

---

**RESPOSTA PRÓ-INFLAMATÓRIA DA INTERLEUCINA-1 e FATOR DE NECROSE TUMORAL NA INFECÇÃO INTRAPERITONEAL POR *Escherichia coli* ENTEROHEMORRÁGICA EM CAMUNDONGOS SWISS**

INTERLEUCIN-1 PRO-INFLAMMATORY RESPONSE AND TUMOR NECROSIS FACTOR IN INTRAPERITONEAL INFECTION BY ESCHERICHIA COLI ENTEROHEMORRHAGIC IN SWISS MICE

Telma Saraiva dos Santos<sup>1</sup>

Bruna Santos Marnieri<sup>1</sup>

Anelise Franciosi<sup>2</sup>

Juan JosuePuño Sarmiento<sup>3</sup>

Ionice Felipe<sup>4</sup>

Nathalia Maria Fioreto Campos<sup>5</sup>

Karina de Almeida Gualtieri<sup>6</sup>

Tacito Graminha Campos<sup>7</sup>

**RESUMO**

*Escherichia coli* faz parte da nossa microbiota podendo ser encontrada no intestino dos mamíferos em geral, colonizando a mucosa do cólon, principalmente de recém nascidos, convivendo de maneira saudável durante muitos anos, porém, essas estirpes comensais podem causar doenças em hospedeiros imunodeprimidos ou com barreira gastrointestinal rompida. As cepas patogênicas de *Escherichia coli* podem utilizar de vários mecanismos de invasão e escape da resposta imunológica natural. Esses mecanismos de virulência permitem a classificação em diferentes patotipos, onde neste trabalho iremos abordar a resposta imune inata contra *Escherichia coli* Enterohemorrágica (EHEC). Portanto, nesse trabalho objetivou-se estabelecer a relação entre a resposta celular na fase inicial da infecção por *Escherichia coli* através do perfil das citocinas Interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) e Fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) no início da infecção experimental em camundongos infectados com cepas diarreiogênicas e não diarreiogênicas. Para isso, foram utilizados 60 camundongos Swiss, divididos em 3 grupos (Controle, ATCC e EHEC) nos tempos 30 minutos, 3, 6, 12, 24 e 48 horas. Os animais foram eutanasiados, inoculados 4 ml de soro fisiológico intraperitoneal para obtenção de exsudato peritoneal e realizado a dosagem de citocinas pró-infamatórias por meio de Ensaio Imunoenzimático de captura. Avaliando o perfil de IL-1 das cepas ATCC e EHEC verificou-se uma diferença significativa entre os grupos nos tempos estudados, onde a cepa ATCC apresentou dosagens superiores, alterando seu perfil em 24 horas e 48 horas de infecção. O pico de IL-1

112

---

<sup>1</sup> Alunas de Iniciação Científicas no Curso de Biomedicina do Centro Universitário Filadélfia.

<sup>2</sup> Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina.

<sup>3</sup> Mestre em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina.

<sup>4</sup> Profa. Dra. da Universidade Estadual de Londrina.

<sup>5</sup> Profa. Esp. do Centro Universitário Filadélfia.

<sup>6</sup> Profa. Dra. do Centro Universitário Filadélfia.

<sup>7</sup> Orientador – Prof. Dr. do Centro Universitário Filadélfia. tacito@biologo.bio.br

da cepa EHEC ocorreu em 12 horas, decaindo posteriormente, porém, sem retornar no nível do controle. Em relação a dosagem de TNF, as cepas de EHEC apresentaram grande variação em 6 horas e 24 horas. Nos primeiros trabalhos de perfil imunológico foi relacionada a indução da expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  com a presença de Stx, assim como a síntese específica de TNF- $\alpha$  no rim. O padrão de citocina IL-1 $\beta$  observado nos animais infectados por EHEC, em relação aos infectados por ATCC revela uma característica altamente patogênica desta cepa e a importância do entendimento do processo infeccioso e inflamatório gerado por EHEC, bem como o perfil de citocinas para diminuir a ocorrência de SHU e mortalidade.

