREW, M. A.; PAMER, E. G. Innate immune signaling in defense against intestinal microbes. *Immunol Rev.*, v. 245, p. 113-131, 2012.

KIVIT, S. et al. Regulation of intestinal immune responses through TLR activation: implications for pro- and prebiotics. *Front Immunol.*, v. 5, p. 60, 2014.

KNUTTON, S. et al. Ability of enteroaggregative *Escherichia coli* strains to adhere *in vitro* to human intestinal mucosa. *Infect Immun.*, v. 60, p. 2083-2091, 1992.

KONAR, M.; GHOSH, S. Enteroaggregative *Escherichia coli* induced increase in intracellular calcium concentration modulates cytoskeletal F-actin rearrangement and bacterial entry in INT-407 cells. *Microb Pathog.*, v. 52, n. 5, p. 278-284, 2012.

KOO, H. L. et al. Coliform contamination of vegetables obtained from popular restaurants in Guadalajara, Mexico, and Houston, Texas. *Clin Infect Dis.*, v. 47, p. 218-221, 2008.

LAI, X. et al. An apoptotic response by J774 macrophage cells is common upon infection with diarrheagenic *Escherichia coli*. *FEMS Micr Lett.*, v. 172, p. 29-34, 1999.

LAI, X-H et al. Macrophage cell death upon intracellular bacterial infection. *Macrophage*, v. 2, p. e779, 2015.

LEDESMA, M. A. et al. The hemorrhagic coli pilus (HCP) of *Escherichia coli* O157:H7 is an inducer of proinflammatory cytokine secretion in intestinal epithelial cells. *Plos One*. 2010; v. 5, n. 8, p. e12127, 2010.

LETOURNEAU, J. et al. *In vitro* assay of bacterial adhesion onto mammalian epithelial cells. *J Vis Exp.*, v. 51, p. e2783, 2011.

LIMA, I. F. N. et al. Prevalence of enteroaggregative *Escherichia coli* and its virulence-related genes in a case-control study among children from north-eastern Brazil. *J Med Microbiol.*, v. 62, n. Pt 5, p. 683-693, 2013.

LIN, C-F et al. Different types of cell death induced by enterotoxins. *Toxins*, v. 2, n. 8, p. 2158-2176, 2010.

MARA, D. et al. Sanitation and health. *PLoS Med.*, v. 7, p. e1000363, 2010.

MEDEIROS, P. et al. The micronutrient zinc inhibits EAEC strain 042 adherence, biofilm formation, virulence gene expression, and epithelial cytokine responses benefiting the infected host. *Virulence*, v. 4, n. 7, p. 624-633, 2013.

MÉNARD, L.P.; DUBREUIL, J. D. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1): a new toxin with an old twist. *Crit Rev Microbiol.*, v. 28, p. 43-60, 2002.

MIAO, E. A. et al. Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. *Nat Immun.*, v. 11, p. 1136-1142, 2010.

MIRI, S. T. et al. Identification of different *Escherichia coli* pathotypes in north and north-west provinces of Iran. *Iran J Microbiol.*, v. 9, n. 1, p. 33-37, 2017.

MOAL, V. L.; SERVINA, A. L. Pathogenesis of human enterovirulent bacteria: lessons from cultured, fully differentiated human colon cancer cell lines. *Microb Mol Biol Rev.*, v. 77, n. 3, p. 380-439, 2013.

