

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU**

**PROPRIEDADES DE ADESÃO E INVASÃO DE CEPAS DE *Escherichia coli*
ISOLADAS DE PACIENTES COM DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL.**

Ana Carolina da Silva Santos

Orientador: Josias Rodrigues

Monografia apresentada ao Instituto de
Biotecnologia, Campus de Botucatu, para
obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biomédicas.

BOTUCATU – SP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Santos, Ana Carolina da Silva

Propriedades de adesão e invasão de cepas de *Escherichia coli*
isoladas de pacientes com doença inflamatória intestinal / Ana Carolina
da Silva Santos. – Botucatu : [s.n.], 2011

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Josias Rodrigues

Capes: 21202010

1. *Escherichia coli*. 2. Intestinos – Doenças inflamatórias.

Palavras-chave: Doença inflamatória intestinal; *Escherichia coli*;
Patogenicidade.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, por todo amor, dedicação e apoio ao longo dos anos.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Josias, pela confiança e pela oportunidade de me deixar participar deste estudo, por todo o aprendizado e pela maravilhosa contribuição ao meu amor pela Microbiologia.

Aos meus pais, por estarem sempre do meu lado, me apoiando e me dando forças.

Às minhas irmãs, Gabi e Luisa pelo companheirismo, amor e apoio sempre.

À minha família, tios, tias, primos, primas, avós, avôs, por toda torcida, apoio e amor.

Às minhas incríveis e grandes amigas, Mandy, Gi, Carol, por todos os momentos de risada e descontração que ajudava a esquecer a correria do dia a dia no laboratório.

Aos meus colegas da XLIV, pelos quatro anos de luta, festas e amizade.

Aos meus companheiros de laboratório, em especial à Rie, e à Caroline, por toda ajuda, paciência e amizade ao longo do ano.

A todos vocês, meu muito obrigada!

RESUMO

A Doença Inflamatória Intestinal (DII) engloba um grupo de processos inflamatórios crônicos de causas não conhecidas. Duas formas clínicas da DII são reconhecidas atualmente: a Retocolite Ulcerativa (RU) e a Doença de Crohn (DC). Foram isoladas de 348 amostras, dos quais 17 foram diagnosticados com DC, e 40 com RU. Os 41 restantes apresentavam outras patologias e compreenderam o grupo controle. Entre as amostras que apresentaram adesão positiva, 110 delas apresentaram padrão de Adesão Agregativa (AA) e 19 apresentaram padrão de Adesão Difusa (AD). A cepa, DII/013, apresentou o padrão de adesão agregativo e invisibilidade média 18 vezes superior à cepa da EIEC. Quando observada ao microscópio eletrônico, bactérias intracelulares foram detectadas na amostra. Assim, a maioria das amostras apresentaram padrão de adesão agregativo, indicando juntamente com estudos anteriores, que esse padrão teria uma possível relação com a patogenicidade da bactéria em relação a DII.

Palavras-chave: *Escherichia coli*, Doença inflamatória intestinal, Patogenicidade.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 - Padrão de adesão agregativo encontrado nos testes de adesão realizados.	20
Figura 02 - Fotomicrografia eletrônica de uma célula HEp-2, onde se observa intracelularmente a amostra DII/013 (isolada de um caso de RU).	20

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Número de amostras de acordo com a origem do material clínico utilizado para obtenção das amostras de E. coli.	16
Tabela 02 - Número de amostras para cada padrão de adesão de E. coli isoladas de pacientes com DII.	19

LISTA DE ABREVIACOES

AA: Adesão Agregativa

AD: Adesão Difusa

AIEC: “*adherent-invasive*” *Escherichia coli*

CO: Grupo de pacientes controle

DC: Doença de Chron

DII: Doença Inflamatória Intestinal

EAEC: *Escherichia coli enteroagregativa*

E. coli: *Escherichia coli*

EIEC: *Escherichia coli enteroinvasora*

MIC: Concentrao Inibitória Mínima

NA: Não Aderidas

RU: Retocolite Ulcerativa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. OBJETIVO.....	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3.1 Indivíduos.....	14
3.2 Cultivo e manutenção das células HEP-2.....	14
3.3 Teste de adesão.....	14
3.4 Teste de invasão.....	15
3.5 Antibiograma.....	15
3.6 Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	16
3.7 Análise Estatística.....	16
4. RESULTADOS.....	18
4.1 Teste de adesão.....	18
4.2 Teste de invasão.....	18
5. DISCUSSÃO.....	22
6. CONCLUSÃO.....	26
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

1. INTRODUÇÃO

A Doença Inflamatória Intestinal (DII) é uma denominação genérica que engloba um grupo de processos inflamatórios crônicos de causas não conhecidas. Duas formas clínicas da DII são reconhecidas atualmente: a Retocolite Ulcerativa (RU) e a Doença de Crohn (DC) (HENDRICKSON; GOKHALE; CHO, 2002.).

