

VERÔNICA DE FRANCO RENNÓ

**UM MECANISMO: INVASÃO DE CÉLULAS EPITELIAIS POR
AMOSTRAS DE *Escherichia coli* ENTEROHEMORRÁGICAS
(EHEC) LEE-NEGATIVAS**

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

São Paulo

2008

VERÔNICA DE FRANCO RENNÓ

**UM MECANISMO: INVASÃO DE CÉLULAS EPITELIAS POR
AMOSTRAS DE *Escherichia coli* ENTEROHEMORRÁGICA
(EHEC) LEE-NEGATIVAS**

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

Área de Concentração: Microbiologia

**Orientador: Prof. Dr. Antonio Fernando
Pestana de Castro**

São Paulo

2008

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

© reprodução parcial

Renno, Verônica de Franco.

Um mecanismo: invasão de células epiteliais por amostras de *Escherichia coli* Enterohemorrágicas (EHEC) LEE-negativas / Verônica de Franco Renno. -- São Paulo, 2008.

Orientador: Antonio Fernando Pestana de Castro.

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

Versão do título para o inglês: A mechanism: invasion of epithelial cells by LEE-negative Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) strains.

Descritores: 1. *Escherichia coli* enterohemorrágica 2. LEE-negativa 3. Invasão 4. Citocalasina D 5. Adesão em células Caco-2 6. SHU I. Pestana de Castro, Antonio Fernando II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós Graduação em Microbiologia. III. Título.

ICB/SBIB059/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Verônica de Franco Renno.

Título da Tese: Um mecanismo: invasão de células epiteliais por amostras de *Escherichia coli* Enterohemorrágicas (EHEC) LEE-negativas.

Orientador(a): Antonio Fernando Pestana de Castro.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 122, referente ao projeto intitulado "*Um mecanismo: Invasão de células epiteliais por amostras de Escherichia coli Enterohemorrágica (EHEC) LEE-negativas*" sob a responsabilidade de Verônica De Franco Rennó, foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEPESH - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 16 de novembro de 2005.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Vice Coordenador em Exercício
CEEA - ICB/USP

Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da CEPESH - ICB/USP

DEDICATÓRIA

**Aos meus pais, minha Avó Márcia, meus irmãos
e familiares pelo constante incentivo, e apoio
incondicional para a minha formação.**

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar saúde, força e condição de levar este trabalho até o fim. E especialmente por Sua presença em todos os momentos da minha vida.

Ao orientador, Prof. Pestana, guia científico.

Ao Laboratório de Microbiologia Médica e Veterinária que me recebeu de braços abertos desde o primeiro dia de estágio (Luciana, Ylanna, Claudia, Eliana, Lika e Rodrigo).

Às amigas Ylanna, Luciana e Claudia, obrigada pela convivência, papos, risadas, pelo grande apoio e ajuda no sentido científico e pessoal.

Aos meus incríveis amigos de São Paulo e de Santa Rita, que juntamente com meus familiares não me deixaram desistir nas horas difíceis e tornam-se hoje parte de mais uma importante etapa de minha vida.

Ao Prof. João Ramos Costa Andrade da UERJ, pelo constante apoio, pela co-orientação e ajuda em minha formação científica.

Ao Prof. Mário Júlio Ávila Campos e Alice, pela compreensão.

E por fim, minha sincera gratidão aos queridos Tia Janete, Tio Márcio, Tia Carmem Sylvia, Tio Galeno, e suas respectivas famílias que me acolheram em São Paulo como se fossem meus verdadeiros pais.

RESUMO

RENNO, V.F. **Um mecanismo: Invasão de células epiteliais por amostras de *Escherichia coli* Enterohemorrágica (EHEC) LEE-negativas.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2008.

