



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

ILA FERNANDA NUNES LIMA

**GENES CODIFICADORES DE FATORES DE VIRULÊNCIA, INFLAMAÇÃO E
AVALIAÇÃO NUTRICIONAL DA INFECÇÃO INTESTINAL ASSOCIADA COM
Escherichia coli ENTEROAGREGATIVA EM CRIANÇAS DE FORTALEZA,
CEARÁ, BRASIL**

FORTALEZA
2008

ILA FERNANDA NUNES LIMA

**GENES CODIFICADORES DE FATORES DE VIRULÊNCIA, INFLAMAÇÃO E
AVALIAÇÃO NUTRICIONAL DA INFECÇÃO INTESTINAL ASSOCIADA COM
Escherichia coli ENTEROAGREGATIVA EM CRIANÇAS DE FORTALEZA,
CEARÁ, BRASIL**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima

FORTALEZA
2008

L698g Lima, Ila Fernanda Nunes
Genes codificadores de fatores de virulência, inflamação e avaliação nutricional da infecção intestinal associada com *Escherichia coli* enteroagregativa em crianças de Fortaleza, Ceará, Brasil / Ila Fernanda Nunes Lima. – Fortaleza, 2008.
197f : il.

Orientador: Aldo Ângelo Moreira Lima
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Ceará. Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Fortaleza-Ce, 2008.
1. Diarréia. 2. Escherichia coli. 3. Fatores de virulência. I. Lima, Aldo Ângelo Moreira (Orient.) II. Título

CDD: 616.3427

ILA FERNANDA NUNES LIMA

**GENES CODIFICADORES DE FATORES DE VIRULÊNCIA, INFLAMAÇÃO E
AVALIAÇÃO NUTRICIONAL DA INFECÇÃO INTESTINAL ASSOCIADA COM
Escherichia coli ENTEROAGREGATIVA EM CRIANÇAS DE FORTALEZA,
CEARÁ, BRASIL**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Farmacologia. Área de Concentração: Farmacologia.

Aprovada em: 12 /11 / 2008

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima (Orientador)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha
Universidade Estadual do Ceará – UECE

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof^a. Dr^a. Cristiane Cunha Frota
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof^a. Dr^a. Helena Serra Azul Monteiro
Universidade Federal do Ceará – UFC

A Deus, que sempre guia e ilumina meus caminhos;

À minha mãe Maria de Fátima (*in memoriam*), meu anjo da guarda e eterno exemplo de vida;

Ao meu marido Flávio, grande companheiro... Sem o seu amor, carinho e compreensão eu jamais conseguiria;

Ao meu pai Salomão e aos meus irmãos Salomão Filho e Victor Emanuel, meus alicerces, que, mesmo estando distante dos olhos nos últimos anos, transmitiram amor e carinho durante toda a minha vida.

Aos meus familiares, que sempre me apoiaram e incentivaram ao longo dessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima, meu orientador, pela dedicação, atenção, compreensão, estímulo e oportunidades oferecidos ao longo desses anos.

À Prof^ª. Dra. Helena Serra Azul Monteiro, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará (UFC), pelo seu empenho e disposição em ajudar os pós-graduandos.

Ao Dr. Alexandre Havt Bindá, o mais recente professor adjunto da UFC, conquista mais que merecida, por todo o suporte no desenvolvimento e execução das técnicas de biologia molecular e pelas palavras de incentivo proferidas nos inúmeros momentos em que eu achei que não fosse conseguir.

À Josiane da Silva Quetz, mestranda do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFC, pelo companheirismo e ajuda imprescindíveis na execução desse trabalho.

À Eunice Bobô de Carvalho, doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da UFC e farmacêutica-bioquímica do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE), pela força e sabedoria transmitidas desde o início dessa caminhada.

Aos demais pós-graduandos, alunos de iniciação científica e voluntários do Laboratório de Doenças Infecciosas (LDI), da Unidade de Pesquisas Clínicas/Instituto de Biomedicina (UPC/IBIMED), da UFC, pela amizade e auxílio direto ou indireto.

À Maria do Carmo Nunes de Pinho, Verônica Maria de Oliveira e Conceição de Maria Nogueira, funcionárias do Setor de Microbiologia do LDI, pela ajuda na execução desse estudo.

À Fabiana Maria da Silva Nascimento, responsável pela parte ética deste e de outros projetos realizados na UPC/IBIMED.

Ao funcionário da UPC/IBIMED, José Amadeus Souza, pela dedicação ao funcionamento desta unidade e, conseqüentemente, de todos os trabalhos nela desenvolvidos.

À Kátia Lima Nogueira, pelo esforço e paciência na administração deste e de todos os outros estudos em curso na UPC/IBIMED.

Aos funcionários do Sistema de Segurança e Gerenciamento de Dados (SSGD), da UPC/IBIMED, Prof. Dr. Alberto Melo Soares, José Quirino Filho, Francisco de Sousa Júnior e Charles Melo, pela confecção dos mapas e digitação, verificação e análise parcial dos dados coletados.

À Leah J. Barret, da Universidade da Virgínia (UVa), pela organização do envio de materiais e reagentes necessários para a realização desse trabalho.

Ao Dr. Richard L. Guerrant, da UVA, pela colaboração internacional, fornecimento das cepas controles e contribuições científicas essenciais para o desenvolvimento desse estudo.

Às agentes de saúde Luzia Melo, Fátima Alves e Rosânia Silva, e à enfermeira Sayonara Alencar, pelo preenchimento dos formulários, coleta das amostras e disposição em ajudar sempre que precisei de algum dado relacionado à comunidade.

Aos pós-graduandos do Laboratório de Farmacologia Cardio-Renal, da UPC/IBIMED, em especial à doutoranda Renata de Sousa Alves, pela amizade e companheirismo dispensados ao longo dessa jornada.

A todos os funcionários e estudantes da UPC/IBIMED, pelo apoio e incentivo no decorrer desses anos.

Ao Dr. James P. Nataro, da Universidade de Maryland, pelas sugestões científicas valiosas fornecidas.

À Prof^ª. Rosa Maria Salani Mota, do Departamento de Estatística e Matemática Aplicada da UFC, pela análise estatística dos dados coletados.

Aos colegas, professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFC, pela atenção durante esses anos.

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFC, Aura Rhanes Farias Nogueira Yida, por sua dedicação na resolução das etapas burocráticas.

A todos os pais e responsáveis das crianças envolvidas nesse estudo, por permitirem a coleta de amostras, contribuindo para o avanço das pesquisas, mesmo diante de tantas dificuldades.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao *National Institutes of Health* (NIH), através do *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* (NIAID) e do *International Clinical Research Training Scholars and Fellows Program*, gerenciado pelo *Fogarty International Center*, pelo apoio financeiro para a realização desse trabalho.

“De tudo ficaram três coisas:

A certeza de que estamos sempre começando...

A certeza de que precisamos continuar...

A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...

Portanto, devemos:

Fazer da interrupção um caminho novo...

Da queda, um passo de dança...

Do medo, uma escada...

Do sonho, uma ponte...

Da procura, um encontro...”

Fernando Pessoa

RESUMO

Genes codificadores de fatores de virulência, inflamação e avaliação nutricional da infecção intestinal associada com *Escherichia coli* enteroagregativa em crianças de Fortaleza, Ceará, Brasil. Ila Fernanda Nunes Lima. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará. Novembro de 2008. Orientador: Prof^o. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima.

Escherichia coli enteroagregativa (EAEC) é um patótipo de *E. coli* que tem sido cada vez mais identificado como agente etiológico das doenças diarréicas. Esse trabalho teve como objetivos determinar a prevalência de EAEC e investigar a importância de alguns genes associados à virulência no grau de severidade das doenças diarréicas causadas pelo microorganismo, além de avaliar o impacto dessas infecções na inflamação intestinal e no estado nutricional de crianças carentes de Fortaleza, Ceará. Crianças na faixa etária entre 2 e 36 meses, com histórico ou não de diarreia nos últimos 14 dias, tiveram suas medidas antropométricas avaliadas e suas amostras fecais coletadas. O diagnóstico de EAEC foi realizado por reação de polimerase em cadeia (PCR) dos genes *aaiC* (cromossomal) e *aatA* (plasmidial). Amostras positivas foram pesquisadas quanto à presença dos genes de virulência *aggR* (regulador transcricional), *aap* (dispersina), *pic* (enterotoxina), *pet* (enterotoxina) e *astA* (enterotoxina). A sequência nucleotídica do gene *aggR* foi analisada através de seqüenciamento. Alíquotas fecais foram submetidas à quantificação de lactoferrina (LFF) e citocinas (IL-4, IL-10, TNF- α e IFN- γ) através de reação imunoenzimática (ELISA). Esse estudo analisou 83 crianças com diarreia (casos) e 83 crianças sem diarreia (controles). EAEC foi encontrada na mesma proporção entre ambos os grupos (41,0%). Crianças com diarreia apresentaram redução significativa na espessura da prega cutânea, índice de massa corporal e escores-z peso-por-idade (WAZ) e peso-por-altura (WHZ), mas a presença da bactéria não foi associada com alterações nos índices antropométricos analisados. Entre as amostras positivas para EAEC, não houve diferença quanto à presença isolada dos fatores de virulência pesquisados nas crianças que desenvolveram ou não diarreia. Avaliando as freqüências desses genes em combinação, cepas de EAEC expressando os genes *aggR*, *aap*, *pic*, *pet* e *astA* foram isoladas em freqüência superior significativa de crianças doentes quando comparadas com cepas de EAEC expressando somente *aggR*, *aap*, *pic* e *astA* (excluindo o gene *pet*). A análise da seqüência codificadora do gene *aggR* apresentou 27 polimorfismos em um único nucleotídeo (SNPs), distribuídos entre cinco amostras caso e três controles. Mais de 80,0% das crianças estudadas apresentaram inflamação intestinal caracterizada por elevados níveis de LFF, independente da presença de diarreia e EAEC. Todas as crianças com diarreia associada com EAEC apresentaram altas concentrações de LFF. Níveis basais de citocinas fecais foram observados entre crianças de ambos os grupos. A variabilidade na presença dos fatores de virulência pesquisados ratifica a heterogeneidade das cepas de EAEC. A combinação de genes codificadores de fatores de virulência mostrou que a presença do *pet* está associada com a doença causada por EAEC. A infecção pela bactéria não causou impacto significativo nos índices antropométricos analisados. As elevadas concentrações observadas de LFF sugerem a existência de fatores adicionais desencadeadores do processo inflamatório.