No Brasil, as informações sobre a prevalência da DII, suas possíveis relações com fatores etiológicos, ambientais são limitados (DICHI, et. al., 1998.). Porém um estudo recente, realizado na região centro-oeste do estado de São Paulo, observou uma maior prevalência da DII em indivíduos jovens, brancos, residentes na zona urbana. Foi verificado também uma incidência maior da RU do que a DC (VICTORIA, 2009.).

Na Retolite Ulcerativa a resposta inflamatória é restringida ao cólon, sendo o reto é afetado em 95% dos pacientes. A inflamação acomete principalmente a mucosa, com envolvimento contínuo e gravidade variável. A principal manifestação clínica é a presença de sangue e muco nas fezes, sendo esse um alerta que pode levar ao rápido diagnóstico da doença. (HENDRICKSON; GOKHALE; CHO, 2002.)

Já na Doença de Crohn, a resposta inflamatória pode atingir qualquer parte do trato gastrointestinal, e a lesão pode ser transmural, muitas vezes estendendo-se até a serosa, levando à formação de fístulas. A região mais afetada é a ileocecal. Sua apresentação é muito sutil, o que dificulta seu diagnóstico. Os sintomas são variáveis, e dependem da localização, extensão e gravidade da lesão (HENDRICKSON; GOKHALE; CHO, 2002.).

A DII é comumente diagnosticada em paciente entre a terceira e quarta década de vida, igualmente entre homens e mulheres, porém indivíduos de qualquer faixa etária podem ser afetados (HENDRICKSON; GOKHALE; CHO, 2002.). Embora tenha etiologia ainda pouco conhecida, estudos mostram que ela não possui uma única causa (HENDRICKSON; GOKHALE; CHO, 2002., ANDU; GROSS, 2000., FIOCCHI, 2005.). Vários fatores genéticos e ambientais podem contribuir para um aumento à susceptibilidade à DII. Fatores ambientais como o tabagismo e a dieta tem mostrado possível relação com a DII, porém nenhum deles como causa única da doença (ANDU; GROSS, 2000., FIOCCHI, 1998.).

Estudos com modelos animais demonstram uma possível associação da microbiota intestinal com o desencadeamento e/ou manutenção da DII. Evidências como o não desenvolvimento da doença em ambientes *germ-free*, e um aumento nos níveis de anticorpos da mucosa contra bactérias intestinais fundamentam essa hipótese. Além disso, a resposta clínica efetiva ao uso de antibióticos e a regressão das lesões em pacientes submetidos ao desvio fecal ressaltam o envolvimento efetivo da flora intestinal na DII (HENDRICKSON; GOKHALE; CHO, 2002., BARNICH; DARFEUILLE-MICHAUD, 2007.).

Por ser um dos principais membros da microbiota intestinal, a *Escherichia coli* tem sido foco constante de estudos sobre uma possível associação com a DII. Estudos mostram que o número dessas bactérias é aumentado em pacientes com a doença, assim como foi observado um aumento na quantidade de anticorpos contra *E. coli* e antígenos da bactéria (HENDRICKSON; GOKHALE; CHO, 2002., RHODES, 2007., KOTLOWSKI, et al., 2007., SEKSIK, 2003.). Além disso, o sítio de lesões de DII coincide com a localização da microbiota intestinal. (GIONCHETTI; RIZZELLO; CAMPIERI, 2001.)

O que é ainda desconhecido pela população científica é o potencial de patogenicidade das *E. coli* em pacientes com DII. Acredita-se que a microbiota influencia por gerar uma exposição exagerada aos produtos normais de bactérias residentes na flora luminal, por causa do aumento da permeabilidade intestinal ou alteração da composição do muco (HENDRICKSON; GOKHALE; CHO, 2002., CAMPIERI; GIONCHETTI, 2001.). Essa hipótese é baseada no fato de alguns estudos mostrarem que não há diferença na prevalência entre os portadores da DII e controles de linhagens portadoras de fatores de patogenicidade (SEKSIK, 2003., GIAFFER; HOLDSWORTH; DUERDEN, 1992.).

Pacientes com DII podem apresentar lesões na camada muco-epitelial, permitindo assim uma associação íntima da mucosa com a microbiota intestinal. Essa proximidade das bactérias com o epitélio pode ser um fator importante no desencadeamento da inflamação e alteração da permeabilidade intestinal típica da DII (HENDRICKSON; GOKHALE; CHO, 2002.).

