

**Universidade de Brasília
Instituto de Biologia
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular**

Alex Leite Pereira

Patogênese de *Escherichia coli* enteroagregativa: o papel de supostos *pili* F na intensificação de biofilmes mistos e na adesão a células HeLa

Brasília, maio de 2009

Alex Leite Pereira

Patogênese de *Escherichia coli* enteroagregativa: o papel de supostos *pili* F na intensificação de biofilmes mistos e na adesão a células HeLa

Tese apresentada ao Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biologia Molecular.

Orientadora: Dr^a Loreny Gimenes Giugliano

Brasília, maio de 2009

Patogênese de *Escherichia coli* enteroagregativa: o papel de supostos *pili* F na intensificação de biofilmes mistos e na adesão a células HeLa

Banca de Defesa

Dr^a Loreny Gimenes Giugliano
(Orientador – UnB - Departamento de Biologia Celular)

Dr^a Tânia A Tardelli Gomes do Amaral
(Membro Externo - UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo)

Dr^a Cynthia Maria Kyaw
(UnB – Departamento de Biologia Celular)

Dr Robert Neil Gerard Miller
(UnB – Departamento de Biologia Celular)

Dr Renato de Oliveira Resende
(UnB – Departamento de Biologia Celular)

Dr^a Marlene Teixeira de Souza
(UnB – Departamento de Biologia Celular)

**Dedicado a:
Clemência Francisca Leite Pereira**

Já pensou como seria ser criado por “Manés”. Eu fui criado por 3 “Zés”: Zé Carlos, Zé Milton e Zé-nóbio. Fui um privilegiado! Poucos tiveram a sorte de ter recebido especial iniciação científica. Com certeza, não existem artigos escritos por estes cientistas nos jornais que costumamos ler. A explicação... A ciência que eles praticam é fundamentada em ensaios sobre a vida, o trabalho, amigos e amores. Mesmo que fossem grafados com maestria, as limitações impostas pelo papel diminuiriam a beleza de seus resultados e a magia de suas conclusões. A plenitude destes resultados só pode ser contemplada por aqueles que participam *in locus* dos ensaios. Assim foi, ao longo de muitos finais de semana, a minha sorte, por isso agradeço;

Aos meus irmãos Alyson, Aline e Alan, que família “[...] ouriçada, brigam por qualquer razão, mas sempre acabam pedindo perdão [...]”;

À Daniela Barbeta agradeço, “[...] Eu, que sempre fui tão inconstante; Te juro meu amor, agora é pra valer [...]” (CARLOS R, CARLOS E. Olha, 1975). Afinal, “[...] Quem pode querer ser feliz, se não for por um bem de amor [...]” (BOSCO J, SILVA A. Desenho de giz, 1987);

Aos meus primos de oitavo grau (?) em linha colateral de parentesco Thiago “o Cabeção” e Aldo “o Gordinho”, aqueles cuja adoção do parentesco é pra mim de segundo grau (certamente!);

Ao meu amigo Ewerton Luis, exemplo de coragem e luta, tudo recompensado como ele sonhava: Green Card!;

Aos meus amigos de pensionato Álvaro Cappellesso e Jaison Argenta agradeço pela sensata moderação dos conteúdos pautados em nossas conversas: assunto sério, cinco minutos; narrativas e discussões sobre prazeres mundanos até esgotarem as possibilidades de qualquer risada;

À Heidi Bessler, à Liliam Maçaneiro, à Inaiara Rosa e à Rosane Mansan e à Thiago Nepomuceno pela amizade, pelos conselhos, pela perseverança demonstrada, pela alegria gratuita e pela ajuda prestada;

À “Zé” Garrofe Dórea, mediador científico desta história;

À professora Loreny Gimenes Giugliano, pelo exemplo, por todo o ensinamento e pela confiança depositada no meu trabalho;

Aos professores que sempre mostraram se dispostos a ajudar na execução deste projeto: Marlene Texeira, Beatriz Dolabela, Cynthia Kyaw, Andréa Maranhão, Sônia Bão e Bergmann Ribeiro;

À Ana H Tiberti e a Sandra Cesário pela solicitude sempre demonstrada;

À Ana Cristina e à Ana Cláudia (EMBRAPA-CENARGEN) por toda ajuda prestada;

Agradeço a Deus por toda esta história!

“Para ter uma grande idéia, tenha uma porção delas”

“To have a great idea, have a lot of them”

Thomas Alva Edison

Inventor estado-unidense

1847-1931

Resumo

Escherichia coli enteroagregativa (EAEC) é uma categoria diarreioagênica composta por isolados que expressam o característico padrão de adesão agregativa (AA) em associação com células epiteliais. Nas cepas protótipo de EAEC, o fenótipo AA está associado à presença dos plasmídios pAA que codificam para fímbrias de adesão agregativa (AAF). Não obstante, o padrão AA é um evento multifatorial influenciado pela expressão de adesinas afimbriais, de *pili* e de fimbriais não associadas aos plasmídios AA. Cepas de EAEC típicas (pAA⁺) são proficientes na formação de biofilmes, característica considerada fator de virulência consensual desta categoria. Durante um estudo epidemiológico, o isolado *C. freundii* (Cf) 205 demonstrando fenótipo AA foi isolado de uma criança diarreica juntamente com a cepa de EAEC 205-1. Em ensaios preliminares, foi mostrado que a adesão bacteriana a células epiteliais era intensificada em decorrência da co-infecção por Cf 205 e cepas de EAEC. Este estudo tem por objetivo determinar características de patogenicidade em cepas de *C. freundii* e definir os eventos biológicos mediadores da ação sinérgica de adesão descrita. Ensaios de adesão a células HeLa e de formação de biofilme, bem como a detecção de marcadores de virulência de *E. coli*, foram realizados para determinar possíveis associações entre cepas de *C. freundii* e diarreia. Todas as 28 cepas de *C. freundii* utilizadas no estudo foram negativas para os fatores de virulência pesquisados. Isolados de *C. freundii* recuperados exclusivamente de diarreia foram caracterizados pela expressão do padrão AA e pela formação de intenso biofilme, e, então, foram denominados *C. freundii* agregativo formadores de biofilme (BACF). Para determinar a natureza do efeito sinérgico desenvolvido por *C. freundii* e cepas de EAEC, ensaios de pré-condicionamento de meio de cultura foram conduzidos com o intuito de verificar a ocorrência eventos de sinalização química. Adicionalmente, análises de ultra-estrutura baseadas em microscopia eletrônica de varredura foram realizadas em complemento a ensaios de agregação bacteriana e de formação de biofilme para verificar o envolvimento de apêndices bacterianos na ação sinérgica descrita. A cepa de BACF 205 mostrou-se capaz de induzir agregação bacteriana quando na presença de cepas de EAEC. Os agregados bacterianos eram mediados por apêndices flexíveis expressos por cepas de EAEC que portavam genes para pilina F (*traA*). Estruturas semelhantes foram visualizadas nos biofilmes simples formados por cepas de EAEC *traA*-positivas, como também nos biofilmes mistos intensificados em decorrência da co-cultura de BACF 205 e cepas de EAEC *traA*-positivas. O aumento dos biofilmes mistos produzidos pela combinação BACF 205-EAEC *traA*-positiva foi abolido por zinco, um inibidor específico de *pili* F. Complementarmente foi mostrado que zinco inibe seletivamente a maioria dos biofilmes formados por cepas de EAEC típicas isoladas de crianças diarreicas. Em conclusão, supostos *pili* F expressos por cepas típicas de EAEC incrementam a formação de biofilmes mistos quando na presença de BACF.

Abstract

Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) are enteropathogenic strains that display the distinctive aggregative adhesion (AA) when in association with cultured cells. In typical EAEC strains, the AA phenotype is associated with specific fimbriae (AAFs) encoded by plasmids (pAA). However, other factors, including afimbrial adhesins and pili, are also associated with this adherence pattern, indicating its complex nature. The expression of biofilms has been considered a consensual virulence factor among typical (pAA⁺) EAEC isolates. During an epidemiologic study focusing infantile diarrhea, AA-positive *Citrobacter freundii* (Cf) 205 and EAEC strains were concomitantly recovered from a severe case of mucous diarrhea. Preliminary assays showed that the coinfection of epithelial cells with Cf 205 and EAEC strains led to an increase in the bacterial adhesion. The aim of this study was to verify the occurrence of pathogenic traits in *C. freundii* strains as well as to identify the biological events underlying the increase in bacterial adherence. Biofilm and adhesion assays showed that *C. freundii* strains that displayed aggregative adhesion to HeLa cells and formed strong biofilms were exclusively isolated from diarrhea. This subset of strains was then named biofilm-forming aggregative *C. freundii* (BACF). All *C. freundii* strains were tested negative for the EAEC fimbrial genes as well as for others *E. coli* virulence markers. In attempt to define the nature of the synergic events developed by *C. freundii* and EAEC strains, pre-conditioned media were used to verify the role of chemical signals in the studied events. Additionally, bacterial aggregation and biofilm assays were carried out and ultrastructurally analyzed employing electron microscopy. The increased adherence was mediated by physical interactions among the bacteria and primed in the absence of chemical signaling. Thus, significant increases in bacterial adhesion were also observed during the formation of mixed biofilms on abiotic surfaces. Bacterial settling assays showed that EAEC strains harboring F-pili genes (*traA*) were capable of forming bacterial aggregates only in the presence of BACF. In scanning electronic microscopy analyses, it was observed that bacterial aggregates as well as enhanced biofilms formed by BACF and *traA*-positive EAEC were mediated by non-bundle forming, flexible pili. Moreover, mixed biofilms formed by BACF and *traA*-positive EAEC strains were significantly reduced using nonlethal concentration of zinc, a specific inhibitor of F pili. In addition, EAEC strains isolated from diarrheic children frequently produced single biofilms sensitive to zinc. In conclusion, putative F pili expressed by EAEC strains boosted the mixed biofilm formation when in presence of biofilm-forming aggregative *C. freundii*.

Lista de Figuras

	Página
Figura 1 - Mapa físico do operon AAF/III evidenciando na região 1 a típica organização genética de um <i>operon</i> da família Afa-Dr	20
Figura 2 - Alinhamento de seqüência (ClustalW) das adesinas AAF codificadas pelos <i>operons agg</i> (AAF/I), <i>aaf</i> (AAF/II) e <i>agg-3</i> (AAF/III)	20
Figura 3 - Análise filogenética das adesinas pertencentes à Superfamília Dr.	21
Figura 4 - Padrão de adesão resistente à manose desenvolvido em ensaios com células HeLa pela cepa protótipo de EAEC 042 e por cepas de <i>C. freundii</i> isoladas de criança.	29
Figura 5 - Ensaios de infecção mista.	30
Figura 6 - Biofilme formado por cepas de <i>C. freundii</i> .	40
Figura 7 - Micrografia eletrônica de transmissão mostrando células de BACF.	41
Figura 8 - Adesão a células HeLa desenvolvida pelas combinações bacterianas (<i>C. freundii</i> e EAEC) recuperadas da criança assintomática 047 e da criança diarréica 205.	42
Figura 9 - Ensaio de pré-condicionamento de DMEM utilizando insertos permeáveis.	43
Figura 10 - Ensaio de pré-condicionamento de células HeLa pela adesão de BACF 205.	44
Figura 11 - Ensaio de cinética de sedimentação.	46
Figura 12 - Cinética de sedimentação bacteriana na presença de zinco (Zn) e magnésio (Mg).	47
Figura 13 - Agregação bacteriana e a intensificação do biofilme desenvolvidos pela co-cultura de BACF 205 e EAEC 340-1 em DMEM-manose são eventos relacionados.	48
Figura 14 - Formação de biofilme sobre lamínulas de vidro.	50
Figura 15 - Ensaio quantitativo de formação de biofilme e inibição por zinco.	52
Figura 16 - Micrografias (MEV) dos biofilmes formados por BACF 205 e cepas de EAEC.	53
Figura 17 - Efeito do zinco sobre biofilmes formados por EAEC típica isolada de crianças com diarréia e controles.	55
Figura 18 - Efeito do zinco sobre adesão a células HeLa desenvolvida por cepas de EAEC.	58
Figura 19 - Micrografias eletrônicas de varredura mostrando a interação de cepas de EAEC típicas com células HeLa.	59

Lista de Tabelas

	Página
Tabela 1 - Iniciadores utilizados em reações de PCR para detecção de marcadores moleculares de patotipos de <i>E. coli</i> .	34
Tabela 2 - Distribuição de fatores de virulência em cepas de EAEC típicas isoladas de crianças diarréicas e assintomáticas classificadas de acordo com a sensibilidade do biofilme a zinco.	56

Lista de abreviaturas e siglas

AA – adesão agregativa

AAF – fimbria de adesão agregativa (do inglês *aggregative adherence fimbria*)

A/E – lesão histopatológica *attachment-and-effacement*

Ag43 – antígeno 43 (adesina)

AggR – ativador transcricional de EAEC

BACF – *Citrobacter freundii* agregativo formador de biofilme

Cf – *Citrobacter freundii*

CFA – fator de colonização de ETEC (do inglês *colonization factor antigen*)

CS – antígeno de superfície – adesina - de ETEC (do inglês *coli surface antigen*)

CV – cristal violeta

CVD432 – sonda para detecção de EAEC

DAEC – *Eschechia coli* que adere difusamente (*diffusely adherent E. coli*)

D-PBS – salina fosfato tamponada de Dulbecco (do inglês *Dulbecco's PBS*)

DMEM – Meio Eagle modificado por Dulbecco (do inglês *Dulbecco's modified Eagle's medium*)

EAEC – *Escherichia coli* agregativa (do inglês *enteroaggregative E. coli*)

EAF – fator de adesão de EPEC (do inglês *EPEC adherence factor*)

EAST1 – toxina termo-estável de EAEC (do inglês *EAEC heat-stable toxin*)

EHEC – *E. coli* enterohemorrágica (do inglês *enterohaemorrhagic E. coli*)

EPEC – *E. coli* enteropatogênica (do inglês *enteropathogenic E. coli*)

ETEC – *E. coli* enterotoxigênica (do inglês *enterotoxigenic E. coli*)

HUS – síndrome urêmica hemolítica (do inglês *haemolytic uraemic syndrome*)

LEE – ilha de patogenicidade de EPEC (do inglês *locus of enterocyte effacement*)

LT – toxina termo-lábil de *E. coli* (do inglês *heat-labile toxin*)

pAA – plasmídio de adesão agregativa

PAP – *pili P*

PBS – salina fosfato tamponada (do inglês *phosphate buffered saline*)

Pet - toxina de EAEC codificada por plasmídio (do inglês *plasmid-encoded toxin*)

Pic – proteína envolvida na colonização de EAEC (do inglês *protein involved in colonization*)

PilS – subunidade principal da *pili* tipo IV de EAEC (do inglês *major type IV pilin subunit*)

PT4 – *pilus* do tipo IV

SFA – *pili S*

SFB – soro fetal bovino

TS – taxa de sedimentação

ST – toxina termo-estável (do inglês *heat-stable toxin*)

Stx – toxina de Shiga (do inglês *Shiga toxin*)

TIF – fímbria do tipo I (do inglês *type I fimbria*)

UNICEF – Fundo das Nações Unidas para a Infância (do inglês *United Nations Children's Fund*)

UPEC – *E. coli* uropatogênica (do inglês *uropathogenic E. coli*)

Sumário

	Página
1- Introdução	15
2- <i>E. coli</i> enteroagregativa	16
2.1- Determinantes do fenótipo AA	19
2.2- Patogênese e biofilme	23
3- Modulação da adesão bacteriana mediada por sinalização química	25
4- <i>Citrobacter spp.</i> compartilham características associadas à virulência de <i>E. coli</i>	26
5- Justificativa	28
5.1- Cepas de EAEC típicas AAF-negativas associadas com diarreia persistente	28
5.2- EAEC e <i>C. freundii</i> agregativo em evento sinérgico associado à diarreia	28
6- Objetivos	31
6.1- Objetivo Geral	31
6.2- Objetivos Específicos	31
7- Material e Métodos	32
7.1- Cepas bacterianas e pacientes	32
7.2- Reação da polimerase em cadeia (PCR) e iniciadores	33
7.3- Células HeLa	35
7.4- Ensaio de adesão a células HeLa	35
7.5- Ensaio de infecção mista (qualitativo e quantitativo)	35
7.6- Ensaio de adesão utilizando pré-condicionamento de DMEM e de células HeLa	36
7.7- Ensaio de agregação bacteriana	36
7.8- Cinética de sedimentação	37
7.9- Formação de biofilme bacteriano sobre lamínulas de vidro	37
7.10- Ensaio de triagem para formação de biofilme e inibição por zinco	37
7.11- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	38
7.12- Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	38
7.13- Análise estatística	38
8- Resultados	39
8.1- <i>Citrobacter freundii</i> agregativo formador de biofilme (BACF) isolado de diarreia	39
8.2- Aumento da adesão bacteriana é um fenótipo inter-específico decorrente da combinação BACF-EAEC isolada de diarreia	42
8.3- Sinalização mediada por substâncias químicas e pelo contato com a célula hospedeira	42
8.4- EAEC albergando locus conjugativo (<i>traA</i>) promove agregação bacteriana na presença de BACF 205	45
8.5- Zinco inibe a agregação bacteriana promovida por cepas de EAEC <i>traA</i> -positivas quando na presença de BACF 205	47
8.6- Agregação bacteriana e a intensificação de biofilme são eventos vinculados	48
8.7- EAEC típicas AAF-positivas induzem o aumento de biofilmes mistos quando portadoras do locus <i>tra</i>	49
8.8- Efeito do zinco sobre biofilmes formados por cepas de EAEC típicas AAF-positivas portadoras de <i>traA</i>	51
8.9- Biofilmes analisados por MEV	53

8.10- Efeito do zinco sobre biofilmes produzidos por cepas de EAEC típica isoladas de crianças com diarreia e controles.	54
8.11- <i>Pili</i> e adesão à célula HeLa	57
9- Discussão	60
10- Perspectivas	64
Referências Bibliográficas	66
ANEXO - Meios de cultura, soluções e preparo de material	74

1- Introdução

Embora a incidência global de gastroenterites seja difícil de ser determinada, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que no ano de 2004 aproximadamente 2,1 milhões de pessoas morreram vítimas de diarreia, o que corresponde a 3,7% do total de óbitos registrados. Em sua maioria (1,8 milhões), os óbitos por diarreia ocorrem em países não industrializados que apresentam renda nacional per capita inferior a U\$ 935,00 (*low-income economies*). Ademais, a diarreia é, em escala mundial, a principal causa de malnutrição e a segunda causa de morte em crianças menores de 5 anos, respondendo por 15-17% do total de óbitos nesta faixa etária (aproximadamente 1,5 milhões de óbitos anuais) (WORLD HEALTH ORGANIZATION; UNICEF, 2004; UNICEF, 2007; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008).

No Brasil a mortalidade infantil atingiu, em 1999, taxa de 31,8 óbitos por mil nascidos vivos. Apesar do declínio em todas as regiões, os valores médios ainda são elevados, sendo maiores na região Nordeste (52,4 óbitos/1000 nascidos vivos) e na Norte (33,9/1000 nascidos vivos). Seguindo o perfil de mortalidade infantil dos países em desenvolvimento, os dados do Ministério da Saúde revelam que no Brasil a diarreia ainda é a segunda causa de óbitos em crianças menores de cinco anos, respondendo por 5,5% do total de mortes (4.487 óbitos) nesta faixa etária. A mortalidade proporcional por diarreia é elevada na região Nordeste (9,7%), estando associada a condições insatisfatórias de saneamento e de atenção à saúde da criança, e baixa na região Sudeste (2,7%) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

O patógeno bacteriano comumente associado a formas endêmicas de diarreia infantil em países em desenvolvimento é *Escherichia coli*. Esta espécie coloniza o trato intestinal dos recém-nascidos nos primeiros dias de vida e compõe a microbiota intestinal em humanos e muitos animais (QUIROGA *et al.*, 2000). Atualmente são conhecidas, pelo menos, seis categorias diarreiogênicas de *E. coli*: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), enterotoxigênica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroagregativa (EAEC) e por fim *E. coli* que adere difusamente (DAEC). Esta classificação está baseada na presença de diferentes genes de virulência cromossômicos e plasmidiais, que estão ausentes em muitas cepas comensais, bem como, em seus padrões de interação com culturas de células e tecidos (NATARO; KAPER, 1998). A EPEC, principal causa de diarreia aguda em crianças menores de 2 anos, é caracterizada pelo fenótipo de adesão localizada (AL), associada ao plasmídeo EAF (*EPEC adherence factor*), e pela lesão histopatológica A/E (*attaching-and-effacing*) que é facilmente demonstrada em culturas de células. ETEC é caracterizada pela produção das enterotoxinas LT (*heat-labile toxin*) e ST (*heat-stable toxin*), e é classicamente vinculada à

diarréia do viajante. Isolados de EHEC pertencem majoritariamente ao sorotipo O157:H7, são caracterizados pela produção da toxina de Shiga (Stx) e pelo padrão AL, e são responsáveis pelos quadros de colite hemorrágicas e pela síndrome urêmica hemolítica (HUS). Cepas de EIEC possuem a habilidade de invadir enterócitos sendo genética e patogenicamente semelhantes a cepas de *Shigella spp.*. DAEC é caracterizada pelo fenótipo de adesão difusa e por portar adesinas da família Afa-Dr (NATARO; KAPER, 1998).

E. coli enteroagregativa (EAEC) é definida como a cepa que apresenta o característico padrão de adesão agregativa (AA) quando em associação com cultura de células eucarióticas. Nas cepas protótipos, este fenótipo é associado à presença dos plasmídios AA (pAA) que codificam as fímbrias AAF (*aggregative adherence fimbriae*) e para duas citotoxinas denominadas EAST1 (*enteroaggregative E. coli heat-stable enterotoxin*) e Pet (EAEC *plasmid-encoded toxin*). O plasmídio AA é parcialmente conservado entre as linhagens de EAEC; em consequência, um *locus* genético do pAA, denominado CVD432, tem sido utilizado como marcador molecular para EAEC em estudos epidemiológicos (NATARO; KAPER, 1998). O fator transcricional AggR, cujo gene é albergado pelo pAA, é considerado o principal modulador da virulência de EAEC e controla não apenas a expressão de genes codificados pelo pAA, como também, a expressão de diversas informações cromossômicas. Relatos epidemiológicos sugerem que as cepas CVD432-positivas que albergam AggR, recentemente denominadas de EAEC típicas, formariam um subgrupo inequívoco de cepas patogênicas (HARRINGTON *et al.*, 2006; FLORES; OKHUYSEN, 2009). Apesar dos esforços empregados na subclassificação das cepas de EAEC, dados controversos gerados por estudos conduzidos em diferentes regiões geográficas tornaram a epidemiologia e a patogenia de EAEC questões de difícil entendimento. No tocante a epidemiologia, permanecem desconhecidos o significado da marcante heterogeneidade genética das cepas e a distribuição dos subtipos de EAEC na população mundial (HUANG *et al.*, 2004).

Apesar das inconsistências, EAEC é considerada um patógeno emergente relacionado classicamente com diarréia persistente (WEINTRAUB, 2007), que é definida como o episódio diarréico, iniciados como um quadro agudo de diarréia aquosa ou disenteria, que se mantém por 14 dias ou mais (U.S.AGENCY FOR INTERNATIONAL DEVELOPMENT *et al.*, 2005). Esta forte associação é evidenciada em estudos realizados tanto em países com economias de baixo rendimento (*low-income economies*), como Bangladesh e Índia, bem como em países em desenvolvimento com economias emergentes, tais como México e Brasil (BHAN *et al.*, 1989; FANG *et al.*, 1995; ALBERT *et al.*, 1999; PEREIRA *et al.*, 2007; MOHAMED *et al.*, 2007). EAEC também tem sido associada a surtos de diarréia aguda em

crianças e em adultos; este fato tem sido demonstrado em países desenvolvidos e em áreas em desenvolvimento (BHATNAGAR *et al.*, 1993; CHAN *et al.*, 1994; PRESTERL *et al.*, 1999; WEINTRAUB, 2007). Notavelmente, dados gerados em alguns estudos epidemiológicos não relacionam EAEC à doença diarréica, sendo este patotipo isolado frequentemente de pacientes assintomáticos (QUIROGA *et al.*, 2000). Contudo, a colonização assintomática por EAEC tem sido vinculada à malnutrição e ao retardo do desenvolvimento infantil (STEINER *et al.*, 1998; GUERRANT *et al.*, 1999). Estas associações inconstantes, geradas em estudos epidemiológicos sobre EAEC, podem ser explicadas pela plasticidade apresentada pelos isolados de EAEC em relação a seus fatores de virulência (OKEKE *et al.*, 2000; WEINTRAUB, 2007).

Diante da heterogeneidade genética apresentada por essa categoria de *E. coli*, a expressão de biofilmes é considerada um fator de virulência consensual entre as cepas de EAEC (HUANG *et al.*, 2004; TORRES *et al.*, 2005; WEINTRAUB, 2007). A formação de biofilme é um evento complexo que pode envolver espécies diferentes e inúmeras adesinas. Além do mais, a participação de fatores não associados à adesão tem revelado a complexidade dos biofilmes bacterianos (BRANDA *et al.*, 2005).

A patogênese da infecção causada por EAEC não está totalmente esclarecida. Contudo, alterações histopatológicas em biópsia e modelos animais já foram relatadas e, geralmente, são acompanhadas pelo aumento na produção de muco, o que propiciaria a colonização persistente do trato intestinal (STEINER *et al.*, 1998; VILLASECA *et al.*, 2000; TORRES *et al.*, 2005).