**Palavras-chave:** Citocinas. Diarreiogênica. *Escherichia coli* Enterohemorrágica. Pró-inflamatória.

### ABSTRACT

*Escherichia coli* is part of our microbiota and can be found in the gut of mammals in general, colonizing in the colon's mucous, especially in newborns, living in healthy conditions for many years. However, these commensal strains can cause disease in immunocompromised hosts or the ones with broken gastrointestinal barriers. Pathogenic strains of *e. coli* can use various mechanisms of invasion and evade natural immune response. These virulence mechanisms allow sorting in different pathotypes, where in this work we will address the innate immune response against Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). Therefore, this work aimed to establish the relationship between the cellular response in the early stage of infection by *Escherichia coli* through the profile of cytokines Interleukin 1 beta (IL- $\beta$  1) and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) at the beginning of an experimental infection study in mice infected with diarrheagenic and non-diarrheagenic strains. For this, 60 Swiss mice, divided into 3 groups (control, ATCC and EHEC) were used at 30 minutes, and 6, 12, 24 and 48 hours. The animals were euthanized, 4 ml of intraperitoneal saline were inoculated to obtain peritoneal exudate and the dosage of pro-inflammatory cytokines was carried out by means of a capture enzyme immunoassay. Evaluating the IL-1 profile of the ATCC and EHEC strains, a significant difference was noticed between the groups at the times studied, where the ATCC strain presented higher dosages, altering its profile in 24 hours and 48 hours of infection. The IL-1 peak of the EHEC strain occurred within 12 hours, decreasing later, without returning at the control level, though. Regarding the TNF dosage, the EHEC strains showed great variation in 6 hours and 24 hours. In the first studies of immunological profile, a relationship was established between the induction of the expression of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  with the presence of Stx, and the specific synthesis of TNF- $\alpha$  in the kidney. The IL-1 $\beta$  cytokine pattern observed in EHEC-infected animals compared to those infected by ATCC revealed a highly pathogenic characteristic of this strain and the importance of understanding the infectious and inflammatory processes generated by EHEC, as well as the cytokine profile to decrease the occurrence of HUS and mortality.

**Keywords:** Cytokines. Diarrheagenic. Enterohemorrhagic *Escherichia Coli*. Pro-Inflammatory.

## INTRODUÇÃO

A família bacteriana *Enterobacteriaceae* é uma das mais importantes e estão entre os principais agentes de infecção hospitalar, e a principal causa de infecção intestinal em muitos países. Essa família constitui um grande grupo heterogêneo de bacilos Gram-negativos anaeróbios facultativos com cromossomo único e circular, membrana citoplasmática, espaço periplásmico, peptídeoglicano ou mureína e membrana externa com lipopolissacarídeos (LPS), porinas e fimbrias. Possuem mais de 150 diferentes antígenos somáticos lipopolissacarídeos termoestáveis (O), mais de 50 antígenos flagelares (H) e mais de 100 antígenos capsulares termolábeis (K) (BROOKS *et al.*, 2012; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

A *Escherichia coli* (*E. coli*) é o membro mais comum e importante do gênero *Escherichia*, bem como da microbiota intestinal do ser humano e outros mamíferos, colonizando a mucosa do cólon, principalmente de crianças menores de cinco anos e convivendo de maneira saudável e com mútuos benefícios durante muitos anos, porém, essas estirpes comensais podem causar doenças em hospedeiros imunodeprimidos ou com barreira gastrointestinal rompida (peritonite, por exemplo), se apresentando como patógeno versátil e frequentemente fatal, causando uma grande variedade de doenças que resultam do processo infeccioso, como gastroenterite e infecções extra intestinais, assim como infecções do trato urinário (UTIs), meningites e sepses (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; MORENO *et al.*, 2010; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2010; NATARO; KAPER, 1998; NATARO; PETRI *et al.*, 2008; SWEENEY *et al.*, 1996).

Acredita-se que a maior parte dos sorogrupos de *E. coli* não apresentem qualquer gene de virulência, porém, durante o processo evolutivo, algumas cepas adquirem diferentes combinações de fatores de virulência que lhes conferem capacidade de causar doenças em indivíduos saudáveis, como genes de virulência codificados por plasmídeos, bacteriófagos, ou ilhas de patogenicidade (IP), onde as adesinas, invasinas, toxinas, fatores inibitórios do sistema imune do hospedeiro, sistema de captação de ferro e genes de resistência a antimicrobianos são os mais

importantes (CHERNAKI-LEFFER *et al.*, 2002; GYLES; FAIRBROTHER, 2010; NATARO; KAPER, 1998; VIEIRA, 2009; WHITT; SALYERS, 2002).

As cepas patogênicas de *E. coli* podem promover aquisição e assimilação de ferro proveniente do hospedeiro que removem o ferro de proteínas carreadoras e/ou capturam o ferro proveniente da lise de eritrócito, além da maioria possuir algum tipo de aderência que é responsável pela ligação íntima entre a bactéria e o epitélio intestinal do hospedeiro, assim como permitem a colonização de locais geralmente não habitados, usando um esquema de várias etapas da patogênese que consiste na colonização da mucosa, evasão das defesas do hospedeiro, multiplicação e danos ao hospedeiro (GYLES; FAIRBROTHER, 2010; HIRSH, 2003; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; ROCHA *et al.*, 2002; SILVEIRA *et al.*, 2002).

Com base nos mecanismos de virulência específicos das cepas patogênicas, a *E. coli* pode ser classificada em patotipos. Dentre os patotipos intestinais de *E. coli* existem seis categorias bem descritas: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC) (FERREIRA; KNÖBL, 2009; NATARO; KAPER, 1998).