A capacidade de adesão a modelos celulares é uma característica compartilhada por linhagens patogênicas e comensais. Entretanto, elas podem ser

distinguidas entre pelo fenótipo de adesão que elas apresentam: Adesão agregativa, Adesão Difusa ou Adesão Localizada (NATARO; KAPER, 1998.). Ensaio sobre a adesão e invasão bacteriana são importantes, pois através dos fenótipos de adesão encontrados, e dos resultados sobre invasão, podemos classificar o tipo de bactéria encontrada, uma vez que sabe-se que alguns fatores de virulência estão relacionados com a capacidade de adesão e invasão celular, e através disso compreender o mecanismo de patogenicidade das bactérias na DII.

Embora não tenha sido encontrado fatores de virulência típicos de amostras patogênicas de *E.coli* em lesões de pacientes com DII (DARFEUILLE-MICHAUD, et al., 1998.), foi observado que algumas amostras apresentaram grande capacidade de aderência e invasão celular (BOUDEAU, et al., 1999.), levando a crer que o potencial de adesão e/ou invasão celular da *E.coli* pode contribuir para a patogênese da DII (BARNICH; DARFEUILLE-MICHAUD, 2007.) através de mecanismos ainda não conhecidos.

2. OBJETIVO

Avaliar a capacidade de adesão e invasão de amostras de *E. coli* da microbiota intestinal de pacientes com DII e pacientes não portadores da DII através de teste de adesão e teste de invasão à células HEp-2.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Indivíduos

Consistiram de 348 amostras, provenientes de 91 adultos atendidos na Unidade de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da UNESP de Botucatu, para colonoscopia de rotina. Cinquenta e sete pacientes foram diagnosticados com DII em diferentes estágios de atividade (moderada ou intensa, segundo avaliação clínica), dos quais 17 foram diagnosticados com DC, e 40 com RU. Os 41 restantes apresentavam outras patologias como, por exemplo, câncer colorretal e compreenderam o grupo controle.

Das amostras, 128 eram do grupo controle, 68 eram de pacientes com DC, e 152 eram com RU. A Tabela 01 mostra a origem do material clínico utilizado para obtenção das amostras.

3.2 Cultivo e manutenção das células HEp-2

Para obtenção de monocamada celular, células HEp-2 foram cultivadas em garrafas de poliestireno de área de 25 cm², em meio essencial mínimo de Eagle (MEM), adicionado com 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂, submetidas a repiques sucessivos realizados periodicamente.

3.3 Teste de adesão

Após tripsização, as células tiveram volumes ajustados para 10⁵ células/ml e volumes entre 0,7 e 1,0 ml de suspensão foram transferidos para pocinhos de microplacas contendo lamínulas esféricas e incubadas por aproximadamente 24 horas. Após esse período o meio de cultura foi desprezado dos pocinhos e as células foram lavadas de 3 a 4 vezes com *phosphate buffered saline* (PBS). Volumes entre 0,7 e 1,0 ml de meio de Eagle (MEM/SFB) com 1% de D-manose foram acrescentados e em seguida, 20 µl de cultura bacteriana, de crescimento de 18 horas em meio BHI, foram inoculados em cada pocinho. As preparações foram incubadas por 3 horas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após esse período, o meio de cultura foi desprezado e a monocamada celular foi lavada de 4 a 5 vezes com PBS e fixadas com metanol por um período mínimo de 30

minutos. Em seguida a preparação foi corada por 10 minutos com May-Grünwald e 15 minutos com Giemsa. Os pocinhos foram lavados em água corrente e as lamínulas foram retiradas. Depois de secas as lamínulas foram montadas em laminas e observadas ao microscópio. Foram consideradas aderentes aquelas amostras em que num campo de observação de 200 células HEp-2 apresentavam pelo menos uma célula bacteriana.

3.4 Teste de invasão

Para o teste de invasão, foi preparada suspensão em meio de Eagle sem antibiótico, e 1 ml de suspensão, contendo 4×10^5 células, foi transferido para pocinhos de placas de cultura. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂ por 20 horas. Decorrido esse tempo, o meio de cultura foi desprezado e as monocamadas celulares foram lavadas 3 vezes com PBS. Em seguida as amostras bacterianas foram acrescentadas, numa proporção de 100 bactérias para cada célula HEp-2. As preparações foram incubadas por 3h em estufa a 37 °C com 5% de CO₂. Posteriormente, a monocamada celular foi lavada 4 vezes com PBS e em seguida, foram acrescentados 1 ml de meio de Eagle, contendo 100 µg/ml de gentamicina e as preparações foram incubadas novamente em estufa a 37°C com 5% de CO₂. As monocamadas foram novamente lavadas por 4 vezes com PBS e as células lisadas, com solução de 1 ml de Triton-X 100 (Sigma) a 1% em água destilada estéril. Os lisados foram plaqueados em ágar nutriente para se quantificar as bactérias intracelulares (que sobreviveram ao tratamento com gentamicina). A invasibilidade foi expressa em termos de porcentagem de bactérias do inóculo inicial que estiveram presentes nos lisados.