Atualmente sabe-se que características classicamente vinculadas a cepas patogênicas de *E. coli* não estão restritas a esta espécie, sendo frequentemente compartilhadas por representantes do gênero *Citrobacter*. Isolados de *C. rodentium*, agente etiológico da hiperplasia colônica murínica, são capazes de induzir a lesão histopatológica A/E à semelhança do que ocorre com a infecção humana por EPEC (SCHAUER; FALKOW, 1993; DENG *et al.*, 2001). Apesar de classicamente considerada espécie comensal da microbiota intestinal humana, isolados de *C. freundii* são esporadicamente associados à gastroenterites com relatos de surtos de diarréia ocorrendo inclusive no Brasil. (DORAN, 1999; KONEMAN *et al.*, 2001). Estes indícios conduziram a identificação de cepas de *C. freundii* albergando fatores de virulência homólogos, e alguns até idênticos, aos já descritos em outras espécies de enteropatógenos; dentre os quais ressaltam-se as toxinas Stx, LT e ST (GUARINO *et al.*, 1987; GUARINO *et al.*, 1989; SCHMIDT *et al.*, 1993; KARASAWA *et al.*, 2002).

2- *E. coli* enteroagregativa

No início da década de 80, Cravioto e colaboradores realizaram estudos sobre a adesão de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) a células HEp-2 que foram essenciais, não apenas, para a pesquisa no campo de EPEC, mas, também serviram de base para a descoberta das duas últimas categorias de *E. coli* diarreioagênicas (EAEC e DAEC). Estes autores demonstraram que a maioria das cepas de EPEC isoladas de surtos de diarreia eram capazes de aderir a células HEp-2, cultivadas *in vitro*, na presença de D-manose, ao contrário das cepas de *E. coli* da microbiota normal (CRAVIOTO *et al.*, 1988; CRAVIOTO *et al.*, 1991).

Em meados de 1987, Nataro e colaboradores examinaram amostras de *E. coli* isoladas em estudos sobre diarreia, realizados em países em desenvolvimento, e concluíram, como Cravioto e colaboradores, que muitas linhagens de EPEC aderiam a células HEp-2; no entanto, os autores descreveram dois padrões distintos de adesão (NATARO *et al.*, 1987). Eles perceberam que muitas cepas não pertencentes aos sorotipos de EPEC, e negativas para EAF (*EPEC adherence factor*) também apresentavam adesão, que momentaneamente foi classificada como adesão difusa (AD). As EPEC produziam um padrão de adesão muito característico, definido pela formação de microcolônias sobre as células HEp-2. Este padrão foi descrito como adesão localizada (AL) (NATARO; KAPER, 1998).

Em pesquisas posteriores, Nataro e colaboradores perceberam que o padrão de adesão difusa era, na realidade, constituído por dois tipos de adesão diferentes. Desta forma o fenótipo de adesão “difusa” foi subdividido em adesão agregativa (AA, *aggregative adherence*) e adesão, verdadeiramente, difusa. O fenótipo AA foi caracterizado pela auto-aglutinação das bactérias aderidas à superfície das células HEp-2 e na lamínula de fixação das células, apresentando uma disposição semelhante a tijolos empilhados (do inglês, *stacked-brick*). No fenótipo AD as bactérias eram vistas de forma dispersa sobre a superfície das células HEp-2 com pequena aderência à lamínula de fixação (NATARO; KAPER, 1998).

Estudos feitos com cepas EAF-negativas isoladas de pacientes chilenos diarreicos, comprovaram que 33% das amostras apresentavam fenótipo AA, enquanto que, apenas, 15% das amostras isoladas de pacientes saudáveis apresentavam o mesmo fenótipo ($P < 0,0002$). Com base nestas observações os autores propuseram a criação de uma nova categoria de *E. coli* diarreioagênica denominada, inicialmente, de *E. coli* enteroaderente-agregativa que mais tarde foi simplificado para *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (NATARO; KAPER, 1998)

Atualmente, EAEC é definida como a cepa de *E. coli* não secretora de toxinas ST e LT que expressa o padrão AA resistente a manose na presença de células HeLa ou Hep-2. Esta definição atinge um amplo espectro de clones, mantendo sob a mesma alcunha desde cepas

altamente patogênicas e de distribuição global, tais como as de sorotipo O44:H18 e O126:H27, bem como cepas não patogênicas (CZECZULIN *et al.*, 1999). As bases moleculares responsáveis pela manutenção de genes de virulência em determinadas linhagens não estão completamente elucidadas; contudo é sabido que fatores de virulência de EAEC são preferencialmente segregados em determinados sorogrupos clássicos de EPEC (PEREIRA *et al.*, 2007).

2.1- Determinantes do fenótipo AA

Um dos principais eventos na patogênese das infecções entéricas é a colonização da mucosa intestinal mediada por fatores de adesão específicos. Diante deste paradigma, o fenótipo AA tem sido estudado detalhadamente em diferentes cepas de EAEC e diversos fatores associados a este padrão de adesão já foram descritos, incluindo adesinas fimbriais e afimbriais. Contudo, as fímbrias AAF expressas pelas cepas prototipo são os fatores melhor caracterizados.

Em 1988, Vial e colaboradores demonstraram que, na amostra protótipo 17-2 de sorotipo O3:H2, a capacidade de aderir de forma agregativa estava associada à presença do plasmídeo pAA1 de aproximadamente 60 MDa (VIAL *et al.*, 1988). Em meados de 1992, Nataro e colaboradores relataram a existência de uma fímbria com 2-3 nm de diâmetro disposta em feixes (*bundle*) presente na cepa 17-2, que foi denominada de AAF/I (*aggregative adherence fimbriae* I). Os genes necessários para a expressão de AAF/I na amostra 17-2 (*agg*) estão contidos no plasmídeo pAA1, e formam duas regiões distintas separadas por um segmento de 9kb não necessário para a biogênese fimbrial (NATARO *et al.*, 1992; NATARO *et al.*, 1993). Mais tarde, este segmento seria associado à expressão da primeira enterotoxina isolada de EAEC, nomeada por Savarino e colaboradores de EAST1 (SAVARINO *et al.*, 1993).

Em 1997, Czeczulin e colaboradores identificaram na cepa protótipo 042 de EAEC (sorotipo O44:H18) a segunda adesina fimbrial, necessária ao fenótipo AA, denominado de AAF/II. Esta fímbria é caracterizada por ter 5 nm de diâmetro e apresentar estrutura rígida formando feixes. Em semelhança ao operon AAF/I, os genes associados à fímbria AAF/II estão localizados no plasmídeo pAA2 de 65 MDa e organizados em duas regiões, não contíguas, separadas por um segmento de 12 kb (CZECZULIN *et al.*, 1997).

Realizando a caracterização genética de cepas de EAEC isoladas de pacientes infectados com HIV que apresentavam diarreia persistente, Bernier e colaboradores identificaram na cepa 55989 a fímbria de adesão agregativa III (AAF/III) codificada por um

operon estruturalmente homólogo aos das fímbrias AAF/I e II. Ao contrário das fímbrias AAF/I e II, que são organizadas em feixes, a AAF/III é observada como filamentos individuais, longos e flexíveis, apresentando um diâmetro de 3 a 5 nm (BERNIER *et al.*, 2002).

Embora possuam particularidades que são mais acentuadas em AAF/II, as fímbrias AAF apresentam características comuns às adesinas Afa-Dr, sendo, por consequência, consideradas integrantes desta família. Considerando a organização genética, os operons AAF concentram os genes responsáveis pela biogênese fimbrial em um determinado *locus* (região 1) seguindo a típica arquitetura genética dos operons Afa-Dr: chaperona, proteína tipo *usher*, subunidade acessória e subunidade principal (figura 1). No operon AAF/II o gene da subunidade fimbrial compõe uma região distinta daquela formada pelos genes acessórios e está posto imediatamente a jusante da respectiva chaperona. Além do mais, os variantes AAF/I, II e III apresentam aminoácidos conservados em posições típicas e a característica

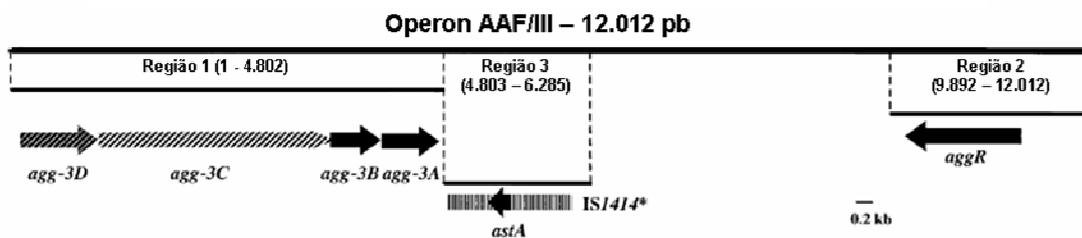


Figura 1-Mapa físico do operon AAF/III evidenciando na região 1 a típica organização genética de um operon da família Afa-Dr: chaperona (Agg-3D), proteína tipo usher (Agg-3C), subunidade acessória (Agg-3B) e subunidade fimbrial (Agg-3A) (BERNIER *et al.*, 2002).

	1	+1	↓	↓	58
Agg-3A	MKKISIIASLVFSLYSGLS--IAAGSSYYRV	TREILASATAKLFVNKCSLNLSISGIND			
AggA	MKTLKNMRRKNLCITLGLVSLLSRGANAALER	PPIKATETIRLTVTNDPCPVTIATN--SP			
AafA	MKKIRMFAIATLLS-----SGAAINATAVAKT	TATSTITVNFCDITITPA--TN			
	**.: : :	: . : : *	: . . . *	* :
	59		↓		114
Agg-3A	EYQAQPGRGALRVFTPTFDNCKNINAKYHIG	GMGKKNQLINERGD---KYTLSEYFV			
AggA	PNVGVSSTTPIIFNATVTTTEQCAKSGARVWL	WGTGAANKWVLEHTTNTKQKYLNPNSID			
AafA	RDVNVDRSANIDLSTIRQPQRCDAGMRIKAWG	EANHGQLLIKPPQG---GNKSAGFTL			
	: . . *	: . * . . :	* . . . :	: : :	.
	115		↓	↓	165
Agg-3A	G-GNLDRVGTNTGHFSG--TVTRSGNYNVQV	VIP---DQYIKPGSYSITAHGVMVLP			
AggA	GNSYFQTPGTNAAIYKN--VTTRDRVLKASV	KVDPK-IQVLIIPGEYRMLHAGINF-			
AafA	ASPRFSYIPNNPANIMNGFVLTNPGVYQLGM	QGSITPAIPLRPGLYEVLNAELVTN			
	. : . . *	. . * . . :	: : :	** * :

Figura 2-Alinhamento de seqüência (ClustalW) das adesinas AAF codificadas pelos operons *agg* (AAF/I), *aaf* (AAF/II) e *agg-3* (AAF/III). Os números marcam a posição dos aminoácidos em relação à adesina codificada pelo operon *agg-3*. Os asteriscos indicam os resíduos conservados; e as setas, os aminoácidos característicos das adesinas Afa-Dr. As setas sólidas indicam os resíduos de cisteína que sustentam a alça N-terminal (BERNIER *et al.*, 2002).

alça N-terminal, sustentada por ponte de cisteína, que marcam as proteínas da família Afa-Dr (figura 2) (CZECZULIN *et al.*, 1997; BERNIER *et al.*, 2002; BOISEN *et al.*, 2008).

Recentemente, uma nova adesina vinculada ao fenótipo AA foi detectada na cepa de EAEC típica C1010-00 isolada na Dinamarca de uma criança diarréica. Esta adesina, denominada HdaA, já havia sido identificada em uma cepa de DAEC (DIJ1) isolada de um caso de síndrome urêmica hemolítica (HUS – do inglês *hemolytic uremic syndrome*). A sequência predita para HdaA da cepa C1010-00 revelou identidade de 61% com a adesina afimbrial M aglutinina, expressa por cepas de *E. coli* uropatogênica, e de 57% com a adesina Afa-8 de DAEC. Embora na cepa C1010-00 a adesina seja codificada por um operon de configuração genética Afa-Dr, análises de sequência mostraram que HdaA pertence a um grupo filogenético diferente do grupo formado pelos variantes AAF (figura 3). Ademais, HdaA não apresenta o domínio N-terminal característico das adesinas Afa-Dr (BOISEN *et al.*, 2008). Apesar dos indícios, alguns autores insistem na pretensão de reclassificar HdaA

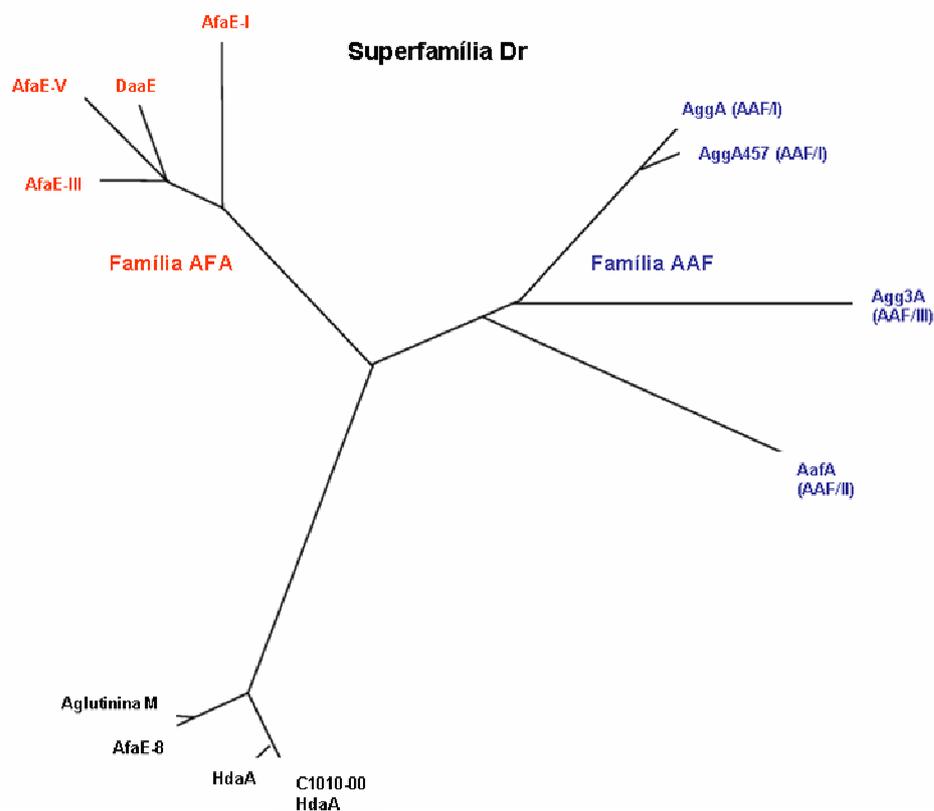


Figura 3-Análise filogenética das adesinas pertencentes à Superfamília Dr. A partir dos genes depositados no *GenBank*, as sequências protéicas foram preditas excluindo-se o peptídeo sinal, alinhadas usando *ClustalW* e analisadas pelo método de agrupamento de vizinhos (*Neighbor-joining*) para construção do dendograma. Os variantes AfaE-I, III e V foram identificados em isolados de trato urinário; DaaE foi isolado de DAEC associada a diarreia; os variantes AAF foram isolados de EAEC e associados com diarreia; e aglutinina M e AfaE-8 foram isolados de cepas veterinárias (BOISEN *et al.*, 2008).

adotando a denominação AAF/IV (FARFAN *et al.*, 2008).

O grupo liderado por James P. Nataro (*Center for Vaccine Development, University of Maryland, Baltimore, USA*) tem empenhado esforços na identificação de novos alelos AAF que apresentem distribuição freqüente entre as cepas de EAEC. O intuito de tamanho esforço é a possível descoberta de um variante AAF de ampla distribuição que fundamente a pesquisa de uma vacina eficaz anti-EAEC. Abordagem semelhante tem sido usada a décadas com ETEC, mas a identificação de 25 fatores de colonização tem impedido o estabelecimento de um imunobiológico anti-ETEC de eficácia comprovada. Os autores insistem com esta abordagem apoiados na esperança de que os fatores de adesão de EAEC possam apresentar menor diversidade (BOISEN *et al.*, 2008).

Em contrapartida e apoiados na baixa freqüência dos alelos AAF, alguns estudos demonstram que o fenótipo AA pode ser mediado por fatores não vinculados ao plasmídeo pAA. Estudando cepas de EAEC negativas para AAF e isoladas de diarreia no Brasil, Monteiro-Neto e colaboradores caracterizaram a adesina afimbrial denominada Ap58 (*aggregative protein 58*). Ap58 é uma adesina resistente a manose que medeia o fenótipo AA em cepas de EAEC atípicas de sorotipo O111:H12 (MONTEIRO-NETO *et al.*, 2003). Na Índia, uma adesina fimbrial que reconhece resíduos de galactose (galactose-sensível) e homóloga a bacterioferritina (citocromo b1) tem sido apontada como fator determinante do fenótipo AA e da atividade de hemaglutinação expressos por cepas de EAEC (GROVER *et al.*, 2001; GROVER *et al.*, 2007). Wai e colaboradores implicaram uma proteína de membrana externa de 38 kDa como sendo responsável pelo fenótipo AA e pela hidrofobicidade celular apresentadas por cepas de EAEC isoladas no Japão (WAI *et al.*, 1996).

Ademais, foi descrito que o padrão AA em cepas de EAEC típicas é assessorado pela fímbria do tipo I (TIF). TIF é uma adesina sensível a manose comumente encontrada em cepas comensais e patogênicas de *E. coli*, como também em outras enterobactérias. Esta adesina permite que as bactérias interajam com resíduos de manose que compõem receptores eucariotos. Desta forma, agindo como fator acessório, TIF acentua o fenótipo AA desenvolvido por cepas de EAEC na ausência de D-manose. Esses relatos têm endossado a natureza complexa do fenótipo AA (MOREIRA *et al.*, 2003).

Analisando a ocorrências de seqüências genéticas conservadas em uma coleção de cepas de EAEC, Nataro e colaboradores caracterizaram o *locus* gênico *aap* situado no plasmídeo pAA das amostras 17-2 e 042. Este gene, originalmente denominado *aspU*, é responsável pela expressão de uma proteína de membrana externa denominada dispersina (do

inglês *dispersin*), que, promovendo a distensão das fímbrias AAF, modula a adesão agregativa e, conseqüentemente, a dispersão de EAEC pela mucosa intestinal (SHEIKH *et al.*, 2002).

2.2- Patogênese e biofilme

A patogênese da infecção por EAEC não está totalmente esclarecida. Contudo, alterações histopatológicas em biópsia e modelos animais já foram relatadas e, geralmente, são acompanhadas do aumento na produção de muco pelos enterócitos, que propiciaria a colonização persistente do trato intestinal (NATARO; KAPER, 1998; HUANG *et al.*, 2004; FLORES; OKHUYSEN, 2009).

Empregando cultura de órgãos *in vitro* (IVOC), Hicks e colaboradores demonstraram que cepas de EAEC, apesar da interação com diferentes regiões do trato intestinal, comumente desenvolvem intensa adesão à mucosa do cólon, formando, neste sítio, densos agregados que mantêm a configuração AA visualizada em culturas celulares. As alterações histológicas foram tênues e caracterizadas por alterações ultra-estruturais em lisossomos secundários, indicando elevada atividade metabólica. Algumas cepas, entre elas o protótipo 17-2, induzem vacuolização dos microvilos quando em íntima associação com a mucosa colônica. Em concordância com o quadro clínico de diarreia mucóide, característica associada à infecção por EAEC, as cepas frequentemente acentuam a produção de muco pelo jejuno e íleo em ensaios de IVOC. Nestes sítios de colonização, a população de EAEC encontrava-se misturada a restos celulares e imersa no glicocálice intestinal justaposto à “borda em escova” (*brush border*) que, por sua vez, apresentava-se sem alterações histológicas (HICKS *et al.*, 1996).

Para o estabelecimento de infecções entéricas, os agentes bacterianos devem interagir com a barreira de muco na tentativa de utilizá-la como matriz de adesão ou de penetrá-la, atingido assim extratos mais internos que são menos afetados pelo fluxo intestinal (STROCCHI; LEVITT, 1991).

Diante da heterogeneidade genética e da ausência de alterações histopatológicas consistentes, a capacidade de formar biofilmes é considerado o único fator de virulência consensual em EAEC. Este paradigma é endossado pelos recorrentes relatos que vinculam EAEC à diarreia mucóide e aos quadros persistentes, ambos de aspecto não absorptivo, e que fazem inferência à colonização maciça do trato intestinal. Baseado neste modelo de infecção, estudos têm mostrado que a infecção assintomática por EAEC está associada à redução do desenvolvimento físico infantil que, empiricamente, é sustentada pela mal-absorção intestinal

decorrente da formação de intenso biofilme (STEINER *et al.*, 1998; HUANG *et al.*, 2004; FLORES; OKHUYSEN, 2009).

Biofilmes foram inicialmente definidos como comunidades bacterianas aprisionadas em uma matriz polimérica associada a superfícies bióticas ou inertes. Em função de variações ambientais, a formação inicial dos biofilmes bacterianos pode seguir múltiplas vias que serão determinadas pela expressão diferencial de vários fatores envolvidos com a adesão bacteriana (BRANDA *et al.*, 2005; VAN; MICHIELS, 2005). Nos estágios iniciais do desenvolvimento de um biofilme, células planctônicas devem superar a corrente de fluidos e as forças repulsivas que se estabelecem entre a superfície de adesão e a bactéria. Em *E. coli*, a adesão inicial é promovida por vários apêndices superficiais que incluem flagelos e fatores clássicos de adesão, tais como adesinas fimbriais e afimbriais.

Tornou-se notório que o biofilme de EAEC possui particularidades que o diferencia dos biofilmes de cepas comensais de *E. coli*. Estudos demonstram que a função flagelar desempenha papel crítico no desenvolvimento de biofilmes por *E. coli*, uma vez que, contrapondo-se às forças repulsivas, favorece o contato inicial entre bactéria e superfície de adesão. Contudo, cepas de EAEC constituem uma exceção. Mutantes imóveis, derivados da cepa protótipo 042, mantêm-se perfeitamente capazes de formar biofilme quando comparados com a EAEC parental. Outra peculiaridade diz respeito à fímbria tipo I (TIF), fator que é absolutamente necessário à formação de biofilmes por diversas espécies de enterobactérias, incluindo *E. coli*. Em relação à EAEC, a participação de TIF na formação de biofilme é negligenciada, sendo os variantes AAF as únicas fímbrias descritas com comprovado papel neste processo (VAN; MICHIELS, 2005). Antígeno 43 (Ag43) é uma adesina afimbrial amplamente distribuída em *E. coli* que promove agregação bacteriana por meio do auto-reconhecimento, facilitando, assim, a formação de biofilmes. Diante dessas características, é predito que Ag43 atue como adesina importante utilizada pela microbiota indígena no processo de colonização intestinal. No entanto, mutações realizadas em Ag43 demonstram que a adesina é dispensável durante a formação de biofilmes por EAEC (SHEIKH *et al.*, 2001; VAN; MICHIELS, 2005).

O desenvolvimento de biofilmes é um evento complexo que pode envolver muitas espécies e um variado número de fatores; dentre estes, fatores não vinculados à adesão. Este cenário tem realçado a natureza multifatorial dos biofilmes bacterianos. Na cepa de EAEC atípica C1096, negativa para os alelos AAF, a formação de biofilme é mediada por um *pilus* do tipo IV (PT4) codificado por um plasmídio (82 kb) do grupo IncI1 (pSERB1) homólogo ao pR64 de *Salmonella spp.* O PT4 é codificado pelo *locus pil* que é albergado com mesma

organização genética pelos plasmídios pSERB1 e R64. Na EAEC C1096, o PT4 atua de forma assessoria nos estágios iniciais da formação do biofilme, promovendo adesão à superfície abiótica e a interação firme entre as bactérias que o compõem. Este *pilus*, que é também conhecido como *pilus* “fino” -*thin pilus*-, está envolvido em inúmeros fenótipos em patógenos gram-negativos, dentre os quais incluem-se adesão à célula hospedeira, como descrito em EPEC; motilidade do tipo *twitching* em cepas de *Pseudomonas aeruginosa*; e conjugação, como descrito para o plasmídio R64 (DUDLEY *et al.*, 2006).

Além do *pilus* fino, a conjugação bacteriana envolve um outro tipo de *pilus* que é essencial para o contato bactéria-bactéria (*mating*) em superfícies sólidas e em líquidos. Mediadores da conjugação envolvendo plasmídios F, estes *pili* são expressos por genes da família *tra* durante a fase exponencial da curva de crescimento (fase log) e são genericamente denominados *pili* F (SOWA *et al.*, 1983). Caracterizados como filamentos flexíveis que se distribuem sem formar feixes (*bundles*), os *pili* F estendem-se por mais de 1µm sondando o ambiente em volta com a finalidade de estabelecer pares conjugativos (CLARKE *et al.*, 2008). A função do *pilus* F é inibida por interações específicas que ocorram na extremidade deste filamento, como por exemplo, a adsorção de bacteriófagos filamentosos e a ação do zinco. O tratamento de células F⁺ com concentrações não letais de zinco (1 x 10⁻³ M) inibe drasticamente a formação de pares conjugativos e, por conseguinte, de agregados bacterianos (OU; ANDERSON, 1972; ACHTMAN, 1975; ACHTMAN *et al.*, 1978).

Como exemplificado por PT4, atualmente é notório que o *pilus* conjugativo F serve a propósitos diferentes daqueles originalmente descritos. Plasmídios que expressam *pilus* F tornam bactérias planctônicas tendentes a participar da formação de biofilmes, propiciando, por meio de ligações inespecíficas, contatos inter-bacterianos e interações com superfícies abióticas (GHIGO, 2001).