A *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) é um subgrupo de *E. coli* produtoras de toxina Shiga (STEC) e inicialmente usado para nomear amostras O157:H7 responsável por causar colite hemorrágica (CH) e síndrome hemolítica urêmica (SHU), em seguida o termo EHEC também passou a ser utilizado em amostras de STEC que causavam diarreia em humanos. Esse patotipo é caracterizado por produzir potentes citotoxinas que possuem capacidade de inibir a síntese proteica de células eucarióticas, denominadas verotoxinas (VT), devido sua atividade em cultura de células Vero, ou toxina Shiga (Stx), sendo elas Shiga-like 1 (Stx1) e Shiga-like 2 (Stx2), que possuem 60% de semelhança entre si, porém são imunologicamente distintas, podendo haver síntese de apenas uma ou ambas as toxinas, assim denominadas pela semelhança com a toxina produzida pela *Shigella dysenteriae* (BROOKS *et al.*, 2012; NATARO; KAPER, 1998; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Existem mais de 100 sorotipos de EHEC, sendo a *E. coli* O157:H7 a principal bactéria desta categoria, a mais comum e melhor caracterizada. Atualmente existe

uma classificação da EHEC baseando-se na presença de fatores de patogenicidade, denominadas cepas típicas quando há presença de fenômeno attaching and effacing (A/E) e cepas atípicas quando não produzem lesão A/E (FOCACCCIA, 2005; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; RODRIGUEZ-ARGELES, 2002; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; TRABULSI; CAMPOS, 1999; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998).

A EHEC se destaca por causar ampla doença no homem que compreende desde casos assintomáticos, diarreia branda até casos mais graves de CH que pode evoluir para complicações extra intestinais como a SHU, além de complicações como trombocitopenia trombótica (PTT) e anormalidades neurológicas (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

A infecção por EHEC geralmente ocorre pela ingestão de alimentos e água contaminada em doses infectantes baixas (menos de 100 organismos são capazes de causar a doença) devido ao sistema de regulação que permite adaptação e sobrevivência à acidez do estômago e após ultrapassar a barreira gástrica atingem o intestino grosso, onde se aderem à mucosa, proliferam e produzem Stx, liberando-a para o lúmen intestinal e enterócitos. A toxina posteriormente é absorvida pelo epitélio intestinal, entra na circulação e se liga aos leucócitos. A transmissão de EHEC cruzada entre as pessoas também pode ocorrer (DONNENBERG; WELCH, 1996; DONNENBERG; YU; KAPER, 1993; MALYUKOVA *et al.*, 2009; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2010; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

As toxinas (Stx-1 e Stx-2) são os principais mecanismos de patogenicidade e são adquiridas pela EHEC por bacteriófagos lisogênicos se ligam ao glicolípídeo específico na célula hospedeira, o globotriaosilceramida (Gb<sub>3</sub>), encontrado nas vilosidades intestinais e nas células endoteliais renais, atuam inibindo a síntese de proteínas e induzindo stress e apoptose. O principal alvo da toxina Stx são as células endoteliais, porém células do túbulo renal, células mesangiais, monócitos e plaquetas também podem ser afetadas. Além disso, podem causar patogênese por meio da lesão A/E que destrói as micro vilosidades intestinais, diminuindo a absorção, levando a diarreia aquosa inicial seguida de diarreia sanguinolenta (CH) com cólicas e pouca febre, podendo progredir para SHU (GRIFFIN; OLMSTEAD; PETRAS, 1990;

JANDHYALA; THOPER; MAGUN, 2012; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2010; O'BRIEN; HOLMES, 1987; STÅHL *et al.*, 2006; TESH, 2012; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

A ação da Stx é potencializada pelas citocinas pró-inflamatórias circulantes como Fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e Interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) estimuladas pela ação da toxina em monócitos. A Stx pode também estimular liberação de Interleucina 8 (IL-8) que promove o influxo inflamatório, desta forma induz uma resposta pró-inflamatória. Uma cascata de reações como coagulação e processos inflamatórios que resultam em SHU são ativadas após a ligação da toxina em seu receptor. No cólon ocorre rompimento dos vasos e nos rins ocorre obstrução dos vasos do glomérulo levando a insuficiência renal. O LPS presente na bactéria induz uma resposta no hospedeiro por meio da ligação no receptor Toll like 4 (TLR4) e ativa vias intracelulares específicas pró-inflamatórias, porém se a ativação for excessiva pode ocorrer danos. A apoptose provocada pela Stx gera uma resposta inflamatória e influxo de fagócitos, desta forma, a migração de neutrófilos para o lúmen intestinal aumenta a translocação de Stx do lúmen através de enterócitos (HURLEY *et al.*, 1999; HURLEY; THORPE; ACHESON, 2001; KARPMAN, 2014; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; THORPE *et al.*, 1999; YAMASAKI *et al.*, 1999).

