
***Escherichia coli* ENTEROPATOGÊNICA (EPEC),
AO CONTRÁRIO DA *Escherichia coli* COMENSAL,
ADERE, SINALIZA E LESA ENTERÓCITOS**

Juliana Azevedo Silva e Wilmar Dias da Silva

RESUMO

Escherichia coli enteropatogênica (EPEC) é importante causa de diarreia infantil em comunidades de baixa renda, onde, de maneira perversa, estão associados fatores como subnutrição, condições precárias de habitação, falta de água potável e de rede de esgotos. Biópsias do intestino de pacientes infectados com EPEC mostraram que as bactérias aderem à superfície do epitélio intestinal, na forma de microcolônias localizadas *localized adhesion* (L/A), e, na célula infectada, causam lesões típicas denominadas *attaching and effacing* (A/E). Essas lesões caracterizam-se por gerar, na face apical da célula, destruição das microvilosidades e formação do pedestal. Modelos *in vitro*, usando células epiteliais como alvo e diferentes cepas ou mutantes de EPEC como agente infectante, revelaram que a adesão da bactéria à célula ocorre em três estágios. O contato inicial entre EPEC e a célula hospedeira é mediado por pili formadores de feixes tipo IV (BFP) codificados por genes encontrados em plasmídios de 50 MDa a 70 MDa, EAF, *EPEC adherence factor* (EAF). Seguem-se estágios intermediários de deslocamento de proteínas efetoras da bactéria para a célula alvo, mediados por fatores tipo III (TTSS). Os genes necessários para a formação de A/E e do pedestal encontram-se dentro de uma ilha de patogenicidade denominada *locus of enterocyte effacement* (LEE). Durante este estágio, ocorrem transdução de sinais na célula hospedeira para ativação do sistema NF- κ B, produção de mediadores da inflamação e apoptose. No estágio final, EPEC adere mais intimamente à célula epitelial. Essa aderência íntima é mediada pela interação entre uma proteína da membrana externa da bactéria, a intimina, e seu receptor Tir, translocado da bactéria para a superfície das células epiteliais. A interação intimina-Tir provoca rearranjo dos componentes do citoesqueleto – α -actina, talina e ezrina – na região da adesão da célula infectada. EPEC induz vigorosa e persistente produção de anticorpos em seres humanos que vivem em áreas endêmicas e em modelos animais imunizados com vetores que expressam fatores de virulência ou com as proteínas recombinantes purificadas. Essas observações reforçam as recomendações de organismos ligados à saúde pública sobre a importância da amamentação do recém-nascido com leite materno e do desenvolvimento de vacinas e anticorpos protetores para prevenção e tratamento de infecções causadas por EPEC.

DESCRITORES: *Escherichia coli* enteropatogênicas (EPEC). Diarreia infantil. Tir. Intimina. BFP (Bundle forming pili).

Endereço para correspondência: Laboratório de Biologia do Reconhecer, Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Av. Alberto Lamego, 2000, Parque Califórnia, Campos dos Goytacazes, RJ. CEP: 28013-620. E-mails: jsilva@uenf.br ou wds@uenf.br

Recebido para publicação em 24/11/2005. Aceito em 26/1/2006.

INTRODUÇÃO

Escherichia coli é a bactéria comensal encontrada em maior quantidade no intestino grosso (cerca de 10^{12} bactérias). Hoje são conhecidas variantes de *E. coli* que adquiriram virulência: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* patogênica extraintestinal (EXPEC).

EPEC, objeto desta revisão, foi isolada de fezes de crianças e caracterizada como causa dos surtos de diarreia infantil que ocorreram na década de 1940 (Bray, 1945). Essa bactéria tem sido matéria de estudos cujo objetivo é ampliar informações sobre: sua distribuição geográfica e epidemiologia; as condições de vida que colocam certas comunidades sob risco de surtos de diarreia; seus fatores de virulência; os mecanismos envolvidos na produção das lesões intestinais e da diarreia e os métodos de diagnóstico, prevenção e tratamento. Ao contrário das cepas comensais da flora intestinal normal, EPEC adquiriu genes que codificam os fatores de virulência que a habilitam a infectar células hospedeiras.

Em um Simpósio Internacional realizado em São Paulo, em 1995, os especialistas propuseram a seguinte definição para EPEC:

EPEC are diarrheogenic *Escherichia coli* that produce a characteristic histopathology known as attaching and effacing (A/E) on intestinal cells and that do not produce Shiga, Shiga-like, or verocytotoxins. EPEC of human origin possess a virulence plasmid known as the EAF (EPEC adherence factor) plasmid that encodes localized adherence on cultured epithelial cells mediated by the Bundle Forming Pilus, while atypical EPEC do not possess this plasmid (Second International Symposium on EPEC, 1995).

O objetivo desta revisão é analisar os principais mecanismos moleculares e celulares desenvolvidos pela EPEC para aderir, sinalizar e lesar enterócitos. Fundamenta-se em dados consistentes recolhidos de trabalhos publicados em revistas especializadas. As informações coligidas e analisadas estão distribuídas nos quatro tópicos desenvolvidos a seguir.

DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E EPIDEMIOLOGIA

EPEC é importante causa de diarreia infantil nos países em desenvolvimento e mesmo nos países desenvolvidos continua a ser um problema de saúde pública (Gomes et al., 1989; Gomes et al., 1991; Nataro & Kaper, 1998). Diarreias causadas por EPEC em geral são mais severas do que as causadas por outros patógenos, com prevalência de óbitos superior a 30% (Levine & Edelman, 1984; Senerwa et al., 1989) e podem estar associadas a deficiências nutricionais (Thoren, 1983).

Estima-se que, no Brasil, diarréias sejam a causa de mais de 200.000 óbitos anuais de crianças, nos quais EPEC se encontra entre as principais causas (Gomes et al., 1989; Gomes et al., 1991; Mangia et al., 1993). Os principais sintomas clínicos da doença causada por EPEC são diarréia aquosa acompanhada de febre, mal-estar e vômitos (Levine, 1987). A maioria das cepas atípicas de EPEC já foi isolada de diferentes espécies de animais, ao contrário das cepas típicas que, segundo os dados até agora disponíveis, têm apenas os seres humanos como reservatório (Nataro and Karper, 1998; Rottner et al., 2005).

De acordo com a definição de EPEC, a presença do plasmídeo EAF caracteriza as cepas típicas de EPEC, que se enquadram em sorotipos O:H bem definidos (Kaper, 1996). A Organização Mundial de Saúde reconheceu, em 1989, doze sorogrupos O, designados: O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142, e O158. Nesses sorogrupos estão incluídas cepas EPEC típicas e atípicas, *E. coli* enteroagregativas, além de outras variantes de *E. coli* causadoras de diarréia (Campos et al., 1994; Rodrigues et al., 1996; do Vale et al., 1997; Scotland et al., 1996). Os sorotipos de EPEC mais freqüentemente encontrados são: O55:H6, O86:H34, O111:H2, O114:H2, O119:H6, O127:H6, O142:H6, O142:H34 (EPEC típicas) e O26:H11, O55:H7, O55:H34, O86:H8, O111ac:H8, O111:H9, O111:H25, O119:H2, O125ac:H6, O128:H2 (EPEC atípicas) (Trabulsi et al., 2002). Esses dados foram recolhidos de estudos análogos conduzidos em São Paulo (Campos et al., 1994; Rodrigues et al., 1996; do Vale et al., 1996; Scotland et al., 1996), no Reino Unido (Scotland et al., 1996), no Rio de Janeiro (Rosa et al., 1998) e na Itália (Giammanco et al., 1996). As cepas O55:H6, O111:H2, O119:H6 (EPEC típicas) e O26:H11, O111ac:H8 (cepas EPEC atípicas) são bactérias imóveis (Trabulsi et al., 2002).

FATORES DE VIRULÊNCIA ENVOLVIDOS NA PATOGENIA DA LESÃO QUE EPEC PRODUZ NA CÉLULA HOSPEDEIRA

Distinguem-se, esquematicamente, três estágios nas interações entre EPEC e a célula hospedeira:

1. Contato inicial

O contato inicial entre EPEC e a célula hospedeira é denominado adesão localizada ou, abreviadamente, LA (*localized adhesion*). LA tem sido analisada essencialmente em culturas de células epiteliais. Há evidências que indicam que esse contato é mediado por fimbrias do tipo IV, expressas na superfície bacteriana e denominadas BFP (*bundle forming pili*) (Giron et al., 1991). Dados mais recentes mostraram que BFP é um importante fator de virulência de EPEC (Bieber et al., 1998). Fimbrias do tipo IV são estruturas filamentosas de 4-nm a 7-nm de diâmetro que se agregam para formar feixes (Giron et al., 1991). Pili semelhantes são

expressos por outras bactérias patogênicas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae* e *Neisseria gonorrhoeae* (Strom & Lory, 1993) e participam nas interações dessas bactérias com as células hospedeiras (Manning & Meyer, 1997).