3- Modulação da adesão bacteriana mediada por sinalização química

Nas últimas décadas, estudos sobre *quorum sensing* revelaram que este sistema, inicialmente descrito como uma forma de controle intra-específico da densidade populacional, é um eficiente mecanismo utilizado para coordenar funções essenciais à sobrevivência de organismos procariontes (SURETTE; BASSLER, 1998). Michael e colaboradores (2001) relataram que *Salmonella typhimurium* era capaz de reconhecer infecções mistas por meio de sinais de *quorum sensing* (autoindutores) produzidos por outras espécies bacterianas; desta forma, ficou caracterizado que este sistema poderia ser utilizado para orquestrar, além de funções intra-específicas, ações inter-específicas (MICHAEL *et al.*, 2001). Martino e

colaboradores (2003) determinaram que o indol pode atuar como molécula sinalizadora para regular a adesão e a expressão de fatores que promovem a formação de biofilme (MARTINO *et al.*, 2003). Os autores mostraram que oxindolil-L-alanina, um inibidor da síntese de indol, foi capaz de atenuar a formação de biofilme de diversos isolados clínicos, incluindo cepas de *Citrobacter koseri*. Contudo nenhum efeito foi observado em cepas de *Klebsiella pneumoniae* que são indol-negativas. Além do mais, alguns trabalhos têm revelado que sinais de *quorum sensing* podem modular a expressão genética em células eucarióticas; o que tornaria os hormônios e os autoindutores sinais intercambiáveis em uma linguagem comum a procariotos e eucariotos (WILLIAMS *et al.*, 2004).

Atualmente é notório que bactérias e células eucariontes interagem ativamente para a promoção de processos patológicos ou para a manutenção do equilíbrio fisiológico. Além do mais, sabe-se que, durante a infecção, muitos organismos procariontes manipulam funções da célula hospedeira para seu próprio benefício (KOHLENER *et al.*, 2003). Em 2003, Bétis e colaboradores comprovaram que cepas de *E. coli* que aderem difusamente (DAEC), expressando adesinas da família Afa/Dr, eram capazes de estimular a expressão de receptores na célula hospedeira, aumentando, assim, a adesão das próprias cepas de DAEC (BETIS *et al.*, 2003). Lyczak (2003) relatou que espécies da microbiota intestinal são capazes de promover mudanças na distribuição do regulador de condutância transmembrana da fibrose cística (CTFR), receptor eucarioto das adesinas de *S. typhimurium*; e que a adesão deste enteropatógeno fora aumentada em decorrência dessa redistribuição de CFTR (LYCZAK, 2003).

4- *Citrobacter spp.* compartilham características associadas à virulência de *E. coli*

Características classicamente associadas a cepas patogênicas de *E. coli* não estão restritas a esta espécie. *Citrobacter rodentium*, agente etiológico da hiperplasia colônica murínica e outrora denominado de *C. freundii* 4280, é capaz de produzir mudanças histopatológicas idênticas à lesão A/E decorrentes da infecção por EPEC. Sequências homólogas aos determinantes genéticos da lesão A/E albergados por EPEC já foram identificados em *C. rodentium*. Em virtude dessas particularidades, *C. rodentium* atualmente integra a família A/E de enteropatógenos, da qual também fazem parte os patótipos de *E. coli* EPEC e EHEC e a espécie *Hafnia alvei* (SCHAUER; FALKOW, 1993; DENG *et al.*, 2001).

C. freundii, que integra o complexo *C. freundii* juntamente com *C. rodentium*, tem sido esporadicamente apontado como agente etiológico de gastroenterites humanas, apesar de classicamente considerados representante comensal da microbiota intestinal (DORAN, 1999).

Estas observações levaram a identificação, em cepas de *C. freundii*, de fatores de virulência homólogos, e alguns até idênticos, aos já conhecidos em outras espécies diarreio gênicas. Schmidt e colaboradores (1993) demonstraram a existências de genes relacionados a Stx II em cepas de *C. freundii* isoladas de pacientes diarréicos. A análise de seqüência revelou que, em comparação com os determinantes de Stx II de *E. coli* O157:H7, o gene da subunidade A desta toxina difere em apenas 4 bases, resultando na substituição de 2 resíduos de aminoácidos. Contudo, a seqüência de nucleotídeos do gene da subunidade B da toxina de *E. coli* mostrou-se idêntica àquela encontrada na cepa de *C. freundii* (SCHMIDT *et al.*, 1993). Karasawa e colaboradores (2002) detectaram em *C. freundii*, isolado de diarréia infantil, um fator (CFXB) reconhecido por anticorpos dirigidos contra a subunidade B da toxina termo-lábil (LT) de *E. coli*. A análise da biblioteca genômica desta cepa mostrou que o gene *cfxB*, com produto predito apresentando 73,8% de identidade com a subunidade B de LT, era o determinante dos resultados positivos nos ensaios imunológicos. Fazendo analogia com as seqüências genéticas que codificam LT em *E. coli*, os autores designaram de *cfxA* a fase de leitura aberta localizada a montante de *cfxB*. No entanto, a seqüência primária de CFXA não apresentou homologia com a subunidade A de LT (KARASAWA *et al.*, 2002).

Guarino e colaboradores (1989) relataram que cepas de *C. freundii* isoladas de diarréia expressavam uma toxina idêntica em seus 18 aminoácidos à toxina ST1a de *E. coli* (GUARINO *et al.*, 1989). Além do mais, uma das cepas de *C. freundii* (AG2ST) fora isolada de uma criança (4 meses de idade) que também albergava *E. coli* produtora de ST1a. Estes indícios fomentaram suspeitas acerca da possível transferência inter-espécie dessa habilidade toxigênica. Em seqüência, os autores mostraram que ST1a albergado em plasmídios selvagens era transferido com alta eficiência (frequência de transferência -FT- variando de 10^{-1} a 10^{-2}) entre isolados clínicos de *C. freundii* e *E. coli*. Diante destes resultados foi sugerido que a capacidade conjugativa fosse considerada fator de virulência em algumas espécies de enterobactérias (GUARINO *et al.*, 1987; ALESSIO *et al.*, 1993).

Desde que os primeiros estudos sobre conjugação de *E. coli* mediada por *pili* F foram publicados, *C. freundii* têm sido apontados como eficiente par conjugativo (DE; STOUTHAMER, 1971). Avaliando a transferência de plasmídios R expressando *pili* F e albergados por *E. coli*, Corliss e colaboradores (1981) mostraram que isolados fecais de *C. freundii* igualavam-se em eficiência às cepas laboratoriais de *E. coli* quanto à habilidade para formar pares conjugativos. Dos isolados fecais testados, apenas 30% se mostraram receptores eficientes, dentre os quais figurava *C. freundii* F-76 (FT de 10^{-2}) que fora ultrapassado apenas pela cepa-referência de *E. coli* (FT de 10^{-1}). A capacidade conjugativa do transconjugante de

C. freundii (F-76R⁺) também foi testada com cepas de *E. coli*. A cepa F-76R⁺ mostrou-se mais competente (FT de $1,6 \times 10^{-1}$) para transferência do plasmídeo R do que o doador padrão de *E. coli* ($4,7 \times 10^{-2}$). Resultados semelhantes foram obtidos quando utilizados isolados selvagens de *E. coli*, e compilado aos demais resultados ratificaram que as duas espécies formam um excelente par conjugativo. Além do mais, os autores concluíram que a inaptidão para atuar como receptor durante a conjugação é uma característica comum aos indivíduos da microbiota intestinal indígena, e que exceções a esta regra (figurada pela cepa *C. freundii* F-76) representariam isolados da microbiota transitória (CORLISS *et al.*, 1981).

5- Justificativa

5.1- Cepas de EAEC típicas AAF-negativas associadas com diarreia persistente

Durante um estudo epidemiológico do tipo caso-controle sobre diarreia infantil (PEREIRA *et al.*, 2007) foram identificados vinte e quatro pacientes (18% do total de casos) com diarreia persistente, dos quais foram isoladas 89 cepas de *E. coli*. A investigação epidemiológica acerca dos marcadores de virulência de EAEC mostrou que 22% destes isolados albergavam plasmídios pAA (cepas CVD432⁺), frequência que foi estatisticamente diferente daquelas encontradas nas cepas de diarreia aguda (9%, $P < 0,001$) e nas do grupo controle (11%, $P < 0,01$). Além do mais, nenhuma das cepas pAA⁺ isoladas de diarreia persistente albergavam genes para as fímbrias AAF-I e II, e 55% delas albergavam a sequência CVD432 como o único marcador de virulência de EAEC. Embora os genes para AAF não tenham sido detectados nos isolados de diarreia persistente, os ensaios de adesão demonstraram que 33% destes isolados expressavam o fenótipo AA, indicando que as cepas de EAEC isoladas de diarreia persistente poderiam utilizar outros fatores para adesão a células HeLa. Juntos estes resultados fomentaram a idéia sobre a existência de mecanismos alternativos de patogenicidade que pudessem endossar a associação estatística observada entre cepas de *E. coli* CVD432-positivas e diarreia persistente.

5.2- EAEC e *C. freundii* agregativo em evento sinérgico associado à diarreia

Neste estudo caso-controle cepas de *C. freundii* (Cf) foram isoladas juntamente com EAEC de duas crianças (PEREIRA, 2004). A cepa Cf205 foi isolada de um paciente que sofria de um quadro grave de diarreia mucóide, enquanto que a cepa Cf047 foi recuperada de uma criança assintomática. Ensaios fenotípicos mostraram que a cepa Cf205 apresentava o característico padrão de adesão AA indistinguível daquele demonstrado pela cepa diarreio gênica de EAEC 042 (figura 4). Em contrapartida, a cepa Cf047 apresentou adesão

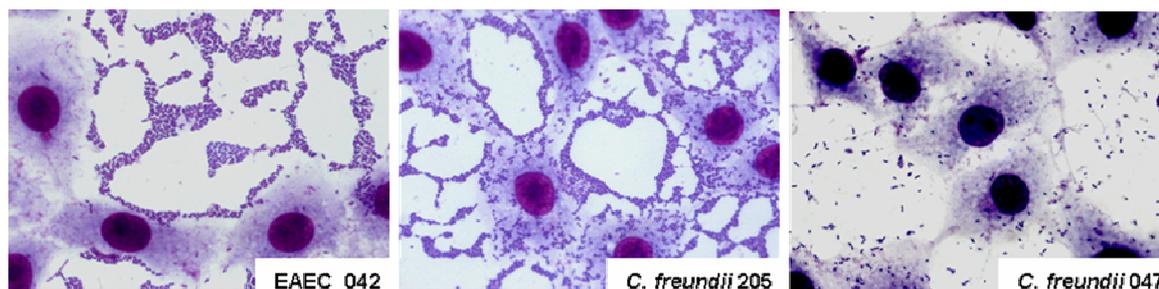


Figura 4 -Padrão de adesão resistente à manose desenvolvido em ensaios com células HeLa pela cepa protótipo de EAEC 042 e por cepas de *C. freundii* isoladas de criança.

tipicamente difusa. O isolamento de *C. freundii* demonstrando adesão AA de uma criança diarréica fomentou as suspeitas acerca do potencial patogênico dessa espécie. Ensaios de infecção mista foram desenhados com o intuito de avaliar os eventos biológicos e o desenlace fenotípico decorrentes da colonização simultânea por *C. freundii* e cepas de EAEC típicas (figura 5). De início foi verificado que a pré-infecção das células HeLa com Cf205 intensificava a adesão bacteriana decorrente da co-infecção com cepas de EAEC típicas. Focando uma das cepas de EAEC típica testada (340-1), a pré-infecção com Cf205 aumentou em 10 vezes a adesão de *E. coli* quando comparada aos ensaios de infecção simples ($P < 0,001$). Em situação oposta, a cepa Cf047, isolada da criança assintomática, mostrou-se incapaz de induzir qualquer aumento na adesão bacteriana quando submetida aos ensaios de infecção mista (figura 5B).

Diante destes resultados foi iniciado um projeto de pesquisa visando (1) determinar a ocorrência do fenótipo AA em cepas de *C. freundii* e a possível relação deste fenótipo com a patogenia desta espécie e (2) esclarecer os eventos biológicos envolvidos com o efeito sinérgico desenvolvido pelas cepas de EAEC e *C. freundii* em ensaios de infecção mista.

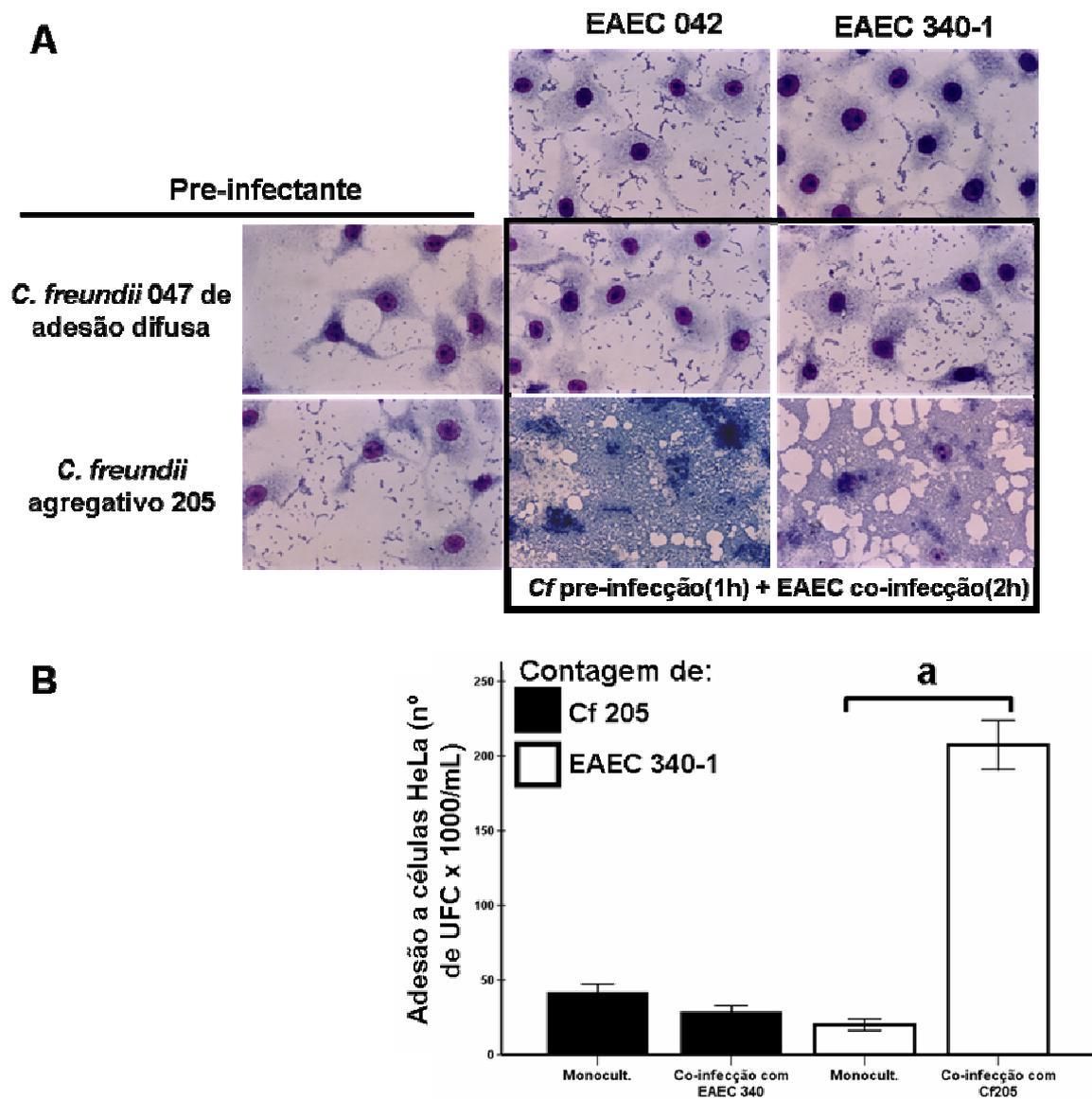


Figura 5 – Ensaio de infecção mista. A- *C. freundii* (Cf) 205 induz o aumento da adesão bacteriana quando em combinação com cepas de EAEC típicas. B- Ensaio quantitativo de infecção mista. Cepa de EAEC 340-1 tem adesão a células HeLa aumentada em 10 vezes quando na presença de Cf 205. “a” indica $P < 0,001$ para comparação de dois grupos (teste t de Student para amostras independentes).

6- Objetivos

6.1- Objetivo Geral

Determinar as características genotípicas e fenotípicas que possam contribuir para o esclarecimento do sinergismo envolvendo EAEC e *C. freundii*.

6.2- Objetivos Específicos

Determinar a presença de genes de virulência já descritos para patótipos de *E. coli* em cepas de *C. freundii*.

Determinar a possível participação de eventos de *quorum sensing* e *crosstalk* nos eventos sinérgicos de adesão induzidos pela co-infecção de EAEC e cepas agregativas de *C. freundii*.

Avaliar a importância da interação física entre EAEC e *C. freundii* para a adesão bacteriana.

Estudar a formação de biofilme simples por cepas de EAEC típicas AAF-negativas e de biofilme misto por EAEC e *C. freundii*.

7- Material e Métodos

Meios de cultura, soluções e preparo de material estão descritos no Anexo I.

7.1- Cepas bacterianas e pacientes

Durante o estudo do tipo caso-controle, a cepa de *C. freundii* (Cf) agregativo 205 (renomeada *a posteriori* *C. freundii* agregativo formador de biofilme – BACF 205) foi isolada de uma criança (com 1 ano e 1 mês de idade) no quinto dia de um episódio severo de diarreia mucóide apresentando, em média, 15 evacuações diárias. Além do mais, Cf 205 foi isolado juntamente com a cepa de EAEC típica 205-1 (CVD432⁺AggR⁺AAF/I⁺Pic⁺). Em situação oposta, a cepa de *C. freundii* 047 apresentando adesão difusa foi recuperada de uma criança assintomática (1 ano e 9 meses de idade) juntamente com a cepa de EAEC atípica 047-1 (genótipo - CVD432⁻AAF/Pic⁺). A cepa de EAEC 340-1 de sorogrupo O128 (genótipo - CVD432⁺AggR⁺AAF/I⁺Pic⁺) foi isolada de um caso persistente de diarreia mucóide afetando uma criança de 3 meses de idade. Esta cepa foi escolhida por que compartilha com EAEC 205-1 o mesmo genótipo, quando considerados os marcadores de EAEC sondados. Outras 43 cepas de EAEC típicas, isoladas no mesmo estudo e apresentando resultados negativos para os determinantes genéticos das fímbrias AAF/I AAF/II foram utilizadas para avaliar o efeito do zinco sob a adesão bacteriana e a possível ocorrência de outros fatores de adesão envolvidos na adesão de EAEC a células HeLa.

Adicionalmente 26 cepas de *C. freundii* isoladas de adultos foram utilizadas para estimar a frequência do fenótipo AA e a capacidade de formar biofilme dessa espécie. Doze cepas destas cepas de *C. freundii* foram isoladas pelo Laboratório Central de Saúde Pública do DF (LACEN-DF) (supervisão da Dr^a Lúcia R. Ferraz) de um surto de diarreia em adultos veiculado por alimentos. Outras 14 cepas (10 isoladas de indivíduos assintomáticos e 4 de pacientes diarreicos) foram isoladas de indivíduos aleatórios atendidos em laboratórios particulares de análises clínicas que apresentaram resultados de coprocultura negativos para o isolamento de *Salmonella ssp.* e *Shigella ssp.* As cepas protótipo de EAEC 042 (CVD432⁺AggR⁺AAF/II⁺EAST1⁺Pet⁺Pic⁺Pap⁻PilS⁻) e 17-2 (CVD432⁺AggR⁺AAF/I⁺EAST1⁺Pet⁻Pic⁻Pap⁺PilS⁺) foram utilizadas nos ensaios moleculares e fenotípicos como controles positivos. Os isolados bacterianos foram preservados a -20 °C em caldo Luria Bertani (LB) adicionado de 15% de glicerol. Quando da ausência de citação específica, todas as culturas bacterianas foram realizadas em caldo LB a 37 °C por 18 h e sob agitação (200 rpm).

7.2- Reação da polimerase em cadeia (PCR) e iniciadores

Para extração do DNA, 1 mL de cultura bacteriana foi centrifugada (3.000 g/3 min.) e o precipitado ressuspensão em 500 µL de água desionizada. A suspensão foi colocada em banho-maria a 100 °C por 5 minutos e centrifugada (4.600 g/2 min.). O sobrenadante foi utilizado como fonte de DNA total para as reações de amplificação. Os produtos de amplificação foram resolvidos por eletroforese em gel de agarose (2% em tampão acetato pH 8,2) e visualizados após coloração com brometo de etídio. Os iniciadores para o gene *traA* foram desenhados baseados em seqüências conservadas apresentadas pelos sub-grupos de genes que codificam pilina F (FROST *et al.*, 1985). Baseado na seqüência depositada no GenBank sob o número K01147, o oligonucleotídio iniciador direto (5'-AAGTGTTTCAGGGTGCTTCTG-3') foi desenhado para reconhecer a seqüência peptídeo sinal de *traA* (posição 1940..1959), enquanto que o iniciador reverso (5'-TATTCTCGTCTCCCGACATC-3') foi posicionado no início do lócus *traL* (posição 2305..2324). As análises baseadas em alinhamento de seqüências mostraram que o par de iniciadores *traA* detectam os sub-tipos I (plasmídios F e ColVBtrp), IIa (ColB2), IIb (R124), III (R1) e IV (R100) dos genes de pilina F albergados pelos plasmídios IncF (FROST *et al.*, 1985). As reações de PCR para a detecção de *traA* foram realizadas em 30 ciclos utilizando nos passos de desnaturação, anelamento e polimerização os respectivos comandos: 94 °C por 60 s, 60 °C por 60 s e 72 °C por 90 s. A cepa protótipo de *E. coli* XL1-Blue (genótipo: F' proAB lacIqZΔM15 Tn10Tet^r) (Stratagene) foi utilizada como controle positivo para detecção do gene *traA*. O desenho dos iniciadores usados na detecção do gene *agn43* (tabela 1) foi baseado na seqüência depositada no GenBank sob o número AF237232. Os iniciadores usados para detecção de marcadores moleculares dos patótipos de *E. coli* estão descritos na tabela 1, bem como as respectivas temperaturas de anelamento. Todas as cepas de *C. freundii* e de EAEC utilizadas foram testadas para a presença dos marcadores moleculares descritos na tabela 1. Os iniciadores foram desenhados utilizando o programa *GeneFisher* disponibilizado na rede mundial de computadores – internet (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/genefisher/old.html>) (GIEGERICH *et al.*, 1996).

Tabela 1- Iniciadores utilizados em reações de PCR para detecção de marcadores moleculares de patótipos de *E. coli*.

Gene	Descrição do locus	Seqüência dos primers (5'-3')	Fragmento esperado (bp)	Temp. de anelamento (°C)	Referência
<i>agn43</i>	Antígeno 43 (adesina)	CGATCGATAAGCTAATAATAACC GAAGACCACCCTGGTGACA	552	55	Este estudo
Marcadores de <i>E. coli</i> enteroagregativa					
<i>aat</i>	Sonda AA (CVD432)	CTGGCGAAAGACTGTATCAT CCATGTATAGAAATCCGCTGTT	630	55-60	(PEREIRA <i>et al.</i> , 2007)
<i>aggR</i>	Ativador transcricional	CTAATTGTACAATCGATGTA CTGAAGTAATTCTTGAAT	324	50	Este estudo
<i>aggA</i>	AAF/I	GCTAACGCTGCGTTAGAAAGACC GGAGTATCATTCTATATTCGCC	421	55-60	(PEREIRA <i>et al.</i> , 2007)
<i>aafA</i>	AAF/II	GACAACCGCAACGCTGCGCTG GATAGCCGGTGAATTGAGCC	233	50	(PEREIRA <i>et al.</i> , 2007)
<i>agg3A</i>	AAF/III	GTATCATTGCGAGTCTGGTATTCAG GGGCTGTTATAGAGTAACTTCCAG	462	60	(BERNIER <i>et al.</i> , 2002)
<i>pilS</i>	<i>Pilus</i> tipo IV	ATGAGCGTCATAACCTGTTC CTGTTGGTTTCCAGTTTGAT	532	58	(DUDLEY <i>et al.</i> , 2006)
<i>pic</i>	Mucinase	TTCAGCGAAAAGACGAA TCTGCGCATTACATACCA	500	55-60	(PEREIRA <i>et al.</i> , 2007)
<i>pet</i>	Toxina codificada or plasmídio	CCGCAAATGGAGCTGCAAC CGAGTTTTCCGCCGTTTTTC	1.133	55-60	(PEREIRA <i>et al.</i> , 2007)
<i>astA</i>	Toxina termo-estável de EAEC	CCATCAACACAGTATATCCGA GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT	111	55-60	(PEREIRA <i>et al.</i> , 2007)
Marcadores de <i>E. coli</i> enteropatogênica					
Sonda <i>EAF</i>	Fator de adesão de EPEC	CAGGGTAAAAGAAAGATGATAA TATGGGGACCATGTATTATCA	396	52	(PEREIRA <i>et al.</i> , 2007)
<i>eae</i>	Intimina (adesina)	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATTCG	877	52	(PEREIRA <i>et al.</i> , 2007)
<i>escC</i>	Locus de virulência LEE 2	GTCAGCGACAGATATAACATAC AACGCATTCACCCTAATC	450	54	(KYAW <i>et al.</i> , 2003)
<i>escV</i>	LEE 3	CTAACTTCTTTCCCAACAATC TATCCCAACAGGCAAAAC	760	54	(KYAW <i>et al.</i> , 2003)
Marcadores de <i>E. coli</i> enterohemorrágica					
<i>stx</i>	Shiga toxina I e II	TTTACGATAGACTTCTCGAC CACATATAAAATTATTTTCGCTC	227	48	(FRATAMI CO <i>et al.</i> , 1995)
<i>hlyA</i>	hemolisina	GGTGCAGCAGAAAAAGTTGTAG TCTCGCCTGATAGTGTGGTA	1.551	57	(SCHMIDT <i>et al.</i> , 1995)
Marcadores de <i>E. coli</i> enterotoxigênica					
<i>cfmA-B</i>	Fator de colonização 1	CTATTGGTGCAATGGCTCTGACC GCAGCAGCTTCAAATCTTTGGC	352	55-60	(HAMERS <i>et al.</i> , 1989)
<i>cs3</i>	Fator de colonização CS3	CCACTCTAACCAAAGAAGCTGGC GGTGGTGGCAAAGCTAGCAGAG	250	60	Este estudo
<i>ltA</i>	Enterotoxina termo lábil	GGCGACAGATTATACCGTGC CCGAATTCGTATATATGTC	696	50	Este estudo
<i>estA</i>	Enterotoxina termo estável	CAGGATGCTAAACCAGTAGAGT TCCCTTTATATTATTAATAGCACCC	174	60	Este estudo
Marcadores de <i>E. coli</i> uropatogênica					
<i>papC</i>	<i>Pilus</i> P	GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	328	60	(DAIGLE <i>et al.</i> , 1994)
<i>sfaD-E</i>	Fímbria S	CTCCGGAGAAGCTGGGTGCATCTTAC CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	407	60	(DAIGLE <i>et al.</i> , 1994)
Marcadores de <i>E. coli</i> de adesão difusa					
<i>afaB-C</i>	Operon Afa-Dr	CATCAAGCTGTTTGTTCGTCGCCCG GCTGGGCAGCAAAGTATAACTCTC	792	55	(DAIGLE <i>et al.</i> , 1994)

7.3- Células HeLa

Para a manutenção de células HeLa foi utilizado meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* - Gibco BRL) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Gibco BRL) e antibióticos (ampicilina e estreptomicina). Após o preparo, o meio foi esterilizado utilizando filtros de 0,22 μm (SterivexTM-GP) e acondicionado a 4 °C. As células foram cultivadas a 37 °C sob atmosfera de CO₂ (4%).