3.5 Antibiograma

Uma concentração de bactérias foi semeada em placa de meio sólido, e em seguida, discos de papeis impregnados com antibióticos são colocados sobre a placa. O antibiótico se difunde no meio de cultura criando um gradiente de concentração da droga ao redor dos discos. O microorganismo inoculado na superfície deste meio de cultura e que não é inibido pela concentração da droga, continua a crescer, tornando-se visível. Nas áreas onde a concentração do antimicrobiano é inibitória, não ocorre crescimento de microorganismo, formando-se então uma zona de

inibição ao redor dos discos. O diâmetro da zona de inibição é inversamente proporcional à concentração inibitória mínima (CIM).

3.6 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para uma determinação mais precisa do CIM em relação à gentamicina, foi feita uma diluição seriada do antibiótico em meio líquido BHI em todos de ensaio. Após a diluição, foi inoculado uma concentração padronizada de bactéria a ser testada em cada tubo. Após a incubação por uma noite, foi observado em qual tubo houve a menor concentração de antibiótico, capaz de inibir o crescimento da bactéria. Esta concentração foi referida como CIM.

3.7 Análise Estatística

Foi utilizado teste de χ^2 para determinar a diferença entre os grupos. O limite para significância em todos os resultados foi de $P < 0,05$.

	ILEO	CECO	COLON ASCENDENTE	COLON DESCENDENTE	COLON SIGMOIDE	RETO	FEZES
DC	9	7	6	5	18	19	4
RU	14	11	17	21	7	72	10
CO	18	18	12	3	29	42	6

Tabela 01. Número de amostras de acordo com a origem do material clínico utilizado para obtenção das amostras de E. coli.

4. RESULTADOS

4.1 Teste de adesão

Em um total de 348 amostras analisadas, 129 delas foram capazes de aderir à células HEp-2. Foram observados dois padrões distintos de fenótipos de adesão: Adesão Difusa, onde as bactérias ficam distribuídas pela monocamada celular, e não há bactérias no espaço intercelular; e Adesão Agregativa, onde as bactérias ficam aderidas na monocamada celular e no espaço intercelular, formando agregados que lembram um favo de mel (*honey-comb*) (Figura 01). Entre as amostras que apresentaram adesão positiva, 110 delas apresentaram padrão de Adesão Agregativa (AA) e 19 apresentaram padrão de Adesão Difusa (AD). A maior prevalência de amostras com adesão do tipo agregativa foi observada em pacientes com Retocolite Ulcerativa (RU), onde 40,8% das amostras apresentaram os padrões de AA, e a análise estatística mostrou que esse valor é significativo, segundo teste de χ^2 . Nos pacientes com Doença de Chron, a prevalência de bactérias com adesão positiva foi menor que as de pacientes com RU, mas maior que os pacientes controle. Encontramos 33,8% de amostras que apresentaram padrão AA nos pacientes com DC contra 19,5% de amostras com o mesmo padrão nos pacientes controle, o que segundo teste de χ^2 representa uma diferença não significativa. Quanto ao padrão de AD, a maior prevalência foi encontrada em pacientes controle, onde 8,6% este padrão, contra 4,0% em pacientes com RU e 3,0% em pacientes com DC, sendo que nenhuma das diferenças foi considerada significativa segundo análise estatística. (Tabela 02)

4.2 Teste de invasão

Foi realizado teste com 38 amostras de biópsias de reto, e 19 amostras vindas de biópsias do íleo. Os resultados de invasão foram comparados com controle positivo e nenhuma amostra se mostrou invasora. Em testes com amostras de pacientes com RU, uma cepa, DII/013, apresentou o padrão de adesão agregativo e, em ensaios de invasão com pelo menos 10 repetições em ocasiões diferentes, apresentou invisibilidade média 18 vezes superior à cepa da EIEC. Todavia, quando submetida à determinação da MIC frente à gentamicina, a amostra

mostrou-se resistente à droga até mesmo em concentrações inferiores às usadas no teste. No entanto, quando algumas preparações foram observadas ao microscópio eletrônico, bactérias intracelulares foram detectadas (Figura 02), o que sugere que a amostra apresenta algum nível de invasibilidade.