117

Em SHU a contagem de neutrófilos se mostra geralmente elevada, justamente pela importância desta célula na resposta inflamatória aguda e em processos infecciosos (FERNANDEZ *et al.*, 2005; MILFORD *et al.*, 1989; WALTERS *et al.*, 1989)

O período de incubação é de 1 a 8 dias provocando inicialmente diarreia não sanguinolenta com ou sem vômito, dor abdominal e febre, a partir de dois dias a diarreia torna-se sanguinolenta e a dor abdominal mais intensa caracterizando a CH, podendo evoluir para cura ou SHU (cerca de 10% dos pacientes) (RODRIGUEZ-ARGELES, 2002; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

A resposta imune tem um importante papel fundamental para a defesa contra agentes infecciosos e constitui a principal obstáculo para ocorrência de infecções disseminadas que geralmente leva a morte, como as infecções bacterianas, onde a participação da imunidade inata em infecções bacterianas ocorre através das células

fagocíticas, ativação do complemento pela via alternativa e produção de quimiocinas e citocinas (JANEWAY, 2001; MACHADO *et al.*, 2004).

Existe a necessidade de estudar a biologia e estratégias de virulência da *E. coli* no contexto do seu local de infecção em analogia a resposta imune, pois os modelos animais que imitam um ou mais aspectos da infecção, assim como o entendimento da resposta pró-inflamatória podem facilitar o desenvolvimento de estratégias terapêuticas e vacinas (MOHAWK; O'BRIEN, 2010; RITCHIE, 2013). Dessa forma, o objetivo deste trabalho é avaliar a resposta pró-inflamatórias em infecção intraperitoneal por *E. coli* em camundongos Swiss através do perfil de IL-1 e TNF, no início da infecção com cepas diarreioigênicas e não diarreioigênica.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Foram utilizados 60 camundongos Swiss fêmeas com idade entre 8 e 10 semanas, procedentes do biotério central da Universidade Filadélfia. Os mesmos foram divididos em 3 grupos, Infectados por EHEC e ATCC e o grupo controle sem infecção, onde cada grupo foi realizado em quadruplicata. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal do Centro Universitário Filadélfia (Parecer nº 011/2016).

Os animais foram infectados via intraperitoneal com uma suspensão contendo  $1 \times 10^5$  de *E. Coli* (EHEC ou ATCC) em uma dose única nos grupos determinados. Após os períodos de zero (controle), 30 minutos, 3, 6, 12, 24 e 48 horas da inoculação da *E. coli*, os animais foram eutanasiados de acordo com o protocolo do comitê de ética animal e inoculados 4 mL de soro fisiológico estéril intraperitoneal para obtenção do exsudato peritoneal.

A partir desse exsudato, foram estocados em freezer  $-80^{\circ}$  C e após todos os experimentos foram realizadas as dosagens das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (eBioscience, San Diego, CA, USA) por meio de Ensaio Imunoenzimático de captura (ELISA) de acordo com as instruções do fabricante.

Os resultados foram analisados pelo programa Prisma 5.0 e as diferenças entre os grupos experimentais, horas após infecção e o controle foram analisadas através

do teste ANOVA por comparação pós-teste de Bonferroni, onde um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## RESULTADOS

A figura 1 demonstra os resultados das dosagens das citocinas pró-inflamatórias no exsudato intraperitoneal dos camundongos infectados e não infectados em diferentes tempos, avaliando assim, a resposta imune inata frente a infecção por *E. coli*. Os animais do grupo 1 foram infectados com a cepa ATCC, grupo 2 infectados com a cepa EHEC e o grupo 3 não foram infectados.

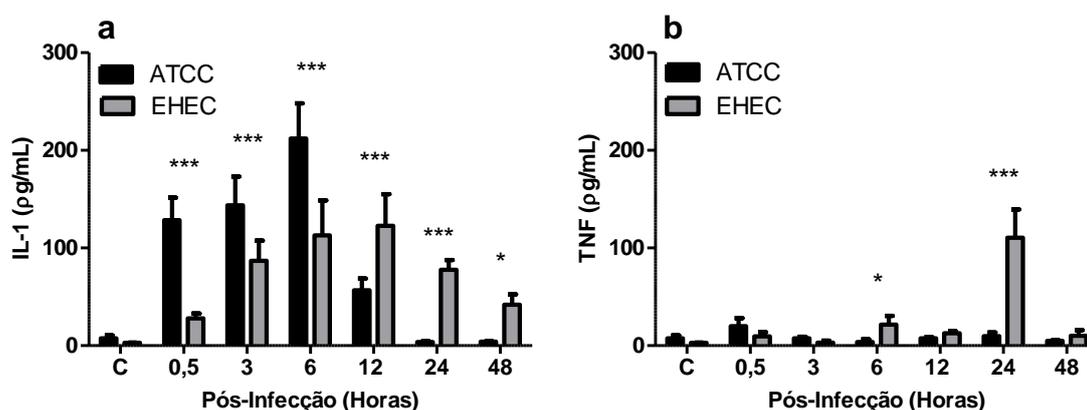
Na figura 1A é evidenciado o perfil da citocina IL-1, comprovando assim a sua importante função frente a infecção inicial pelos micro-organismos.