Os genes que codificam para BFP estão localizados em um plasmídeo de 50 MDa a 70 MDa denominado EAF (*EPEC-adherence factor*) (Baldini et al., 1983), que contém um conglomerado de 14 genes que codificam para BFP (Sohel et al., 1996; Stone et al., 1996) (Figura 1A). O primeiro gene do conglomerado, *bfpA*, codifica a principal subunidade pili de BFP (Donnenberg et al., 1992). A subunidade pilus (*bundlin*) de BFP é expressa após clivagem da proteína nativa da qual deriva por uma peptidase codificada pelo gene *bfpP* (Zhang et al., 1994). Os genes *bfpD* e *bfpF* do conglomerado gênico BFP codificam presumíveis proteínas ligantes de nucleotídeos (Sohel et al., 1996; Stone et al., 1996). Mutantes de EPEC em *bfpF* produzem LA com mais eficiência e aderem em maior número à célula-alvo (Anantha et al., 1998). A mutação em *bfpF* impede a dispersão das bactérias incluídas em LA e reduz, cerca de 200 vezes, a virulência da bactéria mutante em relação à bactéria original testada em seres humanos voluntários (Bieber et al., 1998).

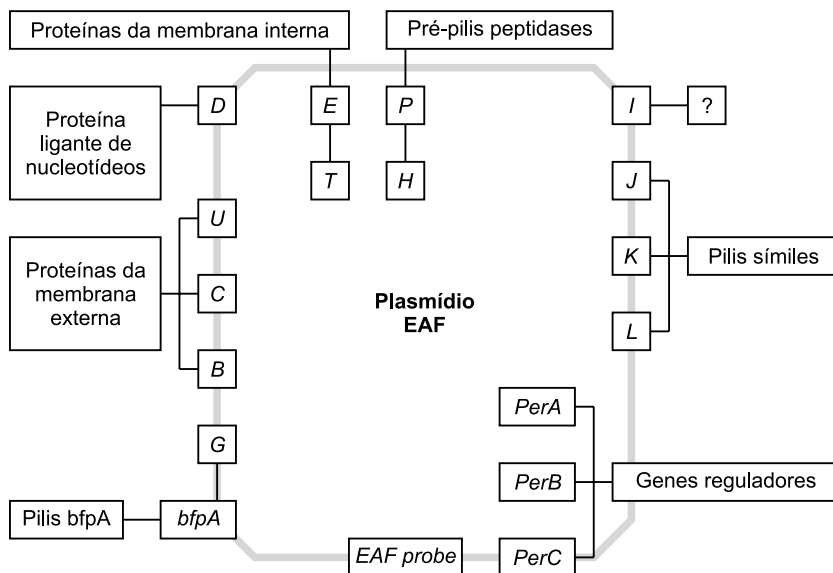
A expressão de BFP requer, além do conglomerado gênico BFP, dois outros fatores: o regulador global Per codificado pelo plasmídeo EAF (Tobe et al., 1996) e uma enzima periplasmática requerida para a formação de ligações dissulfeto (Zhang & Donnenberg, 1996) (Figura 1A). A expressão de BFP na superfície da bactéria é estimulada por sinais emanados do ambiente intestinal. Atinge níveis máximos durante o crescimento exponencial da bactéria na temperatura de 37°C e na presença de ions Ca⁺⁺. BFP também se expressa *in vitro* durante o cultivo de EPEC em meios usuais de cultura de células epiteliais (Puente et al., 1996).

Modelos experimentais, usando culturas de células como alvo e cepas de EPEC originais ou geneticamente modificadas como agente infectante, têm permitido a investigação, com apreciável nível de detalhamento, de aspectos importantes das interações entre EPEC e a célula hospedeira. A produção de mediadores da inflamação, a identificação de vias celulares de sinalização e de mecanismos de lesão ou morte celular e os processos induzidos ou ativados por EPEC têm sido estudados com o emprego de tais modelos.

Uma das variantes, o microensaio de transmigração de leucócitos polimorfonucleares (PMN) através de monocamadas de células (Parkos et al., 1991), permitiu demonstrar que monocamadas de células da linhagem T84, após contato com EPEC, liberam fator(es) quimiotático(s). A transmigração de PMN, avaliada pela dosagem de mieloperoxidase (Parkos et al., 1991), ocorria quando as células T84 eram infectadas com bactérias da cepa EPEC E2348/69 que expressa os mediadores da indução LA. A cepa EPEC JPN15, que não possui genes que codifiquem estes mediadores, não induzia quimiotaxia para PMN. A transmigração não era dependente de peptídios n-formilados, que são fatores quimiotáticos produzidos diretamente por bactérias. Como cerca de 50% da atividade quimiotática dos sobrenadantes das culturas das células T84 infectadas com EPEC

E2348/69 era inibida por anticorpos anti-IL-8, concluiu-se que IL-8 seria um dos fatores quimiotáticos liberados (Savkovic et al., 1996). Experimentos realizados subsequentemente confirmaram que EPEC E2348/69 estimula, de maneira dose-dependente, a produção de IL-8 pelas células T84 (Savkovic et al., 1997).

1A



1B



Fonte: dados publicados por McDaniel et al. (1995); Sperandio et al. (1998)

Figura 1. Disposição dos principais genes de virulência de EPEC: 1A – no plasmídeo EAF, genes para *bfp operon*, genes *per*, e genes dos fatores de virulência tipo IV; 1B – no cromossomo, principais genes do locus LEE.

A participação do sistema NF- κ B na produção de IL-8 por EPEC, no mesmo modelo experimental, foi investigada pelos métodos de *Electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) e *supershift EMSA* usando-se as seqüências oligoméricas 5', 5' TCG AGC GGC AGG GGA ATT CCC CTC TCC 3', específicas, que se ligam com produtos de ativação de NF- κ B e AP-1, 5' AGC TTA AAG CAT GAG

TCA GAC ACCT 3', não específicas, que servem de controle interno da ativação (Rosette & Karin, 1995). Observou-se que o sistema NF- κ B era ativado pela cepa EPEC E2348/69 e não ocorria com a cepa comensal JM109 mantida em laboratório ou com preparações de lipopolissacarídeo (Savkovic et al., 1997). Na presença do competidor oligomérico específico, a atividade ligante de NF- κ B para DNA celular não se expressava, mas o fazia virtualmente, sem restrições, na presença do competidor não específico AP-1.

Os experimentos foram ampliados visando identificar o envolvimento dos presumíveis fatores de transcrição na produção de IL-8 por EPEC. Esses fatores de transcrição, que capturam produtos de ativação de NF- κ B antes que penetrem o núcleo e se combinem com estruturas complementares do DNA, têm sido usados como método eficiente e específico para bloquear eventos dependentes de ativação deste sistema (Eck et al., 1993; Lin et al., 1995). Oligonucleotídeos fosforotiocilados de fita dupla são eficientemente absorvidos pelas células e permanecem no citoplasma onde capturam especificamente fatores de transcrição e previnem seu deslocamento para o núcleo e para a subsequente ligação com DNA (Bielinska et al., 1990). Células T84 foram tratadas com o oligonucleotídeo de captura, 5' G GGG ACT TTC CGC TGG GGA CTT TCC AGG GGG ACT TTC C 3', que contém o motivo de ligação para produtos de NF- κ B ativado, ou com o mutante sem este motivo de ligação, 5' GTC TAC TTT CCG CTG TCT ACT TTC CAC GGT CTA CTT TCC 3', que não se liga com NF- κ B antes da adição de EPEC. Na presença do oligonucleotídeo de captura, a produção de IL-8 por EPEC era significativamente inibida. O oligonucleotídeo mutante não interferia na produção de IL-8. Esses resultados demonstram conexões entre as vias de sinalização que levam à ativação de NF- κ B e à produção de IL-8 (Savkovic et al., 1997).

Uma vez que as células do epitélio intestinal não reagem com *E. coli* não patogênicas ou com lipolissacarídeos purificados, a preocupação seria identificar os fatores de virulência essenciais para a ativação do sistema NF- κ B. Isso foi possível graças à disponibilidade de cepas de EPEC geneticamente bem caracterizadas e de mutantes especificamente criados para a realização de experimentos delineados com tal objetivo, como JPN-15, CVD206 e UMD864. Observou-se que somente o mutante CVD206, sem o gene *eaeA*, ativava fatores de transcrição de NF- κ B. Este mutante, conquanto tenha sido incapaz de expressar intimina em sua superfície e de induzir lesões A/E (Jerse et al., 1991), ainda foi capaz de aderir frouxamente à célula hospedeira, de ativar vias de transdução de sinais (Donnenberg & Kaper, 1992) e de estimular transmigração de PMN (Savkovic et al., 1996). Em conjunto, esses dados sugerem que a formação de A/E não é requerida para a ativação de NF- κ B. Ao contrário, produtos do gene *espB* seriam essenciais para a estimulação de sinal das vias de transdução nas células hospedeiras.

E. coli B171/EAF⁽⁺⁾, mas não B171/EAF⁽⁻⁾, induz apoptose de células HeLa conforme foi avaliado pelos seguintes métodos: a) redução da atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase nas células apoptóticas detectada

pelo teste de MTT (brometo de 3'-[4,5,-dimetiltiazol-2il]2,5-difeniltetrazolio); b) marcação das células apoptóticas com anexina V; c) identificação e quantificação das alterações nucleares típicas de células apoptóticas como condensação da cromatina e fragmentação do núcleo após coloração do DNA com fluorocromos.