Palavras-chave: Diarreia, *Escherichia coli* enteroagregativa, Genes de virulência.

ABSTRACT

Virulence factor coding genes, inflammation and nutritional evaluation of intestinal infection associated with enteroaggregative *Escherichia coli* in children from Fortaleza, Ceara, Brazil. Ila Fernanda Nunes Lima. Thesis submitted to the Pos-Graduation Program of Pharmacology, from Department of Physiology and Pharmacology, from School of Medicine, from Federal University of Ceara. November 2008. Professor: MD PhD Aldo Ângelo Moreira Lima.

Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) is a pathotype of diarrheagenic *E. coli*, which has increasingly been identified as an etiological agent of diarrheal disease. This purpose of this study is to determine the prevalence of EAEC and examine the importance of some virulence-related genes in the severity of the diarrheal disease caused by this microorganism, and further evaluate the impact of these infections on intestinal inflammation and the nutritional status of poor children from Fortaleza, Ceara. Children aged 2 to 36 months, with and without an occurrence of diarrhea in the previous 14 days, had their anthropometric data evaluated and their stools collected. Diagnosis of EAEC was done by polymerase chain reaction (PCR) of the *aaiC* (chromosomal) and *aatA* (plasmidial) genes. Positive samples were further analyzed for the presence of the virulence genes *aggR* (transcription regulator), *aap* (dispersin), *pic* (enterotoxin), *pet* (enterotoxin) and *astA* (enterotoxin). The nucleotide sequence of *aggR* gene was also analyzed by sequencing. Aliquots of stool samples were quantified for lactoferrin (LFF) and cytokines (IL-4, IL-10, TNF- α e IFN- γ) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). This study analyzed 83 children with diarrhea (cases) and 83 children without diarrhea (controls). EAEC was found in the same proportion in both groups (41.0%). Children with diarrhea presented with significantly reduced skin thickness, body mass index and weight-for-age (WAZ) and weight-for-height (WHZ) z-scores. However, the presence of the bacteria was not associated with changes in the analyzed anthropometric measures. Among the positive samples for EAEC, there was no difference in the presence of the isolated virulence genes in the children with or without diarrhea. Observing the frequencies of these genes in combination, EAEC strains carrying the *aggR*, *aap*, *pic*, *pet* and *astA* genes together were isolated in significantly higher frequencies from sick children when compared to EAEC strains expressing only *aggR*, *aap*, *pic*, and *astA* (excluding *pet*). Nucleotide sequence analysis of the *aggR* gene presented 27 polymorphisms of a single nucleotide (SNPs), distributed among five case samples and three control samples. More than 80.0% of studied children had intestinal inflammation characterized by elevated levels of LFF, regardless of the presence of illness and EAEC. All children with diarrhea associated with EAEC presented with high concentrations of LFF. Basal levels of fecal cytokines were observed among children from both groups. Variability in the presence of the evaluated virulence factors confirms the heterogeneity of EAEC strains. The combination of the virulence related genes expressed showed that *pet* has an association with illness caused by EAEC. The infection by this bacterium did not cause significant impact on the anthropometric index analyzed. The high concentrations of LFF observed suggest that there may be additional factors triggering the inflammatory process.

Keywords: Diarrhea, Enteroaggregative *Escherichia coli*, Virulence genes.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Representação esquemática mostrando as junções intercelulares que unem enterócitos adjacentes, compostas pelas junções firmes (TJs), junções aderentes (AJs), desmossomos e junções de comunicação (Gap) -----	29
FIGURA 2	Micrografia eletrônica de varredura de <i>E. coli</i> em cultura, mostrando sua morfologia em bacilo -----	37
FIGURA 3	Padrões de aderência de <i>E. coli</i> em células HEP-2 -----	41
FIGURA 4	Fotomicrografia de transmissão eletrônica mostrando as fímbrias de aderência agregativa AAF/I, estrutura fimbrial flexível de cerca de 2nm de diâmetro, e AAF/II, fibra rígida de 5nm de diâmetro, entre as EAECs -----	46
FIGURA 5	Representação esquemática dos três estágios sugeridos para a patogênese da infecção por EAEC -----	55
FIGURA 6	Localização geográfica das comunidades Gonçalves Dias e Parque Universitário, situadas a cerca de 1 e 5Km, respectivamente, da Unidade de Pesquisas Clínicas / Instituto de Biomedicina (UPC/IBIMED), da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará (UFC), em Fortaleza -----	69
FIGURA 7	Representação esquemática das etapas realizadas desde a triagem das crianças incluídas no estudo ao processamento das amostras fecais -----	73
FIGURA 8	Fluxograma da técnica de extração de DNA fecal utilizando o <i>QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA)</i> -----	76
FIGURA 9	Comparação de cinco métodos de extração de DNA a partir de amostras fecais positivas para EAEC -----	77
FIGURA 10	Fluxograma da técnica de purificação dos produtos de PCR utilizando o <i>QIAquick Purification Kit (Qiagen, Valencia, CA)</i> -----	83
FIGURA 11	Visualização das bandas obtidas após amplificação por PCR dos genes <i>aaiC</i> e <i>aatA</i> , utilizados para o diagnóstico de EAEC -	97
FIGURA 12	Caracterização da doença diarréica (duração em dias e número de evacuações líquidas no período de 24h) dos casos positivos e negativos para EAEC -----	98
FIGURA 13	Número de casos de diarreia com duração superior a 14 dias entre crianças doentes infectadas ou não por EAEC -----	99

FIGURA 14	Comparação das médias \pm erro padrão dos escores-z altura-por-idade (HAZ), peso-por-idade (WAZ) e peso-por-altura (WHZ) entre casos e controles positivos e negativos para EAEC-----	100
FIGURA 15	Comparação das médias \pm erro padrão da circunferência braquial, espessura da prega cutânea e índice de massa corpórea (IMC) entre casos e controles positivos e negativos para EAEC -----	100
FIGURA 16	Representação gráfica das correlações entre os escores-z altura-por-idade (HAZ), peso-por-idade (WAZ) e peso-por-altura (WHZ) e a severidade da doença, caracterizada pelo número de dias com diarreia e de evacuações líquidas em 24 horas, entre crianças com diarreia -----	101
FIGURA 17	Visualização das bandas obtidas após amplificação por PCR dos genes codificadores de fatores de virulência <i>aggR</i> , <i>pet</i> , <i>pic</i> , <i>aap</i> e <i>astA</i> -----	105
FIGURA 18	Representação gráfica de um polimorfismo em um único nucleotídeo (SNP) na posição 300 do gene regulador <i>aggR</i> -----	107
FIGURA 19	Seqüência nucleotídica do gene <i>aggR</i> , obtida do NCBI, com seus respectivos aminoácidos codificados, e as localizações dos 27 polimorfismos em um único nucleotídeo (SNPs) encontrados -----	113
FIGURA 20	Concentração de lactoferrina fecal entre os casos e controles positivos e negativos para EAEC -----	114
FIGURA 21	Concentração de lactoferrina fecal entre os casos e controles positivos para EAEC e positivos ou negativos para o gene <i>aggR</i> -----	115
FIGURA 22	Concentração de lactoferrina fecal entre os casos e controles positivos para EAEC e positivos ou negativos para o gene <i>pet</i> ---	115
FIGURA 23	Concentração de lactoferrina fecal entre os casos e controles positivos para EAEC e positivos ou negativos para o gene <i>pic</i> ---	116
FIGURA 24	Concentração de lactoferrina fecal entre os casos e controles positivos para EAEC e positivos ou negativos para o gene <i>aap</i> -	116
FIGURA 25	Concentração de lactoferrina fecal entre os casos e controles positivos para EAEC e positivos ou negativos para o gene <i>astA</i> -	117
FIGURA 26	Quantificação dos níveis fecais das citocinas IL-4, IL-10, TNF- α e IFN- γ (pg/mL) entre crianças dos grupos caso e controle -----	118

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Estimativas de mortalidade causada por diarreia em crianças de países em desenvolvimento -----	26
TABELA 2	Genes alvo, iniciadores utilizados e tamanhos dos produtos obtidos -----	81
TABELA 3	Distribuição da população incluída no estudo de acordo com o local de origem e o número de crianças por residência -----	89
TABELA 4	Distribuição da população de estudo de acordo com o sexo e a idade -----	90
TABELA 5	Medidas de resumo dos dados antropométricos coletados da população de estudo -----	91
TABELA 6	Distribuição da população de estudo segundo a característica das fezes coletadas -----	91
TABELA 7	Distribuição da população de estudo quanto à ocorrência de diarreia nos últimos 14 dias -----	92
TABELA 8	Distribuição da sub-população caso-controle segundo o sexo e a idade -----	93
TABELA 9	Medidas de resumo dos dados antropométricos coletados da sub-população caso e controle -----	94
TABELA 10	Distribuição da sub-população caso-controle segundo a característica das fezes coletadas -----	95
TABELA 11	Distribuição dos casos e controles quanto à positividade para os genes <i>aaiC</i> e <i>aatA</i> através de PCR -----	96
TABELA 12	Distribuição dos casos e controles quanto à positividade para EAEC, de acordo com o resultado da PCR para os genes <i>aaiC</i> e/ou <i>aatA</i> -----	96
TABELA 13	Percentual de positividade dos genes codificadores de fatores de virulência isolados entre amostras positivas para EAEC dos grupos caso e controle -----	103
TABELA 14	Percentual de positividade dos genes codificadores de fatores de virulência em combinação entre amostras positivas para EAEC dos grupos caso e controle -----	104