Avaliando o percurso do padrão de citocinas relacionando as cepas ATCC e EHEC, podemos verificar que houve uma diferença significativa entre os grupos nos tempos estudados. Relacionando as duas cepas em 0,5 horas ( $p < 0,001$ ), 3 horas ( $p < 0,001$ ), 6 horas ( $p < 0,001$ ) e 12 horas ( $p < 0,001$ ), a dosagem de IL-1 frente a infecção pela cepa ATCC foi bem superior comparando com a EHEC, mudando de perfil após 24 horas ( $p < 0,001$ ) e 48 horas ( $p < 0,01$ ).

Relacionando somente a cepa ATCC, verificamos um pico da IL-1 em 6 horas ( $212,16 \pm 36,00$  pg/mL) e voltando nos níveis do controle ( $7,46 \pm 2,95$  pg/mL) a partir de 24 horas ( $3,58 \pm 0,74$  pg/mL) da infecção, demonstrando assim, a rápida ação dos macrófagos em secretar a citocina para recrutamento dos polimorfonucleares.

Em relação as cepas EHEC o padrão de citocinas foram lineares e o seu pico ocorreu em 12 horas ( $122,50 \pm 35,76$  pg/mL), decaindo após esse tempo, chegando em 48 horas ( $41,75 \pm 10,59$  pg/mL) sem retornar no nível do controle ( $2,81 \pm 0,43$  pg/mL).

**Figura 1** - Dosagens de IL-1 e TNF- $\alpha$  no exsudato intraperitoneal de camundongos infectados por cepas de EHEC e ATCC nos tempos controle, 0,5, 3, 6, 12, 24 e 48 horas. (\*\*\*)  $p < 0,001$  e \*  $p < 0,05$ )



Na figura 1B é exposto o perfil do TNF- $\alpha$  que se mostrou sua significância em relação a ATCC x EHEC somente em 6 horas ( $p < 0,05$ ) e 24 horas ( $p < 0,001$ ). Relacionando somente com a ATCC não verificamos um aumento no exsudado peritoneal, mas quando comparamos a EHEC percebemos uma grande variação em 6 horas ( $21,41 \pm 8,87$  pg/mL) e 24 horas ( $110,32 \pm 29,56$  pg/mL).

120

## DISCUSSÃO

Neste trabalho avaliamos o perfil das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  frente a duas cepas de *E. coli* (virulenta e não virulenta) em modelo animal no exsudato peritoneal em diferentes tempos.

Nos primeiros trabalhos de perfil imunológico foi relacionada a indução da expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  com a presença de Stx, assim como a síntese específica de TNF- $\alpha$  no rim (HAREL *et al.*, 1993; TESH; RAMEGOWDA; SAMUEL, 1994). O TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  podem aumentar o efeito citotóxico da Stx, bem como, induzir a expressão de Gb<sub>3</sub>, aumentando assim, a ligação da Stx a células endoteliais humanas, assim como o LPS bacteriano (KAYE *et al.*, 1993; LOUISE; OBRIG, 1991; VAN DE KAR *et al.*, 1992).

Corroborando com alguns autores, Thorpe *et al.*, (1999), Yamasaki *et al.*, (1999) a EHEC produz alguns fatores que regulam positivamente a produção de citocinas inflamatórias pelas células, como demonstrado no perfil de citocinas pró-inflamatórias apresentadas neste trabalho.

O TNF- $\alpha$  é uma citocina que medeia a inflamação, o efeito citotóxico sobre as células tumorais e a coagulação microvascular. Embora a ação citotóxica da Stx em células endoteliais seja o principal mecanismo de indução à SHU, as citocinas possuem um importante papel neste processo, onde, por exemplo, os altos níveis de TNF- $\alpha$  urinário durante a SHU podem contribuir para a inflamação e trombose, além da ação sinérgica da Stx com a TNF- $\alpha$  que pode promover efeitos citotóxicos nas células endoteliais humanas evidenciando sua importância na coordenação da inflamação aguda, como demonstrado neste trabalho com pico em 24 horas de infecção. Trabalhos futuros poderão esclarecer experimentalmente a relação da TNF com a SHU (LOUISE; OBRIG, 1991; TESH; RAMEGOWDA; SAMUEL, 1994; KARPMAN; STÅHL, 2014).

121

O padrão de citocina IL-1 $\beta$  observado nos animais infectados por EHEC, em relação aos infectados por ATCC revela uma característica altamente patogênica, já conhecida, mostrando que a resposta inicial gerada contra a bactéria não é suficiente para deter a infecção, sendo necessário a presença de citocinas indutoras da inflamação por mais tempo que em infecções com cepa menos patogênica.

Trabalhos publicados anteriormente pelo nosso grupo demonstraram a migração celular intraperitoneal dos leucócitos recrutados em infecção por EHEC e ATCC, evidenciando os neutrófilos, no processo de infecção (ROMERO *et al.*, 2015) corroborando assim, com outros trabalhos que demonstraram que a Stx 2 pode causar neutrofilia por meio de desencadeamento da liberação de células da linhagem mielóide da medula óssea ou pela proliferação acelerada das células polimorfonucleares (PMN) (FERNANDEZ *et al.*, 2006; GEELEN *et al.*, 2007; TE LOO *et al.*, 2001; BRIGOTTI *et al.*, 2011).