7.4- Ensaio de adesão a células HeLa

Os ensaios foram realizados utilizando o método descrito por Mathewson e colaboradores com algumas modificações (MATHEWSON; CRAVIOTO, 1989). Células HeLa ($0,6 \times 10^5$ cels./orifício) foram cultivadas em DMEM (10% SFB e antibióticos) com atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C, utilizando placas de 24 orifícios (Costar[®] - Corning Incorporated, NY), montadas com lamínulas de vidro (10x10mm), até atingirem 50-70% de confluência. Então as células foram lavadas com salina tamponada com fosfato (D-PBS - *Dulbecco's PBS*) e o meio DMEM (sem antibióticos) contendo 1,4% de manose foi repostado e utilizado como meio teste. Para a determinação do padrão de adesão 50 μL de cultura bacteriana foram adicionados à cultura de células. Os testes de adesão foram incubados por 3 horas a 37 °C. Após o tempo de incubação, a cultura de células foi lavada 5 vezes com D-PBS e as lamínulas fixadas com metanol, coradas com May-Grüwald-Giemsa e analisadas por meio de microscopia óptica para determinar o padrão de adesão desenvolvido pelas bactérias. Os ensaios de inibição da adesão foram realizados de forma semelhante utilizando DMEM-manose acrescido de 0,5 mM de zinco.

7.5- Ensaio de infecção mista (qualitativo e quantitativo)

Nos ensaios qualitativos de infecção mista, células HeLa foram cultivadas como descrito no item anterior utilizando lamínulas. Para os ensaios quantitativos, as células ($0,8 \times 10^5$ cels./poço) foram cultivadas de forma semelhante utilizando placas de cultura de 12 poços sem o uso de lamínulas. Os ensaios foram realizados em dois períodos: em um primeiro instante as células HeLa eram infectadas com *C. freundii* (período de pré-infecção); em uma etapa seguinte era realizada a co-infecção com cepas de EAEC. A pré-infecção foi realizada com 50 μL de cultura bacteriana por uma hora, e a co-infecção com 150 μL por 2 horas. Nos ensaios qualitativos, as lamínulas após processo de coloração já descrito foram avaliadas por meio de microscopia óptica. Para a avaliação quantitativa da adesão, foi empregada a

contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) após a solubilização das células (0,5% Triton X100 em PBS), diluição (1:1000) e plaqueamento em meio sólido. Ágar MacConkey foi utilizado para diferenciação entre as colônias de *E. coli* (rápido fermentador de lactose) e *C. freundii* (fermentador tardio de lactose).

7.6- Ensaio de adesão utilizando pré-condicionamento de DMEM e de células HeLa

A influência de sinais químicos (autoindutores) nos eventos estudados foi avaliada por meio do pré-condicionamento do DMEM utilizando insertos permeáveis (Transwell® - Corning). Quando montados em placas de cultura, os insertos possibilitam a separação física dos poços em dois compartimentos por meio de uma membrana permeável de policarbonato com alta densidade de poros (10^8 poros/cm², com diâmetro de 0,4 µm), a qual permite o intercâmbio de substâncias químicas. Inicialmente placas de 24 orifícios, semeadas com células HeLa como descrito anteriormente, foram montadas com os insertos preenchendo a câmara inferior com 400 µL e a superior com 150 µL de DMEM-manose. Após o intervalo de uma hora (37 °C) para o estabelecimento do equilíbrio entre as duas câmaras, 100 µL de cultura bacteriana foi utilizado para inocular o compartimento superior do sistema e iniciar o pré-condicionamento do meio. O DMEM foi pré-condicionado durante duas horas a 37 °C e em seguida as células HeLa, no compartimento inferior, foram infectadas com 150 µL da cultura bacteriana por duas horas. Ao término do ensaio, as células HeLa eram fixadas, lavadas e coradas como já descrito anteriormente. Com o intuito de avaliar a participação das células hospedeiras nos eventos biológicos estudados, células HeLa foram pré-condicionadas pela adesão bacteriana (50 µL de cultura por 1 h) tratadas com gentamicina (200 µg/mL por 45 min.), lavadas com PBS para retirada da população bacteriana aderida e, então, utilizadas em ensaios de adesão como descrito anteriormente.

7.7- Ensaio de agregação bacteriana

Cinco mililitros de DMEM-manose aliqüotados em tubo foram inoculados com 20 µL da cultura bacteriana em fase estacionária (18 h) e incubados em condição estática a 37 °C por 18 h. A agregação bacteriana foi avaliada pela determinação da densidade óptica (OD 600nm) gerada pelas células planctônicas no ápice da cultura (700 µL). Em seguida a cultura foi homogeneizada e a densidade populacional no ápice da cultura foi novamente determinada. O índice de agregação foi calculado segundo a fórmula: $1 - (OD_{600\text{ nm}} \text{ da cultura estática} \div OD_{600\text{ nm}} \text{ da cultura homogeneizada})$.

7.8- Cinética de sedimentação

Os ensaios de sedimentação foram realizados em DMEM-manose, ou LB-manose quando citado, utilizando culturas de 18h ou sincronizadas em fase exponencial (fase log) do crescimento bacteriano (OD 600nm: 0,6-0,8). As culturas foram homogeneizadas e um total de 700 µL de monocultura ou de culturas misturadas (350 µL de cada monocultura) foram colocados em cubeta (percurso óptico de 1 cm) e permaneceram no espectrofotômetro para registro do decaimento da OD ao longo do ensaio. Para observar as estruturas envolvidas na agregação bacteriana, 10 µL de suspensão bacteriana coletados no início do decaimento óptico foram depositados sobre lamínulas de poliestireno (ThermanoxTM - Nunc) adsorvidas com poli-L-lisina e processadas seguindo o protocolo utilizado para microscopia eletrônica de varredura. Para avaliar a ação do zinco e do magnésio sobre a agregação bacteriana, os respectivos elementos químicos foram adicionados a cultura na concentração final de 1 mM. Após um minuto, as bactérias tratadas foram sedimentadas (3.000 g/3 min.) e o meio de cultura foi repostado. Depois de homogeneizada a suspensão bacteriana, o declínio da OD foi registrado como já descrito. A forma de sulfato heptaidratado mantida em solução aquosa estéril (0,1 M) foi usada como estoque das substâncias testadas. As curvas de cinética de sedimentação foram comparadas utilizando a taxa de sedimentação (TS h⁻¹) calculada pela seguinte relação matemática: $2 \times (OD_{\text{tempo 1}} - OD_{\text{tempo 1+30 min}})$.

7.9- Formação de biofilme bacteriano sobre lamínulas de vidro

Com o intuito de avaliar a formação de biofilmes sustentados por cepas de *C. freundii* e de EAEC, ensaios de biofilme foram realizados utilizando lamínulas de vidro (20 x 24 mm) como substrato de adesão que foram acondicionadas em contêineres de 30 mL (Sterilin[®]) em posição vertical. Preenchidos com 15 mL de DMEM-manose, os contêineres foram inoculados com 5 µL de cultura bacteriana e incubados em posição inclinada (45°) a 37°C por 18h sob agitação (170 rpm). Quando para análise em microscopia óptica, as lâminas eram lavadas em D-PBS, fixadas com metanol e coradas com solução aquosa de cristal violeta (0,1%). Para a análise por microscopia eletrônica de varredura seguia-se o procedimento apontado adiante. Ensaios de inibição empregando zinco (0,25 mM) foram realizados de forma semelhante.

7.10- Ensaio de triagem para formação de biofilme e inibição por zinco

A formação de biofilme por cepas de EAEC foi também avaliada utilizando o método descrito por Wakimoto e colaboradores que emprega placa de poliestireno contendo 96 poços

(WAKIMOTO *et al.*, 2004). Concisamente, 200 μL de DMEM-manose por poço foram inoculados com 5 μL de cultura bacteriana. As placas foram incubadas por 18 h a 37 °C e os biofilmes formados foram corados com CV (15 min.) lavados com D-PBS (200 μL /poço). Os biofilmes foram quantificados utilizando a média do CV adsorvido (OD 630 nm) no fundo do poço somado ao CV solubilizado por etanol (200 μL /poço). Os ensaios de inibição foram realizados de forma semelhante utilizando DMEM-manose acrescido de 0,5 mM de zinco.

7.11- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os espécimes destinados a análise por MEV foram processados seguindo métodos corriqueiramente empregados. As amostras foram fixadas durante pernoite em solução modificada de Karnovsky (5% de gluteraldeído e 4% de formaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M) e pós-fixadas por uma hora em tampão cacodilato (0,1 M) contendo 0,5% de tetróxido de ósmio e 0,8% de ferricianeto de potássio. Seguiu-se então a desidratação em acetona (30-100%), a secagem por ponto-crítico de CO_2 e a deposição de camada de ouro (20 nm) sobre as amostras. A análise e a captura das imagens foram realizadas com o microscópio de varredura eletrônica Zeiss DSM 962.

7.12- Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Dez microlitros de cultura bacteriana em DMEM-manose (37 °C por 18 h) foram colocados sobre telas de cobre (200 mesh) (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, USA) cobertas com filme de carbono (Formvar). Após 15 min em temperatura ambiente, as amostras adsorvidas às telas eram negativamente coradas com ácido fosfotúngstico (solução aquosa de 2%, pH 7,2) durante 10 min, e então mantidas em temperatura ambiente até secarem. As análises foram realizadas usando o microscópio eletrônico Joel Jem 100 C (Jeol).

7.13- Análise estatística

A análise estatística e a expressão gráfica dos dados foram geradas utilizando o programa estatístico SPSS versão 13.0. Médias foram comparadas por meio do teste t de Student para amostras independentes, considerando a homogeneidade de variância testada pelo método de Levene. Freqüências foram analisadas por meio do teste exato de Fisher bicaudal. Os resultados com valor de $P \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

8- Resultados

8.1- *Citrobacter freundii* agregativo formador de biofilme (BACF) isolado de diarreia

Com o intuito de avaliar a ocorrência do fenótipo AA em *C. freundii*, 26 isolados de adultos, incluindo 12 cepas isoladas do surto de diarreia, 4 cepas isoladas de casos esporádicos e 10 cepas isoladas de indivíduos assintomáticos, tiveram seus fenótipos de adesão a célula HeLa determinados. Vinte cepas (77%) mostraram o padrão AA, sendo 13 delas isoladas de casos (incluindo 10 cepas do surto) e 7 recuperadas de controles. Esses dados demonstraram que o fenótipo AA é uma característica recorrente entre as cepas de *C. freundii*, não obstante a fonte de isolamento (caso ou controle).

Tendo em mente que o biofilme é considerado um fator de virulência em muitas espécies bacterianas, as cepas de *C. freundii* foram testadas quanto à capacidade de formarem biofilme sob matriz de poliestireno. Os ensaios revelaram a existência de um subgrupo distinto de cepas. Seis isolados de *C. freundii* mostraram habilidade para formar biofilme semelhante àquela desenvolvida por cepas protótipo de EAEC (OD_{600nm} superior a $0,76 \pm 0,06$) (figura 6). Em sua totalidade este subgrupo era formado por cepas associadas à diarreia que expressavam o padrão AA, e incluía 5 isolados de diarreia em adultos e a cepa Cf205, isolada da criança diarreica (figura 6A). Neste subgrupo de *C. freundii* que expressava AA a habilidade para formar biofilme ($1,11 \pm 0,29$) foi estatisticamente diferente ($P < 0,001$) quando comparada com as demais cepas AA-positivas isoladas de casos ($0,38 \pm 0,12$) ou de controles ($0,28 \pm 0,08$) (figura 6B).

De forma semelhante, a heterogeneidade apresentada por EAEC determina a ocorrência de subgrupos de cepas capazes de formar biofilmes com diferentes níveis de intensidade. Ciente de tal fato e considerando que a formação de biofilme é fator de virulência consensual em EAEC, foi criado o termo *C. freundii* agregativo formador de biofilme (BACF – *biofilm-forming aggregative C. freundii*) com o intuito de evidenciar as cepas de *C. freundii* com as seguintes características: positivas para AA, proficientes na formação de biofilme e associadas à diarreia. Em contrapartida, cepas de *C. freundii* de adesão difusa não formaram densos biofilmes, independente da fonte de isolamento (figura 6A).

Análises baseadas em microscopia eletrônica de transmissão foram realizadas com o intuito de caracterizar melhor os fatores de adesão usados pelas cepas de BACF. As micrografias mostraram que as células de BACF não demonstravam qualquer estrutura

fimbrial disposta na superfície bacteriana (figura 7), resultado que indicava a ocorrência de adesinas afimbriais entre as cepas de BACF.

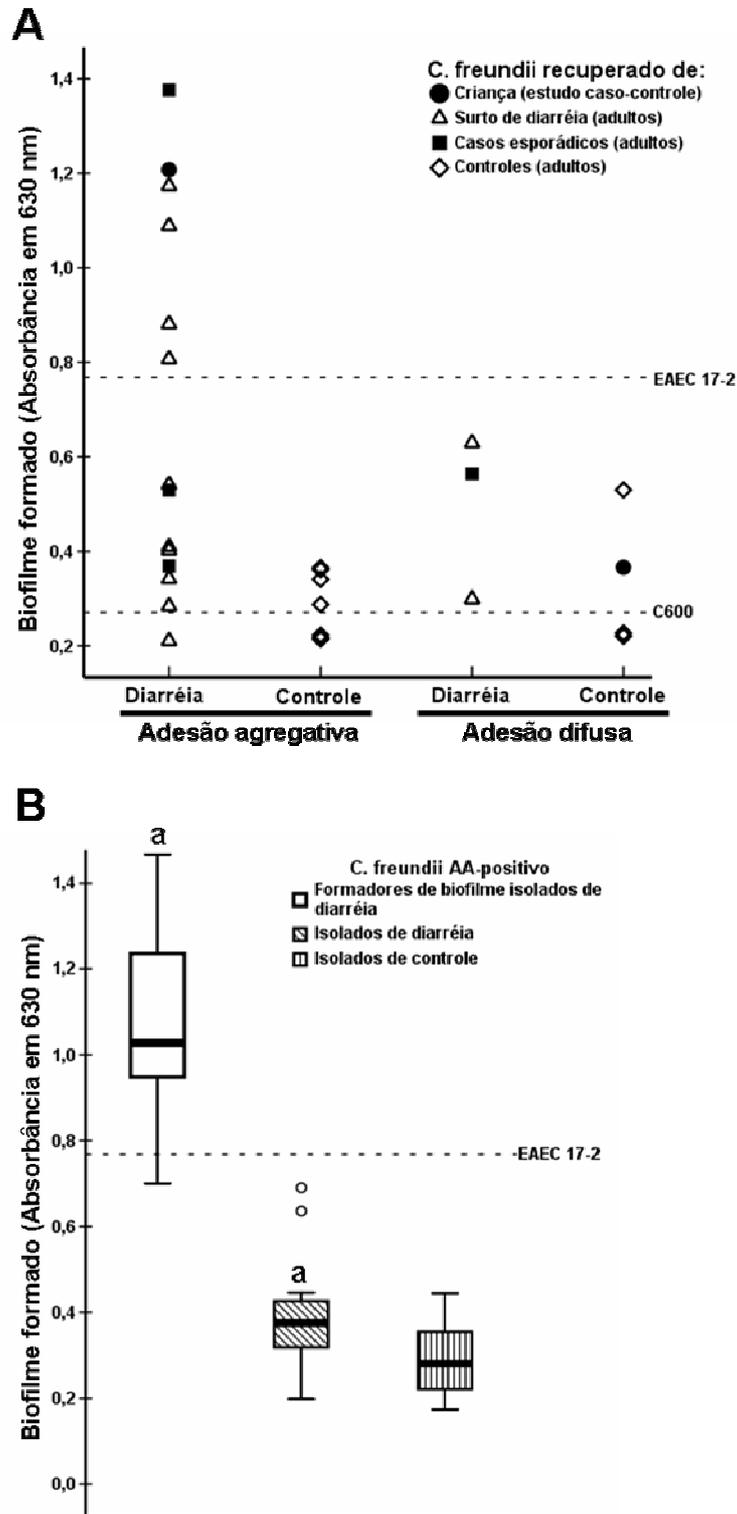


Figura 6 - Biofilme formado por cepas de *C. freundii*. A- Biofilme formado por cepas isoladas de diarreia e controles classificadas pelo padrão de adesão. B- Intenso biofilme formado por um subgrupo de cepas AA-positivas isoladas de diarreia. “a” indica $P < 0,001$ para comparação entre 2 grupos (teste T de Student para amostras independentes).

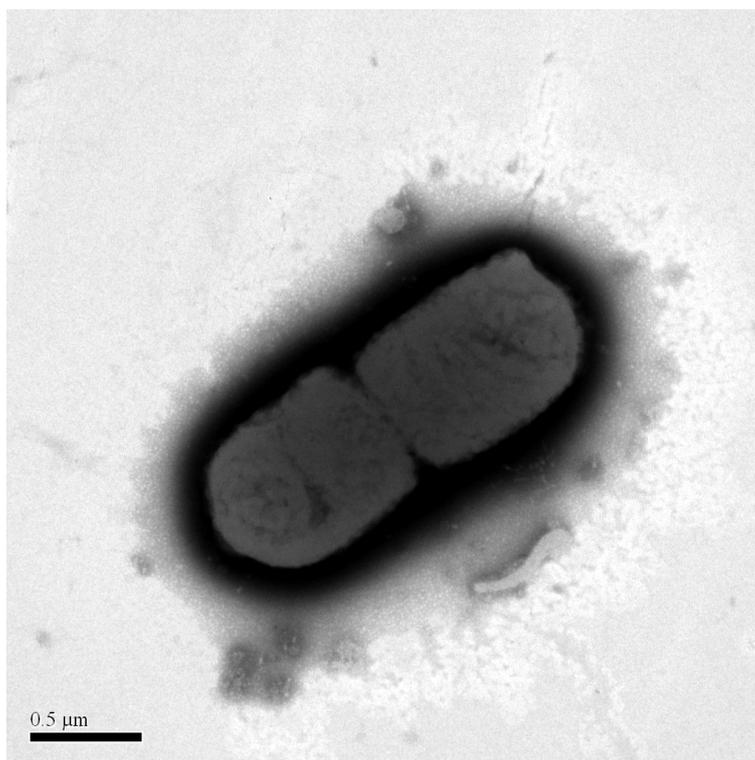


Figura 7 – Micrografia eletrônica de transmissão mostrando células de BACF. Não foram detectadas estruturas fimbriais dispostas na superfície das células de BACF.

Com o intuito de detectar possíveis fatores de virulência vinculados a *E. coli* e compartilhados por *C. freundii*, 23 marcadores moleculares (tabela 1) abrangendo 5 categorias patogênicas de *E. coli* (EAEC, EPEC, ETEC, EHEC, DAEC e UPEC – uropatogênica) foram testados. Todas as cepas de *C. freundii* apresentaram resultados negativos para os marcadores testados.

Compilando os resultados iniciais, verificou-se que *C. freundii* isolado de humanos expressa o fenótipo AA, sendo esta característica frequentemente detectada (82%) em cepas recuperadas de diarreia. Além do mais, dentre as cepas de *C. freundii* AA-positivas, um subgrupo caracterizado pelo intenso biofilme formado foi exclusivamente associado à diarreia e, em consequência, foi denominado *C. freundii* agregativo formador de biofilme (BACF).

Diante da colonização simultânea de dois agentes com fenótipo AA associado a um episódio grave de diarreia, passou-se a investigar possíveis interações entre EAEC e BACF que pudessem contribuir para o processo diarreico.

8.2- Aumento da adesão bacteriana é um fenótipo inter-específico decorrente da combinação BACF-EAEC isolada de diarréia

Ensaio de infecção mista foram realizados para avaliar a adesão desenvolvida pela respectiva combinação bacteriana (*C. freundii* mais EAEC) recuperada do caso 205 e do controle 047. Embora as cepas de EAEC 205-1 e 047-1 provocassem descolamento celular, a adesão desenvolvida pela combinação bacteriana isolada do caso 205 (BACF 205 e EAEC 205-1) foi maior do que aquela recuperada do controle 047 (*C. freundii* 047 e EAEC 047-1) (figura 8).

Pré-infecção por *C. freundii* (1h) + Co-infecção de EAEC (2h)

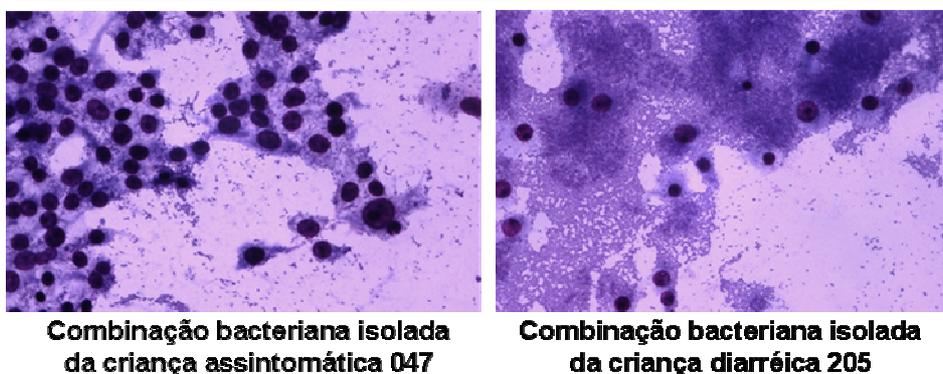


Figura 8 – Adesão a células HeLa desenvolvida pelas combinaes bacterianas (*C. freundii* e EAEC) recuperadas da criança assintomática 047 e da criança diarreica 205.

Para verificar se o aumento da adesão bacteriana era um efeito inespecífico provocado por qualquer combinao de cepas agregativas, ensaios de co-infeco utilizando apenas cepas de EAEC foram realizados. Não foram detectados aumentos na adesão bacteriana quando utilizadas as seguintes combinaes: EAEC 340-1 ou 205-1 com cepas protótipo de EAEC (042 ou 17-2); EAEC 340-1 com 205-1; e, co-infeco com as cepas 042 e 17-2. Desta forma, o aumento de adesão observado passou a ser encarado como um evento sinérgico específico desenvolvido pela combinao BACF-EAEC.

8.3- Sinalizao mediada por substâncias químicas e pelo contato com a célula hospedeira

A participao de sinalizao química inter-específica no aumento da adesão bacteriana foi avaliada usando insertos permeáveis montados em placas de cultura. Os insertos permitem a divisão dos poços de cultura em duas câmaras fisicamente separadas e com livre intercâmbio de possíveis sinalizadores químicos.

O meio pré-condicionado por BACF 205 ou pelas cepas de EAEC estudadas não induziu qualquer mudança na adesão desenvolvida por EAEC 042, EAEC 340-1 ou por BACF 205 (figura 9). Desta forma ficou evidente que, nas condições testadas, o aumento da adesão não estava diretamente vinculado a sinais químicos.