TABELA 15	Comparação da combinação dos genes relacionados à virulência de EAEC pesquisados na presença / ausência do gene <i>pet</i> -----	105
TABELA 16	Ocorrência de polimorfismos em um único nucleotídeo (SNPs) do gene <i>aggR</i> entre amostras dos grupos caso e controle positivas para EAEC-----	108
TABELA 17	Aminoácidos resultantes após a ocorrência de polimorfismos em um único nucleotídeo (SNPs) do gene <i>aggR</i> entre amostras dos grupos caso e controle positivas para EAEC -----	111
TABELA 18	Distribuição da ocorrência de co-infecções com parasitas em casos e controles positivos para EAEC -----	119

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
cm	Centímetros
g	Gramas
°C	Graus Celsius
h	Horas
Kb	Quilobases
kDa	Quilodaltons
Kg	Quilogramas
Km	Quilômetros
Km²	Quilômetros quadrados
KV	Quilovolts
m	Metros
M	Molar
MDa	Megadaltons
μg	Microgramas
μL	Microlitros
μM	Micromolares
mg	Miligramas
mL	Mililitros
ng	Nanogramas
nm	Nanômetros
pb	Pares de base

% Por cento

UFC Unidade formadora de colônia

US\$ Dólares americanos

V Volts

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Aderência agregativa
AAF	Fímbria de aderência agregativa (<i>aggregative adherence fimbriae</i>)
AAF/I	Fímbria de aderência agregativa I (<i>aggregative adherence fimbriae</i> I)
AAF/II	Fímbria de aderência agregativa II (<i>aggregative adherence fimbriae</i> II)
AAF/III	Fímbria de aderência agregativa III (<i>aggregative adherence fimbriae</i> III)
AAF/IV	Fímbria de aderência agregativa IV (<i>aggregative adherence fimbriae</i> IV)
Aap	Proteína anti-agregação de <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC <i>anti-aggregation protein</i>)
AJs	Junções aderentes (<i>adherens junctions</i>)
aggR	Regulador da aderência agregativa de <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC <i>aggregative adherence regulator</i>)
aspU	Proteína secretada U de <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC <i>secreted protein U</i>)
ATP	Adenosina trifosfato
Caco-2	Linhagem celular derivada de carcinoma de cólon humano
Cdt	Toxina letal ao citoesqueleto (<i>cytolethal distending toxin</i>)
cGMP	Monofosfato de guanosina cíclico
COMEPE/UFC	Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
DA	Aderência difusa verdadeira

DALY	Anos de vida saudável perdidos por morte prematura ou incapacidade (<i>disability associated life years</i>)
DNA	Ácido deoxirribonucléico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DAEC	<i>Escherichia coli</i> difusamente aderente
DTT	Dithiothreitol
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EAST-1	Enterotoxina termoestável 1 de <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC <i>heat-stable enterotoxin 1</i>)
EDTA	Ácido etilendiamino-tetra-acético (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasora
ELISA	<i>Enzyme linked immunossorbent assay</i>
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> extra-intestinal
Gap	Junções de comunicação (<i>gap junctions</i>)
GM-CSF	Fator estimulante de granulócitos e macrófagos (<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>)
GRO	Oncogenes relacionados ao crescimento (<i>growth-related oncogene</i>)
GTP	Guanosina trifosfato
HAZ	Altura-por-idade (<i>height-for-age</i>)
HeLa	Linhagem celular derivada de carcinoma cervical humano
HEp-2	Linhagem celular derivada de carcinoma laríngeo humano

HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HT29/C1	Linhagem celular epitelial derivada de cólon humano
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICAM	Molécula de adesão intercelular 1 (<i>inter-cellular adhesion molecule</i>)
IFN	Interferon
IgA	Imunoglobulina A
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corporal
JAM	Molécula de adesão juncional (<i>junctional adhesion molecule</i>)
LA	Padrão de aderência localizado
LDI	Laboratório de Doenças Infecciosas
LFF	Lactoferrina fecal
MAP	Proteína ativada por mitógeno
MNEC	<i>Escherichia coli</i> associada à meningite e sepse
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NCHS	<i>National Center for Health Statistics</i>
NK	Células exterminadoras (<i>natural killer</i>)
pAA	Plasmídeo que confere o fenótipo AA à <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
PBS	Tampão salina-fosfato (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)

Pet	Toxina codificada por plasmídeo (<i>plasmid-encoded toxin</i>)
Pic	Proteína envolvida na colonização intestinal (<i>protein involved in intestinal colonization</i>)
PMN	Neutrófilo polimorfonuclear
RNA	Ácido ribonucléico (<i>ribonucleic acid</i>)
Sat	Toxina autotransportadora secretada (<i>secreted autotransporter toxin</i>)
ShET1	Enterotoxina de <i>Shigella</i> 1 (<i>Shigella enterotoxin 1</i>)
SNP	Polimorfismo em um único nucleotídeo (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
SPATEs	Serino-proteases auto-transportadoras secretadas por espécies da família das <i>Enterobacteriaceae</i>
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
SSGD	Sistema de Segurança e Gerenciamento de Dados
STa	Toxina termo-estável de <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
T6SS	Sistema de secreção tipo VI (<i>type VI secretion system</i>)
T84	Linhagem celular epitelial derivada de adenocarcinoma de cólon humano
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGI	Trato gastrointestinal
Th1	Linfócito T auxiliar 1 (<i>T helper 1</i>)
Th2	Linfócito T auxiliar 2 (<i>T helper 2</i>)
TJs	Junções firmes (<i>tight junctions</i>)
TLR5	Receptor <i>Toll-like</i> 5 (<i>Toll-like receptor 5</i>)
TNF	Fator de necrose tumoral

TRO	Terapia de re-hidratação oral
UFC	Universidade Federal do Ceará
UPC/IBIMED	Unidade de Pesquisas Clínicas/Instituto de Biomedicina
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatogênica
UV	Luz ultravioleta
UVa	Universidade da Virgínia
WAZ	Peso-por-idade (<i>weight-for-age</i>)
WHZ	Peso-por-altura (<i>weight-for-height</i>)
ZO	Zonulinas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	Morbidade e Mortalidade Causada por Doenças Diarréicas	24
1.2	Definição das Doenças Diarréicas	26
1.3	Epitélio Gastrointestinal e Barreira Funcional	27
1.4	Classificação das Doenças Diarréicas	30
1.5	Conseqüências das Doenças Diarréicas	31
1.6	Etiologia das Doenças Diarréicas	34
1.7	<i>Escherichia coli</i>	37
1.8	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC)	40
1.8.1	Histórico	40
1.8.2	Morbidade	42
1.8.3	Fatores de Virulência	44
1.8.3.1	Adesão	44
1.8.3.2	Dispersão	47
1.8.3.3	Citotoxinas e Enterotoxinas	48
1.8.3.4	Inflamação	52
1.8.4	Fisiopatologia	54
1.8.5	Manifestações Clínicas	57
1.8.6	Diagnóstico e Caracterização das Cepas de EAEC	58
2	JUSTIFICATIVA	61
3	OBJETIVOS	64
3.1	Objetivo Geral	65
3.2	Objetivos Específicos	65
4	MATERIAL E MÉTODOS	66
4.1	Descrição do Estudo	67

4.1.1	Considerações Éticas -----	67
4.1.1.1	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) -----	67
4.1.1.2	Confidencialidade dos Dados -----	67
4.1.2	Local do Estudo -----	68
4.1.3	Critérios de Inclusão e Exclusão da População do Estudo -----	70
4.1.4	Tipo e Período do Estudo -----	70
4.2	Triagem, Entrevista e Preenchimento da Ficha Epidemiológica -----	70
4.3	Medidas Antropométricas -----	71
4.4	Coleta e Transporte das Amostras de Fezes -----	71
4.5	Processamento das Amostras Fecais -----	72
4.6	Extração do DNA Fecal -----	74
4.7	Quantificação do DNA Extraído -----	78
4.8	Diagnóstico Molecular de EAEC -----	78
4.9	Pesquisa de Genes Relacionados à Virulência -----	80
4.10	Purificação dos Produtos de PCR -----	82
4.11	Sequenciamento do Gene <i>aggR</i> -----	83
4.12	Avaliação de Lactoferrina Fecal (LFF) -----	85
4.13	Quantificação de Citocinas Fecais -----	85
4.14	Gerenciamento e Análise Estatística dos Dados -----	86
5	RESULTADOS -----	88
5.1	Caracterização da População Estudada -----	89
5.2	Caracterização da Sub-População Caso-Controle -----	92
5.3	Prevalência de EAEC entre Casos e Controles -----	95
5.4	Caracterização da Doença Diarréica -----	97
5.5	Avaliação das Medidas Antropométricas -----	99
5.6	Pesquisa dos Genes de Virulência -----	102
5.7	Seqüenciamento do Gene <i>aggR</i> -----	106
5.8	Avaliação de Lactoferrina Fecal (LFF) -----	114
5.9	Quantificação de Citocinas Fecais -----	117