Essas alterações morfológicas eram acompanhadas por significativa ativação de caspase-3, enzima importante na via de sinalização citoplasmática que leva à apoptose. O bloqueio de BfpA associada à superfície de *E. coli* B171/EAF⁽⁺⁾ com anticorpos IgY anti-BfpA inibe a apoptose. Esta observação reforça a sugestão de que BFP é essencial para a sinalização intracelular que leva à apoptose (Melo et al., 2005). BfpA, ao contrário, não parece ser essencial para iniciar ativação do sistema NF-κB na célula hospedeira. Experimentos realizados *in vitro*, usando EPEC B171/EAF⁽⁺⁾ e EPEC B171/EAF⁽⁻⁾ como sinalizadores, células HeLa como alvo e métodos que identificam produtos de ativação do sistema NF-κB, revelaram que BfpA não parece ser essencial, pelo menos para iniciar o processo de ativação de NF-κB. O método de EMSA *supershift* detectou p65/RelA formando complexo com DNA nas células infectadas, tanto com EPEC B171/EAF⁽⁺⁾ como com EPEC B171/EAF⁽⁻⁾. Todavia, como a transativação de NF-κB dependente de gene repórter foi estimulada mais pronunciadamente por EPEC B171/EAF⁽⁺⁾, ficou a sugestão de que o fator de virulência BfpA poderia influenciar na regulação da atividade de transcrição de NF-κB (Melo et al., 2005).

Experimentos *in vitro* realizados em paralelo e usados para infectar células epiteliais EPEC selvagem e a variável mutante VD206 EPEC, sem a região *eaeA* que acomoda o gene que codifica para intimina, mostraram que a expressão de intimina não era necessária para a indução de apoptose (Abul-Milh et al., 2001) e para a ativação de NF-κB (Savkovic et al., 1997).

2. Adesão frouxa

Logo após o contato inicial entre EPEC e a célula alvo com formação de LA, seguem-se estágios que levam ao estabelecimento da lesão celular patognomônica da infecção por EPEC, denominada *attaching and effacing*, abreviadamente A/E. Assim que EPEC adere à superfície da célula epitelial, formam-se colônias de bactérias que a seguir se dispersam (Figura 2). A análise desse fenômeno bifásico, com o emprego simultâneo de microscopias de imunofluorescência e imunoeletrônica, revelou que BFP passa por profundas modificações estruturais (Knutton et al., 1999). Logo que BFP promove a agregação das bactérias entre si e organiza microcolônias sobre a célula epitelial (Figura 2), formam-se *pilus bundles* com cerca de 40nm de diâmetro. A seguir, os *pilus bundles* de BFP espessam-se, alongam-se e seus diâmetros podem aumentar até 100nm, formando uma rede frouxa tridimensional (Knutton et al., 1999). A dispersão da EPEC e a transformação dos feixes de BFP de finos e curtos para longos e espessos não ocorre na cepa E2348/69, que é um mutante em *bfpF*. BFP promove, portanto, a formação e a dispersão das colônias de EPEC

sobre a célula alvo. A fase de dispersão requer BfpF e está associada a profundas modificações estruturais nos feixes de BFP.

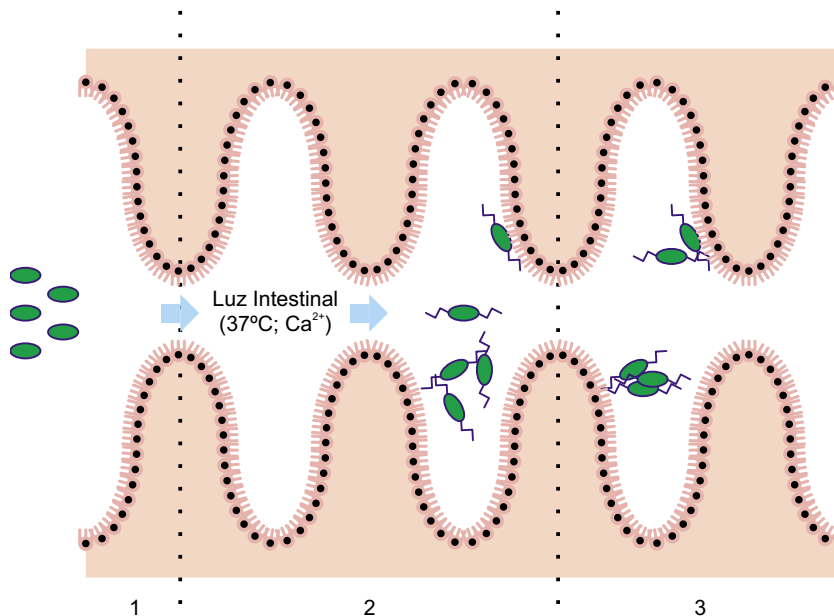


Figura 2. Estágio inicial da infecção por EPEC. EPEC na luz intestinal (**fase 1**) por influência de condições locais, 37° C e Ca⁺⁺, por exemplo, aciona genes *bfpA* do plasmídio a produzir BfpA componentes que formam feixes (**fase 2**) para adesão inicial da bactéria aos enterócitos e de agregação entre as bactérias do grumo aderido (**fase 3**).

3. Adesão firme

O mecanismo central na patogênese da EPEC é, como já foi referido, a lesão A/E. Caracteriza-se pela aderência íntima da bactéria à superfície das células epiteliais, seguida de destruição das microvilosidades, formação de pedestal e agregação polarizada de moléculas de α -actina, talina, ezrina, bem como de outros componentes do citoesqueleto situados abaixo do sítio de adesão (Figura 3). A habilidade de produzir A/E não se restringe a EPEC; tem sido observada também em *E. coli*, produtora de Shiga toxina, e em outras espécies de bactérias (Nataro et al., 1998; Pedroso et al., 1993; Knutton et al., 1989).

EPEC expressa um outro grupo de fatores de virulência que participa na patogênese da lesão A/E. Tais fatores são codificados por genes localizados numa região cromossômica específica de 35,5 kb, denominada LEE (*Locus of enterocyte effacement*). A presença de LEE é uma característica comum entre os patógenos

que causam a lesão A/E. Genes da região LEE experimentalmente introduzidos na cepa K-12 de *E. coli*, não virulenta, transformam-na em virulenta e capacitam-na a induzir A/E (McDaniel & Kaper, 1997). A observação indica que os fatores bacterianos requeridos para a produção de A/E são produtos codificados por genes localizados nesta ilha de patogenicidade (Celli et al., 2000).

LEE contém genes que codificam um grupo de proteínas que se distribuem em seis categorias principais: 1) reguladores transcricionais, tal como o regulador de LEE ou Ler (Dean et al., 2005); 2) proteínas do Sistema de Secreção do Tipo III, como EspA, EspB, EspD e EspF, denominadas em conjunto Esp; 3) translocadores; 4) chaperonas moleculares; 5) proteínas efetoras secretadas, incluindo o receptor translocado de intimina, Tir; 6) intimina (Figura 1B). O canal transportador, organela, de aproximadamente 0.7µm de comprimento (Nougayrède et al., 2003), é organizado pela associação de moléculas de EspA. Transfere moléculas efetoras como Tir, EspB e EspD, também produzidas pela bactéria, para a superfície da célula hospedeira. Tir funciona como receptor para intimina, enquanto EspB e EspD são usadas para formar poros através dos quais outras presumíveis moléculas efetoras seriam introduzidas no interior da célula (Knutton et al., 1998, Wolff et al., 1998, Wachter et al., 1999, Warawa et al., 1999, Daniell et al., 2001; Ide et al., 2001, Shaw et al., 2001) (Figura 3). Uma ATPase, denominada EscN e associada ao TTSS, participa desse mecanismo (Nataro et al., 1998; Pedroso et al., 1993; Knutton et al., 1989; Trabulsi et al., 2002; Rosenshine et al., 2000). TTSS é também encontrado em outros patógenos entéricos nos quais exerce funções semelhantes (Chen & Frankel, 2005).

As principais proteínas efetoras responsáveis pelo desencadeamento da adesão íntima e A/E são a intimina e seu receptor Tir. A interação intimina-Tir permite a ancoragem da EPEC na superfície da célula hospedeira, inicia processos de sinalização celular e reorganiza os componentes do citoesqueleto para formar o pedestal (Goosney et al., 2000).

Intimina é uma proteína de 94-kDa, codificada pelo gene *eae*, que se expressa na membrana externa da bactéria. Análises das seqüências dos 280 resíduos de aminoácidos de sua porção C terminal, correspondente ao domínio que interage com Tir, permitem distinguir moléculas de intimina encontradas em EPEC e em STEC (Adu-Bobie et al., 1998). Já foram descritos quatro subtipos de intimina: α , β , γ , δ . Cada um deles pode estar relacionado com o tropismo tecidual da bactéria para diferentes regiões no intestino (Phillips & Frankel, 2000).