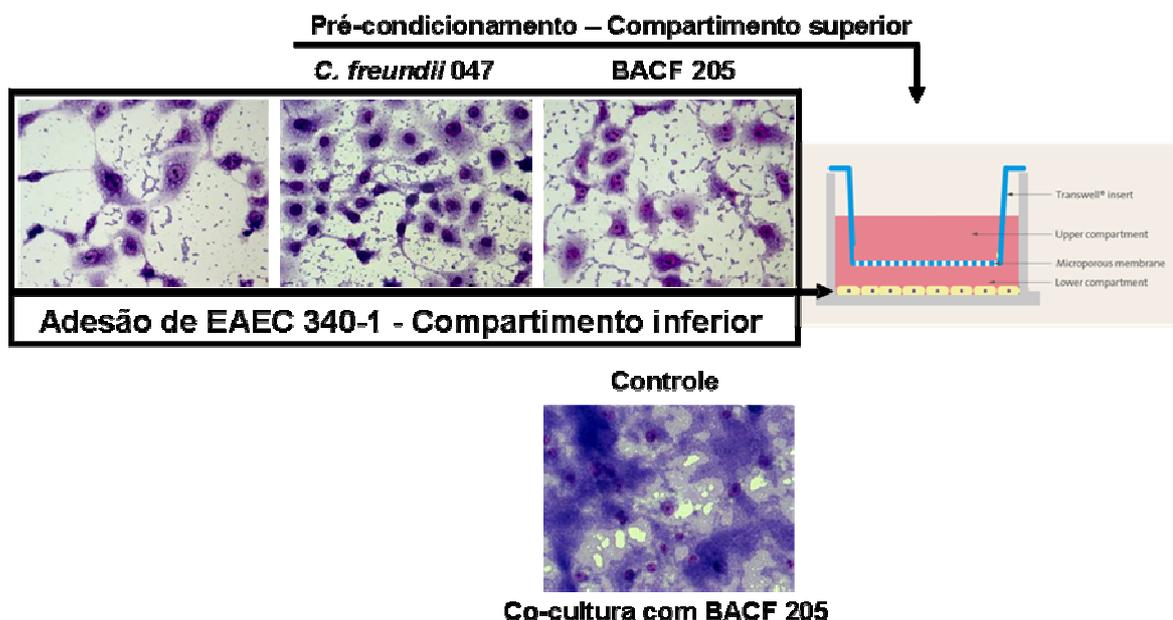


Figura 9 - Ensaio de pré-condicionamento de DMEM utilizando insertos permeáveis. Não há evidências de sinalização química associada ao aumento da adesão bacteriana decorrente da combinação BACF-EAEC. O experimento controle foi realizado paralelamente na ausência do inserto permeável.

Considerando que o contato bacteriano com a célula hospedeira pode ser necessário para o aumento da adesão bacteriana, células HeLa pré-condicionadas pela adesão de BACF 205 foram tratadas com antibiótico, lavadas para remoção das bactérias, e então usadas em ensaios de adesão com cepas de EAEC (figura 10, painel B). Uma vez que a intensidade da adesão bacteriana manteve-se inalterada, concluiu-se que a célula hospedeira tinha participação irrelevante no aumento da adesão bacteriana.

Adicionalmente, ensaios semelhantes realizados na ausência do passo de lavagem mostraram que o fenótipo da adesão aumentada podia ser iniciado por ação exclusiva das cepas de EAEC. Assim, a população de BACF 205 aderida a células HeLa e inativada por antibiótico ainda mantinha a habilidade de intensificar a adesão das cepas 340-1 e 042 (figura 10, painel A). Este resultado mostra que a adesão aumentada de BACF 205 desenvolvida nos ensaios de infecção mista quando em combinação com EAEC 042 era, em parte, sustentado pela ação direta da cepa 042.

Em suma, a adesão bacteriana desenvolvida pelo par BACF-EAEC é modulada por interação física, em parte iniciada pelas cepas de EAEC, independentemente de sinalização química e da participação da célula hospedeira.

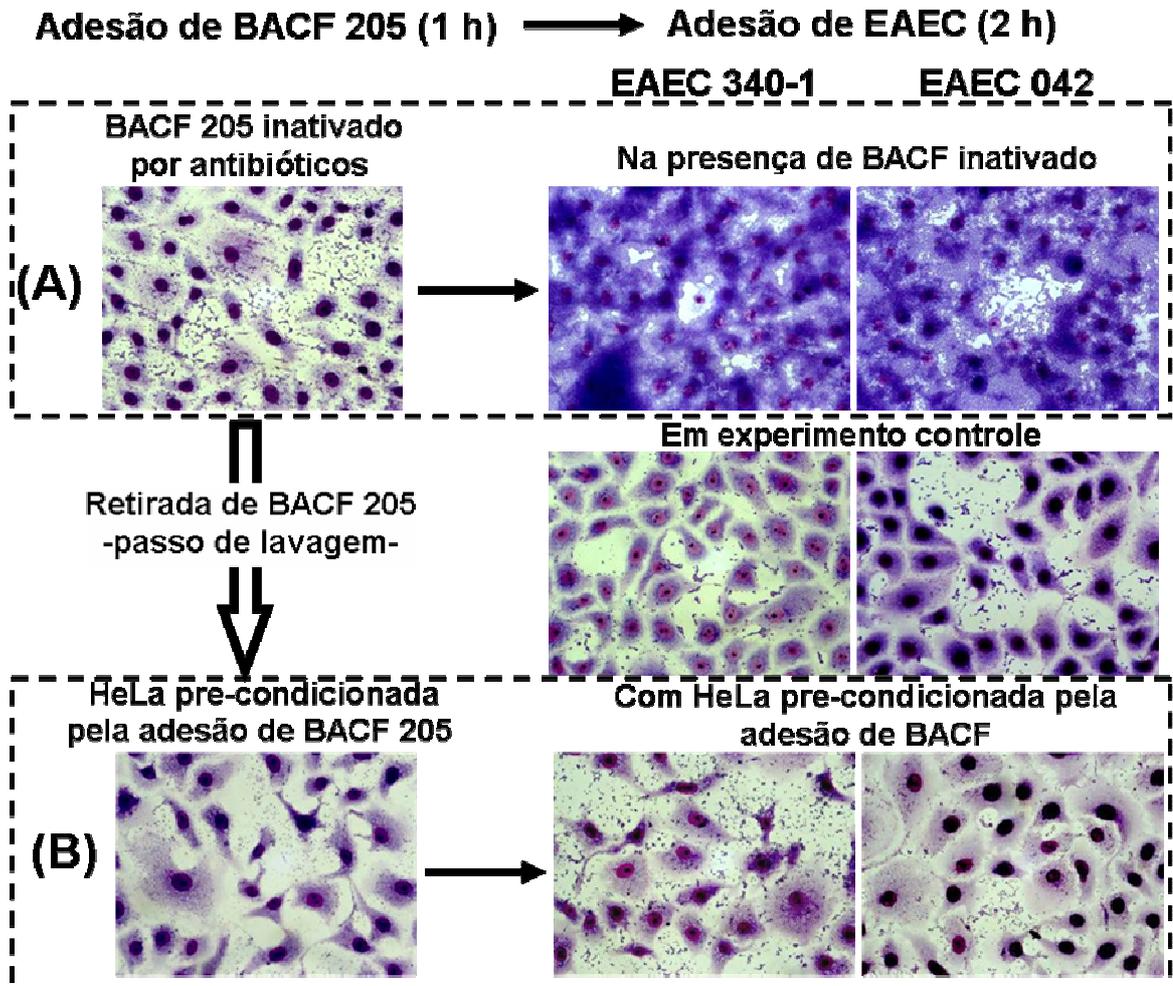


Figura 10 – Ensaio de pré-condicionamento de células HeLa pela adesão de BACF 205. Painel A – Adesão de cepas de EAEC é intensificada na presença da população inativada de BACF 205 aderida a células HeLa. Painel B – Células HeLa pré-condicionadas pela adesão de BACF 205 não induzem aumento da adesão de cepas de EAEC. Após a infecção com BACF 205, o tapete celular foi lavado para remoção do pré-infectante e utilizado para testar a adesão de BACF 205.

8.4- EAEC albergando locus conjugativo (*traA*) promove agregação bacteriana na presença de BACF 205

Ensaio de agregação bacteriana e de cinética de sedimentação foram realizados para verificar possíveis interações físicas entre as cepas de EAEC e de *C. freundii* que pudessem explicar o aumento de adesão descrito.

Algumas culturas em caldo de *E. coli* agregam, e conseqüentemente sedimentam, quando são mantidas em condição estática; sendo a adesina Ag43, com capacidade de auto-reconhecimento, o principal mediador bacteriano deste fenômeno. Endossando o resultado positivo para Ag43 apresentado pela EAEC 042 em ensaio de PCR, sua monocultura mostrou intensa agregação (índice de agregação de 0,99). Com a intenção de avaliar possíveis interações inter-específicas os ensaios foram conduzidos utilizando as cepas de EAEC 340-1, 205-1 ou 17-2 que foram testadas como co-culturas ou suspensões bacterianas mistas em combinação com BACF 205 ou *C. freundii* 047.

Os ensaios de agregação mostraram que a co-cultura de BACF 205 com EAEC 340-1 apresentava maior índice de agregação ($0,70 \pm 0,04$) quando em comparação com a co-cultura *C. freundii* 047-EAEC 340-1 ($0,52 \pm 0,05$) e as seguintes monoculturas: BACF 205 ($0,34 \pm 0,11$), EAEC 340-1 ($0,53 \pm 0,05$) e *C. freundii* 047 ($0,53 \pm 0,05$). Os ensaios de cinética de sedimentação mostraram que os agregados bacterianos formados por BACF 205 e EAEC 340-1 não eram re-estabelecidos se a co-cultura fosse homogeneizada. Ademais, não foi observada agregação bacteriana quando monoculturas em fase estacionária (18h) de BACF 205 e EAEC 340-1 eram misturadas. Compilados, os resultados indicavam que o fenômeno envolvido na interação BACF 205-EAEC 340-1 deveria ocorrer em um momento específico durante o crescimento bacteriano e envolvia o reconhecimento inter-específico.

Para verificação de tal hipótese, ensaios de cinética de sedimentação foram realizados empregando culturas sincronizadas em fase log do crescimento bacteriano (figura 11). Os ensaios ratificaram que as cepas de EAEC 340-1 e 205-1 agregam, e conseqüentemente sedimentam, somente quando na presença de BACF 205 (figura 11A). Quando misturadas a BACF 205, as cepas de EAEC 340-1 e 205-1 iniciaram uma queda constante na curva de sedimentação (taxa de sedimentação [TS] = $0,5 \text{ h}^{-1}$) logo nos primeiros 15 minutos. Contraditoriamente, a cepa de EAEC 17-2 não induziu agregação quando misturada a BACF 205. Além do mais, a sedimentação ocorreu na ausência de auto-reconhecimento uma vez que as monoculturas de EAEC e a de BACF 205 não agregaram (figura 11A). Imagens de MEV revelaram que os agregados bacterianos eram mediados por longos e flexíveis filamentos que se estendem por até $2 \mu\text{m}$ promovendo interações entre as bactérias (figura 11B).

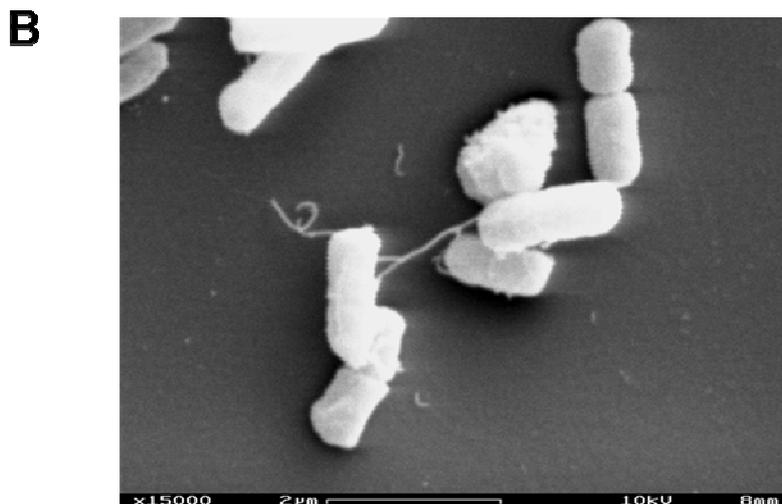
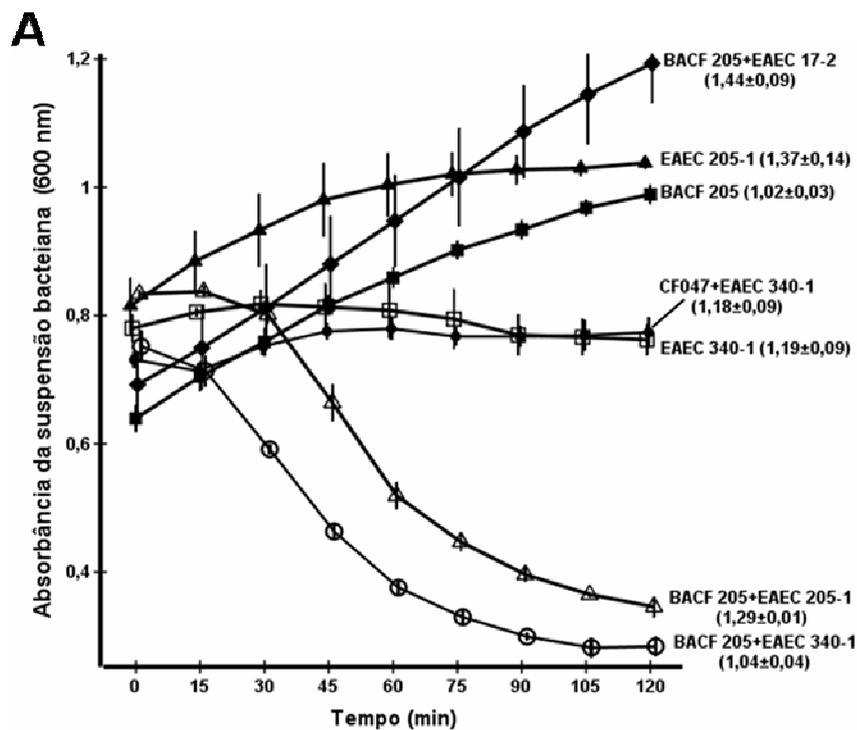


Figura 11 – Ensaio de cinética de sedimentação. Os números entre parênteses indicam a densidade óptica da suspensão bacteriana após a homogeneização no tempo 120 minutos. A- Cinética de sedimentação desenvolvida por BACF 205 e cepas de EAEC. A agregação bacteriana ocorre em decorrência das seguintes combinações: BACF 205 na presença da cepa de EAEC 340-1 ou 205-1 (cepas albergando *traA*). B- Micrografia (MEV) mostrando pili flexíveis, dispostos sem formar feixes, mediando a formação dos agregados na suspensão BACF-EAEC. Os *pili* estendem-se por 2 μ m conectando outras bactérias que formam o agregado.

Compilando os resultados, o reconhecimento inter-específico em fase log e o envolvimento de *pili* flexíveis alcançando 2 μ m de comprimento indicavam a participação de *pilus* conjugativo F na formação dos agregados bacterianos. Endossando o envolvimento de *pili* F na agregação bacteriana, as cepas de EAEC 340-1 e 205-1 mostraram resultados

positivos para *traA* (pilina F) em ensaios de PCR. Em contraposição, a cepa de EAEC 17-2, que não induzia agregação na presença de BACF 205, não albergava *traA*.

8.5- Zinco inibe a agregação bacteriana promovida por cepas de EAEC *traA*-positivas quando na presença de BACF 205

Evidências adicionais acerca do envolvimento do *pilus F* com a agregação bacteriana foram obtidas empregando zinco, um inibidor específico de *pili F*. O tratamento com zinco das cepas de EAEC 340-1 e 205-1 impactou negativamente as respectivas curvas de agregação quando em presença de BACF 205 (figura 12).

Em relação à cepa 340-1, a redução na taxa de sedimentação (considerando $T_1 = 15$ min e $T_{1+15} = 30$ min) foi de 78% ($0,47 \text{ h}^{-1}$ versus $0,12 \text{ h}^{-1}$, $P = 0,027$). Inibição semelhante foi obtida nos ensaios com a combinação BACF 205-EAEC 205-1 que apresentou redução na taxa de sedimentação de 57% quando na presença de zinco ($0,57 \text{ h}^{-1}$ versus $0,24 \text{ h}^{-1}$, $P = 0,035$). Em contrapartida, o tratamento da cepa 340-1 com magnésio acentuou a queda da curva de sedimentação (EAEC 340-1-BACF 205) que passou a ter início súbito ($T_1 = 0$) com taxa de sedimentação de $0,7 \text{ h}^{-1}$.

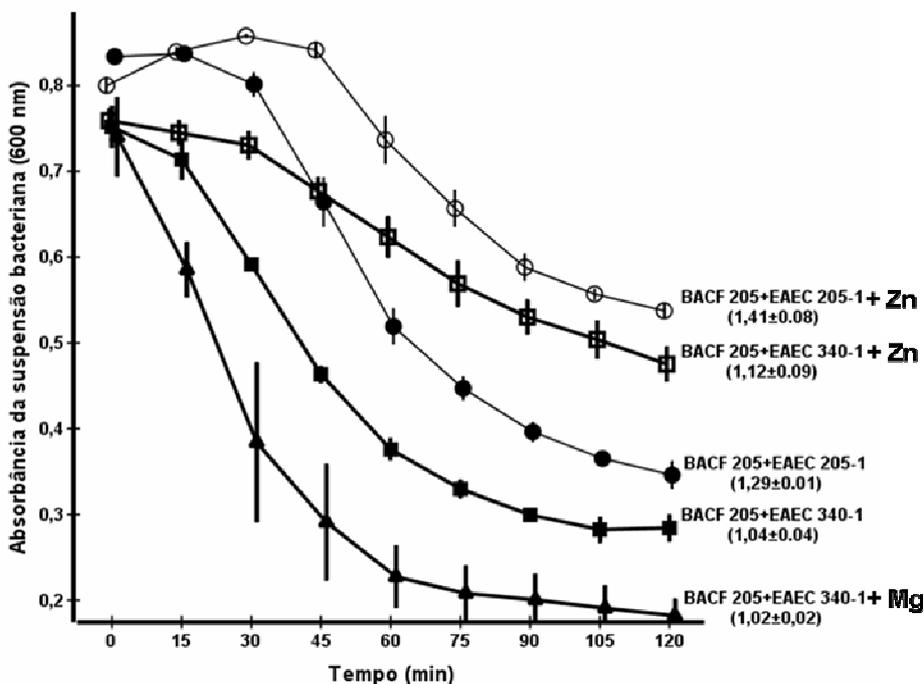


Figura 12 – Cinética de sedimentação bacteriana na presença de zinco (Zn) e magnésio (Mg). Efeito do zinco sobre a curva de sedimentação desenvolvida pelas cepas de EAEC 340-1 e EAEC 205-1 na presença de BACF 205. Os números entre parênteses indicam a densidade óptica da suspensão bacteriana após a homogeneização no tempo 120 minutos.

8.6- Agregação bacteriana e a intensificação de biofilme são eventos vinculados

Os indícios que diretamente vincularam os eventos de agregação inter-específica à formação de biofilme foram obtidos variando o tipo de meio de cultura empregado nos ensaios. O crescimento em DMEM-manose de BACF 205 e EAEC 340-1 culminava na agregação bacteriana e no aumento do biofilme formado, no entanto, a intensificação do biofilme era abolida quando se empregava como meio de cultura LB-manose (figura 13). Diante desta observação, ensaios de cinética de agregação foram realizados para determinar se o reconhecimento inter-específico entre BACF 205 e EAEC 340-1 era também abolido quando utilizado LB-manose. Como esperado, os resultados demonstraram a ausência de interação física entre BACF 205 e EAEC 340-1 em LB-manose, comprovando, assim, que a agregação bacteriana e a intensificação dos biofilmes eram eventos vinculados.

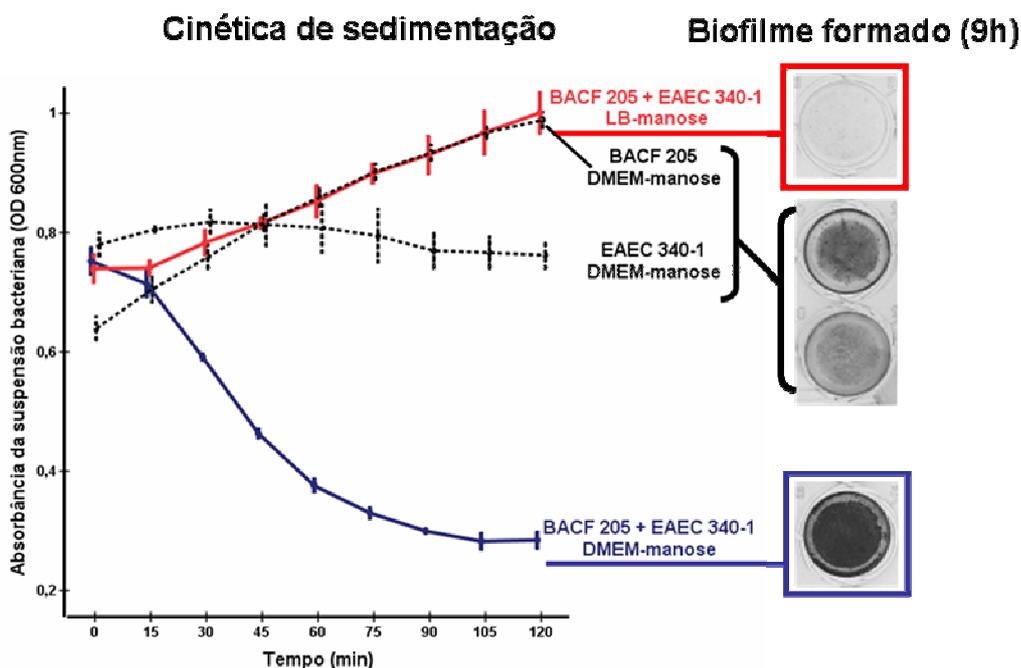


Figura 13 - Agregação bacteriana e a intensificação do biofilme desenvolvidos pela co-cultura de BACF 205 e EAEC 340-1 em DMEM-manose são eventos relacionados. Os biofilmes bacterianos foram formados em poços de placas de cultura sob condição estática. Cultura em LB-manose aboli a interação física entre BACF 205 e EAEC 340-1 e a conseqüente intensificação do biofilme formado pela co-cultura BACF 205-EAEC 340-1.

8.7- EAEC típicas AAF-positivas induzem o aumento de biofilmes mistos quando portadoras do *locus tra*

Para verificar a associação entre a presença do *locus tra* e o aumento da adesão bacteriana, as cepas de EAEC típicas 17-2 (*traA*-), 205-1 (*traA*+) e 340-1 (*traA*+) foram testadas quanto a capacidade de intensificar a formação dos biofilmes mistos quando na presença de BACF 205. As cepas de EAEC selecionadas compartilhavam a mesma fímbria de adesão agregativa (AAF-I). Além do mais, foi pesquisada a presença de determinantes genéticos para *pili* tipo IV de EAEC utilizando o par de iniciadores *pilS* (tabela 1). Fatores de adesão característicos de outras categorias diarreiogênicas de *E. coli* também foram pesquisados (tabela 1). Em complemento, a presença de marcadores moleculares para as ilhas de patogenicidade LEE e para o sistema de secreção do tipo III (tabela 1) foi verificada. Ao fim da análise molecular foi confirmado que, com a exceção do *locus tra*, as cepas de EAEC 17-2, 205-1 e 340-1 compartilhavam o mesmo genótipo: pCVD432⁺AggR⁺AAF-I⁺,PilS⁺ e Pap⁺.

Inicialmente, foi confirmado que a intensificação da adesão bacteriana, anteriormente visualizada com células HeLa, era reprodutível sob as novas condições experimentais que incluíam cultivo não-estático e superfície vítrea como matriz para adesão (figura 14A). Desta forma, os biofilmes mistos formados pela co-cultura de cepas de EAEC *traA*-positivas (340-1 e 205-1) e BACF 205 mostraram um aumento médio de 2,7 vezes quando comparados aos biofilmes formados por monoculturas de EAEC 340-1 e 205-1 ($P < 0,001$) (figura 15A). O aumento da adesão foi observado nas duas faces da lamínula demonstrando que a intensificação dos biofilmes decorria de processos ativos de adesão ao invés de mera consequência da sedimentação bacteriana (figura 14B). Em oposição, o biofilme misto formado por EAEC 17-2 (negativa para *traA*) e BACF 205 ($OD_{630nm} 0,431 \pm 0,084$) não apresentou diferença estatística quando comparado ao biofilme formado pela cepa 17-2 ($OD_{630nm} 0,383 \pm 0,079$) ($P = 0,237$) (figura 14A e 15A).