5.10	As Co-Infecções -----	118
6	DISCUSSÃO -----	120
7	CONCLUSÕES -----	140
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	142
	ANEXOS -----	179
	ANEXO A – Carta de Aprovação na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) -----	180
	ANEXO B – Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará (COMEPE/UFC) -----	182
	ANEXO C – Carta de Autorização do COMEPE/UFC para o Início das Atividades -----	183
	ANEXO D – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) -----	184
	ANEXO E – Carta de Aprovação do COMEPE/UFC para Complementações no TCLE -----	186
	ANEXO F – Formulário Ambiental e Sócio-Econômico -----	187
	ANEXO G – Formulário de Coleta de Fezes e Dados Antropométricos -----	189
	ANEXO H – Distribuição dos genes codificadores de fatores de virulência <i>aggR</i> , <i>pet</i> , <i>pic</i> , <i>aap</i> e <i>astA</i> entre as amostras positivas para EAEC provenientes de crianças do grupo dos casos -----	190
	ANEXO I – Distribuição dos genes codificadores de fatores de virulência <i>aggR</i> , <i>pet</i> , <i>pic</i> , <i>aap</i> e <i>astA</i> entre as amostras positivas para EAEC provenientes de crianças do grupo dos controles -----	192
	ANEXO J – Resumos em Congressos -----	194
	ANEXO K – Artigos Científicos em Preparação -----	196
	ANEXO L – Projetos de Pesquisa Aprovados -----	197

1 INTRODUÇÃO

1.1 MORBIDADE E MORTALIDADE CAUSADA POR DOENÇAS DIARRÉICAS

As doenças diarréicas constituem um importante problema mundial, especialmente entre crianças na faixa etária de até cinco anos de idade. Atualmente, com o reconhecimento de seu impacto a longo prazo, as doenças diarréicas estão entre as principais ameaças à saúde infantil em países em desenvolvimento (GUERRANT *et al.*, 2002b; KEUSCH *et al.*, 2006).

Durante as últimas décadas, a mortalidade ocasionada por essas doenças vem declinando, o que pode ser atribuído a diversos fatores, tais como o advento da terapia de re-hidratação oral (TRO) e a elevação das taxas de amamentação, além de melhoria dos fatores nutricionais (FAGUNDES-NETO; SCALETSKY, 2000; KOSEK; BERN; GUERRANT, 2003; PETRI JR. *et al.*, 2008; UNICEF, 2003; VICTORIA *et al.*, 2000; WHO, 1998). A **Tabela 1** mostra a redução do número de mortes causadas pelas doenças diarréicas, de cerca de cinco milhões em 1976 para aproximadamente 1,6 milhão em 2002. Dados de um levantamento feito por Monteiro e Schmitz (2004) no Distrito Federal confirmaram essa queda no cenário nacional brasileiro. No período compreendido entre os anos de 1990 e 2000, houve uma redução de 72,8% na proporção de óbitos atribuídos às doenças infecciosas e parasitárias em crianças no primeiro ano de vida. No início do estudo, estas doenças constituíam a segunda causa de morte na faixa etária analisada, passando a ocupar o quarto lugar em 2000. Apesar do declínio, as diarréias foram responsáveis por 17.300 mortes no ano de 2002 em nosso país e representaram em torno de 15% de todas as mortes infantis naquele ano (WHO, 2003; 2004-GBD).

Enquanto as taxas de mortalidade ocasionadas pelas doenças diarréicas têm declinado, a morbidade tem permanecido constante e até aumentado em algumas faixas etárias. Crianças menores de cinco anos de idade apresentam de 2,8 a 6,3 episódios diarréicos anualmente (GUERRANT *et al.*, 2002a; KOSEK; BERN; GUERRANT, 2003; WHO, 2003). No Brasil, essa realidade não é diferente. Um estudo transversal realizado no estado de Pernambuco observou a ocorrência de 3,9 episódios de doenças diarréicas/criança/ano. De 2074 crianças menores de cinco anos investigadas, 19,8% apresentaram diarréia nos 15 dias anteriores à pesquisa, 6,1% necessitaram de atendimento ambulatorial e 2,7% tiveram que ser

hospitalizadas. Anualmente, as doenças diarréicas são responsáveis por 24,4% dos atendimentos ambulatoriais e por 35,3% de todas as internações de crianças menores de cinco anos de idade em Pernambuco (VASCONCELOS; BATISTA FILHO, 2008). No Rio de Janeiro, a taxa de prevalência de diarréia entre 104 crianças provenientes de famílias de baixa renda foi de 55,7% (BORGES *et al.*, 2007). Na Bahia, pesquisadores acompanharam diariamente durante um ano 84 crianças com até 40 meses de idade, residentes em áreas carentes de Salvador, e relataram a ocorrência de 2,8 episódios diarréicos/criança/ano. Em média, cada criança sofreu 11,1 dias de diarréia e cada episódio durou 3,9 dias. A maior incidência foi observada entre crianças menores de um ano (MELO *et al.*, 2008). No Ceará, um estudo de quase quatro anos de duração identificou mulheres grávidas e visitou a casa do recém-nascido três vezes por semana. As crianças acompanhadas tiveram uma média de 5,25 episódios diarréicos/criança/ano e passaram 27 dias com diarréia anualmente (LIMA *et al.*, 2000). De acordo com Melo *et al.* (2007), o pequeno intervalo entre as visitas é essencial para uma avaliação correta desse importante problema de saúde. Condições sócio-econômicas precárias estão entre os principais fatores de risco associados à ocorrência de doenças diarréicas (FERRER *et al.*, 2008).

Apesar de serem mais comuns em países em desenvolvimento, as doenças diarréicas também representam um problema em países desenvolvidos. Casos esporádicos são freqüentes nesses países e representam a segunda causa mais comum entre as doenças infecciosas, com um a dois episódios/pessoa/ano (STEINER; SAMIE; GUERRANT, 2006). Nos Estados Unidos, ocorrem entre 211 e 375 milhões de episódios diarréicos anualmente, resultando em 73 milhões de consultas médicas, 1,8 milhões de hospitalizações e 3100 óbitos. Estima-se que isto represente em torno de US\$6 bilhões gastos a cada ano com cuidados médicos e perda de produtividade (GUERRANT *et al.*, 2001).

TABELA 1 – Estimativas de mortalidade causada por diarreia em crianças de países em desenvolvimento.

Fonte	Ano de estimativa	Mortes por ano (milhões)
Rhode (1984)	1976	5
Snyder; Merson (1982)	1980	4,6
Institute of Medicine (1986)	1986	3,5
Martines; Phillips (1993)	1990	3,2
Bern <i>et al.</i> (1992)	Década de 1980	3,3
World Bank (1993)	1990	2,5
Murray; Lopez (1997)	1997	2,4-2,9
Kosek; Bern; Guerrant (2003)	Década de 1990	2,1-4,7
Parashar <i>et al.</i> (2003)	Década de 1990	1,7-3,0
Murray <i>et al.</i> (2001)	2000	1,3
WHO (2002)	2001	1,4
WHO (2003)	2002	1,6

Fonte: Adaptado de Podewils *et al.*, 2004.

1.2 DEFINIÇÃO DAS DOENÇAS DIARRÉICAS

A diarreia consiste em uma alteração do movimento e do transporte de fluidos e eletrólitos intestinais, caracterizada por uma elevação no volume fecal, na quantidade de água e/ou na frequência das evacuações (FORDTRAN, 1967; GUERRANT *et al.*, 2001). O volume final de água presente nas fezes determina a consistência normal do bolo fecal, que apresenta variações entre os indivíduos e pode variar, ainda, na mesma pessoa, de acordo com a alimentação. Essa variação complica a definição de diarreia (BLACK; LANATA, 2002). Segundo a Organização Mundial de Saúde (2005a), diarreia é a ocorrência de três ou mais evacuações pastosas ou líquidas no período de 24 horas. A consistência das fezes é mais

relevante do que o número de evacuações e a eliminação de fezes formadas não é definida como diarreia. De acordo com Keusch *et al.* (2006), considera-se como 48 horas o intervalo de separação entre dois episódios diarréicos.

1.3 EPITÉLIO GASTROINTESTINAL E BARREIRA FUNCIONAL

O epitélio gastrointestinal atua como uma das interfaces primárias entre o organismo e o ambiente exterior e sua integridade é crítica para a saúde humana (GEWIRTZ *et al.*, 2002; MADARA, 1997). Além de desempenhar as funções de digestão e absorção dos nutrientes e secreção de água e eletrólitos, o trato gastrointestinal (TGI) constitui a linha de frente na defesa contra os microorganismos potencialmente patogênicos que são capazes de se desenvolver no lúmen intestinal, enquanto mantém um estado não-responsivo em relação à microbiota comensal e aos antígenos alimentares (FIELD, 2003; HOOPER *et al.*, 1998; WERSHIL; FURUTA, 2008).

O TGI é formado por uma variedade de tipos celulares unidos através de junções intercelulares, formando uma delgada camada celular de epitélio colunar simples, que se dobra, formando as criptas e os vilos (MADARA; TRIER, 1994). As criptas contêm uma população de células pluripotentes, localizadas na sua base, que são capazes de se diferenciar em todos os tipos celulares. Essas células especializadas migram em direção ao topo das vilosidades, de onde são eliminadas dias depois (CHENG; LEBLOND, 1974; MADARA; TRIER, 1994).

As junções intercelulares, que ligam os enterócitos adjacentes formando uma camada celular, têm como função primordial a formação de barreiras seletivas que permitem a geração e manutenção de composições distintas entre os compartimentos teciduais. As células epiteliais intestinais são unidas umas às outras através junções firmes (*tight junctions* – TJs), junções aderentes (*adherens junctions* – AJs), junções de comunicação (*gap junctions* – Gap) e desmossomos. As TJs representam a principal barreira paracelular para o movimento de água, solutos e células imunes, estabelecendo polaridade e prevenindo a mistura de componentes entre os compartimentos apical e basolateral dos enterócitos (**FIGURA 1**) (ANDERSON; VAN ITALLIE, 1995; CAPLAN; SEO-MAYER; ZHANG, 2008;

FANNING; MITIC; ANDERSON, 1999). No início da década de 60, utilizando imagens estáticas de microscopia eletrônica, as TJs foram conceituadas como uma estrutura adesiva formando uma barreira absoluta e sem qualquer tipo de regulação no espaço paracelular. Estudos posteriores revelaram que as TJs são estruturas dinâmicas passíveis de alterações estruturais que adaptam seu estado funcional sob uma variedade de circunstâncias fisiológicas e patológicas (CEREIJIDO, 1992; FASANO; NATARO, 2004).