## CONCLUSÃO

Muitos animais têm sido utilizados como modelo para infecção e doenças causadas por EHEC, como ratos, camundongos, coelhos, além de animais maiores (RITCHIE, 2013), porém, ainda existe a necessidade de buscar um modelo animal que reproduza os aspectos clínicos da doença como visto em humanos, pois mudou-se as perspectivas a respeito da *E. coli* que não é mais apenas um micro-organismo comensal e inofensivo. Desta forma, o entendimento do processo infeccioso e inflamatório gerado por EHEC, bem como o perfil de citocinas, colabora para o desenvolvimento de novos estudos e novas formas de tratamento, diminuindo conseqüentemente a ocorrência de SHU e mortalidade.

## REFERÊNCIAS

- BRIGOTTI, M.; TAZZARI, P. L.; RAVANELLI, E.; CARNICELLI, D.; ROCCHI, L.; ARFILLI, V.; SCAVIA, G.; MINELLI, F.; RICCI, F.; PAGLIARO, P.; FERRETTI, A. V.; PECORARO, C.; PAGLIALONGA, F.; EDEFONTI, A.; PROCACCINO, M. A.; TOZZI, A. E.; CAPRIOLI, A. Clinical relevance of Shiga toxin concentrations in the blood of patients with hemolytic uremic syndrome. **Pediatric Infectious Disease**, [s.l.], v. 30, p. 486–490, 2011.
- BROOKS, G. F.; CARROLL, K. C.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A.; MIETZNER, T. A. **Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick e Aldelberg**. 25. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012. 812 p.
- CHERNAKI-LEFFER, A. M.; BIESDORF, S. M.; ALMEIDA, L. M.; LEFFER, E. V. B.; VIGNE, F. Isolamento de Enterobactérias em *Alphitobius diaperinus* e na cama de aviários no oeste do estado do Paraná. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 4, n. 3, p. 243-247, dez. 2002.
- DONNENBERG, M. S.; WECH, R. A. Virulence determinants of uropathogenic *Escherichia coli*. In: MOBLEY, H. L. T.; WARREN, J.W., ed. *Urinary tract infections: molecular pathogenesis and clinical management*. **American Society for Microbiology Press**, Washington, p. 135-174, 1996.
- DONNENBERG, M. S., YU, J.; KAPER, J. B. A second chromosomal gene necessary for intimate attachment of enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells. **Jornal Bacteriology**, [s.l.], v. 175, p. 4670-4680, 1993.

FERNANDEZ, G. C.; GOMEZ, S. A.; RUBEL, C. J.; BENTANCOR, L. V.; BARRIONUEVO, P.; ALDUNCIN, M.; GRIMOLDI, I.; EXENI, R.; ISTURIZ, M. A.; PALERMO, M. Impaired neutrophils in children with the typical form of hemolytic uremic syndrome. **Pediatric Nephrology**, [s.l.], v. 20, p. 1306-1314, 2005.

FERNANDEZ, G. C.; LOPEZ, M. F.; GOMEZ, S. A.; RAMOS, M. V.; BENTANCOR, L. V.; FERNANDEZ-BRANDO, R. J.; LANDONI, V. I.; DRAN, G. I.; MEISS, R.; ISTURIZ, M. A.; PALERMO, M. S. Relevance of neutrophils in the murine model of haemolytic uraemic syndrome: mechanisms involved in Shiga toxin type 2- induced neutrophilia. **Clinical Experimental Immunology**, [s.l.], v. 146, p. 76-84, 2006.

FERREIRA, A. J. P.; KNÖBL, T. Enfermidades bacterianas. In: JÚNIOR BERCHIERI, A.; SILVA, NEPOMUCENO, E.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das aves**. Campinas: Facta, 2009. cap.4, p. 457-474.

FOCACCIA, R. V. **Tratado de Infectologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2005.

GRIFFIN, P. M.; OLMSTEAD, L. C.; PETRAS, R. E. Escherichia coli O157:H7-associated colitis: a clinical and histological study of 11 cases. **Gastroenterology**, [s.l.], v. 99, p. 142–149, 1990.

GEELLEN, J. M.; VAN DER VELDEN, T. J.; TE LOO, D. M.; BOERMAN, O. C.; VAN DEN HEUVEL, L. P.; MONNENS, L. A. Lack of specific binding of Shiga-like toxin (verocytotoxin) and non-specific interaction of Shiga-like toxin 2 antibody with human polymorphonuclear leucocytes. **Nephrology Dialysis Transplant**, [s.l.], v. 22, p. 749–755, 2007.