	AA	AD	NA	TOTAL
RU	62	6	84	152
	(40,8)	(4,0)	(55,2)	
DC	23	2	43	68
	(33,8)	(3,0)	(63,2)	
CO	25	11	92	128
	(19,5)	(8,6)	(71,9)	
TOTAL	110	19	219	348
	(31,6)	(5,5)	(62,9)	

Tabela 02. Número de amostras para cada padrão de adesão de E. coli isoladas de pacientes com DII, entre parênteses, está a percentagem correspondente de acordo os grupos de estudo.

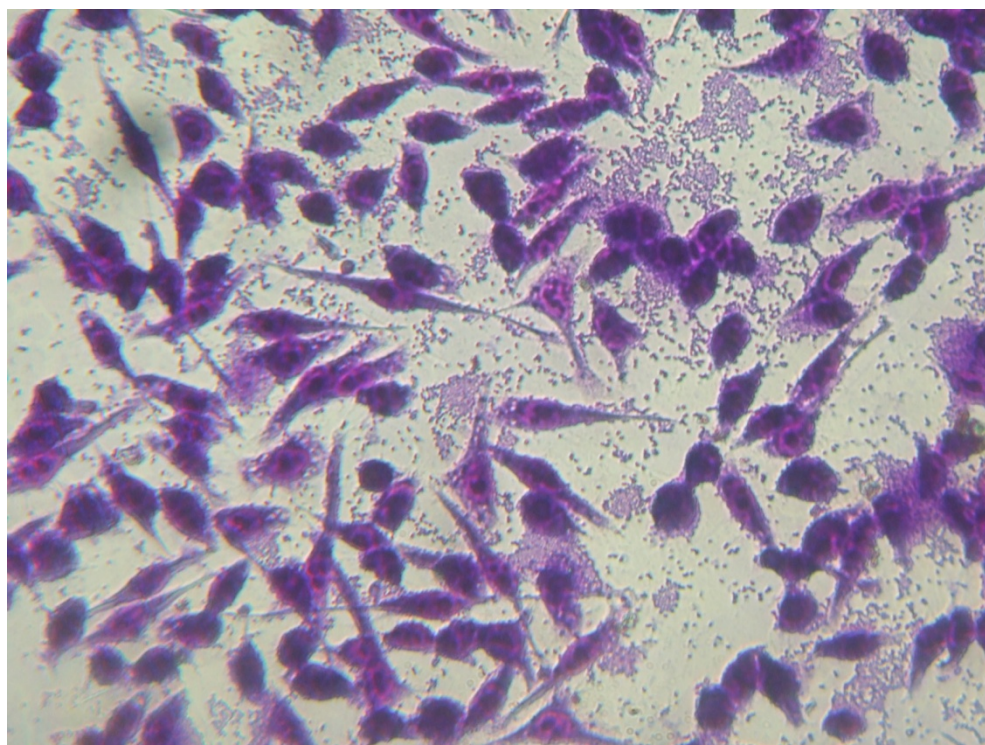
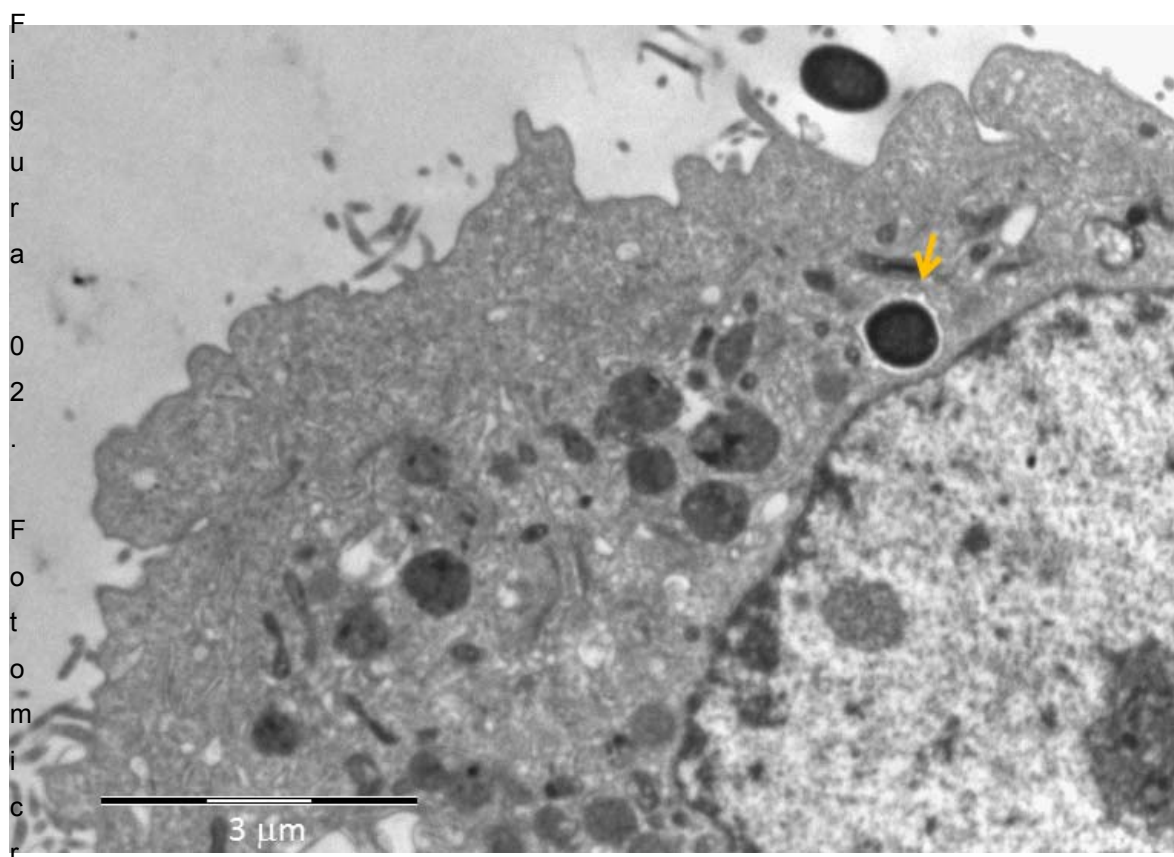