Em análises mais avançadas, as TJs, que circundam a parte superior da superfície lateral de cada enterócito, apareceram como uma série de pontos de contato célula a célula. Esses contatos são estruturas transmembranas contínuas em fileiras, que formam longas ramificações, circuncidando as células e interagindo com estruturas similares de células vizinhas. Diversas proteínas componentes das TJs têm sido identificadas nos últimos anos e sua estrutura atual é mostrada na **Figura 1**, embora essa lista esteja provavelmente incompleta (ANDERSON; VAN ITALLIE, 1995; CEREIJIDO, 1992; FASANO; NATARO, 1994).

A primeira proteína associada com as TJs foi descrita por Furuse *et al.* (1993). Utilizando membranas enriquecidas de junções de fígado de galinha como antígeno para a produção de anticorpos monoclonais específicos, eles identificaram uma proteína de aproximadamente 65kDa e a designaram de ocludina. Técnicas de imunofluorescência e microscopia eletrônica mostraram que a proteína localizava-se exclusivamente nos pontos de contato da membrana de células epiteliais e endoteliais. A ocludina é composta por quatro domínios transmembrana, dois domínios extracelulares e uma longa cadeia carboxi-terminal citoplasmática. A forma fosforilada parece ser predominante dentro das TJs. Experimentos subsequentes com células embrionárias pluripotentes *knockout* sugeriram a existência de outros componentes responsáveis pelo funcionamento das TJs (FASANO; NATARO, 2004; SAITOU *et al.*, 1997).

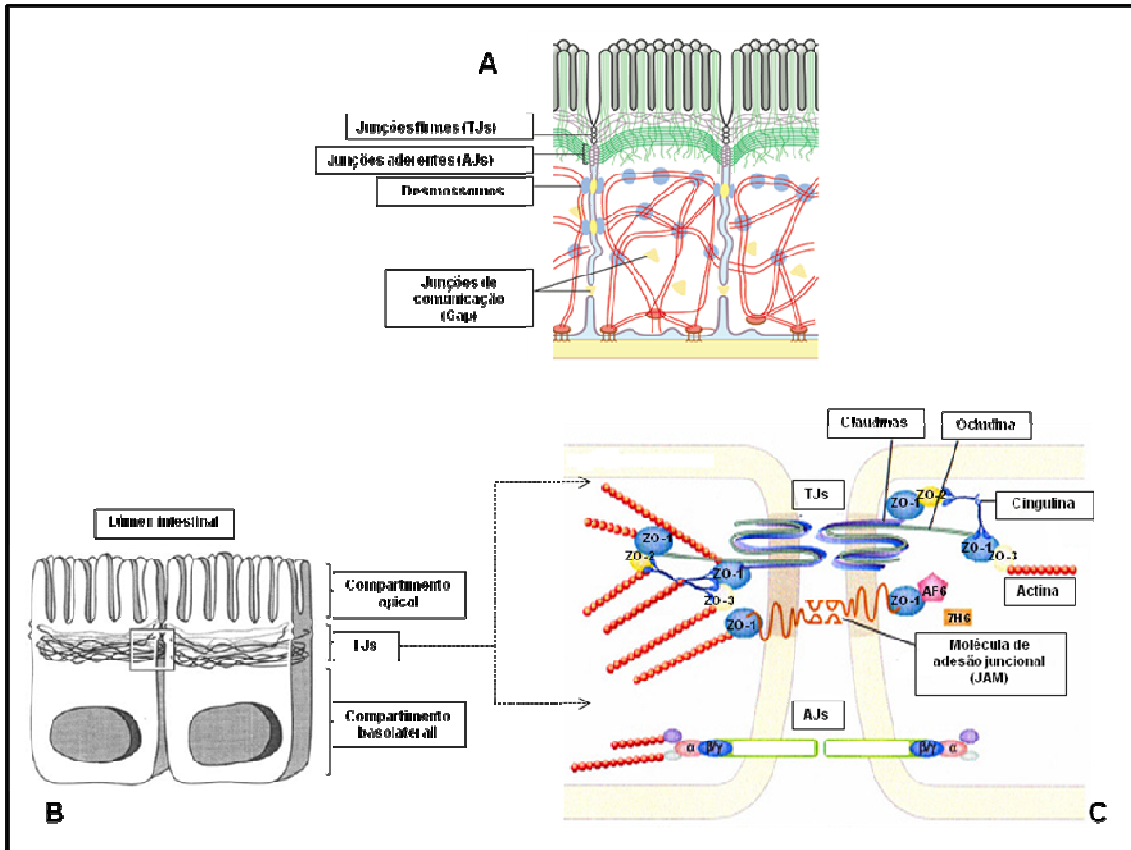


FIGURA 1 – Representação esquemática mostrando as junções intercelulares que unem enterócitos adjacentes, compostas pelas junções firmes (TJs), junções aderentes (AJs), desmossomos e junções de comunicação (Gap) (1A). As TJs delimitam os compartimentos apical e basolateral dos enterócitos e suas estruturas transmembranares formam longas ramificações, que circuncidam as células e interagem com estruturas similares de células vizinhas (1B). Representação esquemática do complexo protéico que compõe as TJs, incluindo as proteínas transmembrana ocludina, claudina e molécula de adesão junctional (JAM). Esse complexo inclui, ainda, várias proteínas citoplasmáticas, como as zonulinas (ZO), cingulina e 7H6 (1C).

Fonte: Chandran *et al.*, 2003 (1A); Anderson; Van Itallie, 1995 (1B); Huber; Egleton; Davis, 2001 (1C).

As evidências sobre a existência de outras proteínas componentes das TJs levou Furuse *et al.* (1998) a re-examinar as frações isoladas de fígado de galinha e detectar uma fração de 22kDa próxima à fração da ocludina. Duas seqüências peptídicas distintas foram obtidas, sendo denominadas de claudinas 1 e 2. As claudinas formam fibrilas e, à semelhança da ocludina, também apresentam a capacidade de interagir com as células vizinhas. Atualmente, vários outros tipos de claudinas têm sido descritos, sendo as claudinas 2 a 5 as mais encontradas no

intestino. Cada uma delas apresenta características seletivas de permeabilidade (FURUSE; SASAKI; TSUKITA, 1999; RAHNER; MITIC; ANDERSON, 2001).

Uma terceira proteína da membrana foi identificada por Martín-Padura *et al.* (1998). A molécula de adesão juncional (*junctional adhesion molecule* – JAM) apresenta um único domínio transmembrana e dois domínios extracelulares com pontes de enxofre, similar aos receptores das imunoglobulinas. Apesar de sua participação na adesão célula a célula ter sido descrita, sua função na barreira permanece desconhecida (FASANO; NATARO, 2004).

As zonulinas (ZO) constituem um complexo de proteínas citoplasmáticas ligadas às TJs. ZO-1 é a proteína periférica de membrana que tem ligação direta com a cadeia carboxi-terminal citoplasmática da ocludina e estudos sugerem que ela também apresenta ligação com o citoesqueleto através da espectrina (FURUSE *et al.*, 1994; ITOH *et al.*, 1993; STEVENSON *et al.*, 1986). Várias funções fisiológicas são atribuídas ao sistema zonulina, dentre elas a regulação do movimento de fluido, macromoléculas e leucócitos entre o lúmen intestinal e a corrente sanguínea e a proteção contra microorganismos (FASANO, 2001).

Outras proteínas citoplasmáticas, que interagem com o citoesqueleto de actina, têm sido implicadas na transdução de sinais e na adesão celular, embora suas funções específicas na regulação da permeabilidade das TJs permaneçam incertas. Dentre elas, destacam-se a cingulina, 7H6, proteínas ligantes de guanosina trifosfato (GTP) (Rab13 e Rab3B) e tirosino-quinases (c-Src e c-Yes) (TSUKITA *et al.*, 1991; WEBER *et al.*, 1994; ZAHRAOUI *et al.*, 1994; ZHONG *et al.*, 1993).

1.4 CLASSIFICAÇÃO DAS DOENÇAS DIARRÉICAS

Ainda não existe uma classificação única para as doenças diarréicas. Elas podem ser classificadas, de acordo com o grau dos sintomas, em leves, moderadas e severas (CHINA CDC, 2005). A presença de desidratação, que consiste na perda de 250mL/Kg/dia ou mais de água através das fezes, é um parâmetro importante na avaliação do grau da doença. Esse volume excede o volume total de plasma e fluido

intersticial e pode levar à morte, caso a terapia de reposição não seja instituída (CHINA CDC, 2005; KEUSCH *et al.*, 2006).

Quanto à etiologia, as doenças diarréicas podem ser divididas em infecciosas, quando existe a associação de um microorganismo patogênico, e não infecciosas. Estas podem ser subdivididas em alimentares (decorrentes da ingestão de alimentos não recomendados com conseqüente má-absorção dos nutrientes ingeridos), sintomáticas (resultantes da complicação de outras doenças), alérgicas (decorrentes de reações imunológicas em resposta a um alérgeno presente no alimento ingerido) e outras (todas as diarréias não infecciosas, que não se enquadram nos parâmetros mencionados anteriormente) (CHINA CDC, 2005).