HAREL, Y.; SILVA, M.; GIROIR, B.; WEINBERG, A.; CLEARY, T. B.; BEUTLER, B. A reporter transgene indicates renal-specific induction of tumor necrosis factor (TNF) by Shiga-like toxin. **Journal Clinical Investigation**, [s.l.], v. 92, p. 2110–2116, 1993.

HIRSH, D. D. Escherichia coli. In: HIRSH, D. D. **Microbiologia Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Granabara Koogan, 2003. cap. 9, p. 63-69.

HURLEY, B. P.; JACEWICZ, M.; THORPE, C. M.; LINCICOME, L. L.; KING, A. J.; KEUSCH, G.T.; ACHESON, D. W. Shiga toxins 1 and 2 translocate differently across polarized intestinal epithelial cells. **Infection Immunity**, [s.l.], v. 67, p. 6670-6677, 1999.

HURLEY, B. P.; THORPE, C. M.; ACHESON, D. W. Shiga toxin translocation across intestinal epithelial cells is enhanced by neutrophil transmigration. **Infection Immunity**, [s.l.], v. 69, p. 6148–6155, 2001.

JANEWAY, C. A. How the immune system protects the host from infection. **Microbes Infect**, [s.l.], v. 3, p. 1167-71, 2001.

JANDHYALA, D. M.; THORPE, C. M.; MAGUN, B. Ricin and Shiga toxins: effects on host cell signal transduction. **Curr Top Microbiol Immunol**, [s.l.], v. 357, p. 41-65, 2012.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic Escherichia coli. **Nature Reviews Microbiology**, Estados Unidos, v. 2, p. 123-140, feb. 2004.

KARPMAN, D.; STÅHL, A. Enterohemorrhagic escherichia coli pathogenesis and the host response. **Microbiology spectrum**, [s.l.], v. 2, 2014.

KAYE, S. A.; LOUISE, C. B.; BOYD, B.; LINGWOOD, C. A.; OBRIG, T. G. Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: interleukin-1 enhancement of Shiga toxin cytotoxicity toward human vascular endothelial cells in vitro. **Infection Immunity**, [s.l.], v. 61, p. 3886–3891, 1993.

LOUISE, C. B.; OBRIG, T. G. Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: combined cytotoxic effects of Shiga toxin, interleukin-1, and tumor necrosis factor alpha on human vascular endothelial cells in vitro. **Infection Immunity**, [s.l.], v. 59, p. 4173–4179, 1991.

MACHADO, P. R.; ARAÚJO, M. I. A.; CARVALHO, L.; CARVALHO, E. M. Mecanismos de resposta imune às infecções Immune response mechanisms to infections. **An Bras Dermatol**, [s.l.], v. 79, p. 647-664, 2004.

124

MALYUKOVA, I.; MURRAY, K. F.; ZHU, C.; BOEDEKER, E.; KANE, A.; PATTERSON K.; PETERSON, J.R.; DONOWITZ, M.; KOVBASNJUK, O. Macropinocytosis in Shiga toxin 1 uptake by human intestinal epithelial cells and transcellular transcytosis. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, [s.l.], v. 296, p. 78 -92, 2009.

MILFOR, D.; TAYLOR, C. M.; RAFAAT, F.; HALLORAN, E.; DAWES, J. Neutrophil elastases and haemolytic uraemic syndrome. **Lancet**, [s.l.], v. 2, p. 1153, 1989.

MOHAWK, K. L.; O'BRIEN, A. D. Mouse Models of Escherichia coli O157:H7 Infection and Shiga Toxin Injection. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, [s.l.], nov. 2011.

MORENO, A. C.; FILHO, A. F.; GOMES, T. A.; RAMOS, S.T.; MONTEMOR, L. P.; TAVARES, V. C.; FILHO, L. S.; IRINO, K.; MARTINEZ, M. B. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, [s.l.], v. 66, p. 50-57, Jan. 2010.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia médica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 948 p.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic Escherichia coli. **Clinical Microbiology Reviews**, [s.l.], v.11, n. 1, p. 142-201, jan. 1998.

O'BRIEN, A. D.; HOLMES, R. K. Shiga and Shiga-like toxins. **Microbiol Revs**, [s.l.], v. 51, p. 206-220, 1987.

PETRI Jr, W. A.; MILLER, M.; BINDER, H. J.; LEVINE, M. M.; DILLINGHAM, R.; GUERRANT, R. L. Enteric infections, diarrhea and their impact on function and development. **Journal of Clinical Investigation**, [s.l.], v. 118, p. 1277-1290, apr. 2008.

RITCHIE, J. M. Animal models of enterohemorrhagic Escherichia coli infection. **Microbiology spectrum**, [s.l.], v. 2, n. 4, 2014.

ROCHA, A. C. G. P.; SILVA, A. B.; BRITO, B. G.; MORAES, H. L.; PONTES, A. P.; CÉ, M. C.; NASCIMENTOS, V. P.; SALLE, C. T. P. Virulence factors of avian pathogenic Escherichia coli isolated from broilers from the South of Brazil. **Avian diseases**, Kennet Square, v. 46, n.3, p. 749-753, 2002.