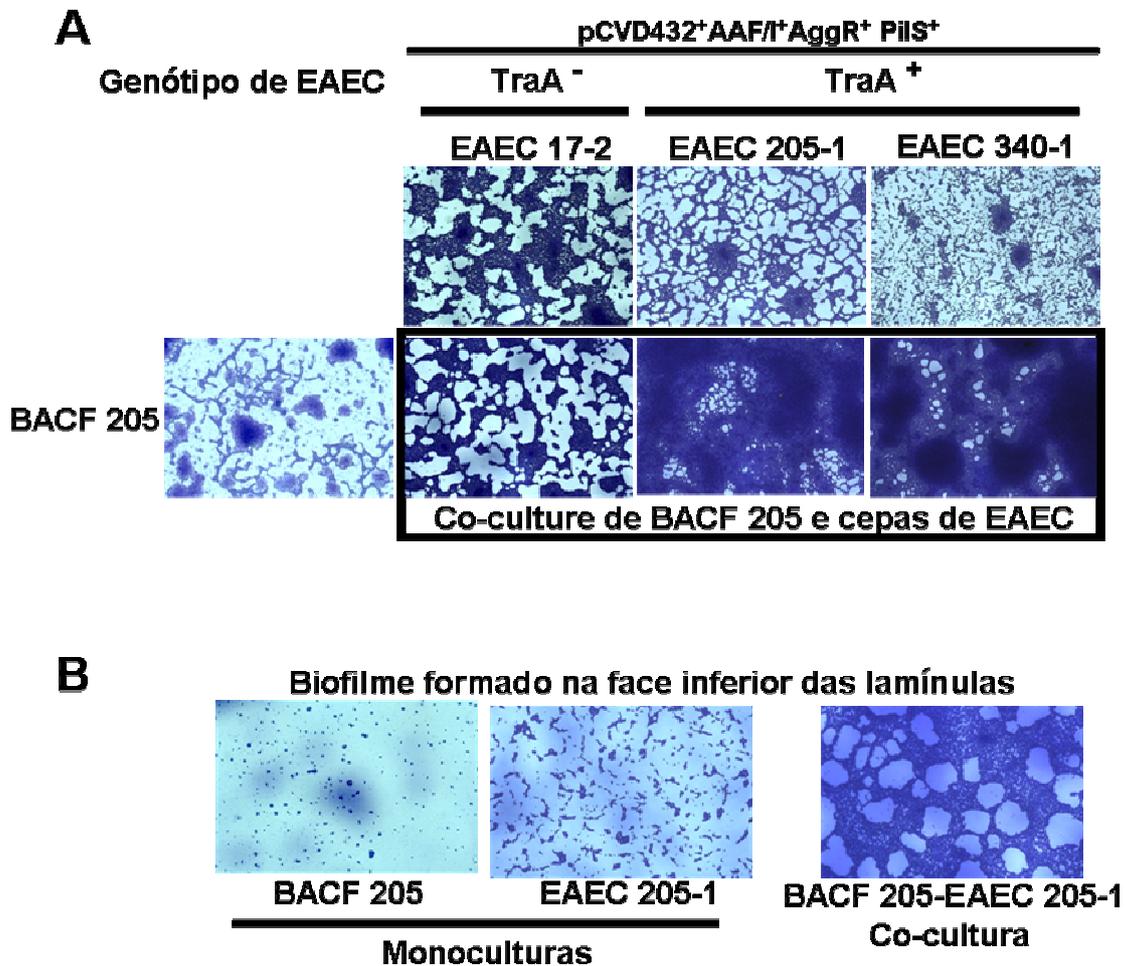


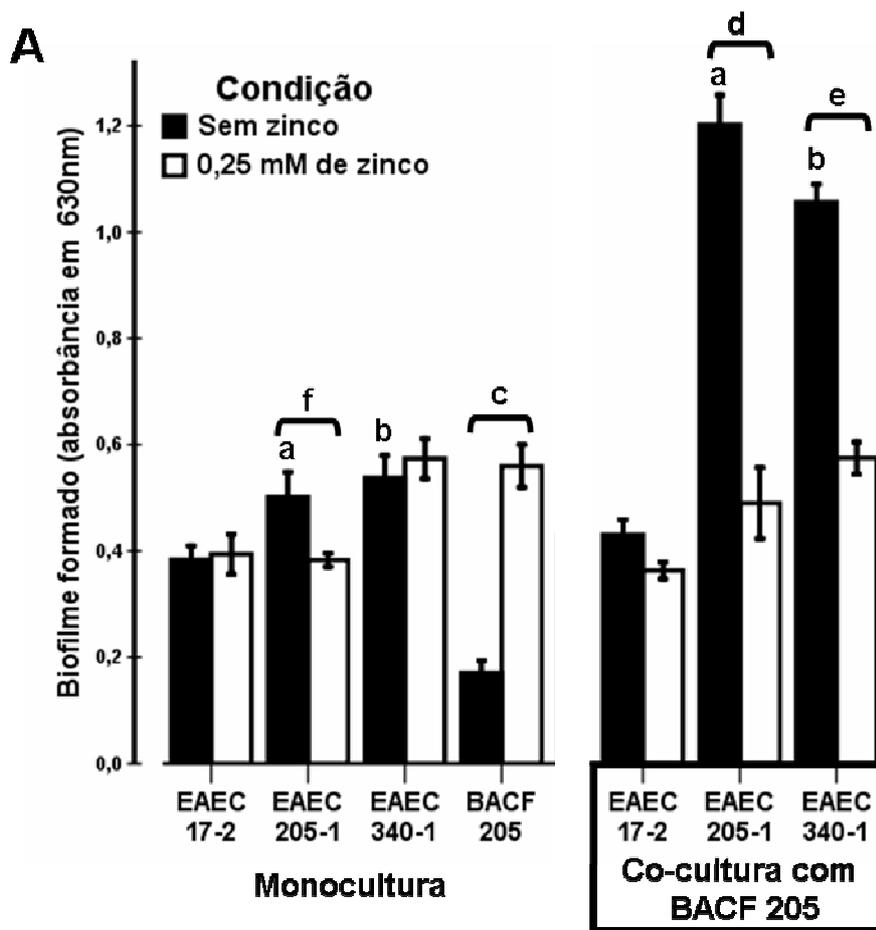
Figura 14 - Formação de biofilme sobre lamínulas de vidro. As micrografias mostram a adesão bacteriana desenvolvida nas faces superior (A) e inferior (B) das lamínulas. A- Biofilmes formados por monocultura de BACF 205 ou de cepas de EAEC foram comparados com os biofilmes formados por co-cultura de BACF 205 e cepas de EAEC. A intensificação dos biofilmes decorreu da co-cultura de BACF 205 e cepas de EAEC *traA*-positivas. B- Micrografias de biofilmes formados na face inferior das lamínulas. A intensificação dos biofilmes foi visível também na face inferior das lamínulas indicando que o aumento da adesão bacteriana é resultado de um processo ativo ao invés de mera consequência da sedimentação bacteriana.

8.8- Efeito do zinco sobre biofilmes formados por cepas de EAEC típicas AAF-positivas portadoras de *traA*

O envolvimento de supostos *pili* F na intensificação dos biofilmes mistos desenvolvidos pela combinação BACF 205 e EAEC *traA*-positiva foi avaliado por meio da adição de zinco à cultura de biofilme (figura 15). Inicialmente, o efeito do zinco sobre a formação de biofilmes simples foi avaliado. Os ensaios mostraram que 0,25 mM de zinco (concentração 12 vezes menor do que o MIC do zinco) reduzia em 23% o biofilme formado por EAEC 205-1 ($P = 0,038$) (figura 15A). Em relação às cepas de EAEC 340-1 e 17-2, nenhuma redução no biofilme foi detectada. Contraditoriamente, o biofilme formado por BACF 205 mostrou um aumento significativo de três vezes em decorrência da adição de zinco à cultura ($P < 0,001$) (figura 15A). Em relação às cepas de EAEC *traA*-positivas, os resultados indicam que os putativos *pili* F assumiriam variável relevância durante a formação de biofilmes simples.

Por fim, foi avaliado o impacto do zinco sobre a formação dos biofilmes mistos. Apesar do aumento da adesão de BACF 205, a presença de zinco reduziu significativamente ($P < 0,001$) os biofilmes mistos formados por EAEC 205-1 (redução de 59%) ou por EAEC 340-1 (redução de 45%) quando na presença de BACF 205 (figura 15A e B). Nestas condições os biofilmes mistos mostraram níveis semelhantes àqueles alcançados pelo biofilme formado pela monocultura de BACF 205 na presença de zinco (figura 15A). Como esperado, o tratamento com zinco não influenciou biofilme misto formado por BACF 205 e EAEC 17-2 (cepa *traA* negativa) (figura 15A).

O efeito inibitório do zinco sobre os isolados albergando *traA* indica que *pili* F expressos por EAEC tornam estas cepas predispostas à formação de biofilmes mistos quando cepas de *C. freundii* agregativas estão presentes.



B

Co-cultura BACF 205-EAEC 340-1
-Biofilme formado-

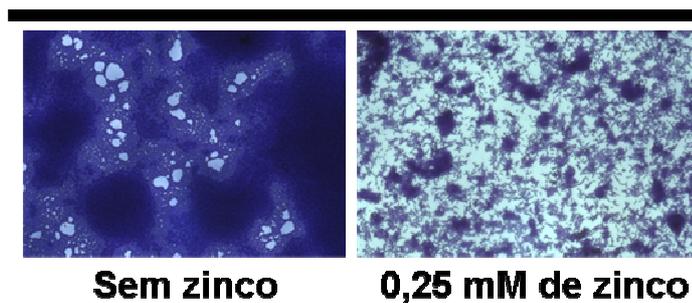


Figura 15 - Ensaio quantitativo de formação de biofilme e inibição por zinco.
 A- Quantificação dos biofilmes. Biofilmes formados por monocultura de BACF 205 ou de cepas de EAEC foram comparados com os biofilmes formados por co-cultura de BACF 205 e cepas de EAEC. A co-cultura de BACF 205 e cepas de EAEC *traA*-positivas induzem aumentos significativos nos biofilmes formados. Na presença de zinco o fenômeno de intensificação dos biofilmes é abolida. As letras “a”, “b”, “c”, “d”, e “e” indicam $P < 0,001$ para a comparação entre dois grupos; “f” indica $P < 0,05$ (teste t de Student para amostras independentes). B- Formação de biofilme sobre lamínulas de vidro. As micrografias mostram a adesão bacteriana desenvolvida na face superior das lamínulas e a inibição provocada pela adição de concentração não letal de zinco à cultura bacteriana.

8.9- Biofilmes analisados por MEV

As micrografias revelaram que o biofilme formado por BACF 205 não apresentava qualquer apêndice extracelular (figura 16A). Em contraposição, os biofilmes desenvolvidos pelas cepas de EAEC 340-1 e 205-1 eram mediados por *pili* que conectavam a superfície abiótica (figura 16B). Os *pili* não estavam limitados a região polar das bactérias e, ocasionalmente, eram vistos entrelaçados formando estruturas mais espessas. Os biofilmes intensificados em decorrência do co-cultivo de EAEC 340-1 ou 205-1 com BACF 205 eram também mediados por *pili* que, além da adesão à superfície abiótica, frequentemente promoviam interações bactéria-bactéria (figura 16C). Como esperado, o biofilme formado pela cepas de EAEC 17-2, que é negativa para *traA*, não apresentou estruturas tipo *pili* mediando a adesão bacteriana (figura 16D).

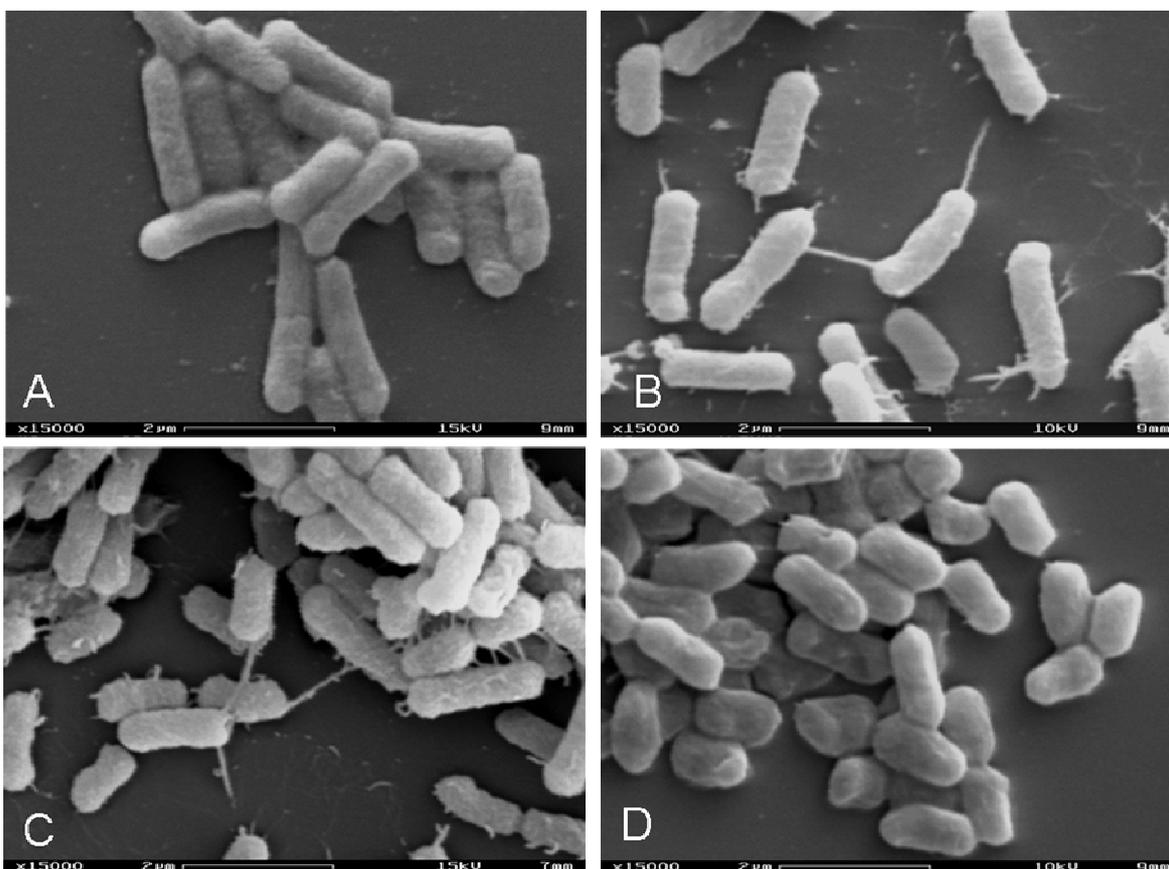


Figura 16 - Micrografias (MEV) dos biofilmes formados por BACF 205 e cepas de EAEC. A- Biofilme formado pela monocultura de BACF 205. B- Biofilme formado pela monocultura de EAEC 340-1 (*traA*-positiva). C- Biofilme intensificado formado pela co-cultura de BACF 205 e EAEC 340-1. D- Biofilme formado pela monocultura de EAEC 17-2 (*traA*-negativa).

8.10- Efeito do zinco sobre biofilmes produzidos por cepas de EAEC típica isoladas de crianças com diarreia e controles.

Com a intenção de melhor avaliar o papel de putativos *pili* F na formação de biofilme, 43 cepas de EAEC típica, incluindo 24 cepas isoladas de diarreia e 19 recuperadas de controles, foram testadas quanto à habilidade de formar biofilme na presença de zinco (figura 17 e tabela 2). Empregando o nível médio de redução (41,1%) apresentado pelas cepas protótipo de EAEC 042 (*traA*⁺) como linha de corte, os ensaios revelaram a existência de duas populações posicionadas em situações opostas (figura 17 e tabela 2). A linha de corte derivada da redução provocada por zinco determina a capacidade de adesão mediada pelas adesinas protótipo da cepa 042 na ausência da ação de putativos *pili* F, uma vez que estes foram bloqueados pela ação do zinco. A maioria das cepas isoladas de diarreia foi posicionada acima da linha de corte, demonstrando formação de biofilme sensível ao zinco. Sendo mais específico, 16 das 24 cepas isoladas de diarreia localizavam-se acima da linha de corte, enquanto que 17 das 19 cepas isoladas de controles posicionavam-se abaixo da linha ($P < 0,001$). Além do mais, dentre as 12 cepas isoladas de casos severos de diarreia (representadas por símbolos sólidos: ■, ●), que incluíam 10 cepas de casos persistentes, apenas 3 cepas formavam biofilmes resistentes a zinco ($P < 0,001$ quando comparado com o grupo controle) (figura 17). É importante notar que em 11 cepas, incluindo 3 isoladas de diarreia, a presença de zinco intensificou a formação do biofilme (figura 17 e tabela 2).

De início, esta abordagem simples ratifica que cepas de EAEC típica e negativas para AAF usam variados fatores de adesão durante a formação de biofilmes. Ademais, os ensaios indicaram que a maioria das cepas de EAEC isolada de diarreia emprega *pilus* F (fatores sensíveis a zinco) como o principal fator de adesão durante a formação de biofilmes. Em situação oposta, cepas de EAEC isoladas de controles frequentemente utilizam-se de adesinas resistentes a zinco na formação de biofilmes.

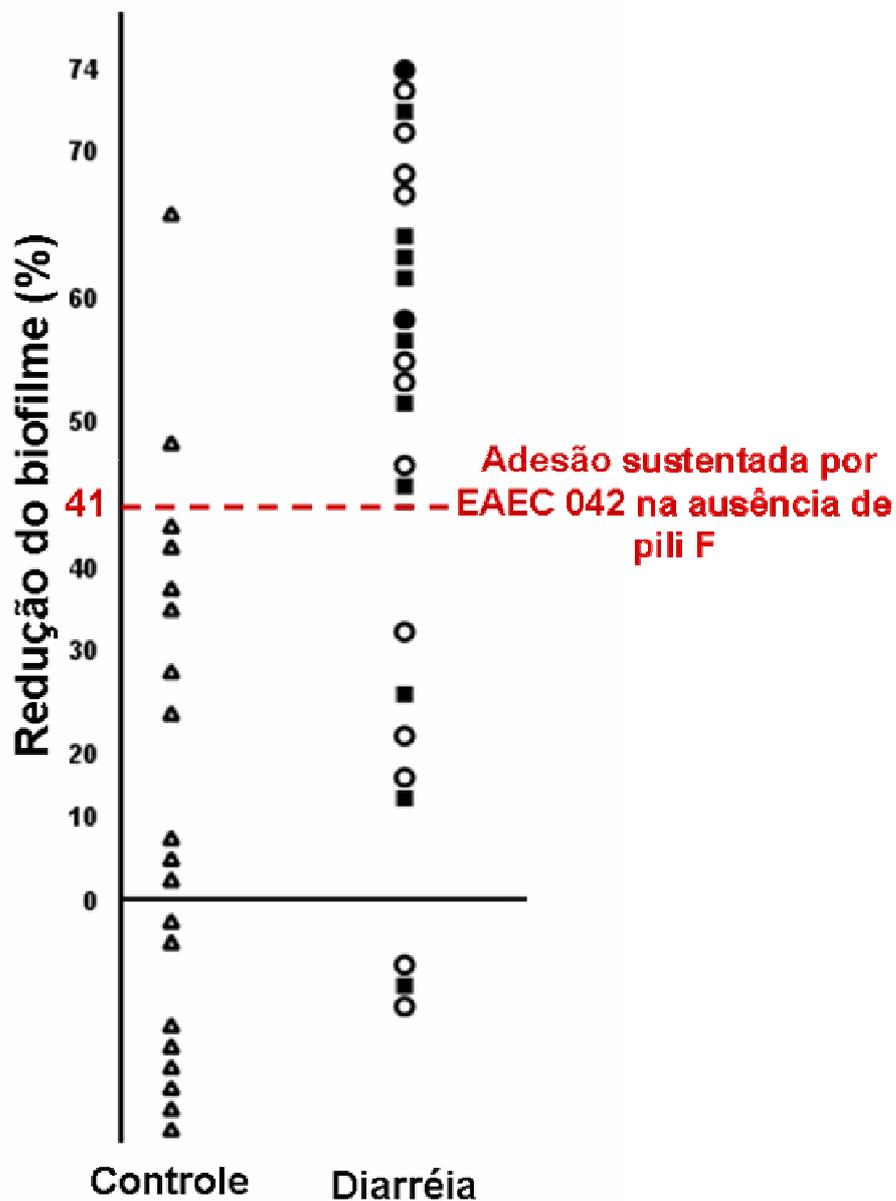


Figura 17 – Efeito do zinco sobre biofilmes formados por EAEC típica isolada de crianças com diarréia e controles. Os dados representam a redução média dos biofilmes obtida após 3 ensaios independentes. Representação gráfica dos casos: ■- diarréia persistente (acima de 14 dias), ●- diarréia com 12 dias de duração, ○- casos agudos.

Tabela 2 – Distribuição de fatores de virulência em cepas de EAEC típicas isoladas de crianças diarréicas e assintomáticas classificadas de acordo com a sensibilidade do biofilme a zinco.

Cepas	Marcadores moleculares de EAEC					Adesinas de outras categorias de <i>E. coli</i>			Redução do biofilme por zinco (classificação decrescente)		
	Fatores de adesão					PAP	AFA	Ag43	TraA	%	Diarréia
	EAST-1	Pic	AggR	AAF	PilS						
298-2			+						+	74,0	+
329-4			+							73,4	+
8-5										71,1	+
220-4		+	+		+			+	+	70,7	+
220-1		+	+		+			+	+	67,8	+
292-4										67,8	+
119-5		+	+					+	+	67,2	
343-1			+				+		+	67,2	+
240-1	+	+	+	III	+				+	64,1	+
286-4	+		+		+	+	+		+	63,4	+
298-3			+						+	59,6	+
240-3	+	+	+	III	+				+	58,1	+
241-1			+						+	57,8	+
371-2	+		+			+	+		+	53,0	+
340-3			+						+	51,5	+
64-2					ND			+	ND	47,9	
241-5			+						+	47,1	+
343-2			+				+		+	45,1	+
Redução do biofilme de EAEC 042 decorrente da inibição de pili F										41,1	-----
416-4		+	+					+	+	41,0	
64-4					+			+	+	40,8	
401-1			+						+	38,7	
115-1		+	+		+				+	35,0	
384-5					+				+	33,3	+
54-2					+			+		29,9	
8-1										27,0	+
97-1			+		+			+		25,9	
371-3	+		+			+	+			22,9	+
292-3										14,8	+
340-4			+						+	14,3	+
115-5		+	+		+				+	7,9	
401-2			+						+	6,3	
5-2			+		+			+	+	1,7	
83-5	+	+							+	-5,2	
5-4					+			+		-24,5	
329-3			+							-33,5	+
286-1	+		+		+		+		+	-37,0	+
384-4					+				+	-40,7	+
319-5	+									-45,1	
91-1			+							-56,7	
54-5					+			+	+	-62,5	
102-5			+					+		-74,1	
2-3					+			+	+	-245,0	
2-1					+			+	+	-373,2	

Abreviaturas: EAST-1, toxina termo-estável de EAEC; Pic, mucinase de EAEC; AggR, ativador transcricional de EAEC; AAF, fímbria de adesão agregativa; PilS, pilus do tipo IV de EAEC; PAP, pilus P; AFA, *operon* Afa-Dr; Ag43, antígeno 43; TraA, pilina F; +, resultado positivo; III, AAF/III; ND, não determinado.

8.11- *Pili* e adesão à célula HeLa

Em nossa coleção de EAEC típicas, composta em sua grande maioria por cepas AAF-negativas, a sensibilidade do biofilme a zinco mostrou especificidade de 89,4 % e valor preditivo positivo de 88,9 % quando utilizada como critério para segregação de cepas de EAEC associadas à diarreia. Como esperado este grupo mostrou incrível variação genética (vide página anterior, tabela 2), e para determinar se as cepas compartilhavam o mesmo mecanismo biológico no desenvolvimento do padrão AA, ensaios de adesão a células HeLa foram analisados por MEV.

De início, 4 cepas de EAEC que apresentaram biofilme sensível a zinco tiveram o desenvolvimento do fenótipo AA também desafiado. Como esperado, todos os isolados apresentaram padrão AA sensível a zinco em conformidade com a redução apresentada pelos respectivos biofilmes (redução média de $70,7 \pm 7,5\%$). A adesão da cepa 220-1 representativa desta observação é mostrada na figura 18. Em consonância com a capacidade de formar biofilme na presença de zinco (com redução de apenas $41,1 \pm 3,6\%$), a cepa protótipo de EAEC 042 não teve seu padrão de adesão alterado por zinco (figura 18). Em situação completamente oposta, a cepa de EAEC 2-3, que, isolada de controle, apresentou biofilme intensificado (aumento de $4,4 \pm 1,2$ vezes) na presença de zinco, teve a adesão a HeLa aumentada, com intensa aderência à superfície abiótica, quando desafiada com zinco (figura 18).

As imagens de MEV revelaram que as cepas de EAEC 220-1 (com adesão inibida por zinco) e 2-3 (com adesão resistente a zinco) utilizavam diferentes estratégias para aderirem a células HeLa (figura 19A e 19B). A cepa de EAEC 220-1, isolada de diarreia, apresentava longos ($> 2 \mu\text{m}$) e flexíveis filamentos mediando o contato com as células hospedeiras (figura 19A e 19C). Concordando com a configuração espacial característica do padrão AA (adesão à periferia celular), os apêndices bacterianos frequentemente aderiam à região limítrofe das células HeLa. Ademais, os *pili* promoviam não só a adesão individualizada de bactérias, como também mediavam a interação de agregados bacterianos com as células HeLa (figura 19C). Em situação oposta, a cepa de EAEC 2-3, isolada de controle, mostrou adesão a HeLa na ausência de *pili* (figura 19B).

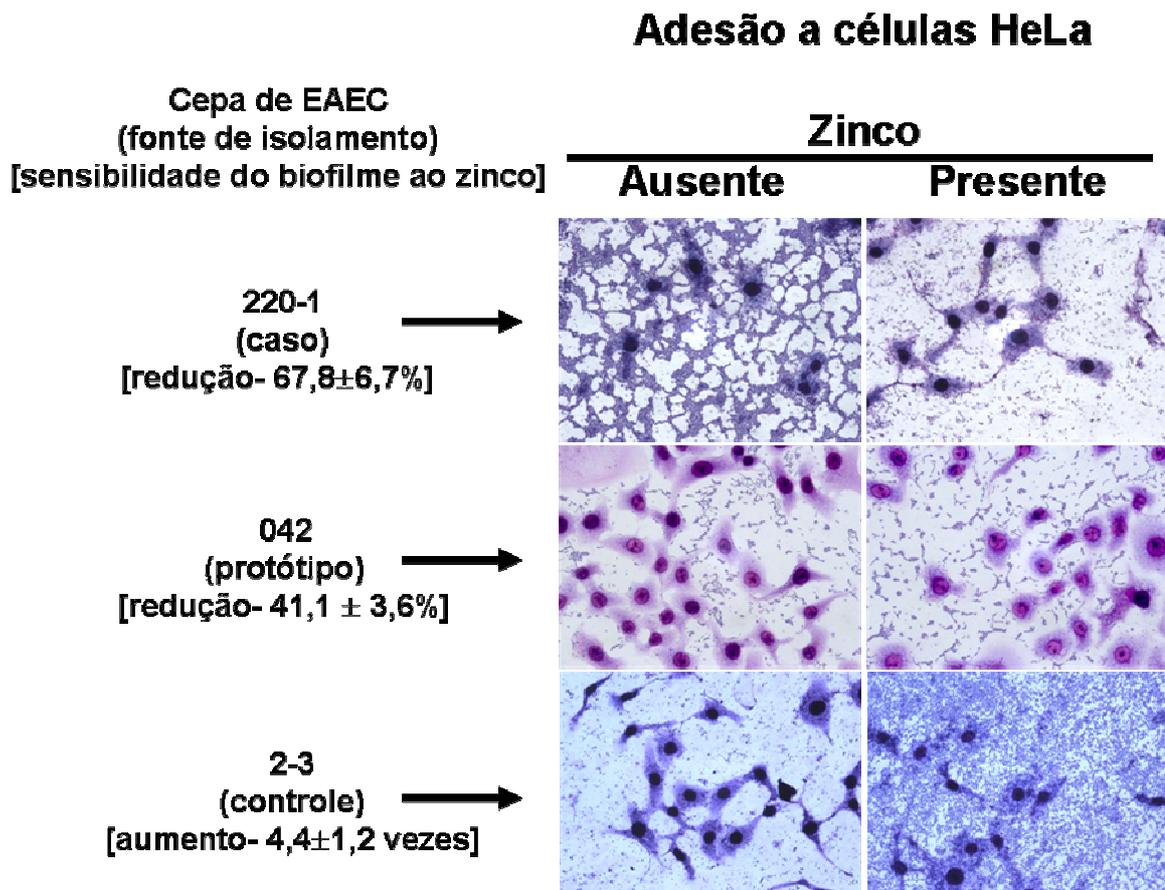


Figura 18 – Efeito do zinco sobre adesão a células HeLa desenvolvida por cepas de EAEC. Cepas de EAEC isoladas de diarreia e de controle (crianças assintomáticas) apresentam comportamentos antagônicos quanto a adesão a células HeLa.