A duração da doença é outro critério empregado na classificação. Considera-se como agudo o episódio diarréico com duração igual ou inferior a 14 dias. Episódios com duração superior a duas semanas são classificados como persistentes. Alguns autores denominam as diarréias persistentes de longa duração como crônicas. Não existe um consenso entre o intervalo de tempo para que uma doença diarréica passe a ser considerada como crônica, sendo as durações superiores a 30 e 60 dias os limites normalmente empregados (CHINA CDC, 2005; GUERRANT *et al.*, 2001).

1.5 CONSEQÜÊNCIAS DAS DOENÇAS DIARRÉICAS

Com o advento da TRO, os óbitos causados por diarréias agudas têm reduzido, entretanto os quadros diarréicos persistentes têm emergido como as principais causas de morbidade e mortalidade por doenças diarréicas (BHUTTA *et al.*, 2008; KOSEK; BERN; GUERRANT, 2003; LIMA *et al.*, 1992; 2000; LIMA; GUERRANT, 1992; MCAULIFFE *et al.*, 1986). As diarréias persistentes são responsáveis por aproximadamente metade do número total de óbitos causados por doenças diarréicas e, apesar de representarem somente 8 a 11% dos casos da doença, estão implicadas em 34 a 50% dos dias de diarréia (LIMA *et al.*, 2000; SCHORLING *et al.*, 1990b).

Nosso grupo de pesquisa, em parceria com a Universidade da Virgínia (UVa), vem realizando trabalhos de vigilância das doenças diarréicas na população infantil pobre da cidade de Fortaleza-CE desde 1978 e tem observado que as diarréias persistentes e algumas infecções entéricas específicas estão associadas com a ruptura da barreira intestinal, provocando alterações na sua função absorptiva e predispondo crianças a uma maior carga diarréica (GUERRANT, R. L. *et al.*, 1999; LIMA *et al.*, 2000; SCHORLING *et al.*, 1990a; STEINER *et al.*, 1998).

Em uma avaliação longitudinal prospectiva de 315 crianças provenientes de uma comunidade carente em Fortaleza, Ceará, nosso grupo observou que a desnutrição está associada a um maior risco para as doenças diarréicas. Cada queda do escore-z (desvio padrão) de peso-por-idade (*weight-for-age* – WAZ) ou altura-por-idade (*height-for-age* – HAZ), que avaliam o déficit do estado nutricional, é seguido por um aumento de 11,8 a 12,5% no número de episódios diarréicos/criança/ano e um aumento de 15 a 17% em número de dias de diarréia, mesmo quando controlado por idade e incidência anterior de diarréia pela regressão linear de Poisson (MOORE *et al.*, 2000). Por sua vez, as doenças diarréicas, principalmente os quadros diarréicos persistentes, estão associadas com um maior risco para a desnutrição e um aumento na freqüência e duração de novos episódios diarréicos em crianças (GUERRANT *et al.*, 1992b; 2002b; 2008; KOSEK; BERN; GUERRANT, 2003; LIMA *et al.*, 1992; 2000; SCHORLING *et al.*, 1990a). Os efeitos dessas enfermidades no subsequente estado nutricional, bem como o efeito do estado nutricional anterior na freqüência e duração da doença têm sido documentados por diversos autores, demonstrando, assim, a importância do ciclo vicioso das diarréias e da desnutrição na população infantil (ALASFOOR *et al.*, 2007; BLACK; BROWN; BECKER, 1984; HUMPHREY, 2008; WEISSTAUB; ARAYA, 2008).

Outra importante descoberta do nosso grupo é o impacto a longo prazo das doenças diarréicas e infecções entéricas na população infantil. A ocorrência de diarréias persistentes e de algumas infecções entéricas assintomáticas nos primeiros anos de vida pode prejudicar o crescimento da criança, bem como seu desenvolvimento físico e cognitivo.

O primeiro estudo a longo prazo realizado observou a aptidão física e a função cognitiva de crianças na faixa etária entre seis e nove anos, que foram acompanhadas durante os primeiros dois anos de vida. O teste de Harvard mostrou um decréscimo na aptidão física correlacionado diretamente com o número total de episódios de diarreia nos primeiros dois anos de vida. Na análise preliminar da função cognitiva, utilizando testes apropriados, como o *McCarthy Draw-A-Design*, *Wechsler Intelligence Scales for Children* e o *Backward Digit Span Test*, pontuações significativamente menores foram observadas em crianças com elevadas taxas de episódios diarreicos nos dois primeiros anos de vida, ocorridos quatro a sete anos antes da realização dos testes (GUERRANT, D. I. *et al.*, 1999).

Com o aprofundamento desse trabalho inicial, os autores observaram uma associação altamente significativa entre as doenças diarreicas no início da infância e o crescimento linear da criança, determinado pelo escore HAZ. Episódios de diarreia persistente nos primeiros dois anos de vida mostraram ter associação com um déficit de crescimento de 1,5 a 4cm aos 4 a 6 anos de idade nessas crianças (MOORE *et al.*, 2001).

Estudos complementares demonstraram que a idade de início da criança na escola e a idade por ano escolar são significativamente atrasadas pelas doenças diarreicas no início da infância. Estes achados confirmam os prejuízos causados pela ocorrência de diarreias no início da vida, uma vez que tais parâmetros de rendimento escolar são utilizados pelos economistas para prever a produtividade econômica (GUERRANT *et al.*, 2002b).

Trabalhos complementares do nosso grupo e de outras equipes de pesquisa confirmaram os prejuízos nos índices antropométricos, na função cognitiva e no rendimento escolar das crianças após a ocorrência de doenças diarreicas no início da infância (AGNEW *et al.*, 1998; BERKMAN *et al.*, 2002; BUSHEN *et al.*, 2007; CHECKLEY *et al.*, 1997; 1998; 2002; 2003; LORNTZ *et al.*, 2006; LUNN, 2000; MOORE *et al.*, 2007; NEWMAN *et al.*, 2001; NIEHAUS *et al.*, 2002; PATRICK *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2008; SCHORLING; GUERRANT, 1990; WALKER *et al.*, 2007). Dados de um período de 20 anos de avaliação diária de crianças de cinco países ratificaram a influência dos episódios diarreicos no crescimento infantil. A

possibilidade de ocorrência (*odds ratio*) de nanismo aos 24 meses de idade aumentou significativamente com cada episódio diarréico e com cada dia de diarreia ocorrido nos dois primeiros anos de vida (CHECKLEY *et al.*, 2008).

Pelo menos dois mecanismos têm sido propostos na tentativa de explicar as conseqüências das diarreias persistentes ocorridas no início da vida. A atrofia parcial das vilosidades intestinais, caracterizada por redução no número e comprimento das microvilosidades, alterações nas bordas dos enterócitos, perda do glicocálice e encurtamento dos vilos, reduziria a digestão e absorção da lactose e provavelmente de outros nutrientes (BARBOZA JR. *et al.*, 1999; FAGUNDES-NETO *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 1997). Alternativamente, os danos à função de barreira da mucosa permitiriam a passagem de macromoléculas para a mucosa e o sangue, ativando uma resposta imune local e sistêmica com conseqüentes mecanismos inflamatórios (LIMA *et al.*, 1997). A redução na absorção de nutrientes e/ou a ocorrência de inflamação intestinal prolongadas poderiam ocasionar o dano ao desenvolvimento da criança a longo prazo (LUNN *et al.*, 2000).

Essa relevância da integridade do TGI nos primeiros anos de vida tem sido descrita por vários autores. Como outras espécies de animais, principalmente mamíferos, os seres humanos apresentam expressivo desenvolvimento cerebral e formação de sinapses durante os primeiros dois anos após o nascimento (DOBBING, 1984; 1985; 1990; DOBBING; SANDS, 1981; 1985; KATZ; DAVIES; DOBBING, 1982; PETRI JR. *et al.*, 2008). Dessa forma, a absorção de nutrientes nessa fase da vida é essencial para garantir o crescimento e desenvolvimento do corpo, cérebro e das sinapses neuronais que determinam a capacidade humana (PETRI JR. *et al.*, 2008). O atraso no tempo de formação das sinapses pode ser irreversível (DOBBING, 1990).

1.6 ETIOLOGIA DAS DOENÇAS DIARRÉICAS

Para ser um agente etiológico de doenças diarréicas, um microorganismo precisa ter as capacidades de ser transmitido das fezes de um indivíduo infectado para a boca de outro e de sobreviver no pH ácido estomacal. Além disso, um patógeno entérico deve ser um bom colonizador, ser hábil na competição por

nutrientes e ser capaz de interagir com as células intestinais para induzir a secreção de água e eletrólitos (FASANO, 1999; FASANO; NATARO, 2004; KEUSCH *et al.*, 2006).

Uma variedade de microorganismos, tais como bactérias, parasitas e vírus, preenchem estes requisitos e está associada com a etiologia das doenças diarréicas. Eles diferem na rota entre as fezes e a boca e no número de microorganismos necessários para causar infecção e doença. Alguns não são adaptados para infectar um hospedeiro específico, podendo causar doença em humanos e animais, inclusive os domésticos, o que facilita a transmissão para o homem (DHAMA *et al.*, 2008; KEUSCH *et al.*, 2006; RWEGO *et al.*, 2008). A frequência de isolamento desses agentes varia de acordo com a localização geográfica, nível sócio-econômico (países desenvolvidos e subdesenvolvidos), idade, estado imunológico, tempo de aleitamento materno, diferentes estações do ano, urbanização e, até mesmo, dentro de uma população. A técnica diagnóstica empregada e o local de coleta (comunidade ou hospital) também influenciam na frequência de associação dos diferentes enteropatógenos como causa de diarréia (KEUSCH *et al.*, 2006; PETRI JR. *et al.*, 2008).