Um conjunto de 47 amostras enteropatogênicas de *Escherichia coli*, previamente caracterizadas por sorotipo, fenótipo de aderência, habilidade de induzir a formação da lesão histopatológica e presença das seqüências genéticas *eae*, *bfp* e *EAF*, foi analisado e comparado usando-se os seguintes critérios de variabilidade: a) o perfil de fragmentação do DNA cromossômico obtido pela técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE); b) a mobilidade eletroforética das isoenzimas (MLEE); c) a presença de seqüências de DNA da região LEE (*eae*, *espA*, *espB*, *tir*) e respectivos alelos. A amplificação das seqüências específicas da região

LEE revelou 18 padrões genéticos distintos. A tipagem do gene *eae* identificou os alelos de intimina β (35%), γ (12%) e α (12%). A maioria das amostras analisadas, cerca de 42%, não expressava seqüências típicas para intimina. A fragmentação do DNA cromossômico detectou um elevado polimorfismo genético entre as amostras estudadas, não tendo sido observada correlação com os marcadores de virulência investigados. Por outro lado, a análise das variantes entre as isoenzimas sugeriu uma distribuição clonal específica de variantes genéticas do *locus eae*. Esses dados sugerem que informações adicionais sobre o *locus eae* poderiam situá-lo como marcador relevante na definição das relações genéticas entre as *Escherichia coli* enteropatogênicas (Régua-Mangia et al., 2003).

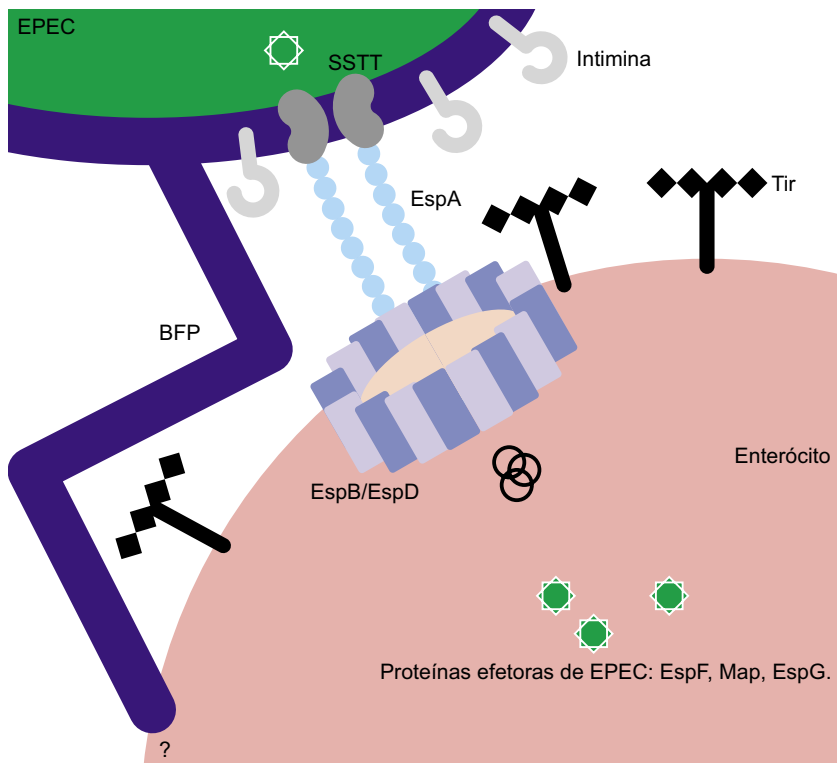
A molécula Tir, após ser inserida na célula hospedeira, é fosforilada em três sítios distintos: em dois resíduos de serina pela proteína quinase A (Warawa & Kenny, 2001) e no resíduo de tirosina-474 por uma quinase ainda não identificada (Rosenshine et al., 1996; Kenny et al., 1997). A fosforilação do resíduo de tirosina-474 parece ser importante na remodelagem da actina e na formação do pedestal (Kenny et al., 1997). Há observações sugerindo que a reunião de moléculas de Tir em aglomerados induz sua fosforilação (Rottner et al., 2005). O resíduo de tirosina-474 permite a ligação direta das proteínas Nck (Nck-1 e Nck-2), proteínas adaptadoras presentes na célula hospedeira (Gruenheid et al., 2001; Campellone et al., 2002). Essas proteínas recrutam e se ligam diretamente ao domínio SH2 da proteína N-WASP, relacionada com a síndrome neurológica de Wiskott-Aldrich. O complexo Nck/N-WASP recruta e ativa diretamente as proteínas Arp2/3 relacionadas com a actina (Nougayrède et al., 2003; Rottner et al., 2005). O complexo WASP/Arp2/3 se localiza no topo dos pedestais induzidos por EPEC, sugerindo seu envolvimento no processo de concentração e polimerização de actina em filamentos (Sanger, 1996) e, por conseqüência, na patogênese da lesão A/E (Kalman et al., 1999; Lommel et al., 2001; Gruenheid et al., 2001).

O emprego da microscopia de fluorescência na patogenia das lesões A/E (Finlay, et al., 1992; Manjarrez-Hernandez, et al., 1991, Kalman, et al., 1999) permitiu demonstrar o recrutamento e a associação das moléculas α -actina, vinculina, cortactina e talina na reorganização do citoesqueleto para formar o pedestal (Frankel et al., 1998; Goosney et al., 2000; Cantarelli et al., 2001; Huang et al., 2002).

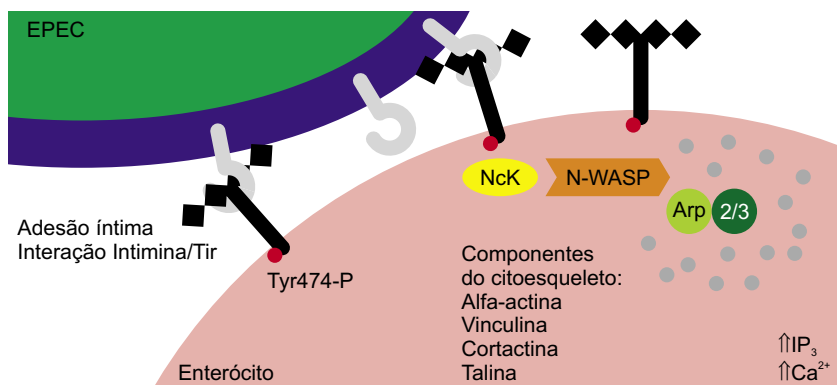
A interação Tir-intimina induz, nas células infectadas por EPEC, a liberação de Ca^{++} intracelular no citosol, a elevação dos níveis de inositol-3-fosfato (IP_3) e a fosforilação de fosfolipase C- γ (Foubister et al., 1994; Dean et al., 2005). IP_3 e fosfolipase C- γ são mediadores do rearranjo morfoestrutural do citoesqueleto (Chen & Frankel, 2005).

O pedestal exerce papel efetivo na adesão firme de EPEC à superfície da célula hospedeira. Pode ser uma estratégia desenvolvida pela bactéria para permanecer no ambiente extracelular e não ser internalizada se, eventualmente, aderir à superfície de fagócitos profissionais (Goosney et al., 1999; Kenny et al., 1997) (Figura 3C).

3A



3B



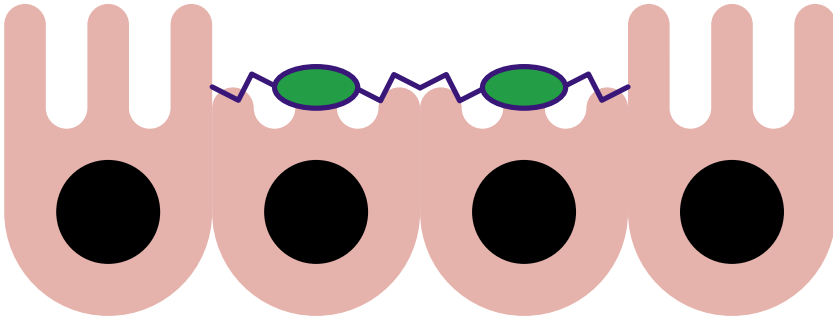


Figura 3. Desenvolvimento da adesão firme entre EPEC e enterócito: Fatores bacterianos são requeridos para produção da lesão A/E. **3A** – Primeiro, EPEC adere na superfície da célula alvo por meio dos feixes ricos em BfpA, os quais promovem também agregação das bactérias entre si reforçando a estabilidade dos grumos bacterianos. A seguir, há a transferência de moléculas bacterianas efetoras como Tir, EspB e EspD, para a célula hospedeira através do sistema transportador do tipo III. Tir funciona de receptor para intimina enquanto EspB e EspD formam poros para transferência de outras moléculas efetoras para o interior da célula hospedeira. **3B** – A interação intimina-Tir induz processos de sinalização celular na célula hospedeira como ativação de fosfolipase C (PLC), efluxo de inositol trifosfato (IP_3) e liberação de Ca^{++} , de seus depósitos para o citosol, e reorganiza os componentes do citoesqueleto para formar o pedestal, através do recrutamento de moléculas de actina, α -actina, talina, ezrina etc. O citoesqueleto se reorganiza formando-se o pedestal sobre o qual se apóia a bactéria. **3C** – Lesão A/E caracterizada por aderência íntima da bactéria na superfície das células epiteliais, seguida de destruição das microvilosidades e formação de pedestal.