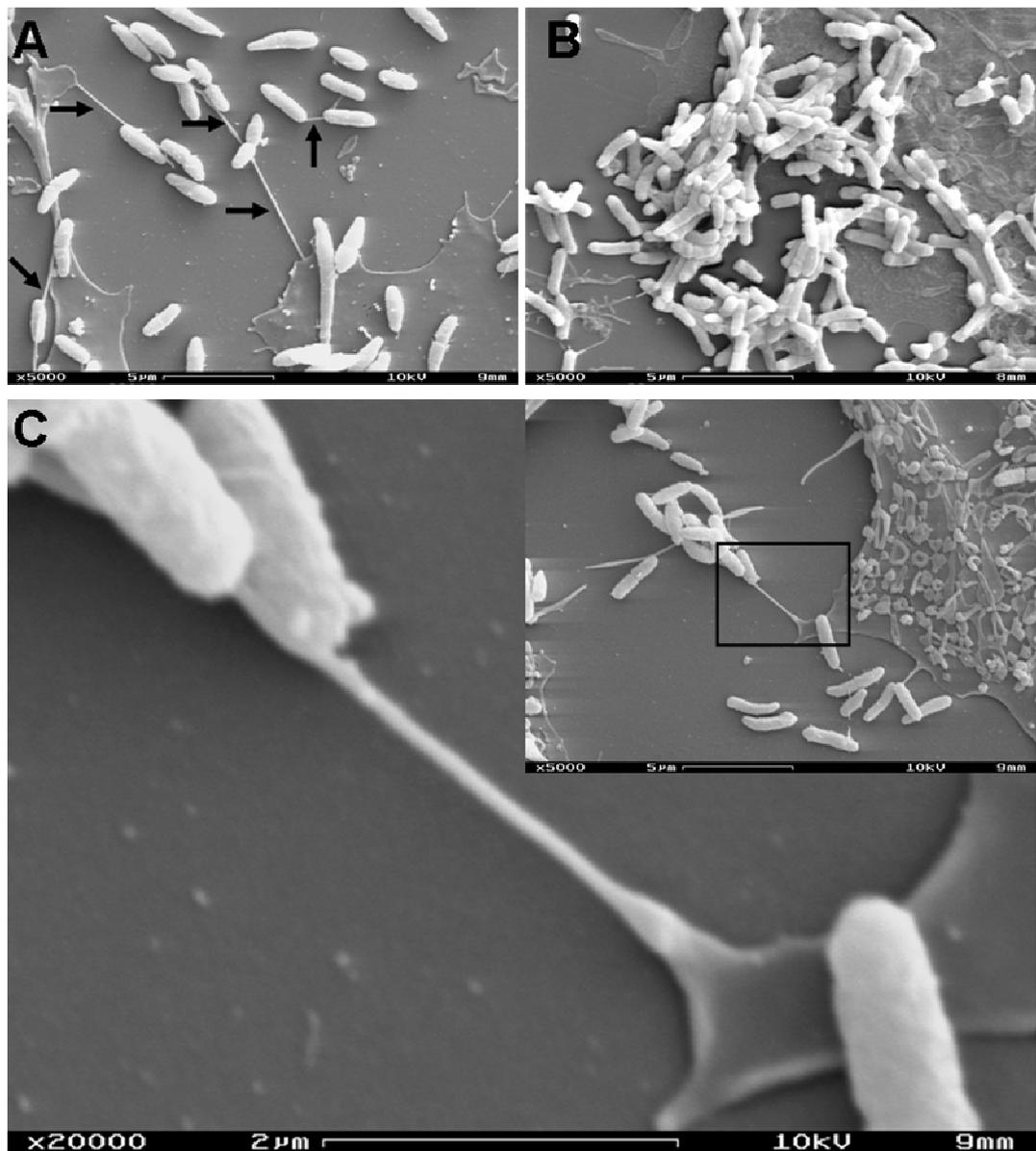


Figura 19 – Micrografias eletrônicas de varredura mostrando a interação de cepas de EAEC típicas com células HeLa. A – Adesão da cepa de EAEC 220-1 mediada por putativos pili F (setas sólidas). B – Adesão da cepa de EAEC 2-3 suportada na ausência de pili. C – Visão detalhada de agregado bacteriano formado pela cepa de EAEC 220-1 interagindo com região limítrofe de célula HeLa por meio de putativo pilus F.

9- Discussão

Apesar de descrita a pelo menos duas décadas, ainda hoje muitos estudos são realizados com o intuito de esclarecer a epidemiologia e a patogênese de *E. coli* enteroagregativa. Estudos epidemiológicos sugerem que cepas de EAEC portadoras de plasmídios pAA, denominadas EAEC típicas, seriam os reais representantes patogênicos desta categoria heterogênea de *E. coli* (HARRINGTON *et al.*, 2006). Diante da heterogeneidade genética, a capacidade de formar biofilmes é atualmente considerada fator de virulência consensual entre as linhagens de EAEC (FLORES; OKHUYSEN, 2009). Não obstante as tentativas de subclassificação desta categoria, EAEC é reconhecida como um enteropatógeno cosmopolita e emergente com forte associação à diarreia persistente demonstrada, sobretudo, em regiões de economia em desenvolvimento (WEINTRAUB, 2007). Além do mais, a colonização por EAEC tem sido vinculada a manifestações subclínicas, sendo a mal-nutrição e a redução no desenvolvimento físico infantil os principais sinais clínicos descritos. Teoricamente, estas manifestações seriam conseqüências da formação de espesso biofilme sobre o epitélio intestinal. Steiner e colaboradores (STEINER *et al.*, 1998) sugeriram que agentes bacterianos com ação patogênica ainda desconhecida poderiam estar envolvidos juntamente com isolados de EAEC em eventos de formação de biofilme e de colonização persistente do intestino.

Citrobacter freundii é classicamente considerado espécie indígena da microbiota intestinal apesar de esporadicamente ser associado a casos de diarreia. O isolamento de cepas de *C. freundii* expressando a adesão agregativa levantou suspeitas acerca do papel patogênico desta espécie. Apesar do padrão AA ter sido identificado indiscriminadamente na maioria das cepas de *C. freundii* estudadas (81% em casos e 70% em controles), ensaios posteriores revelaram que os isolados AA-positivos e proficientes em formar biofilme estavam associados exclusivamente com diarreia ($P < 0,001$) e, assim, foram denominados *C. freundii* agregativo formador de biofilme (BACF), em alusão a EAEC.

Embora a presença de genes de virulência de *E. coli* já tenha sido demonstrada em cepas de *C. freundii* (GUARINO *et al.*, 1989; SCHMIDT *et al.*, 1993; KARASAWA *et al.*, 2002), a caracterização genotípica baseada na ocorrência de 23 marcadores moleculares e abrangendo 6 categorias patogênicas de *E. coli* não mostrou qualquer resultado positivo. De início, estes resultados confirmaram que a adesão agregativa era expressa pelos isolados de *C. freundii* na ausência das fimbrias protótipo de EAEC. Além do mais, os resultados negativos conduziram à investigação de outros mecanismos associados à virulência dos isolados de BACF.

Não é inédito o fato de que o fenótipo AA vinculado à capacidade de formar biofilme esteja associado à virulência de outras espécies bacterianas. Rocha e colaboradores (2007) demonstraram que cepas uropatogênicas de *Proteus mirabilis* expressam o padrão AA e formam biofilme ambos mediados, em parte, por uma fímbria específica resistente a manose (MR/P). Além do mais, nenhuma das cepas estudadas portava genes relacionados às fímbrias de EAEC. Os autores relataram que, em semelhança a EAEC, o fenótipo AA e o desenvolvimento de biofilme por *P. mirabilis* são sustentados por um conjunto de adesinas (ROCHA *et al.*, 2007).

Hess e colaboradores (2004) mostraram que cepas uropatogênicas de *C. freundii* portam um *locus* homólogo ao determinante genético da fímbria tipo I (*fim*) de *Salmonella spp.*. Apesar da homologia genética, em *C. freundii* os genes *fim* codificam uma adesina afimbrial sensível a manose (HESS *et al.*, 2004). Neste trabalho, as análises de microscopia eletrônica também apontam para a ocorrência de adesinas afimbriais mediando a adesão das cepas de BACF. Mas em contraposição as cepas uropatogênicas de *C. freundii*, os isolados de BACF mantiveram a adesão bacteriana mesmo na presença de manose, indicando a existência de adesinas afimbriais resistentes a manose.

Fundamentado no fato de que BACF 205 fora isolado de um caso grave de diarreia juntamente com EAEC, ensaios de infecção mista foram realizados com o intuito de determinar a ocorrência de um possível sinergismo que pudesse esclarecer a associação com diarreia desta peculiar combinação: BACF-EAEC. Inicialmente, os ensaios mostraram que a associação entre BACF e EAEC proporcionava um significativo aumento na adesão bacteriana a células HeLa, sendo este evento mediado por interação física entre as bactérias e independente de sinalização química, ou da célula hospedeira.

Apesar de parecer óbvio que o aumento da adesão bacteriana decorreria da combinação de quaisquer isolados AA-positivos, os ensaios de co-infecção determinaram que o efeito sinérgico ocorria de forma específica e somente quando a combinação testada era BACF-EAEC. A cepa de *C. freundii* apresentando adesão difusa e isolada de controle (Cf047) foi incapaz de interagir com as cepas de EAEC testadas. Ainda em relação à especificidade, a caracterização genotípica e os ensaios de inibição baseados na ação do zinco trouxeram fortes evidências de que a interação física entre BACF e EAEC era mediada por putativos *pili* F expressos por cepas de EAEC portadoras de *traA* (*traA*-positivas). Ensaios de cinética de sedimentação mostraram que o zinco era capaz de inibir a agregação bacteriana iniciada por cepas de EAEC *traA*-positivas quando na presença de BACF. Em situação oposta, o magnésio intensificou a agregação bacteriana decorrente da combinação BACF e EAEC *traA*+. Outros

estudos têm demonstrado que o magnésio pode intensificar a aderência mediada por pilinas de *E. coli* (MCMICHAEL; OU, 1979), bem como, por pilinas de outras espécies de enteropatógenos. Cepas de *Aeromonas hydrophila*, espécie da família *Vibrionaceae*, aderem a células epiteliais e a eritrócitos de várias espécies animais por meio de *pili* flexíveis codificados (*fxp* gene) por plasmídios (CARRELLO *et al.*, 1988; HO *et al.*, 1990; HO *et al.*, 1992). Em semelhança aos resultados apresentados neste estudo, Ho e colaboradores (1992) mostraram que a hemaglutinação mediada pelo FXP *pilus* ocorria na presença de manose e era diretamente proporcional à concentração de íons magnésio.

Em complemento aos dados iniciais, a interação mediada pelo putativo *pilus F* mostrou-se ser o principal evento envolvido na intensificação do biofilme formado pelo co-cultivo das cepas de BACF e de EAEC *traA*-positivas. A formação de biofilmes por *E.coli* é um evento multifatorial e de cinética complexa (MAY; OKABE, 2008). A participação de fatores não devotados à adesão na formação de biofilme tem sido descrita inclusive em modelos experimentais utilizando cepas de EAEC (DUDLEY *et al.*, 2006). Contudo, até o momento da finalização deste trabalho, este é o primeiro estudo que demonstra o envolvimento de *pili F* na formação de biofilme de cepas de EAEC típica. Ademais, este é também uma descrição inédita de um consórcio bacteriano associado à diarreia humana e mediado por um putativo *pilus F* que é formado por patógenos reconhecidos (EAEC) e agentes com suspeição de virulência (*C. freundii*).

A importância assumida pelos supostos *pili F* na adesão de cepas de EAEC foi ratificada pelo efeito do zinco sobre a formação de biofilmes mistos. A presença de zinco reduziu de forma significativa os biofilmes formados pela combinação BACF-EAEC, que, sob estas condições, atingiram níveis semelhantes aos desenvolvidos pelas cepas de EAEC quando em monoculturas.

O uso de zinco no tratamento e prevenção de diarreia é prática de eficácia comprovada e incentivada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), sobretudo em casos de diarreia persistente. A OMS indica a suplementação com zinco como método adicional ao uso dos sais de reidratação oral (U.S.AGENCY FOR INTERNATIONAL DEVELOPMENT *et al.*, 2005). Embora comprovados os efeitos benéficos do uso de zinco no manejo da diarreia infantil, não se conhece explicações objetivas e contundentes acerca da ação anti-diarreica do zinco. Desta forma, são recorrentes as argumentações baseadas na melhora da condição imunológica ou na inibição de enterotoxinas (AGGARWAL *et al.*, 2007; LUKACIK *et al.*, 2008). Utilizando modelo baseado em EAEC, principal categoria bacteriana associada à diarreia persistente, hipotetizamos que o zinco atua inibindo o evento *sine qua non* das infecções intestinais: a

adesão bacteriana. Uma vez mostrado que o zinco reduz a capacidade de EAEC para formar biofilmes mistos, passamos a avaliar o impacto do zinco nos biofilmes formados por monoculturas de EAEC típica, em sua maioria cepas negativas para os variantes AAF. Os ensaios mostraram a presença de dois grupos de isolados apresentando comportamentos opostos em relação à sensibilidade do biofilme a zinco. Em consonância com a hipótese sugerida, a maioria das cepas de EAEC recuperadas de diarreia mostrou formação de biofilme sensível a zinco (16 de 24 casos), indicando o envolvimento de um putativo *pilus* F (ou de outras adesinas sensíveis a zinco) como fator central na adesão destes isolados. Em situação oposta, 17 das 19 cepas isoladas de controle apresentaram aderência resistente a zinco, sustentando que cepas de EAEC isoladas de controles aderem preferencialmente por meio de fatores resistentes a zinco.

Paralelismo semelhante foi detectado em ensaios de adesão com células HeLa, levando à comprovação, por meio de micrografia eletrônica, que cepas selvagens de EAEC isoladas de diarreia utilizam estruturas semelhantes a *pili* F e sensíveis a zinco para aderirem à célula hospedeira. Desta forma, o zinco mostrou inibir seletivamente a adesão e o biofilme da maioria das cepas de EAEC associadas à diarreia.

Em estudo epidemiológico publicado anteriormente, relatamos a associação inequívoca de EAEC com diarreia persistente infantil ($P < 0,001$) (PEREIRA *et al.*, 2007). Associações semelhantes são constantemente relatadas e endossadas por outros estudos focando EAEC, sobretudo aqueles conduzidos em regiões em desenvolvimento (HUANG *et al.*, 2004; FLORES; OKHUYSEN, 2009). Em nossa região de estudo tal associação conduz a um paradoxo: “Como EAEC associa-se a diarreia persistente sem mostrar, inicialmente, associação com diarreia aguda?”. Ademais, como um enteropatógeno comprovadamente associado à diarreia persistente pode frequentemente habitar o trato intestinal de pessoas assintomáticas?

Baseados em nossos resultados e cientes da heterogeneidade advinda do conceito de EAEC, sugerimos que existam linhagens de EAEC que apresentam diferentes estratégias para formar biofilmes. Uma das estratégias utiliza-se de supostos *pili* F como fatores de adesão inespecíficos capazes de interagir com células hospedeiras, com integrantes da microbiota intestinal, além de substratos abióticos. Diante destas variadas possibilidades e contrariando a competição com a microbiota, certas linhagens de EAEC se mantêm colonizando a mucosa intestinal de forma assintomática ou subclínica. Na ocorrência de desequilíbrios agudos no ambiente intestinal, sejam eles infecciosos ou não, a EAEC fazendo uso da sua capacidade de colonização subjugaria a microbiota ou eventuais patógenos dando início à diarreia

persistente. Neste processo de sucessão micro-ecológica, a associação com diferentes espécies determinaria a população majoritária do novo consórcio diarreioagênico. Em nosso atual objeto de estudo, *C. freundii* agregativo integra este consórcio que é mediado por *pilus F* expresso por *E. coli* enteroagregativa.

10- Perspectivas

A idéia sobre existência de consórcios bacterianos associados a doença humana foi inicialmente proposta no campo da microbiologia oral como explicação para os eventos de sucessão micro-ecológica que ocorrem no desenvolvimento das doenças periodontais baseadas na formação de biofilmes (SHU *et al.*, 2000; RAMSEY; WHITELEY, 2009). Alguns estudos têm tornado notório que outras infecções humanas possuem etiologia poli-bacteriana (HARRISON, 2007) e que espécies patogênicas desenvolvem parcerias com patógenos oportunistas com o objetivo de estabelecerem sítios de colonização baseados na formação de biofilmes (KLAYMAN *et al.*, 2009). Em relação aos enteropatógenos, somam se a estes aspectos os relatos demonstrando que categorias diarreioagênicas de *E. coli* utilizam fatores de adesão comuns aos encontrados em cepas comensais (RENDON *et al.*, 2007). Dentre estes fatores, os *pili* conjugativos têm recebido considerável atenção (DUDLEY *et al.*, 2006; CLARKE *et al.*, 2008; MAY; OKABE, 2008).

Neste estudo foi mostrado que *C. freundii* agregativo e *E. coli* enteroagregativa, ambos isolados de diarreia, estabelecem uma parceria durante o desenvolvimento de biofilmes mistos que culmina com o aumento na adesão bacteriana. O consórcio é mantido por meio de putativos *pili F* expressos por EAEC que passam a atuar como fatores de adesão inespecíficos interagindo com as células de *C. freundii*, a superfície de adesão e a célula hospedeira. Diante deste cenário novas perspectivas de investigação são visualizadas:

- 1- Identificar os determinantes biológicos responsáveis pela adesão agregativa em cepas de *C. freundii*? Seriam os mesmos que servem de sítio para a adsorção do *pili F* de EAEC?
- 2- Outras espécies encaradas como comensais da microbiota intestinal podem influenciar a formação de biofilmes por enteropatógenos clássicos?

3- *Pili* F expresso por cepas de EAEC típicas podem favorecer a formação de biofilmes mistos na presença de outras espécies entéricas?

4- O subtipo de *pilina* F determina alguma característica específica em relação a capacidade de adesão à células HeLa e de formação de biofilme mistos em cepas de EAEC típicas?

Referências Bibliográficas

1. ACHTMAN, M., 1975, Mating aggregates in *Escherichia coli* conjugation: *J.Bacteriol.*, v. 123, no. 2, p. 505-515.
2. ACHTMAN, M.; G. MORELLI; S. SCHWUCHOW, 1978, Cell-cell interactions in conjugating *Escherichia coli*: role of F pili and fate of mating aggregates: *J.Bacteriol.*, v. 135, no. 3, p. 1053-1061.
3. AGGARWAL, R.; J. SENTZ; M. A. MILLER, 2007, Role of zinc administration in prevention of childhood diarrhea and respiratory illnesses: a meta-analysis: *Pediatrics*, v. 119, no. 6, p. 1120-1130.
4. ALBERT, M. J.; A. S. FARUQUE; S. M. FARUQUE; R. B. SACK; D. MAHALANABIS, 1999, Case-control study of enteropathogens associated with childhood diarrhea in Dhaka, Bangladesh: *J.Clin.Microbiol.*, v. 37, no. 11, p. 3458-3464.
5. ALESSIO, M.; F. ALBANO; L. TARALLO; A. GUARINO, 1993, Interspecific plasmid transfer and modification of heat-stable enterotoxin expression by *Klebsiella pneumoniae* from infants with diarrhea: *Pediatr.Res.*, v. 33, no. 2, p. 205-208.
6. BERNIER, C.; P. GOUNON; B. C. LE, 2002, Identification of an aggregative adhesion fimbria (AAF) type III-encoding operon in enteroaggregative *Escherichia coli* as a sensitive probe for detecting the AAF-encoding operon family: *Infect.Immun.*, v. 70, no. 8, p. 4302-4311.
7. BETIS, F.; P. BREST; V. HOFMAN; J. GUIGNOT; I. KANSAU; B. ROSSI; A. SERVIN; P. HOFMAN, 2003, Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* infection in T84 cell monolayers induces increased neutrophil transepithelial migration, which in turn promotes cytokine-dependent upregulation of decay-accelerating factor (CD55), the receptor for Afa/Dr adhesins: *Infect.Immun.*, v. 71, no. 4, p. 1774-1783.
8. BHAN, M. K.; P. RAJ; M. M. LEVINE; J. B. KAPER; N. BHANDARI; R. SRIVASTAVA; R. KUMAR; S. SAZAWAL, 1989, Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with persistent diarrhea in a cohort of rural children in India: *J.Infect.Dis.*, v. 159, no. 6, p. 1061-1064.
9. BHATNAGAR, S.; M. K. BHAN; H. SOMMERFELT; S. SAZAWAL; R. KUMAR; S. SAINI, 1993, Enteroaggregative *Escherichia coli* may be a new pathogen causing acute and persistent diarrhea: *Scand.J.Infect.Dis.*, v. 25, no. 5, p. 579-583.
10. BOISEN, N.; C. STRUVE; F. SCHEUTZ; K. A. KROGFELT; J. P. NATARO, 2008, New adhesin of enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF family: *Infect.Immun.*, v. 76, no. 7, p. 3281-3292.
11. BRANDA, S. S.; S. VIK; L. FRIEDMAN; R. KOLTER, 2005, Biofilms: the matrix revisited: *Trends Microbiol.*, v. 13, no. 1, p. 20-26.