Nos países desenvolvidos, a grande maioria dos episódios diarréicos é causada por agentes virais, que apresentam características sazonais. Alguns autores sugerem a possibilidade de transmissão desses agentes através de fômites e secreções respiratórias (FRAGOSO; KUMAR; MURRAY, 1986; PODEWILS *et al.*, 2004; PARASHAR *et al.*, 1998). Nos países em desenvolvimento, as bactérias e parasitas são mais prevalentes, sendo o primeiro grupo mais comum, embora evidências sugiram o aumento da importância dos agentes virais entéricos nesses países. Em virtude das condições higiênico-sanitárias, crianças de países em desenvolvimento são expostas muito cedo a uma ampla variedade de patógenos entéricos, principalmente os bacterianos, sofrendo vários episódios diarréicos como resultado dessa exposição (PODEWILS *et al.*, 2004).

Inúmeros microorganismos são facilmente transmitidos por via oro-fecal e são descritos como agentes etiológicos das doenças diarréicas. Os principais patógenos bacterianos causadores de diarréia são *Escherichia coli*, *Shigella* spp.,

Campylobacter spp., *Vibrio* spp., e *Salmonella* spp.. Dentre as causas parasitárias podemos citar *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba histolytica* e *Cyclospora cayetanensis*. Rotavírus, norovírus e sapovírus são os principais vírus associados com diarreia. Outros vírus entéricos são também importantes nesta etiologia, tais como coronavírus, torovírus e enterovírus. Enteropatógenos como *Entamoeba dispar*, *Vibrio* spp., *Yersinia* spp., *Listeria* spp. e *Clostridium* spp. são reportados em menor frequência (BROOKS *et al.*, 2006; GHOSH *et al.*, 1990; GUERRANT *et al.*, 1983; GUY; XIAO; HORGEN, 2004; HUNTER *et al.*, 2004; MANDOMANDO *et al.*, 2007; MORENO *et al.*, 2008; NATARO *et al.*, 2006; NIANGUÉ-BEUGRÉ *et al.*, 2006; PARKS *et al.*, 1999; PODEWILS *et al.*, 2004; PONTUAL *et al.*, 2006; SAMIE *et al.*, 2006a; 2006b; 2007a; 2007b; 2008; SAXENA; MITTON; POLLOK, 2008; SCHORLING *et al.*, 1990b; SHERMAN; TARR, 2005; STEINER; THIELMAN; GUERRANT, 1997; SULIK *et al.*, 2007; TALAL *et al.*, 2000; VARGAS *et al.*, 2004; VERNACCHIO *et al.*, 2006).

Como descrito acima, nosso grupo de pesquisas tem concentrado seus trabalhos no estudo de quadros diarreicos persistentes. Os trabalhos realizados desde 1989 têm revelado, além do impacto dessas patologias na população estudada, os agentes etiológicos, que são distintos dos patógenos associados com as diarreias agudas. As principais etiologias de diarreia persistente encontradas em nosso meio são *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *Cryptosporidium* spp. e *Giardia lamblia*, ao contrário dos casos agudos, em que predominam *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), rotavírus e torovírus (FANG *et al.*, 1995; KOOPMANS *et al.*, 1997; LIMA *et al.*, 1992; LIMA; GUERRANT, 1992; NEWMAN *et al.*, 1994; 1999). Essa diferença entre os microorganismos causadores de diarreias agudas e persistentes tem sido descrita por outros autores em diferentes partes do mundo (MANRIQUE-ABRIL *et al.*, 2006; MARANHÃO *et al.*, 2008; PETRI JR. *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2002; THAPAR; SANDERSON, 2004)

Atualmente, inúmeros trabalhos relatam a relevância de amostras de *E. coli* patogênicas entre casos diarreicos em todo o mundo (BUERIS *et al.*, 2007; COHEN *et al.*, 2005; FERRAZ, 2003; GUION *et al.*, 2008; HUNTER, 2003; MOSSORO *et al.*, 2002; OKEKE *et al.*, 2000b; PRESTERL *et al.*, 2003; SCALETSKY

et al., 2002; SCHULTSZ *et al.*, 2000; SPANO *et al.*, 2008; TORNIEPORTH *et al.*, 1995; VALENTINER-BRANTH *et al.*, 2003; VARGAS *et al.*, 1998).

1.7 *Escherichia coli*

E. coli é um bacilo Gram-negativo, móvel, membro da família *Enterobacteriaceae*, tribo e gênero *Escherichia* (**FIGURA 2**) (BETTELHEIM *et al.*, 1994; KONEMAN *et al.*, 2001). A utilização de meios seletivos, que inibem o crescimento de bactérias Gram-positivas e algumas Gram-negativas exigentes, e a incubação a 37°C, sob atmosfera aeróbia, permitem o crescimento seletivo dos membros dessa família a partir de amostras fecais e sua diferenciação morfológica. A identificação final exige etapas adicionais, como testes bioquímicos e sorologia (KONEMAN *et al.*, 2001).

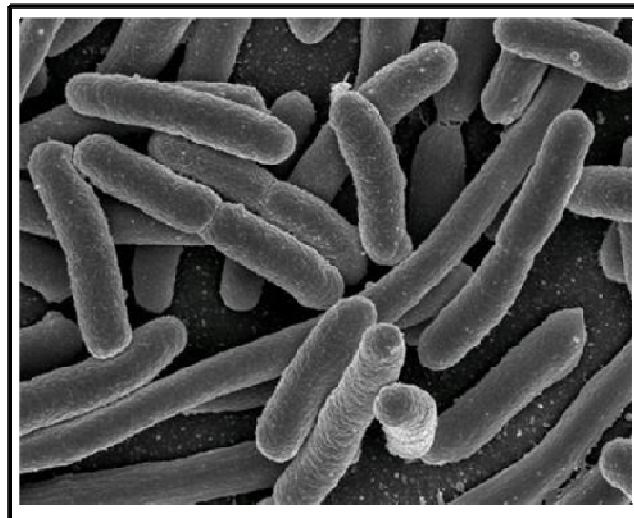


FIGURA 2 – Micrografia eletrônica de varredura de *E. coli* em cultura, mostrando sua morfologia em bacilo.

Fonte: Rocky Mountain Laboratories, NIAID, NIH, 2008.

O microorganismo foi descrito pela primeira vez pelo pediatra alemão Theodor Escherich, em 1884, que observou a presença do bacilo e de outros microorganismos ao examinar fezes humanas em microscópio durante um estudo de 15 meses. Escherich denominou o bacilo de *Bacterium coli commune* (bacilo comum do cólon) e provavelmente não imaginou a complexidade do microorganismo que ele

acabara de descobrir (KHAN; STEINER, 2002; SHULMAN; FRIEDMANN; SIMS, 2007). Atualmente, *E. coli* é a espécie bacteriana mais comumente isolada nos laboratórios clínicos (KONEMAN *et al.*, 2001).

A bactéria coloniza o TGI humano dentro de horas após o nascimento e lá permanece durante toda a vida do indivíduo em uma relação de benefícios para ambos (DRASAR; HILL, 1974). O bacilo é altamente competidor no seu nicho comensal, a camada mucóide das células colônicas, compreendendo o microorganismo anaeróbio facultativo predominante na microbiota intestinal humana. Trabalhos com *E. coli* foram pioneiros no campo da genética bacteriana e, apesar do grande número de estudos genéticos e fisiológicos realizados com essa espécie, os mecanismos que garantem o sucesso dessa relação ainda são pouco compreendidos (DONNENBERG, 2000; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; NATARO; KAPER, 1998). Uma hipótese sugerida por Sweeney *et al.* (1996) é que a *E. coli* utilizaria o gliconato presente no cólon de maneira mais eficiente quando comparada aos outros microorganismos, o que daria a essa espécie uma vantagem nutricional em relação às outras.

Cepas comensais de *E. coli* permanecem, em geral, confinadas ao lúmen intestinal e raramente causam doenças, exceto em indivíduos imunocomprometidos ou nos casos em que há lesão da barreira gastrointestinal, como na peritonite, por exemplo. Entretanto, alguns clones de *E. coli* altamente adaptados têm adquirido fatores de virulência específicos, que os conferem uma elevada capacidade de adaptação a novos nichos e lhes permitem causar um amplo espectro de doenças (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; NATARO; KAPER, 1998). Esses fatores de virulência podem ser adquiridos através de elementos genéticos transmissíveis de uma célula para outra, como transposons, plasmídeos, bacteriófagos e ilhas de patogenicidade. Tais elementos genéticos podem permanecer separados do ácido deoxirribonucléico (*deoxyribonucleic acid* – DNA) cromossomal bacteriano ou podem integrar-se a ele. Somente algumas combinações de fatores de virulência persistem e tornam-se patótipos específicos de *E. coli* capazes de causar doença em indivíduos saudáveis (DONNENBERG, 2000; FASANO, 2002; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

E. coli é reconhecida como um patógeno entérico desde 1898, quando se observou a aglutinação do soro de pacientes com diarreia na presença de isolados do microorganismo de outros pacientes durante o mesmo surto. A mesma reação não foi observada nos pacientes sem diarreia (KHAN; STEINER, 2002). A infecção por *E. coli* patogênica pode permanecer restrita à superfície da mucosa ou disseminar-se por todo o corpo, resultando em três tipos de síndromes clínicas: doença diarreica, infecção do trato urinário e sepse/meningite. *E. coli* uropatogênica (UPEC) é o tipo mais comum de *E. coli* extra-intestinal (ExPEC), embora tenha sido observado um crescimento na importância do patótipo associado à meningite e sepse (MNEC) nos últimos anos (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; NATARO; KAPER, 1998). A participação de *E. coli* em infecções nosocomiais também tem sido descrita (ALY; AL-MOUSA; AL ASAR, 2008). Quatro tipos de *E. coli* patogênicas intestinais foram descritas no início da década de 80:

1. *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) – associada à diarreia dos viajantes, é caracterizada por uma diarreia aquosa, com câimbras abdominais leves, acompanhadas ou não por vômitos e desidratação;
2. *E. coli* enteropatogênica (EPEC) – responsável por diarreia com grande quantidade de muco, pouco sangue, febre baixa, mal-estar e vômitos, que geralmente ocorre em crianças;
3. *E. coli* enteroinvasora (EIEC) – disenteria caracterizada por febre, colite, tenesmo, sangue, muco e leucócitos fecais;
4. *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) – caracterizada por diarreia sanguinolenta com leucócitos e dor abdominal, que pode evoluir para síndrome hemolítico-urêmica (dano renal agudo, trombocitopenia e anemia hemolítica microangiopática) (HUANG *et al.*, 2004; KONEMAN *et al.*, 2001).