RODRIGUEZ-ANGELES, G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli. **Salud pública México**, Cuernavaca, v. 44, n. 5, p. 464-475, sept. 2002.

125

ROMERO, R. T.; DOS SANTOS, T. S.; DE MATO, F. P.; FRANCIOSI, A.; CAMPOIS, N. F.; SARMIENTO, J. P.; NAKAZATO, G.; GUALTIERI, K. D.; CAMPOIS, T. G. Study of Cell Migration in Intraperitoneal Infection by Escherichia coli in Mice Swiss. **Frontiers Immunology**, [s.l.], 2015.

SILVEIRA, W. D.; FERREIRA, A.; BROCCHI, M.; HOLLANDA, L. M.; CASTRO, A. F. P.; YAMADA, A. T.; LANCELLOTTI, M. Biological characteristics and pathogenicity of avian Escherichia coli strains. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 85, n. 1, p. 47-53, 2002.

STÅHL, A. L.; SVENSSON, M.; MORGELIN, M.; SVANBORG, C.; TARR, P. I.; MOONEY, J. C.; WATKINS, S. L.; JOHNSON, R.; KARPMAN, D. Lipopolysaccharide from enterohemorrhagic Escherichia coli binds to platelets through TLR4 and CD62 and is detected on circulating platelets in patients with hemolytic uremic syndrome. **Blood Journal**, [s.l.], v. 108, p. 167–176, 2006.

SWEENEY, N. J.; KLEMM, P.; McCORMICK, B.A.; MOLLER-NIELSEN, E.; UTLEY, M.; SCHEMBRI, M. A.; LAUX, D. C.; COHEN, P. S. The Escherichia coli K-12 gntP Gene Allows E. coli F-18 To Occupy a Distinct Nutritional Niche in the Streptomycin Treated Mouse Large Intestine. **Infection and Immunity**, Estados Unidos, v. 64, n. 9, p. 3497-3503, Sept. 1996.

TE LOO, D. M.; VAN HINSBERGH, V. W.; VAN DEN HEUVEL, L. P.; MONNENS, L. A. Detection of verocytotoxin bound to circulating polymorphonuclear leukocytes of patients with hemolytic uremic syndrome. **J Am Soc Nephrol**, [s.l.], v. 12, p. 800-806, 2001.

TESH, V. L. The induction of apoptosis by Shiga toxins and ricin. **Curr Top Microbiol Immunol**, [s.l.], v. 357, p. 137–178, 2012.

TESH, V. L.; RAMEGOWDA, B.; SAMUEL, J. E. Purified Shiga-like toxins induce expression of proinflammatory cytokines from murine peritoneal macrophages. **Infection Immunity**, [s.l.], v. 62, p. 5085-5094, 1994.

THORPE, C. M.; HURLEY, B. P.; LINCICOME, L. L.; JACEWICZ, M. S.; KEUSCH, G. T.; ACHESON, D. W. Shiga toxins stimulate secretion of interleukin-8 from intestinal epithelial cells. **Infection Immunity**, [s.l.], v. 67, p. 5985–5993, 1999.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 760 p.

TRABULSI, L.R.; CAMPOS, L.C. Escherichia. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 215-26.

VAN DE KAR, N. C. A. J.; MONNENS, L. A. H.; KARMALI, M. A.; VAN HINSBERGH, V. W. M. Tumor necrosis factor and interleukin-1 induce expression of the verotoxin receptor globotriaosylceramide on human endothelial cells: implications for the pathogenesis of the hemolytic uremic syndrome. **Blood Journal**, [s.l.], v. 80, p. 2755–2764, 1992.

126

VIEIRA, M. A. M. Ilhas de patogenicidade. **O mundo da saúde**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 406-414, 2009.

WHITT, D. D.; SALYERS, A. A. Escherichia coli extraintestinal. In: WHITT, D. D.; SALYERS, A. A. **Bacterial pathogenesis, as molecular approach**. 2 ed. Washington: ASM Press, 2002. cap.29, p. 422-436.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Zoonotic non-O157 shiga toxin producing Escherichia coli (STEC). **Report of a WHO scientific working group meeting**, 1998.

WALTERS, M. D.; MATTHEI, I. U.; KAY, R.; DILLON, M. J.; BARRATT, T. M. The polymorphonuclear leucocyte count in childhood haemolytic uraemic syndrome. **Pediatric Nephrology**, [s.l.], v. 3, p. 130–134, 1989.

YAMASAKI, C.; NATORI, Y.; ZENG, X. T.; OHMURA, M.; YAMASAKI, S.; TAKEDA, Y.; NATORI, Y. Induction of cytokines in a human colon epithelial cell line by Shiga toxin 1 (Stx1) and Stx2 but not by non-toxic mutant Stx1 which lacks N-glycosidase activity. **FEBS Letters**, [s.l.], v. 442, p. 231-234, 1999.