Figura 01. Padrão de adesão agregativo encontrado nos testes de adesão realizados.



ografia eletrônica de uma célula HEP-2, onde se observa intracelularmente (seta) a amostra DII/013 (isolada de um caso de RU).

5. DISCUSSÃO

A DII é uma doença infecciosa típica, onde múltiplos fatores estão envolvidos com a sua causa e seu desenvolvimento. Estudos mostram cada vez mais que a microbiota intestinal tem um papel importante no desenvolvimento da doença (HENDRICKSON; GOKHALE; CHO, 2002.). Pela facilidade de cultivo e por ser um microorganismo comum à flora intestinal, a *E. coli* tem sido freqüente objeto de estudo sobre seu envolvimento com a DII. Estudos comprovam que seu número é aumentado em portadores da doença (KOTLOWSKI, et al., 2007.). Pesquisadores procuram entender o papel dessas bactérias excedentes no desenvolvimento da doença. Ainda não é certo se essas bactérias são parte da microbiota normal do intestino, causando apenas uma resposta exagerada do sistema imunológico, ou se essa poluição de *E. coli* incluiria cepas dotadas de fatores de patogenicidade. (SAMEGIMA, 2008.)

Apesar de o potencial de patogenicidade da *E. coli* na DII ainda não ser totalmente conhecido, as propriedades de adesão e invasão a células epiteliais, em experimentos realizados *in vitro*, tem sido comumente estudadas. Resultados sobre adesão e invasão a células epiteliais tem sido conflitantes entre vários pesquisadores. Porém observou-se que é importante levar em conta fatores como a linhagem de células utilizadas (MARTIN, et al., 2004.) e o tempo de incubação dessas bactérias com as células hospedeiras (SASAKI, et al., 2007.).

Estudos mostram que testes com células HEP-2, originárias de carcinoma de laringe, em testes de 6 horas, não mostram diferenças na prevalência de adesão entre os portadores da DII e o grupo controle (SCHULTSZ, et al., 1997.). Porém, quando o tempo de incubação em testes é diminuído para 3 horas, observa-se um predomínio de linhagens aderentes em pacientes com DII (SAMEGIMA, 2008.). Foi observado também que as amostras que apresentaram adesão positiva em testes de 6 horas são geneticamente distintas das que apresentaram adesão positiva em testes de três horas, mostrando a importância de se empregar testes de 3 horas

para analisar a adesão de amostras *E. coli* isoladas em pacientes com DII (SAMEGIMA, 2008.).

Em nosso estudo, foi observado que a porcentagem total de bactérias aderentes no grupo controle (21,3%) foi menor que a encontrada em pacientes com DII (31%). Ao analisar os resultados diferenciando os padrões de adesão e os grupos de pacientes, observamos uma maior prevalência de amostras com padrão de adesão agregativo em pacientes com RU (24,4%) do que em pacientes com DC (16,3%) e controle (16,9%).

A capacidade de adesão a modelos celulares é uma característica compartilhada por linhagens patogênicas e comensais. Entretanto, elas podem ser distinguidas entre pelo fenótipo de adesão que elas apresentam: Adesão agregativa, Adesão Difusa ou Adesão Localizada (NATARO; KAPER, 1998.). O fenótipo agregativo é encontrado em uma das categorias da *E. coli* mais estudadas atualmente, a *E. coli enteroagregativa* (EAEC). Uma vez que a maioria das amostras com adesão positiva testada em nosso estudo apresentou fenótipo de Adesão Agregativa, é sugestivo que a EAEC possa ter envolvimento com a DII.