- MOHAMED, J. A. et al. Association of putative enteroaggregative *Escherichia coli* virulence genes and biofilm production in isolates from travelers to developing countries. *J Clin Microbiol.*, v. 45, p. 121-126, 2007.
- MONTEIRO-NETO, V. et al. Characterization of an outer membrane protein associated with haemagglutination of adhesive properties of enteroaggregative *Escherichia coli* O111:H12. *Cell Microbiol.*, v. 5, p. 533-547, 2003.
- MURAKAMI, H.; MASUI, H. Hormonal control of human colon carcinoma cell growth in serum-free medium. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 77, p. 3464-3468, 1980.
- NATARO, J. P. et al. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to Hep-2 cells. *Pediatr Infect Dis J.*, v. 6, p. 829-831, 1987.
- NATARO, J. P. et al. Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. *Infect Immun.*, v. 60, p. 2297-304, 1992.
- NATARO, J. P. et al. T84 cells in culture as a model for enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. *Infect Immun.*, v. 64, p. 4761-4768, 1996.
- NAVARRO-GARCÍA, F et al. Cytoskeletal effects induced by pet, the serine protease enterotoxin of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun.*, v. 67, p. 2184-2192, 1999.
- NIEMANN, H. H.; SCHUBERT, W. D.; HEINZ, D. W. Adhesins and invasins of pathogenic bacteria: a structural view. *Microbes Infect.*, v. 6, p. 101-112, 2004.
- OKEKE, I. N.; NATARO, J. P. Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Lancet Infect Dis.*, v. 1, p. 304-313, 2001.
- OKHUYSEN, P. C.; DUPONT, H. L. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC): a cause of acute and persistent diarrhea of worldwide importance. *J Infect Dis.*, v. 202, p. 503-505, 2010.
- OLESEN B. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* O78:H10, the cause of an outbreak of urinary tract infection. *J Clin Microbiol.*, v. 50, p. 3703-3711, 2012.
- OUNDO, J. O. et al. High incidence of enteroaggregative *Escherichia coli* among food handlers in three areas of Kenya: a possible transmission route of travelers' diarrhea. *J Travel Med.*, v. 15, p. 31-38, 2008.
- PAWLOWSKI, S. W.; WARREN, C. A.; GUERRANT, R. Diagnosis and treatment of acute or persistent diarrhea. *Gastroenterology*, v. 136, p. 1874-1886, 2009.
- PEREIRA, A. C. M. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) strains enter and survive within cultured intestinal epithelial cells. *Microb Pathog.*, v. 45, p. 310-314, 2008.
- PEREIRA, A. L. et al. Diarrhea-associated biofilm formed by enteroaggregative *Escherichia coli* and aggregative *Citrobacter freundii*: a consortium mediated by putative F pili. *BMC Microbiol.*, v. 10, p. 57, 2010.

PHILIPSON, C. W.; BASSAGANYA-RIERA, J.; HONTECILLAS, R. Animal models of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. *Gut Microbes*, v. 4, n. 4, p. 281-291, 2013.

PLATTS-MILLS, J. A. et al. Association between enteropathogens and malnutrition in children aged 6-23 mo in Bangladesh: a case-control study. *Am J Clin Nutr.*, v. 105, n. 5, p. 1132-1138, 2017.

POON, I. K.H.; HULETT, M. D.; PARISH, C. R. Molecular mechanisms of late apoptotic/necrotic cell clearance. *Cell Death Diff.*, v. 17, n.3, p. 381-397, 2010.

PRIYA, A. et al. Cell cycle arrest and apoptosis induced by enteroaggregative *Escherichia coli* in cultured human intestinal epithelial cells. *J Med Microb.*, v. 66, p. 217-225, 2017.

PUÑO-SARMIENTO, J. et al. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats in Brazil. *Vet Microbiol.*, v. 166, p. 676-680, 2013.

REGUA-MANGIA A. H. et al. 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.*, v. 58, p. 414-422, 2009.

ROCHA-RAMÍREZ, L. M. et al. Pet serine protease from enteroaggregative *Escherichia coli* stimulates the inflammatory response activating human macrophages. *BMC Microbiol.*, v. 16, n. 1, p. 158, 2016.

ROGAWSKI, E. T. et al. Epidemiology of enteroaggregative *Escherichia coli* infections and associated outcomes in the MAL-ED birth cohort. *PLoS Negl Trop Dis.*, v. 11, n. 7, p. e0005798, 2017.

SALMANI, H et al. Pathotypic and phylogenetic study of diarrheagenic *E. coli* and uropathogenic *E. coli* using multiplex polymerase chain reaction. *Jundishapur J Microbiol.*, v. 9, p. e28331, 2016.

SCHMIDT, H. et al. Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.*, v. 33, p. 701-705, 1995.

SCHUBERT, S. et al. Prevalence of the “High-pathogenicity island” of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. *Infect and Immun.*, v. 66, n. 2, p. 480-485, 1998.

SHEIKH, J. et al. A novel dispersin protein in enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Clin Invest.*, v. 110, p. 1329-1337, 2002.

SHEN, H. et al. The 12 gastrointestinal pathogens spectrum of acute infectious diarrhea in a sentinel hospital, Shenzhen, China. *Front. Microbiol.*, v. 7, p. 1926, 2016.

SHIN, J. et al. An outbreak of foodborne illness caused by enteroaggregative *Escherichia coli* in a high school in South Korea. *Jpn J Infect Dis.*, v. 68, p. 514-519, 2015.