Os dados disponíveis sobre a resposta da célula hospedeira aos fatores de virulência desenvolvidos por EPEC são compatíveis com as informações já obtidas para outros patógenos, como, por exemplo, produção de fatores quimiotáticos, estimulação de sinal das vias de transdução nas células hospedeiras e recrutamento de células inflamatórias. Vários estudos usando diferentes modelos animais ou sistemas *in vitro* têm identificado a interleucina IL-8 como um dos principais fatores quimiotáticos que atraem PMN para o sítio de infecções ou de lesão tecidual (Hoch et al., 1996). Células epiteliais respondem a patógenos entéricos produzindo vários mediadores da inflamação como TNF- α , que é um fator estimulador de formação de colônias para granulócitos/monócitos (Jung et al., 1995), além de IL-8 (Savkovic et al., 1997).

IMUNIDADE INDUZIDA POR EPEC

A indução de imunidade local nas mucosas é crítica na infância. MALT (*mucosa-associated lymphoid tissue*) inclui tanto os folículos linfóides agregados das placas de Peyer do íleo como folículos linfóides solitários, dispersos na mucosa e submucosa do apêndice e porção distal do intestino (Figura 4). A importância funcional desse compartimento de tecido linfóide ressalta-se pelo fato de que cerca de 80% a 90% dos imunócitos produtores de imunoglobulinas (Igs) se encontram nas mucosas e glândulas exócrinas (Brandtzaeg et al., 1999a).

Os produtos mais importantes desses imunócitos são IgA polimérica (pIgA) e IgM pentamérica (pIgM). Ambos, pIgA e pIgM, possuem sítios de ligação para receptores poliméricos de Igs (pIgR), denominados peças de secreção (PS), que são essenciais para o transporte ativo da molécula de Ig através da célula epitelial. O sítio de ligação pIgR/PS depende da incorporação covalente da cadeia J na estrutura quaternária dos polímeros na ocasião em que estão sendo produzidos pelos imunócitos.

A produção de pIgA e pIgM inicia-se com a tomada de antígenos (Ags) solúveis ou particulados pelas células M localizadas entre as células epiteliais da mucosa. As células M transferem as moléculas de Ags para células apresentadoras de Ags (APC). Depois de processados, peptídios imunogênicos associados a produtos do complexo principal de histocompatibilidade da classe II são expostos na superfície das células APC e apresentados a linfócitos T CD4⁺ virgens. Da interação e diferenciação entre diferentes subtipos de linfócitos resultam plasmócitos produtores de Igs específicas para Ags recolhidos nas mucosas, além de células de memória (Figura 4). O aparecimento de anticorpos produzidos nas secreções, no colostro e no leite, reflete a importância do eixo imunológico “MALT-glândula mamária-migração de linfócitos B” para a proteção do recém-nascido (Goldblum et al., 1996; Brandtzaeg et al., 1999a). A migração de linfócitos B já comprometidos com antígenos recuperados na mucosa intestinal para gânglios linfáticos mesentéricos explica a presença de pIgA e IgM circulantes específicos para estes antígenos (Goldblum et al., 1996; Brandtzaeg et al., 1999b).

Dados epidemiológicos indicam que, nas áreas endêmicas, a diarreia causada por EPEC é mais comum e mais grave na primeira infância, progressivamente menos freqüente e mais branda na segunda e terceira infâncias e rara em adultos (Levine & Edelman, 1984). Já o aparecimento de anticorpos circulantes segue curso inverso: não são detectáveis na primeira infância, aumentam com a idade e atingem níveis mais elevados nos adultos (Neter et al., 1955). Admite-se, portanto, que a exposição a EPEC durante infância produz imunidade contra este patógeno. Esses dados sugerem que o desenvolvimento de vacinas contra EPEC seria de utilidade em países como o Brasil, onde, de maneira perversa, estão associados fatores como subnutrição, condições precárias de habitação e falta de água potável e de rede de esgotos.

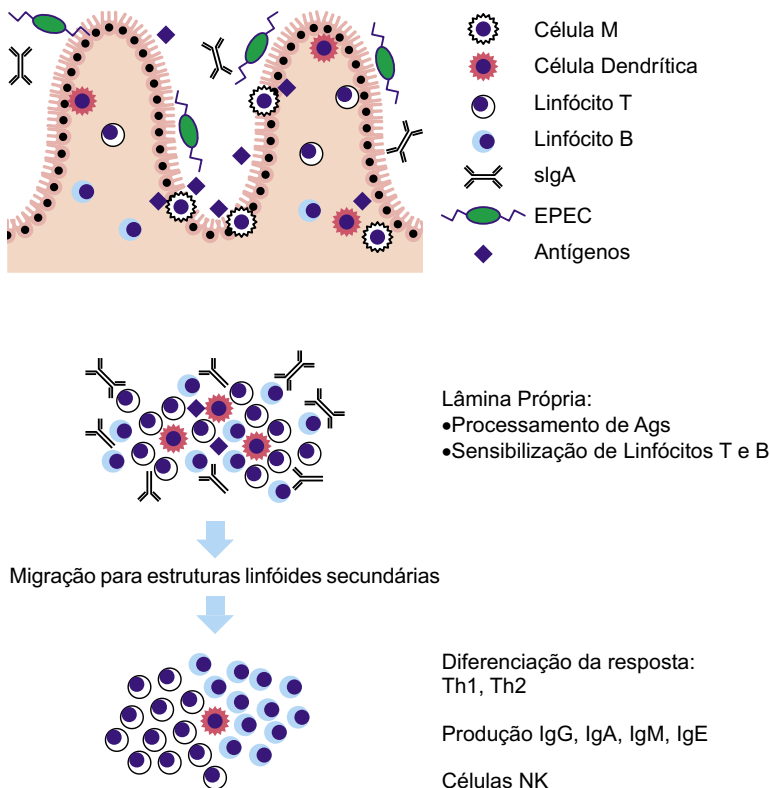


Figura 4. Representação esquemática dos três principais compartimentos da imunidade das mucosas: exclusão antigênica, regulação imune e mecanismos efetores.

Os imunógenos que poderiam ser incluídos na formulação de vacinas anti-EPEC, na forma de clones ou de subunidades, seriam alguns dos fatores de virulência já conhecidos, como os produtos de genes localizados no plasmídeo EAF e no locus EAE.

BfpA, subunidade dos feixes de BfpA, pelas atividades que exerce durante as interações da EPEC com a célula hospedeira e pelas propriedades imunogênicas que exibe, seria um dos candidatos a ser incluído na formulação da vacina anti-EPEC.

Um recombinante bfpA, referido como SL3261 (pBfpA), expresso na cepa *aroA* de *Salmonella typhimurium* e administrado por via oral para camundongos BALB/c, evoca títulos elevados e persistentes de anticorpos anti-BfpA (Schriefer et al., 1999). SL3261 (pBfpA) foi construído amplificando-se por PCR cópias da região de *bfpA* obtidas do plasmídeo EAF da cepa B171 de EPEC. Após subclonagem de uma cópia intacta de *bfpA* no vetor de expressão

pCYTEXP1, o produto pBfpA foi usado para transformar a amostra não patogênica de *Salmonella*, *aroA S. typhimurium*, cepa SL3261, gerando SI3261(pBfpA). Este recombinante expressava SI3261(pBfpA), como indicado pela presença de uma proteína de 21 kDa. A identidade da proteína recombinante, obtida com BfpA nativa, foi determinada usando-se anticorpos anti-BfpA específicos.

Construções subsequentes de plasmídios semelhantes em *E. coli* não patogênica, usando *forward and reverse primers* de 32 bp de comprimento correspondentes às terminações 5' e 3' de *bfpA* de SI3261(pBfpA), permitiram a obtenção do plasmídio pEU84 (Quintana-Flores et al., 2002). A proteína recombinante BfpA recuperada desse plasmídio foi usada como imunógeno em galinhas poedeiras, induzindo-se títulos elevados de anticorpos IgY anti-BfpA. Os anticorpos IgY, isolados e purificados da gema dos ovos, reconheciam de maneira semelhante BfpA recombinante e nativa, bloqueavam a indução de LA no sistema *in vitro* EPEC-células HeLa, inibiam o crescimento em cultura de EPEC B171/EAF⁽⁺⁾, porém não de EPEC B171/EAF⁽⁻⁾, e discriminavam amostras de EPEC de outras cepas de *E. coli* não patogênicas (Almeida et al., 2003). Essas observações confirmaram o elevado poder imunogênico de BfpA (Schriefer et al., 1999).

A imunogenicidade dos fatores de virulência codificados por genes em LEE está também sendo investigada, principalmente nos aspectos relativos à proteção de mucosas. Assim, a amamentação de recém-nascidos tem sido amplamente defendida por muitos pesquisadores como tratamento preventivo de muitas infecções entéricas. Já foi demonstrado que o colostro e o leite materno contêm pIgA específicas para intimina, BfpA, EspA, EspB e Tir (Loureiro et al., 1998; De Souza Campos Fernandes et al., 2002; Sanches et al., 2000).