Quanto a invasibilidade, apenas uma amostra de paciente de RU apresentou invasão significativa e, embora esta amostra apresente resistência à gentamicina, a presença de bactérias intracelulares observada ao microscópio eletrônico enfatiza o potencial de invasão desta cepa. A invasão negativa encontrada nas amostras do reto é coerente com estudos que mostram que bactérias invasoras tem sido encontradas em pacientes com DC, onde o íleo é o principal local acometido (SASAKI, et al., 2007., DARFEUILLE-MICHAUD, 2002.). Além disso, a diferença desses resultados com nosso estudo em amostras de biópsias de íleo pode ser justificada pelo tipo de células empregadas, pois nesses trabalhos, foram utilizadas linhagens de células intestinais, enquanto em nosso estudo utilizamos células HEP-2, derivadas de carcinoma de laringe.

Dados da literatura indicam que as cepas de *E. coli* isoladas em pacientes com RU apresentam virulência distintas daquelas isoladas em pacientes com DC. Isso justificaria as particularidades clínicas de cada doença. Acredita-se que a *E. coli* na DC participe como uma categoria invasora, o que condiz com a manifestação clínica da doença através da formação de abscessos e fístula (RHODES, 2007.).

Apesar de não ser conhecido o papel da *E. coli* na RU, acredita-se que sua participação se de por um mecanismo distinto, não relacionado a invasão. Estudos anteriores mostraram marcadores típicos da EAEC foram encontrados em pacientes com RU, e ausentes em pacientes com DC, enfatizando uma possível relação da EAEC com a RU (SAMEGIMA, 2008.).

É comum patótipos clássicos de *E. coli* *diarreioogênicas* apresentarem adesão positiva em testes in vitro com células eucarióticas (NATARO; DENG; WALKER, 1994.). Apesar das linhagens de *E. coli* isoladas em pacientes com DII apresentarem as mesmas propriedades invasoras, elas não apresentaram os genes de adesinas e outros fatores de virulência correspondente (KOTLOWSKI, et al., 2007., BARNICH; DARFEUILLE-MICHAUD, 2007.), sugerindo que a interação celular possivelmente acontece por mecanismos distintos destes patótipos. Estudos mostram que pacientes com DC apresentam maior prevalência de linhagens com capacidade de invadir células caco-2 (SCHUBERT, et al, 1998.) e em uma dessas linhagens não se encontrou fatores de virulência clássicos e mecanismos de invasão distintos da *E. coli* *enteroinvasora* (EIEC). Isso levou ao reconhecimento de uma nova categoria patogênica, a “*adherent-invasive*” *E. coli* (AIEC).

A AIEC tem sido encontrada comumente na mucosa de pacientes com DC (NATARO; KAPER, 1998.), enquanto em pacientes com RU elas foram ausentes, sugerindo assim uma interação da causa da DC com a AIEC. Acredita-se que a *E. coli* na DC seja capaz de invadir e se replicar no interior de células epiteliais e macrófagos, induzindo a produção de TNF- α , estimulando assim a produção de IL-8 pelos enterócitos e recrutando leucócitos polimorfonucleares para a região basal e superfície da mucosa (DARFEUILLE-MICHAUD, 2004.), dando início ao processo inflamatório.

Além dos fatores expostos, acredita-se que a proliferação de *E. coli* na mucosa é favorecida pela abundância de muco, presente na DII pela alteração da fisiologia intestinal (NAZLI; et al., 2004.). Sendo assim as linhagens patogênicas estariam presentes no muco e não no lúmen intestinal (RHODES, 2007.).

Embora sejam escassas as informações disponíveis na literatura sobre a patogenia da *E. coli* na DII, seu envolvimento no desenvolvimento da doença fica cada vez mais evidente. Além de ensaios quantitativos, estudos tem priorizado

também a pesquisa de características típicas de linhagens já conhecidas, sendo a capacidade de adesão e invasão as mais investigadas. A capacidade de adesão a células eucarióticas é uma característica comumente encontrada nessas bactérias, embora não tenha sido encontrado nenhum marcador de virulência dos patótipos clássicos nestas bactérias. Nosso estudo enfatiza a necessidade de realizar testes de adesão com tempo de incubação de 3 horas, para melhor distinguir cepas com um mesmo fenótipo de adesão, mas aparentemente dotada de potenciais de virulência distintos.