As *Escherichia coli* enterohemorrágicas (EHEC) são importantes patógenos humanos por causarem doenças que vão desde diarreia até Síndrome Hemolítico-Urêmica (SHU). Dentre as EHEC associadas à SHU, a maioria possui o LEE (Locus of Enterocyte Effacement), uma Ilha de Patogenicidade (PAI) na qual se encontram genes capazes de induzir lesões “Attaching and Effacing (A/E)” na mucosa intestinal. Embora o LEE seja importante para a colonização do hospedeiro, sorotipos de EHEC que não possuem LEE são frequentemente isolados de pacientes com doença severa. Muitos genes têm sido descritos como auxiliares na adesão deste patógeno às células do hospedeiro. Além disso, alguns sorotipos de EHEC LEE - negativas têm sido encontrados intracelularmente. Desta maneira, a habilidade de invasão em amostras relacionadas com SHU tem sido estudada, bem como a determinação do perfil genético “extra-LEE” capaz de favorecer e proporcionar a determinadas amostras o fenótipo invasor. Neste estudo foram pesquisados fatores de virulência de amostras LEE-negativas descritas como causadoras de SHU em humanos, bem como o padrão de adesão e o perfil de invasão em células epiteliais HEp-2 e Caco-2. Das nove amostras isoladas de ovinos e bovinos, quatro (44,5%) apresentaram o perfil *stx*₂⁺. Todas foram *lpfA*⁺ e *iha*⁺, genes que codificam para “long polar fimbriae” e “adherence-conferring protein”. Somente três amostras (33,3%) foram *saa*⁺ e cinco foram *Ehly*⁺ que codificam “autoagglutinating adhesin” e “Enterohemolisina”. Já para o gene *toxB* todas as amostras foram negativas. Em relação à adesão, observamos que a maioria das amostras apresentou um padrão de adesão difusa em células HEp-2, e em Caco-2 apresentaram aderência positiva com vários graus de intensidade. Avaliando a invasão, observamos que as células HEp-2 não foram permissivas à internalização das bactérias testadas. Ao contrário, em células Caco-2, a maioria das amostras testadas apresentou um perfil invasor maior que 3,3%. Frente ao inibidor de polimerização de actina Citocalasina D, houve uma significativa redução nos níveis de invasão, sugerindo que estas amostras utilizam um mecanismo da célula hospedeira para internalização, e que, provavelmente, a contribuição de fatores de virulência, como adesinas, favorece a adesão das mesmas, compensando a ausência de LEE. Desta maneira, julgamos importante investigar a adesão, bem como a analisar possíveis mecanismos que favoreçam a internalização de amostras LEE-negativas.

Palavras-chave: *Escherichia coli* Enterohemorrágica, LEE-negativa, Invasão Caco-2, Adesinas

ABSTRACT

RENNO, V.F. **A mechanism: Invasion of epithelial cells by LEE- negative Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) strains.** Master (Microbiology) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2008

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) are important human pathogens that can cause diseases such as diarrhea and Hemolytic Uremic Syndrome (SHU). The most EHEC associated with SHU possess LEE (Locus of Enterocyte Effacement) a Pathogenic Island (PAI) that encodes genes able to induce Attaching and Effacing lesions (A/E) on intestinal mucosa. Although LEE is important for host colonization, some EHEC serotypes that lack LEE are frequently isolated from patients with severe disease, including SHU. Many genes have been described to contribute to adhesion of this pathogen on host cells. Moreover, some serotypes of LEE-negative EHEC have been found located intracellular. Then, the ability of invasion by strains related with SHU has been studied, such as the determination of “extra-LEE” genetic profile capable to favor and promote to some strains the invasion.

The aim of this study was to investigate putative virulence factors of LEE-negative strains related to the occurrence of SHU in humans and compare adherence and invasion patterns in epithelial HEp-2 and Caco-2 cells. Nine strains isolated from ovine and bovine, four (44.5%) were stx₂. All were positive for *lpfA* and *iha* genes. Only three (33.3%) harbor the *saa* gene and five were *Ehly* positive. All strains were negative for *toxB* gene. It was observed that the most strains showed a diffuse adhesion pattern to HEp-2 cells and in Caco-2 positive adherence with various degrees of intensity. It was also observed that none of the studied bacteria isolates internalize in HEp-2. Conversely, most tested strains showed an invasion profile displaying more than 3.3% in Caco-2. There was a significant reduction of invasion in the presence of the actin polymerization inhibitor Cytochalasin D, suggesting that strains use a host cell mechanism for internalization and probably the contribution of virulence factors like adhesins, favors their adhesion, compensating LEE absence, and the infection installation. Overall, it is important to investigate the role of adjuvant in intestinal colonization, and the mechanisms that strains may employ to invade the intestinal mucosa promoting the infection installation.

Key Words: Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, LEE-negative, Caco-2 Invasion, Adhesins

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-Amostras analisadas no presente estudo	24
Tabela 2-Iniciadores, temperaturas de anelamento e tamanho dos amplicons obtidos na técnica de PCR	27
Tabela 3-Perfil genético das amostras LEE-negativas obtido através de PCR	32
Tabela 4-Resultados e análise da aderência de amostras às células CaCO-2	36
Tabela 5-Invasão de sorotipos de EHEC LEE-negativas às células HEp-2 e CaCO-2	41
Tabela 6-Porcentagem de invasão em células CaCO-2	42

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