Há, portanto, possibilidade real de formulação de vacina anti-EPEC usando-se segmentos gênicos de LEE ou EAF ou alguns de seus produtos como BfpA, intimina e EspB.

SUGESTÕES

- Extensão de inquéritos epidemiológicos sobre a incidência de diarreias causadas por EPEC às outras regiões de risco existentes no país e que ainda não foram catalogadas pelos órgãos governamentais de saúde pública.
- Desenvolvimento de métodos de baixo custo, de execução fácil e rápida e, necessariamente, seguros para a identificação de cepas patogênicas de *E. coli* em amostras de fezes.
- Ampliação dos critérios de discriminação entre EPEC típica e atípica.
- Identificação de outros eventuais fatores de virulência da bactéria.
- Análise da imunogenicidade dos fatores de virulência já conhecidos visando à formulação de vacinas de clones recombinantes ou de subunidades.

- Construção de outros clones contendo genes que codifiquem fatores de virulência de EPEC.
- Introdução de estratégias para a antecipação de surtos de diarreias nas áreas de risco. As informações que viessem a ser obtidas seriam valiosas para o estabelecimento de medidas de prevenção e tratamento. Entre essas medidas incluir-se-ia a vacinação das grávidas. A inequívoca presença de IgA anti-EPEC no colostro (Parissi-Crivelli et al., 2000; Loureiro et al., 1998) e o sucesso da vacinação preventiva contra tétano umbilical, promovida pelo Ministério da Saúde do Brasil, justificam a sugestão.

PERSPECTIVAS

A fecunda atividade de pesquisa que está sendo realizada com *Escherichia coli* enteropatogênicas antecipa, com certa segurança, algumas conquistas:

- Obtenção de mais informações sobre as atividades biológicas e as propriedades imunológicas dos fatores de virulência das *Escherichia coli* patogênicas.
- Desenvolvimento de métodos de produção de reagentes para a imunodeteção de cepas patogênicas.
- Formulação de vacinas eficientes.
- Mapeamento cuidadoso das áreas de risco.
- Aquisição de informações tanto sobre o patógeno como sobre as populações que possam ser usadas como marcadores em epidemiologia genética.

UTOPIA

O desmonte das condições perversas, anteriormente citadas, que favorecem a emergência de surtos de diarreia infantil causada por EPEC, no Brasil, não parece impossível. Cuba, embora seja um país pequeno com apenas 11 milhões de habitantes e, significativamente, muito mais pobre que o Brasil, ao associar reforço na infraestrutura dos serviços de saúde pública com educação e estímulo à ciência, desmitificou esta utopia. Criou 60 universidades que hoje abrigam 220 centros de pesquisa em ciência e tecnologia, graduou 700.000 estudantes e empregou 78.000 cientistas ou tecnólogos para realizar projetos bem planejados nas diversas áreas de ciência e tecnologia. Com um programa de 13 vacinas obrigatórias desenvolvidas no próprio país conseguiu erradicar poliomielite (em 1962), malária (em 1967), tétano umbilical e difteria (na década de 1970). Sarampo, rubéola e caxumba foram eliminadas na década 1990, enquanto tétano, doenças meningocócicas, hepatite B e leptospirose já estão sob controle. Conquanto a incidência da tuberculose em alguns países seja da ordem de 100 casos/100.000 habitantes, em Cuba é de 6,6 casos /100.000 habitantes. Óbitos causados por diarreias foram reduzidos em cerca de 95% (Guzmán, 2005).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem as bolsistas de apoio técnico, Cláudia Leticia da Silva e Verônica da Silva Santos Souza, bolsistas da FENORTE-TECNORTE (Proc. n.º E15/021668/04), pela dedicação e, sobretudo, pela eficiência tanto nos trabalhos de rotina como na participação nos projetos sobre *Escherichia coli* enteropatogênicas que estão sendo conduzidos no Laboratório de Biologia do Reconhecer, Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense - Darcy Ribeiro. Esses projetos estão sendo financiados com recursos aprovados pelas seguintes instituições de apoio à pesquisa científica: CNPq, Proc. n.º, 4727452003-4 e Proc. n.º 521941/95-4 (NV); FAPERJ, Proc. n.º E-26/151/501/99 e Proc. n.º E-26152-497/2002; FENORTE Proc. n.º E-5/022024/03; bolsas de doutorado da FAPERJ, Proc. n.º E-26/ 150.830./97 (Cláudia M. Costa de Almeida) e FENORTE Proc. n.º E-26/ 150.830./97 (Alessandra Rocha Melo).

ABSTRACT

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), instead of comensal *Escherichia coli*, adheres, signalize and damage enterocytes

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is an important cause of diarrhea in infants of low socioeconomic level living under conditions of malnutrition, poor houses, deficient potable water supply and deficiency in sewer systems. Mortality rates of 25% to 70% have been reported and the clinical illness is characterized by vomiting, low-grade fever, and profuse watery diarrhea. Biopsies taken from EPEC-infected patients show that EPEC adheres by clusters of bacteria to the surface of intestinal epithelium this pattern of cell colonization is called *localized adherence* (L/A). After EPEC adhesion the cell microvilli are replaced by compact microfilamentous structures known as pedestals that protrude from the cells surface and cup individual bacteria. This typical cell lesion is referred as *attaching and effacing* (A/E). Based on *in vitro* experimental models using cultured epithelial cells as hosts and, as infecting agents, some wild type EPEC derivative strains, which lack genes coding for virulence factors, a sequence of three stage events was observed. The initial stage was the binding of EPEC to epithelial cells mediated by the type IV bundle-forming pili (BFP). BFP is encoded by large 50-70 MDa EAF (for EPEC adherence factor) plasmids. This stage was followed by the translocation of EPEC effector proteins as EspA, EspB, and EspD from the bacteria to the cell, a process that is mediated by the type III secretion system (TTSS). The genes necessary for the formation of A/E and pedestal are contained within a 35-kbp pathogenic island termed the locus of enterocyte effacement (LEE). Along this stage occurs induction of signal transduction process in the host cells leading to activation of the NF- κ B system, production of mediators of inflammation or apoptosis. In the final stage, EPEC is attached more intimately to the epithelial cells. This intimate attachment is mediated by the interaction of a bacterial outer membrane protein, intimin, and its translocated receptor, Tir. EPEC induce vigorous and sustained antibody production both in patients recovering from infection and in animal models

experimentally immunized with live recombinant vaccine expressing BfpA or with purified recombinant BfpA protein. The reported presence of anti-EPEC antibodies against the EPEC virulence factors in colostrums of mothers living in endemic areas reinforces promotion of breast-feeding and development of vaccines and protective antibodies for protection or treatment of infections caused by EPEC.

KEYWORDS: Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). Infantile diarrhea. Translocated intimin receptor, Tir, Intimin, Bundle forming pili.

REFERÊNCIAS

1. Abul-Milh M; Wu Y, Lau B, Lingwood CA & Foster DB. Induction of epithelial cell death including apoptosis by enteropathogenic *Escherichia coli* expressing bundle-forming pili. *Infect Immun* 69: 7356-7364, 2001.
2. Adu-Bobie J, Frankel G, Bain C, Goncalves AG, Trabulsi LR, Douce G et al. Detection of intimins alpha, beta, gamma, and delta, four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. *J Clin Microbiol* 36: 662-668, 1998.
3. Almeida CMC, Quintana-Flores VM, Medina-Acosta E, Schriefer A, Barral-Netto M & Dias da Silva W. Egg yolk anti-BfpA antibodies as a tool for recognizing and identify enteropathogenic *Escherichia coli*. *Scandinavian J Immunol* 57: 573-582, 2003.
4. Anantha RP, Stone KD & Donnenberg MS. The role of BfpF, a member of the PilT family of putative nucleotide-binding proteins, in type IV pilus biogenesis and in interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host cells. *Infect Immun* 66: 122-131, 1998.
5. Baldini MM, Kaper JB, Levine MM, Candy DC & Moon HW. Plasmid-mediated adhesion in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2: 534-538, 1983.
6. Bieber D, Ramer SW, Wu C-Y, Murray WJ, Tobe T, Fernandez R & Schoolnik GK. Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 280: 2114-2118, 1998.
7. Bielinska A, Shivdasani RA, Zhang LQ & Nabel GJ. Regulation of gene expression with double-stranded phosphorothioate oligonucleotides. *Science* 250: 997-1000, 1990.
8. Brandtzaeg P, Farstad IN & Haraldsen G. Regional specialization in the mucosal immune system: primed cells do not always home along the same track. *Immunology Today* 20: 267-277, 1999a.
9. Brandtzaeg P, Farstad IN, Johansen FE, Morton HC, Norderhaug IN & Yamanaka T. The B-cell system in human mucosal and exocrine glands. *Immunological Reviews* 171: 45-87, 1999b.
10. Bray J. Isolation of antigenically homogeneous strains of *Bact. coli neopolitanum* from summer diarrhoea of infants. *J Pathol Bacteriol* 57: 239-247, 1945.
11. Campellone GK, Giesse A, Tipper DJ & Leong JM. A tyrosine-phosphorylated 12-amino-acid sequence of enteropathogenic *Escherichia coli* Tir binds the host adaptor protein Nck and is required for Nck localization to actin pedestals. *Mol Microbiol* 43: 1.227-1.241, 2002.
12. Campos LC, Whittam TS, Gomes TAT, Andrade JRC & Trabulsi LR. *Escherichia coli* serogroup O111 includes several clones of diarrheogenic strains with different virulence properties. *Infect Immun* 62: 3.282-3.288, 1994.
13. Cantarelli VV, Takanashi A, Yanagihara I, Akeda Y, Imura K, Kodama T, Kono G, Sato Y & Honda T. Talin, a host cell protein, interacts directly with the translocated intimin receptor, Tir, of enteropathogenic *Escherichia coli*, and is essential for pedestal formation. *Cell Microbiol* 3: 745-751, 2001.
14. Celli J, Deng W & Finlay BB. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) attachment to epithelial cells: exploiting the host cell cytoskeleton from the outside. *Cell Microbiol* 2: 1-9, 2000.
15. Chen HD & Frankel G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev* 29: 83-98, 2005.