Por fim, considerando os padrões de adesão agregativa encontrada em pacientes de RU sugerem que esta variante clínica da DII tenha associação com a EAEC. Considerando a alteração de produção de muco e aumento da permeabilidade da mucosa como características patológicas típicas da DII, estas cepas de EAEC poderiam se tratar de cepas comensais, onde a alteração nas condições locais facilitou a migração para a região da submucosa. Sendo assim, a DC estaria envolvida com outra categoria de E. coli, a AIEC, justificando com isso as diferentes apresentações clínicas da DII.

6. CONCLUSÃO

A maioria das amostras apresentaram padrão de adesão agregativo, indicando portanto, que esse padrão teria uma possível relação com a patogenicidade da bactéria em relação a DII.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDUS, T.; GROSS, V. Etiology and pathophysiology of inflammatory bowel disease - Environmental factors. **Hepato-Gastroenterol.**, v. 47, p. 29-43, 2000.

BARNICH, N.; DARFEUILLE-MICHAUD, A. Role of bacteria in the etiopathogenesis of inflammatory bowel disease. **World J. Gastroenterol.**, v.13, p. 5571-5576, 2007.

BOUDEAU, J. et al. Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 4499-4509, 1999.

CAMPIERI, M.; GIONCHETTI, P. Bacteria as the cause of ulcerative colitis. **Gut**, v. 48, p. 132-135, 2001.

DARFEUILLE-MICHAUD, A. et al. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. **Gastroenterology**. v. 115, p. 1405-1413, 1998.

DARFEUILLE-MICHAUD, A. Adherent-invasive *Escherichia coli*: a putative new *E. coli* pathotype associated with Crohn's disease. **Int. J. Med. Microbiol.**, v.292, p. 185-193, 2002.

DARFEUILLE-MICHAUD, A. et al. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. **Gastroenterology**, v. 127, p. 412-421, 2004.

DICHI, I. et. al. Use of proteic metabolism (^{15}N -glycine) in the early detection of disease exacerbation in patients with non-specific ulcerative colitis. **Arq.Gastroenterol.** Jul-Sep; v. 35(3), p. 175-80, 1998.

FIOCCHI, C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. **Gastroenterology.**, v. 115, p. 182-205, 1998.

FIOCCHI, C. The multiple components of inflammatory bowel disease pathogenesis: should we invest in all of them or should we pick and choose? **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 21, p. 399-400, 2005.

GIAFFER, M. H.; HOLDSWORTH, C. D.; DUERDEN, B. I. Virulence properties of *Escherichia coli* strains isolated from patients with inflammatory bowel disease. **Gut.**, v. 33, p. 646-650, 1992

GIONCHETTI, P.; RIZZELLO, F.; CAMPIERI, M. Probiotics and antibiotics in inflammatory bowel disease. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 17, p. 331-335, 2001

HENDRICKSON, B. A.; GOKHALE, R.; CHO, J. H. Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 15, p. 79-94, 2002.

KOTLOWSKI, R. et al. High prevalence of *Escherichia coli* belonging to the B2+D phylogenetic group in inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 56, p. 669-675, 2007.

MARTIN, H. M. et al. Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. **Gastroenterology**. v. 127, p.:80-93, 2004.

NATARO, J. P.; DENG, Y.; WALKER, K. AggR, a transcriptional activator of aggregative adherence factor I expression. **J. Bacteriology**., v. 176, p. 4691-469, 1994.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11(1), p. 142-201, 1998.

NAZLI, A.; et al. Epithelia under metabolic stress perceive commensal bacteria as a threat. **Am. J. Pathol.**, v. 164, p. 947-957, 2004.

RHODES, J. M. The role of *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 56, p. 610-612, 2007.

SAMEGIMA, D. A. G. Algumas propriedades de virulência de *Escherichia coli* isoladas de pacientes com doença inflamatória intestinal. **Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)** – Universidade de São Paulo, São Paulo. 2008.

SASAKI, M. et al. Invasive *Escherichia coli* are a feature of Crohn's disease. **Labor. Invest.**, v. 10, p. 1-13, 2007.

SCHUBERT, S. et al. Prevalence of the "High- Pathogenicity Island" of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 480-485, 1998.

SCHULTSZ, C. et al. Frequency of pathogenic and enteroadherent *Escherichia coli* in patients with inflammatory bowel disease and controls. **J. Clin. Pathol.**, v. 50, p. 573-579, 1997.

SCHUMACHER, G. et al. Virulence properties of *Escherichia coli* isolated from the rectal mucosa of patients with first attacks of colitis. **Microb. Ecol. Health Dis.**, v. 8, p. 1-7, 1995.

SEKSIK, P. et al. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. **Gut**, v. 52, p.237-242, 2003.

VICTORIA, C. R. et.al. Incidência e prevalência das doenças inflamatórias intestinais na região centro-oeste do Estado de São Paulo. **Arq. Gastroenterol.** [online]. v. 46, p. 20-25, 2009.