12. CARRELLO, A.; K. A. SILBURN; J. R. BUDDEN; B. J. CHANG, 1988, Adhesion of clinical and environmental *Aeromonas* isolates to HEp-2 cells: *J.Med.Microbiol.*, v. 26, no. 1, p. 19-27.
13. CHAN, K. N.; A. D. PHILLIPS; S. KNUTTON; H. R. SMITH; J. A. WALKER-SMITH, 1994, Enteroaggregative *Escherichia coli*: another cause of acute and chronic diarrhoea in England?: *J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.*, v. 18, no. 1, p. 87-91.
14. CLARKE, M.; L. MADDERA; R. L. HARRIS; P. M. SILVERMAN, 2008, F-pili dynamics by live-cell imaging: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 105, no. 46, p. 17978-17981.
15. CORLISS, T. L.; P. S. COHEN; V. J. CABELLI, 1981, R-Plasmid Transfer to and from *Escherichia-Coli* Strains Isolated from Human Fecal Samples: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 41, no. 4, p. 959-966.
16. CRAVIOTO, A.; R. E. REYES; R. ORTEGA; G. FERNANDEZ; R. HERNANDEZ; D. LOPEZ, 1988, Prospective study of diarrhoeal disease in a cohort of rural Mexican children: incidence and isolated pathogens during the first two years of life: *Epidemiol.Infect.*, v. 101, no. 1, p. 123-134.
17. CRAVIOTO, A.; A. TELLO; A. NAVARRO; J. RUIZ; H. VILLAFAN; F. URIBE; C. ESLAVA, 1991, Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea: *Lancet*, v. 337, no. 8736, p. 262-264.
18. CZECZULIN, J. R.; S. BALEPUR; S. HICKS; A. PHILLIPS; R. HALL; M. H. KOTHARY; F. NAVARRO-GARCIA; J. P. NATARO, 1997, Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*: *Infect.Immun.*, v. 65, no. 10, p. 4135-4145.
19. CZECZULIN, J. R.; T. S. WHITTAM; I. R. HENDERSON; F. NAVARRO-GARCIA; J. P. NATARO, 1999, Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*: *Infect.Immun.*, v. 67, no. 6, p. 2692-2699.
20. DAIGLE, F.; J. HAREL; J. M. FAIRBROTHER; P. LEBEL, 1994, Expression and detection of pap-, sfa-, and afa-encoded fimbrial adhesin systems among uropathogenic *Escherichia coli*: *Can.J.Microbiol.*, v. 40, no. 4, p. 286-291.
21. DE, G. J.; A. H. STOUTHAMER, 1971, *Citrobacter freundii* mutants deficient in host specificity functions and their recipient ability for foreign deoxyribonucleic acid: *J.Gen.Microbiol.*, v. 67, no. 1, p. 91-97.
22. DENG, W.; Y. LI; B. A. VALLANCE; B. B. FINLAY, 2001, Locus of enterocyte effacement from *Citrobacter rodentium*: sequence analysis and evidence for horizontal transfer among attaching and effacing pathogens: *Infect.Immun.*, v. 69, no. 10, p. 6323-6335.
23. DORAN, T. I., 1999, The role of *Citrobacter* in clinical disease of children: review: *Clin.Infect.Dis.*, v. 28, no. 2, p. 384-394.
24. DUDLEY, E. G.; C. ABE; J. M. GHIGO; P. LATOUR-LAMBERT; J. C. HORMAZABAL; J. P. NATARO, 2006, An IncI1 plasmid contributes to the

- adherence of the atypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain C1096 to cultured cells and abiotic surfaces: *Infect.Immun.*, v. 74, no. 4, p. 2102-2114.
25. FANG, G. D.; A. A. LIMA; C. V. MARTINS; J. P. NATARO; R. L. GUERRANT, 1995, Etiology and epidemiology of persistent diarrhea in northeastern Brazil: a hospital-based, prospective, case-control study: *J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.*, v. 21, no. 2, p. 137-144.
 26. FARFAN, M. J.; K. G. INMAN; J. P. NATARO, 2008, The major pilin subunit of the AAF/II fimbriae from enteroaggregative *Escherichia coli* mediates binding to extracellular matrix proteins: *Infect.Immun.*, v. 76, no. 10, p. 4378-4384.
 27. FLORES, J.; P. C. OKHUYSEN, 2009, Enteroaggregative *Escherichia coli* infection: *Curr.Opin.Gastroenterol.*, v. 25, no. 1, p. 8-11.
 28. FRATAMICO, P. M.; S. K. SACKITEY; M. WIEDMANN; M. Y. DENG, 1995, Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR: *J.Clin.Microbiol.*, v. 33, no. 8, p. 2188-2191.
 29. FROST, L. S.; B. B. FINLAY; A. OPGENORTH; W. PARANCHYCH; J. S. LEE, 1985, Characterization and sequence analysis of pilin from F-like plasmids: *J.Bacteriol.*, v. 164, no. 3, p. 1238-1247.
 30. GHIGO, J. M., 2001, Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development: *Nature*, v. 412, no. 6845, p. 442-445.
 31. GIEGERICH, R.; F. MEYER; C. SCHLEIERMACHER, 1996, GeneFisher--software support for the detection of postulated genes: *Proc.Int.Conf.Intell.Syst.Mol.Biol.*, v. 4, p. 68-77.
 32. GROVER, V.; S. GHOSH; A. CHAKRABORTI; S. MAJUMDAR; N. K. GANGULY, 2007, Galactose-specific fimbrial adhesin of enteroaggregative *Escherichia coli*: a possible aggregative factor: *Curr.Microbiol.*, v. 54, no. 3, p. 175-179.
 33. GROVER, V.; S. GHOSH; N. SHARMA; A. CHAKRABORTI; S. MAJUMDAR; N. K. GANGULY, 2001, Characterization of a galactose specific adhesin of enteroaggregative *Escherichia coli*: *Arch.Biochem.Biophys.*, v. 390, no. 1, p. 109-118.
 34. GUARINO, A.; G. CAPANO; B. MALAMISURA; M. ALESSIO; S. GUANDALINI; A. RUBINO, 1987, Production of *Escherichia coli* STa-like heat-stable enterotoxin by *Citrobacter freundii* isolated from humans: *J.Clin.Microbiol.*, v. 25, no. 1, p. 110-114.
 35. GUARINO, A.; R. GIANNELLA; M. R. THOMPSON, 1989, *Citrobacter freundii* produces an 18-amino-acid heat-stable enterotoxin identical to the 18-amino-acid *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin (ST Ia): *Infect.Immun.*, v. 57, no. 2, p. 649-652.
 36. GUERRANT, D. I.; S. R. MOORE; A. A. LIMA; P. D. PATRICK; J. B. SCHORLING; R. L. GUERRANT, 1999, Association of early childhood diarrhea and cryptosporidiosis with impaired physical fitness and cognitive function four-seven

- years later in a poor urban community in northeast Brazil: *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, v. 61, no. 5, p. 707-713.
37. HAMERS, A. M.; H. J. PEL; G. A. WILLSHAW; J. G. KUSTERS; B. A. VAN DER ZEIJST; W. GAASTRA, 1989, The nucleotide sequence of the first two genes of the CFA/I fimbrial operon of human enterotoxigenic *Escherichia coli*: *Microb.Pathog.*, v. 6, no. 4, p. 297-309.
 38. HARRINGTON, S. M.; E. G. DUDLEY; J. P. NATARO, 2006, Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection: *FEMS Microbiol.Lett.*, v. 254, no. 1, p. 12-18.
 39. HARRISON, F., 2007, Microbial ecology of the cystic fibrosis lung: *Microbiology*, v. 153, no. Pt 4, p. 917-923.
 40. HESS, P.; A. ALTENHOFER; A. S. KHAN; N. DARYAB; K. S. KIM; J. HACKER; T. A. OELSCHLAEGER, 2004, A Salmonella fim homologue in *Citrobacter freundii* mediates invasion in vitro and crossing of the blood-brain barrier in the rat pup model: *Infect.Immun.*, v. 72, no. 9, p. 5298-5307.
 41. HICKS, S.; D. C. CANDY; A. D. PHILLIPS, 1996, Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa in vitro: *Infect.Immun.*, v. 64, no. 11, p. 4751-4760.
 42. HO, A. S.; T. A. MIETZNER; A. J. SMITH; G. K. SCHOOLNIK, 1990, The pili of *Aeromonas hydrophila*: identification of an environmentally regulated "mini pilin": *J.Exp.Med.*, v. 172, no. 3, p. 795-806.
 43. HO, A. S.; I. SOHEL; G. K. SCHOOLNIK, 1992, Cloning and characterization of fxp, the flexible pilin gene of *Aeromonas hydrophila*: *Mol.Microbiol.*, v. 6, no. 18, p. 2725-2732.
 44. HUANG, D. B.; P. C. OKHUYSEN; Z. D. JIANG; H. L. DUPONT, 2004, Enteroaggregative *Escherichia coli*: an emerging enteric pathogen: *Am.J.Gastroenterol.*, v. 99, no. 2, p. 383-389.
 45. KARASAWA, T.; H. ITO; T. TSUKAMOTO; S. YAMASAKI; H. KURAZONO; S. M. FARUQUE; G. B. NAIR; M. NISHIBUCHI; Y. TAKEDA, 2002, Cloning and characterization of genes encoding homologues of the B subunit of cholera toxin and the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin from clinical isolates of *Citrobacter freundii* and *E. coli*: *Infect.Immun.*, v. 70, no. 12, p. 7153-7155.
 46. KLAYMAN, B. J.; P. A. VOLDEN; P. S. STEWART; A. K. CAMPER, 2009, *Escherichia coli* O157:H7 Requires colonizing partner to adhere and persist in a capillary flow cell: *Environ.Sci.Technol.*, v. 43, no. 6, p. 2105-2111.
 47. KOHLER, H.; B. A. MCCORMICK; W. A. WALKER, 2003, Bacterial-enterocyte crosstalk: cellular mechanisms in health and disease: *J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.*, v. 36, no. 2, p. 175-185.

48. Koneman, E. W., S. D. Allen, W. M. Janda, P. C. Schreckenberger, and W. C. Winn, 2001, Enterobacteriaceae, Diagnóstico Microbiológico - Texto e Atlas colorido: Rio de Janeiro, Editora Médica e Científica Ltda, p. 177-262.
49. KYAW, C. M.; C. R. DE ARAUJO; M. R. LIMA; E. G. GONDIM; M. M. BRIGIDO; L. G. GIUGLIANO, 2003, Evidence for the presence of a type III secretion system in diffusely adhering *Escherichia coli* (DAEC): *Infect.Genet.Evol.*, v. 3, no. 2, p. 111-117.
50. LUKACIK, M.; R. L. THOMAS; J. V. ARANDA, 2008, A meta-analysis of the effects of oral zinc in the treatment of acute and persistent diarrhea: *Pediatrics*, v. 121, no. 2, p. 326-336.
51. LYCZAK, J. B., 2003, Commensal bacteria increase invasion of intestinal epithelium by *Salmonella enterica* serovar Typhi: *Infect.Immun.*, v. 71, no. 11, p. 6610-6614.
52. MARTINO, P. D.; R. FURSY; L. BRET; B. SUNDARARAJU; R. S. PHILLIPS, 2003, Indole can act as an extracellular signal to regulate biofilm formation of *Escherichia coli* and other indole-producing bacteria: *Can.J.Microbiol.*, v. 49, no. 7, p. 443-449.
53. MATHEWSON, J. J.; A. CRAVIOTO, 1989, HEp-2 cell adherence as an assay for virulence among diarrheagenic *Escherichia coli*: *J.Infect.Dis.*, v. 159, no. 6, p. 1057-1060.
54. MAY, T.; S. OKABE, 2008, *Escherichia coli* harboring a natural IncF conjugative F plasmid develops complex mature biofilms by stimulating synthesis of colanic acid and Curli: *J.Bacteriol.*, v. 190, no. 22, p. 7479-7490.
55. MCMICHAEL, J. C.; J. T. OU, 1979, Binding of lysozyme to common pili of *Escherichia coli*: *J.Bacteriol.*, v. 138, no. 3, p. 976-983.
56. MICHAEL, B.; J. N. SMITH; S. SWIFT; F. HEFFRON; B. M. AHMER, 2001, SdiA of *Salmonella enterica* is a LuxR homolog that detects mixed microbial communities: *J.Bacteriol.*, v. 183, no. 19, p. 5733-5742.
57. Ministério da Saúde, 2001, Anuário estatístico de saúde do Brasil, Ministério da Saúde - Brasil, <<http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/anuario2001/index.cfm>>, Accessed January 3, 2009.
58. MOHAMED, J. A.; D. B. HUANG; Z. D. JIANG; H. L. DUPONT; J. P. NATARO; J. BELKIND-GERSON; P. C. OKHUYSEN, 2007, Association of putative enteroaggregative *Escherichia coli* virulence genes and biofilm production in isolates from travelers to developing countries: *J.Clin.Microbiol.*, v. 45, no. 1, p. 121-126.
59. MONTEIRO-NETO, V.; S. Y. BANDO; C. A. MOREIRA-FILHO; J. A. GIRON, 2003, Characterization of an outer membrane protein associated with haemagglutination and adhesive properties of enteroaggregative *Escherichia coli* O111:H12: *Cell Microbiol.*, v. 5, no. 8, p. 533-547.

60. MOREIRA, C. G.; S. M. CARNEIRO; J. P. NATARO; L. R. TRABULSI; W. P. ELIAS, 2003, Role of type I fimbriae in the aggregative adhesion pattern of enteroaggregative *Escherichia coli*: *FEMS Microbiol.Lett.*, v. 226, no. 1, p. 79-85.
61. NATARO, J. P.; Y. DENG; D. R. MANEVAL; A. L. GERMAN; W. C. MARTIN; M. M. LEVINE, 1992, Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes: *Infect.Immun.*, v. 60, no. 6, p. 2297-2304.
62. NATARO, J. P.; J. B. KAPER, 1998, Diarrheagenic *Escherichia coli*: *Clin.Microbiol.Rev.*, v. 11, no. 1, p. 142-201.
63. NATARO, J. P.; J. B. KAPER; R. ROBINS-BROWNE; V. PRADO; P. VIAL; M. M. LEVINE, 1987, Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells: *Pediatr.Infect.Dis.J.*, v. 6, no. 9, p. 829-831.
64. NATARO, J. P.; D. YIKANG; J. A. GIRON; S. J. SAVARINO; M. H. KOTHARY; R. HALL, 1993, Aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli* requires two unlinked plasmid regions: *Infect.Immun.*, v. 61, no. 3, p. 1126-1131.
65. OKEKE, I. N.; A. LAMIKANRA; J. CZECZULIN; F. DUBOVSKY; J. B. KAPER; J. P. NATARO, 2000, Heterogeneous virulence of enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from children in Southwest Nigeria: *J.Infect.Dis.*, v. 181, no. 1, p. 252-260.
66. OU, J. T.; T. F. ANDERSON, 1972, Effect of Zn²⁺ on bacterial conjugation: inhibition of mating pair formation: *J.Bacteriol.*, v. 111, no. 1, p. 177-185.
67. PEREIRA, A. L. *Epidemiologia de Escherichia coli enteroagregativa: fatores de virulência, sorogrupos e novas evidências sobre a patogênese*. 2004. Dissertação - Mestrado em Biologia Molecular. Universidade de Brasília, Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Celular, Brasília-DF. 2004.
68. PEREIRA, A. L.; L. R. FERRAZ; R. S. SILVA; L. G. GIUGLIANO, 2007, Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence markers: positive association with distinct clinical characteristics and segregation into 3 enteropathogenic *E. coli* serogroups: *J.Infect.Dis.*, v. 195, no. 3, p. 366-374.
69. PRESTERL, E.; R. NADRCHAL; D. WOLF; M. ROTTER; A. M. HIRSCHL, 1999, Enteroaggregative and enterotoxigenic *Escherichia coli* among isolates from patients with diarrhea in Austria: *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.*, v. 18, no. 3, p. 209-212.
70. QUIROGA, M.; P. OVIEDO; I. CHINEN; E. PEGELS; E. HUSULAK; N. BINZTEIN; M. RIVAS; L. SCHIAVONI; M. VERGARA, 2000, Asymptomatic infections by diarrheagenic *Escherichia coli* in children from Misiones, Argentina, during the first twenty months of their lives: *Rev.Inst.Med.Trop.Sao Paulo*, v. 42, no. 1, p. 9-15.
71. RAMSEY, M. M.; M. WHITELEY, 2009, Polymicrobial interactions stimulate resistance to host innate immunity through metabolite perception: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 106, no. 5, p. 1578-1583.

72. RENDON, M. A.; Z. SALDANA; A. L. ERDEM; V. MONTEIRO-NETO; A. VAZQUEZ; J. B. KAPER; J. L. PUENTE; J. A. GIRON, 2007, Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 104, no. 25, p. 10637-10642.
73. ROCHA, S. P.; W. P. ELIAS; A. M. CIANCIARULLO; M. A. MENEZES; J. M. NARA; R. M. PIAZZA; M. R. SILVA; C. G. MOREIRA; J. S. PELAYO, 2007, Aggregative adherence of uropathogenic *Proteus mirabilis* to cultured epithelial cells: *FEMS Immunol.Med.Microbiol.*, v. 51, no. 2, p. 319-326.
74. SAVARINO, S. J.; A. FASANO; J. WATSON; B. M. MARTIN; M. M. LEVINE; S. GUANDALINI; P. GUERRY, 1993, Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 90, no. 7, p. 3093-3097.
75. SCHAUER, D. B.; S. FALKOW, 1993, The *eae* gene of *Citrobacter freundii* biotype 4280 is necessary for colonization in transmissible murine colonic hyperplasia: *Infect.Immun.*, v. 61, no. 11, p. 4654-4661.
76. SCHMIDT, H.; L. BEUTIN; H. KARCH, 1995, Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933: *Infect.Immun.*, v. 63, no. 3, p. 1055-1061.
77. SCHMIDT, H.; M. MONTAG; J. BOCKEMUHL; J. HEESEMANN; H. KARCH, 1993, Shiga-like toxin II-related cytotoxins in *Citrobacter freundii* strains from humans and beef samples: *Infect.Immun.*, v. 61, no. 2, p. 534-543.
78. SHEIKH, J.; J. R. CZECZULIN; S. HARRINGTON; S. HICKS; I. R. HENDERSON; C. LE BOUGUENEC; P. GOUNON; A. PHILLIPS; J. P. NATARO, 2002, A novel dispersin protein in enteroaggregative *Escherichia coli*: *J.Clin.Invest*, v. 110, no. 9, p. 1329-1337.
79. SHEIKH, J.; S. HICKS; M. DALL'AGNOL; A. D. PHILLIPS; J. P. NATARO, 2001, Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*: *Mol.Microbiol.*, v. 41, no. 5, p. 983-997.
80. SHU, M.; L. WONG; J. H. MILLER; C. H. SISSONS, 2000, Development of multi-species consortia biofilms of oral bacteria as an enamel and root caries model system: *Arch.Oral Biol.*, v. 45, no. 1, p. 27-40.
81. SOWA, B. A.; D. MOORE; K. IPPEN-IHLER, 1983, Physiology of F-pilin synthesis and utilization: *J.Bacteriol.*, v. 153, no. 2, p. 962-968.
82. STEINER, T. S.; A. A. LIMA; J. P. NATARO; R. L. GUERRANT, 1998, Enteroaggregative *Escherichia coli* produce intestinal inflammation and growth impairment and cause interleukin-8 release from intestinal epithelial cells: *J.Infect.Dis.*, v. 177, no. 1, p. 88-96.
83. STROCCHI, A.; M. D. LEVITT, 1991, A reappraisal of the magnitude and implications of the intestinal unstirred layer: *Gastroenterology*, v. 101, no. 3, p. 843-847.

84. SURETTE, M. G.; B. L. BASSLER, 1998, Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 95, no. 12, p. 7046-7050.
85. TORRES, A. G.; X. ZHOU; J. B. KAPER, 2005, Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells: *Infect.Immun.*, v. 73, no. 1, p. 18-29.
86. U.S.AGENCY FOR INTERNATIONAL DEVELOPMENT; WORLD HEALTH ORGANIZATION; UNICEF. Diarrhoea Treatment Guidelines - including new recommendations for the use of ORS and zinc supplementation - for Clinic-Based Healthcare Workers. 2005. The MOST Project - Washington DC, USAID.
Ref Type: Report
87. UNICEF. Progress for Children: A World Fit for Children Statistical Review. v. 6, 2007. United Nations Children's Fund. Progress for Children.
Ref Type: Report
88. VAN, H. R.; C. W. MICHIELS, 2005, Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation: *Res.Microbiol.*, v. 156, no. 5-6, p. 626-633.
89. VIAL, P. A.; R. ROBINS-BROWNE; H. LIOR; V. PRADO; J. B. KAPER; J. P. NATARO; D. MANEVAL; A. ELSAYED; M. M. LEVINE, 1988, Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease: *J.Infect.Dis.*, v. 158, no. 1, p. 70-79.
90. VILLASECA, J. M.; F. NAVARRO-GARCIA; G. MENDOZA-HERNANDEZ; J. P. NATARO; A. CRAVIOTO; C. ESLAVA, 2000, Pet toxin from enteroaggregative *Escherichia coli* produces cellular damage associated with fodrin disruption: *Infect.Immun.*, v. 68, no. 10, p. 5920-5927.
91. WAI, S. N.; A. TAKADE; K. AMAKO, 1996, The hydrophobic surface protein layer of enteroaggregative *Escherichia coli* strains: *FEMS Microbiol.Lett.*, v. 135, no. 1, p. 17-22.
92. WAKIMOTO, N. et al., 2004, Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for enteroaggregative *Escherichia coli*: *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, v. 71, no. 5, p. 687-690.
93. WEINTRAUB, A., 2007, Enteroaggregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection: *Journal of Medical Microbiology*, v. 56, no. 1, p. 4-8.
94. WILLIAMS, S. C.; E. K. PATTERSON; N. L. CARTY; J. A. GRISWOLD; A. N. HAMOOD; K. P. RUMBAUGH, 2004, *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer enters and functions in mammalian cells: *J.Bacteriol.*, v. 186, no. 8, p. 2281-2287.
95. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Fact sheet - The top ten causes of death. v. 310, 2008. World Health Organization. Fact Sheet. 3-1-2009.
Ref Type: Report
96. WORLD HEALTH ORGANIZATION; UNICEF. Clinical management of acute diarrhoea. 2004. The United Nations Children's Fund and World Health Organization. WHO/Unicef joint statement.
Ref Type: Report

ANEXO – Meios de cultura, soluções e preparo de material.

1- Meios de cultura

Caldo LB (*Luria broth*)

Peptona	10g
NaCl	10g
Extrato de levedura	5g
Água destilada q.s.p	1000 mL

O pH foi ajustado para 7,4 e o meio autoclavado a 120°C (1 kgf/cm²) por 15 minutos.

Meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

Para a manutenção de células HeLa foi utilizado meio DMEM com glicose (4,5 g/L) (Gibco BRL) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado e antibióticos (250µL da solução estoque [ampicilina/estreptomicina]/100mL de meio). Para os ensaios de adesão a células HeLa e formação de biofilme o meio DMEM foi suplementado apenas com 1,4% de D(+)-manose (Vetec) (DMEM-manose). Após o preparo, o meio foi esterilizado utilizando filtros de 0,22 µm (SterivexTM-GP) e acondicionado a 4°C.

2- Soluções

2.1 – Soluções utilizadas nos manejo de células HeLa

Solução estoque de EDTA (0,33M)

A solução teve o pH ajustado para 7,0 com Na OH (5,0 M), foi esterilizada por filtração (Durapore[®] – 0,22µm) e estocada a 4°C.

Solução estoque de tripsina 5%

A solução teve o pH ajustado para 7,8 com NaOH (2N) e foi mantida em repouso durante a noite a 4 °C. Então, o pH foi ajustado para 7,6, a solução clarificada e esterilizada por filtração (papel Whatman 1 e membrana de PVDF Durapore[®] - 0,22µm-, respectivamente) e estocada a -20 °C.

Solução estoque de antibióticos (ampicilina/estreptomicina)

Ampicilina	5.000.000U
Sulfato de estreptomicina	500.000U
Água destilada	10 mL

A solução foi esterilizada por filtração (Durapore[®] - 0,22µm) e acondicionada a -20°C.

D-PBS Modificado (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*)

Cloreto de cálcio dihidratado	0,13 g
Cloreto de potássio	0,2 g
Fosfato de potássio monobásico	0,2 g
Cloreto de sódio	8 g
Fosfato de sódio dibásico (anidro)	1,5 g
Água destilada q.s.p	1000 mL

Após o preparo, o pH da solução foi ajustado para 7,0 – 7,4, esterilizada por filtração (SterivexTM-GP) e armazenada a 4 °C.

2.2- Soluções utilizadas em procedimentos de coloração

Solução aquosa de cristal violeta (CV)

Cristal violeta em concentração de 0,1% foi mantido em solução aquosa armazenado em frasco de cor âmbar a temperatura ambiente. No momento do uso, a solução de cristal violeta foi filtrada utilizando membrana filtrante (Millipore - 0,22 µm).

Solução May-Grünwald para uso

No momento do uso, a solução estoque de May-Grünwald (solução alcoólica modificada para microscopia - Merck) foi diluída 1:20 em tampão Sørensen e filtrada utilizando membranas filtrantes 0,22 µm (Millipore). O tempo de coloração é de 1 hora.

Solução estoque de Giemsa

Giemsa	0,362 g
Metanol	30,43 mL
Glicerol	19,56 mL

A solução foi mantida em temperatura ambiente e acondicionada em frasco âmbar.

Solução de Giemsa pra uso.

No momento do uso a solução estoque de Giemsa foi diluída 1:40 em tampão Sørensen e filtrada utilizando membranas filtrantes 0,22 µm (Millipore). O tempo de coloração é de 1 hora.

Tampão Sørensen utilizado na coloração de células HeLa

Soluções iniciais

Solução A 0,908% KH_2PO_4

Solução B 0,947% Na_2HPO_4

O tampão Sørensen foi obtido ajustando pH da solução B em 7,3 utilizando a solução A. No momento do uso o tampão foi diluído (1:2) em água destilada.

2.3 – Soluções utilizadas em procedimento de eletroforese em gel de agarose.

Tampão Acetato 40X (TAE)

Trizma base ($\text{CO}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$)	193,8 g
Acetado de Sódio (tri-hidratado)	108,9 g
EDTA (Merck, titriplex)	14,9 g
Água destilada q.s.p	1000 mL

Ajustar o pH da solução para 8,2 e armazenar a temperatura ambiente. Concentração de uso 1X.

Tampão para amostra de DNA (10X)

Sacarose	65% (m/v)
Tris-HCl (pH 8.0)	10 mM
EDTA	10mM
Azul de Bromofenol	0,3% (m/v)

Solução de Brometo de Etídio para detecção de fragmentos de DNA

Solução aquosa de brometo de etídio com concentração de 10 mg/ml foi utilizada como solução estoque e mantida a 5° C em franco de cor âmbar. Para coloração de fragmentos de DNA separados em gel de agarose a solução de uso foi preparada adicionando 25 µL da solução estoque em 500 mL de água destilada.

3- Tampão Cacodilato de sódio (0,1 M)

Cacodilato de sódio	4,28 g
Cloreto de cálcio	25 g
Ácido clorídrico 0,2N	2,5 mL
Água destilada q.s.p	200 mL
pH final 7,4	

4- Criopreservação de amostras bacterianas

Após cultura por 18 horas a 37° C em meio LB, a cultura bacteriana foi acrescida de glicerol estéril em concentração final de 15% (v/v). Após homogeneização, a cultura era aliquoteada e mantida a temperatura de 20 °C negativos.

5- Preparo de lamínulas para microscopia

Adsorção de poli-L-lisina em lamínulas de poliestireno

Poli-L-lisina em concentração de 0,01% [poly-L-lisina (hidrochloride) Sigma Company] foi mantida em solução aquosa e armazenada a 5°C. No momento do uso lamínulas de poliestireno (ThermanoxTM- Nunc) foram adsorvidas com 50 µL de poli-L-lisina durante 30

minutos em temperatura ambiente. Após o tratamento, as lamínulas foram rapidamente imersas em água destilada e postas pra secar em temperatura ambiente.

Preparo de lamínulas para ensaios de adesão e formação de biofilme

Lamínulas de vidro (com dimensões de 10 x 10 mm para ensaios de adesão a HeLa e 20 x 24 mm para ensaios de formação de biofilme) foram fervidas em Extran 1% por alguns minutos, enxaguadas com água destilada quente, passadas em solução aquosa contendo etanol (4%) e ácido acético (1%) e, em seguida, acetona pura. Após enxaguar duas vezes em água destilada, as lamínulas foram acondicionadas (separadas por papel de filtro) e esterilizadas em autoclave (120°C -1kgf/cm²- por 15 minutos).