16. Daniell SJ, Delahay RM, Shaw RK, Hartland EL, Pallen MJ, Booy F, Ebel F, Knutton S & Frankel G. Coiled-coil domain of enteropathogenic *Escherichia coli* type III secreted protein EspD is involved in EspA filament-mediated cell attachment and hemolysis. *Infect Immun* 69: 4.055-4.064, 2001.
17. Dean P, Maresca M & Kenny B. EPEC's weapon of mass subversion. *Curr Op Microbiol* 8: 28-34, 2005.
18. De Souza Campos Fernandes RC, Quintana-Flores VM & Medina-Acosta E. Prevalent transfer of human colstral IgA antibody activity for the enteropathogenic *Escherichia coli* bundle-forming pilus structural repeating subunit A in neonates. *Diag Microbiol and Infect Dis* 44: 331-336, 2002.
19. Do Valle GR, Gomes A, Irino K & Trabulsi LR. The traditional enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) serogroup O125 comprises serotypes which are mainly associated with the category of enteroaggregative *E. coli*. *FEMS Microbiol Lett* 152: 95-100, 1997.
20. Donnenberg MS & Kaper JB. Mini Review. Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 60: 3.953-3.961, 1992.
21. Donnenberg MS, Girón JA, Nataro JP & Kaper JB. A plasmid-encoded type IV fimbriae gene of enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localized adherence. *Mol Microbiol* 6: 3.427-3.437, 1992.
22. Eck SL, Perkins ND, Carr DP & Nabel GJ. Inhibition of phorbol ester-induced cellular adhesion by competitive binding of NF- κ B in vivo. *Mol Cell Biol* 13: 6.530-6.536, 1993.
23. Finlay BB, Rosenshine I, Donnenberg MS & Kaper JB. Cytoskeletal composition of attaching and effacing lesions associated with enteropathogenic *Escherichia coli* adherence to HeLa cells. *Infect Immun* 60: 2.541-2.543, 1992.
24. Frankel G, Phillips AD, Rosenshine I, Dougan G, Kaper JB & Knutton S. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* more subversive elements. *Mol Microbiol* 30: 911-921, 1998.
25. Foubister V, Rosenshine I & Finlay BB. A diarrheal pathogen, enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), triggers a flux of inositol phosphates in infected epithelial cells. *J Exp Med* 179: 993-998, 1994.
26. Giammanco A, Maggio M, Giammanco G, Morelli R, Minelli F, Scheutz F & Caprioli, A. Characteristics of *Escherichia coli* strains belonging to enteropathogenic *E. coli* serogroups isolated in Italy from children with diarrhea. *J Clin Microbiol* 34: 689-694, 1996.
27. Girón JA, Ho ASY & Schoolnik GK. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 254: 710-713, 1991.
28. Goldblum RM, Hanson LA & Brandzaeg P. The mucosal defense system. (Stiehm, E.R.; ed.) *Immunologic Disorders in Infants and Children*. 4th ed. p.159-199. WB Saunders, Philadelphia, 1996.
29. Gomes TAT, Rassi V, MacDonald KL, Ramos SR, Trabulsi LR, Vieira MA, Candeias JAN, Ivey C, Toledo MRF & Blake PA. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in São Paulo, Brazil. *J Infect Dis* 64: 331: 337, 1991.
30. Gomes TAT, Blake PA & Trabulsi LR. Prevalence of *Escherichia coli* strains with localized, diffuse, and aggregative adherence to HeLa cells in infants with diarrhea and matched controls. *J Clin Microbiol* 27: 266-269, 1989.
31. Goosney D, DeVinney R, Pfuetzner R, Frey E, Strynadka NC & Finlay BB. Enteropathogenic *E. coli* translocated intimin receptor, Tir, interacts directly with alpha-actin. *Curr Biol* 10: 735-738, 2000.
32. Goosney DL, Celli J, Kenny B & Finlay BB. Enteropathogenic *Escherichia coli* inhibits phagocytosis. *Infect Immun* 67: 490-495, 1999.
33. Gruenheid S, DeVinney R, Bladt F, Goosney D, Gelkop S, Gish GD, Pawson T & Finlay BB. Enteropathogenic *Escherichia coli* Tir binds Nck to initiate actin pedestal formation in host cells. *Nat Cell Biol* 3: 856-859, 2001.
34. Guzmán M. Deciphering Dengue: The Cuban experience. *Science* 309: 1.495-1.497, 2005.
35. Hoch RC, Schraufstatter IU & Cochrane CG. *In vivo, in vitro*, and molecular aspects of interleukin-8 and the interleukin-8 receptors. *J Lab Clin Med* 128: 134-145, 1996.

36. Huang L, Mittla B, Sanger JW & Sanger JM. Host focal adhesion protein domains that bind to the translocated intimin receptor (Tir) of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). *Cell Motil Cytoskeleton* 52: 255-265, 2002.
37. Jerse AE & Kaper JB. The *eae* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes a 94-kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid. *Infect Immun* 59: 4.302-4.309, 1991.
38. Jung HC, Eckmann L, Yang SK, Panja A, Fierer J, Morzycka-Wroblewska E & Kagnoff MF. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J Clin Invest* 95: 55-65, 1995.
39. Ide T, Laarmann S, Greuene L, Schillers H, Oberleithner H & Schmidt MA. Characterization of translocation pores inserted into plasma membranes by type III-secreted Esp proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* 3: 669-679, 2001.
40. Kalman D, Weiner OD, Goosney DL, Sedat JW, Finlay BB, Abo A & Bishop JM. Enteropathogenic *Escherichia coli* acts through WASP and Arp2/3 complexes to form actin pedestal. *Nat Cell Biol* 1: 389-391, 1999.
41. Kaper JB. Defining EPEC. *Rev Microbiol* 27: 130-133, 1996.
42. Kenny B, DeVinney R, Stein M, Reinscheid DJ, Frey EA & Finlay BB. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* 91: 511-520, 1997.
43. Knutton S, Shaw RK, Anantha RP, Donnenberg MS & Zorgani AA. The Type-IV bundle forming-pilus of enteropathogenic *Escherichia coli* undergoes dramatic alterations in structure associated with bacterial adherence, aggregation and dispersal. *Mol Microbiol* 33: 499-509, 1999.
44. Knutton S, Rosenshine I, Pallen MJ, Nisan I, Neves BC, Bain C, Wolff C, Dougan G & Frankel G. A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. *EMBO J* 17: 2.166-2.176, 1998.
45. Knutton S, Baldwin T, Williams PH & McNeish AS. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 57: 1.290-1.298, 1989.
46. Levine MM. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Dis* 155: 377-389, 1987.
47. Levine MM & Edelman R. Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. *Epidemiol Rev* 6: 31-5, 1984.
48. Lin K, Lee S, Narayanan R, Baraban JM, Hardwick JM & Ratan RR. Thiol agents and Bcl-2 identify an alphavirus-induced apoptotic pathway that requires activation of the transcription factor NF-kappa B. *J Cell Biol* 131: 1.149-1.161, 1995.
49. Lommel S, Benesch S, Rottner K, Franz T, Wehland J & Kuhn R. Actin pedestal formation by enteropathogenic *Escherichia coli* and intracellular motility of *Shigella flexneri* are abolished in N-WASP defective cells. *EMBO Reports* 2: 850-857, 2001 (verificar volume).
50. Loureiro I, Frankel G, Adu-Bobie J, Dougan G, Trabulsi LR & Carneiro-Sampaio MM. Human colostrum contains IgA antibodies reactive to enteropathogenic *Escherichia coli* virulence-associated proteins: intimin, BfpA, EspA, and EspB. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 27: 166-171, 1998.
51. McDaniel TK & Kaper JB. A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12. *Mol Microbiol* 23: 399-407, 1997.
52. McDaniel TK, Jarvis KG, Donnenberg MS & Kaper JB. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 1664-1668, 1995.
53. Mangia AH, Duarte AN, Duarte R, Silva LA, Bravo VL & Leal MC. Aetiology of acute diarrhea in hospitalized children in Rio de Janeiro city, Brazil. *J Trop Pediatr* 39: 365-367, 1993.
54. Manjarrez-Hernandez HA, Amess B, Sellers L, Baldwin TJ, Knutton S, Williams PH & Aitken A. Purification of a 20kDa phosphoprotein from epithelial cells and identification as a myosin light chain phosphorylation induced by enteropathogenic *Escherichia coli* and phorbol ester. *FEBS Lett* 292: 121-127, 1991.