- SIDHU, J. P. S. et al. Occurrence of virulence genes associated with diarrheagenic pathotypes in *Escherichia coli* isolates from surface water. *Appl Environ Microbiol.*, v. 79, p. 328-335, 2013.
- STEINER, T. S. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* produce intestinal inflammation and growth impairment and cause interleukin-8 release from intestinal epithelial cells. *J Infect Dis.*, v. 177, p. 88-96, 1998.
- SUZUKI, T.; SASAKAWA, H. Molecular basis of the intracellular spreading of *Shigella*. *Infect Immun.*, v. 69, n. 10, p. 5959-5966, 2001.
- TELLI, M. et al. Prevalence of enterotoxins among *Escherichia coli* isolates causing bacteraemia. *FEMS Microbiol Lett.*, v. 306, p. 117-121, 2010.
- TOMAR, B. S. Intestinal infections. *Indian J Pediatr.*, v. 68, p. 8-18, 2001.
- TRIBBLE, D. R. Resistant pathogens as causes of traveller's diarrhea globally and impact(s) on treatment failure and recommendations. *J Travel Med.*, v. 24, n.suppl_1, p. S6-S12, 2017.
- TRUNG, N. V. et al. Colonization of Enteroaggregative *Escherichia coli* and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in chickens and humans in southern Vietnam. *BMC Microbiol.*, v. 16, n. 1, p. 208, 2016.
- TZIPORI, S. et al. Studies with enteroaggregative *Escherichia coli* in the gnotobiotic piglet gastroenteritis model. *Infect Immun.*, v. 60, p. 5302-5306, 1992.
- UNICEF Data: Monitoring the Situation of Children and Women. [updated feb 2017]
Disponível em: <<https://data.unicef.org/topic/child-health/diarrhoeal-disease/>>. Acesso em: 08 jun. 2017.
- VAREILLE, M. et al. Heme oxygenase-1 is a critical regulator of nitric oxide production in enterohemorrhagic *Escherichia coli*-infected human enterocytes. *J Immunol.*, v. 180, n. 8, p. 5720-5726, 2008.
- VASUDEVAN, P. et al. Behavior of enteroaggregative *Escherichia coli* in bottled spring and mineral water. *J Food Prot.* 2003; v. 66, p. 497-500, 2003.
- VILA, J. et al. Diarrea del viajero. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2016; 34(9):579-584.
- WANG, L. et al. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in foods and fecal specimens obtained from cattle, pigs, chickens, asymptomatic carriers, and patients in Osaka and Hyogo, Japan. *Jpn J Infect Dis.*, v. 70, n. 4, p. 464-469, 2017.
- WEINTRAUB, A. Enteroaggregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. *J Med Microbiol.*, v. 56, p. 4-8, 2007.
- YAMAMOTO, T. et al. Characteristics of adherence of enteroaggregative *Escherichia coli* to human and animal mucosa. *Infect Immun.*, v. 59, n. 10, p. 3722-3739, 1991.

YÁÑEZ, D. et al. The role of fibronectin in the adherence and inflammatory response induced by enteroaggregative *Escherichia coli* on epithelial cells. *Front Cell Infect Microbiol.*, v. 6, p. 166, 2016.

YANG, S. C. et al. Current pathogenic *Escherichia coli* foodborne outbreak cases and therapy development. *Arch Microbiol.*, v. 199, n.6, p. 811-825, 2017.

YATES, J. Traveler's Diarrhea. *American Family Physician*, v. 71, n. 11, p. 2095-2100, 2005.

YU, S.; GAO, N. Compartmentalizing intestinal epithelial cell toll like receptors for immune surveillance. *Cell Mol Life Sci.*, v. 72, n. 17, p. 3343-3353, 2015.

ZHOU, X. et al. Flagellin of enteropathogenic *Escherichia coli* stimulates interleukin-8 production in T84 cells. *Infect Immun.*, v. 71, n. 4, p. 2120-2129, 2003.

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



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº CEA/007/2009 sobre "Análise da interação de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) com diferentes sítios do trato digestivo de coelhos *in vivo*", 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 16/03/2009. Este certificado expira em 16/03/2013.

Rio de Janeiro, 16 de Março de 2009.

Prof. Israel Felzenszwalb
CEA/IBRAG/UERJ

Profa. Patricia Cristina Lisboa
CEA/IBRAG/UERJ

Profª Dra. Patricia Cristina Lisboa da Silva
Profª Adj. de Dept. Ciências Fisiológicas / IBRAG / UERJ
Matrícula 34765-8

Ass