55. Manning PA & Meyer TF. Type-4 pili: biogenesis, adhesins, protein export and DNA import. *Gene* 192: 1, 1997.
56. Melo AR, Lasunskaia EB, Almeida CMC, Schriefer A, Kipnis TL & Dias da Silva W. Expression of the virulence factor, BfpA, by enteropathogenic *Escherichia coli* is essential for apoptosis signaling but not for NF- κ B activation in host cells. *Scand J Immunol* 61: 511-510, 2005.
57. Nataro JP & Kaper JB. Diarrheogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 11: 142-201, 1998.
58. Neter E, Westphal O, Luderitz O & Needell MH. Demonstration of antibodies against enteropathogenic *Escherichia coli* in sera of children of various ages. *Paediatrics* 16: 801-805, 1955.
59. Nougayrède JP, Fernandes PJ & Donnenberg MS. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. Microreview. *Cell Microbiol* 5: 359-372, 2003.
60. Parkos CA, Delp C, Arnaout MA & Madara JL. Neutrophil migration across a cultured intestinal epithelium: dependence on a CD11b/CD18-mediated event and enhanced efficiency in the physiologic direction. *J Clin Invest* 88: 1.605-1.612, 1991.
61. Parissi-Crivelli A, Parissi-Crivelli J & Girón J. Recognition of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence determinants by human colostrum and serum antibodies. *J Clin Microbiol* 38: 2.696-2.700, 2000.
62. Pedroso MZ, Freymuller E, Trabulsi LR & Gomes TA. Attaching – effacing lesions and intracellular penetration in HeLa cells and human duodenal mucosa by two *Escherichia coli* strains not belonging to the classical enteropathogenic *E.coli* serogroups. *Infect Immun* 61: 1.152-1.156, 1993.
63. Phillips AD & Frankel G. Intimin-mediated tissue specificity in enteropathogenic *Escherichia coli* interaction with human intestinal organ cultures. *J Infect Dis* 181: 1.496-1.500, 2000.
64. Puente JL, Bieber D, Ramer SW, Murray W & Schoolnik GK. The bundle-forming pili of enteropathogenic *Escherichia coli*: transcriptional regulation by environmental signals. *Mol Microbiol* 20: 87-100, 1996.
65. Quintana-Flores VM, Campos Fernandes RCS, Sousa de Macedo Z & Medina-Acosta E. Expression and purification of the recombinant enteropathogenic *Escherichia coli* vaccine candidates BfpA and EspB. *Protein Expr Purif* 25: 16-22, 2002.
66. Régua-Mangia AH, Gomes TAT, Andrade JRC, Vieira MAM, Gonzalez AGM, Zahner V, Irino K & Teixeira LM. Genetic analysis of *Escherichia coli* strains carrying enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) markers, isolated from children in Rio de Janeiro city, Brazil. *Braz J Microbiol* 34(suppl.1): 38-41, 2003.
67. Rodrigues J, Saletsky ICA, Campos LC, Gomes TAT, Whittan ST & Trabulsi LR. Clonal structure and virulence factors in strains of *Escherichia coli* of the classic serogroup O55. *Infect Immun* 64: 2.680-2.686, 1996.
68. Rosa AC, Mariano AT, Pereira AM, Tibana A, Gomes TAT & Andrade JR. Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* isolated from infants with acute diarrhoea and healthy controls in Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Microbiol* 47: 781-790, 1998.
69. Rosenshine I, Knutton S & Frankel G. Interaction of enteropathogenic *Escherichia coli* with host cells. (Oelschlaeger and Hacker, Eds.) *Subcellular Biochemistry: Bacterial Invasion into Eukaryotic Cells*. Vol. 33. pp 21-45. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2000.
70. Rosenshine I, Ruschkowski S, Stein M, Reinscheid DJ, Mills SD & Finlay BB. A pathogenic bacterium triggers epithelial signals to form a functional bacterium receptor that mediates actin pseudopod formation. *EMBO J* 15: 2613-2624, 1996.
71. Rosette C & Karin M. Cytoskeletal control of gene expression: depolymerization of microtubules activates NF- κ B. *J. Cell Biol.* 128: 1.111-1.119, 1995.
72. Rottner K, Stradal TEB & Wehland J. Bacteria-host cell interactions at the plasma membrane: stories on actin cytoskeleton subversion. *Devolp Cell* 9: 3-17, 2005.
73. Sanches MI, Keller R, Hartland EL, Figueiredo DM, Batchelor M, Martinez MB, Dougan G, Careiro-Sampaio MM, Frankel G, Trabulsi LR. Human colostrum and serum contain antibodies reactive to the intimin-binding region of the enteropathogenic *Escherichia coli* translocated intimin receptor. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 30: 73-77, 2000.

74. Sanger JW. Novel form of actin-based motility transports bacteria on the surface of infected cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 34: 279-287, 1996.
75. Savkovic SD, Koutsouris A & Hecht G. Attachment of a noninvasive enteric pathogen, enteropathogenic *Escherichia coli*, to cultured human intestinal epithelial monolayers induces transmigration of neutrophils. *Infect Immun* 64: 4.480-4.487, 1996.
76. Savkovic SD, Koutsouris A & Hecht G. Activation of NF- κ B in intestinal epithelial cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Am J Physiol* 273: C1160-C1167, 1997.
77. Schriefer A, Maltz JR, Silva N, Stoeckle MY, Barral-Netto M & Riley LW. Expression of a pilin subunit BfpA of the bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli* in a oral A live Salmonella vaccine strain. *Vaccine* 17: 770-778, 1999.
78. Scotland SM, Smith HR, Cheasty T, Said B, Willshaw GA, Stokes N & Rowe B. Use of gene probes and adhesion tests to characterize *Escherichia coli* belonging to enteropathogenic serogroups isolated in the United Kingdom. *J Med Microbiol* 44: 438-443, 1996.
79. Senerwa D, Olsvik O, Mutanda LN, Lindqvist KJ, Gothuma JM, Fossum K & Wachsmuth K. Enteropathogenic *Escherichia coli* serotype 0111:HNT isolated from preterm neonates in Nairobi, Kenya. *J Clin Microbiol* 27: 1.307-1.311, 1989.
80. Shaw RK, Daniell S, Ebel F, Frankel G & Knutton S. EspA filament-mediated protein translocation into red blood cells. *Cell Microbiol* 3: 213-222, 2001.
81. Sohel I, Puente JL, Ramer SW, Bieber D, Wu C-Y & Schoolnik GK. Enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a gene cluster coding for bundle-forming pilus morphogenesis. *J Bacteriology* 178: 2.613-2.628, 1996.
82. Sperandio V, Kaper JB, Bortolini MR, Neves BC, Keller R & Trabulsi LR. Characterization of the locus of enterocyte effacement (LEE) in different enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) serotypes. *FEMS Microbiol Lett* 164: 133-139, 1998.
83. Stone KD, Zhang HZ, Carlson LK & Donnenberg MS. A cluster of fourteen genes from enteropathogenic *Escherichia coli* is sufficient for the biogenesis of a type IV pilus. *Mol Microbiol* 20: 325-337, 1996.
84. Strom MS & Lory S. Structure-function and biogenesis of the type IV pili. *Annu Rev Microbiol* 47: 565-596, 1993.
85. Thoren A. The role of enteropathogenic *Escherichia coli* in infantile diarrhea: aspects on bacteriology, epidemiology and therapy. *Scand J Infect Dis* 37(Suppl.):1-20, 1983.
86. Tobe T, Schollnik GK, Sohel I, Bustamante VH & Puente JL. Cloning and characterization of *bfpTVW*, genes required for the transcriptional activation of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 21: 963-975, 1996.
87. Trabulsi LR, Keller R & Gomes TAT. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 8: 508-513, 2002.
88. Wachter C, Beinke C, Mattes M & Schmidt MA. Insertion of EspD into epithelial target cell membranes by infecting enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 31: 1.695-1.707, 1999.
89. Warawa J & Kenny B. Phosphoserine modification of the enteropathogenic *Escherichia coli* Tir molecule is required to trigger conformational changes in Tir and efficient pedestal elongation. *Mol Microbiol* 42: 1.269-1.280, 2001.
90. Warawa J, Finlay BB & Kenny B. Type III secretion-dependent hemolytic activity of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 67: 5.538-5.548, 1999.
91. Wolff C, Nisan I, Hanski E, Frankel G & Rosenshine I. Protein translocation into epithelial cells by infecting enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 28: 143-155, 1998.
92. Zhang H-Z & Donnenberg MS. DsbA is required for stability of the type IV pilin of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 21: 787-797, 1996.
93. Zhang H-Z, Lory S & Donnenberg MS. A plasmid-encoded prepilin peptidase gene from enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 176: 6.885-6.891, 1994.