Com o desenvolvimento do teste de aderência em células humanas, descrito abaixo, dois novos patótipos foram descritos: *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC) (NATARO *et al.*, 1987).

EAEC tem sido cada vez mais reconhecida como agente etiológico de diarreia infantil, principalmente em quadros persistentes (NATARO; KAPER, 1998). Nas próximas seções serão abordados temas relacionados à EAEC, incluindo o histórico da descrição da bactéria e de sua associação com o desenvolvimento de

diarréia, epidemiologia, o papel dos fatores de virulência descritos, fisiopatologia, manifestações clínicas, diagnóstico e caracterização das cepas.

1.8 *Escherichia coli* ENTEROAGREGATIVA (EAEC)

1.8.1 Histórico

Em 1979, Cravioto *et al.* relataram a adesão de cepas de EPEC à cultura de células derivadas de carcinoma laríngeo humano (HEp-2) e a utilidade de tal característica na diferenciação desse tipo de *E. coli*. Alguns anos depois, Scaletsky, Silva e Trabulsi (1984) e Nataro *et al.* (1985), utilizando células derivadas de carcinoma cervical humano (HeLa), além de HEp-2, observaram que cepas de *E. coli* não-EPEC também aderiam à monocamada celular, porém apresentando um padrão de aderência distinto. Enquanto as cepas de EPEC apresentavam um padrão de aderência localizado (LA), denotando a presença de micro-colônias na superfície celular, as cepas não-EPEC aderiam difusamente por toda a superfície da monocamada de células (**FIGURA 3**). No mesmo ano, Mathewson *et al.* (1985) reportaram a associação de cepas não-EPEC aderentes às monocamadas de células HEp-2, então denominadas *E. coli* enteroaderentes, com doença diarréica em adultos viajando pelo México. Outro trabalho do grupo demonstrou a capacidade de uma dessas cepas de causar diarréia em adultos voluntários (MATHEWSON *et al.*, 1986).

Nataro *et al.* (1987) analisaram os padrões de aderência de cepas de *E. coli* isoladas a partir das fezes de 154 crianças com diarréia e 66 controles provenientes do Chile. Os autores observaram diferenças no padrão de aderência das cepas não-EPEC, dividindo o fenótipo difuso em duas categorias: agregativa e difusa verdadeira. As cepas com aderência agregativa (AA), designadas *E. coli* enteroaderente-agregativas, foram caracterizadas por uma auto-aglutinação bacteriana tanto na superfície da monocamada celular quanto na superfície de vidro utilizada como suporte para o crescimento das células HEp-2, com uma configuração semelhante a “tijolos empilhados”. Por sua vez, a aderência difusa verdadeira (DA) foi designada como a aderência bacteriana difusa sobre toda a superfície da monocamada celular, com pouca agregação e pouca aderência à

lâmina de vidro (**FIGURA 3**). Além da divisão em duas categorias, esse estudo detectou cepas agregativas com maior freqüência no grupo dos casos quando comparado aos controles (33% *versus* 15%, $p < 0,0002$), sendo o primeiro trabalho a propor que EAEC poderia ser um microorganismo patogênico. Cepas de DAEC não foram associadas com diarréia nesse estudo. Simultaneamente, Mathewson *et al.* (1987), ao analisar um grupo caso-controle de crianças mexicanas, sugeriram que *E. coli* enteroaderente seria um importante enteropatógeno pediátrico. Um ano depois, Vial *et al.* (1988) demonstraram que as cepas de *E. coli* enteroaderentes estudadas pelo grupo de Mathewson apresentavam os mesmos padrões de aderência (AA e DA) descritos por Nataro.

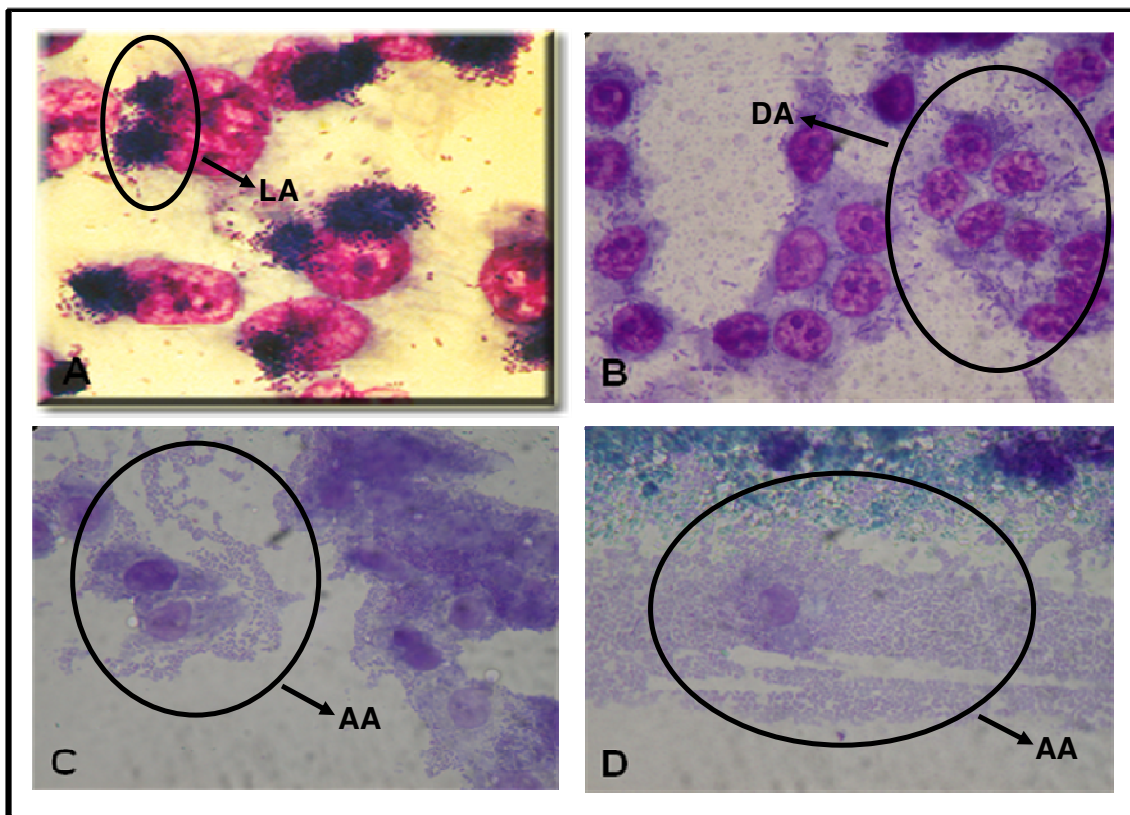


FIGURA 3 – Padrões de aderência de *E. coli* em células HEp-2. Padrão de aderência localizado (LA), com a presença de micro-colônias na superfície celular, característico de *E. coli* enteropatogênica (EPEC) (1A); aderência bacteriana difusa (DA) sobre toda a superfície da monocamada celular, com pouca agregação e pouca aderência à lâmina de vidro, de *E. coli* difusamente aderente (DAEC) (1B); configuração em “tijolos empilhados” (AA) característica de *E. coli* enteroagregativa (EAEC), com auto-aglutinação bacteriana nas superfícies da monocamada celular e do vidro utilizado como suporte para o crescimento das células HEp-2 (1C e 1D).
Fonte: Campos; Franzolin; Trabulsi, 2004 (1A); Ila Fernanda Nunes Lima (1B, 1C e 1D).

Atualmente, os termos enteroaderente e enteroaderente-agregativa foram substituídos pelos termos específicos “enteroagregativa” e “difusamente aderente” (NATARO; KAPER, 1998).

1.8.2 Morbidade

A inconsistência de associação entre EAEC e diarreia no final da década de 80 e início dos anos 90 gerou dúvidas quanto à sua função como patógeno humano (OKEKE; NATARO, 2001). Enquanto alguns autores da época reportaram a associação entre a presença da bactéria e a doença (BHAN *et al.*, 1989abcd; BHATNAGAR *et al.*, 1993; BOUZARI *et al.*, 1994; CRAVIOTO *et al.*, 1991; FANG *et al.*, 1995; JALLAT *et al.*, 1993), outros encontraram percentuais semelhantes de prevalência do microorganismo entre crianças doentes e saudáveis (ALBERT *et al.*, 1995; BAQUI *et al.*, 1992; ECHEVERRIA *et al.*, 1992; GOMES; BLAKE; TRABULSI, 1989; MAGALHÃES *et al.*, 1992; MORELLI *et al.*, 1994). De acordo com Law e Chart (1998), a discrepância entre os resultados poderia ser explicada pela variação geográfica na distribuição do microorganismo, pelo emprego de diferentes técnicas diagnósticas e devido a fatores do hospedeiro, como idade e estados nutricional e imunológico. Outra hipótese sugerida pelos autores seria a existência de cepas avirulentas de EAEC, sendo que somente algumas cepas específicas seriam capazes de causar doença. A realização de um estudo com voluntários que ingeriram quatro cepas diferentes de EAEC mostrou que apenas uma delas era capaz de causar diarreia, confirmando a heterogeneidade desse grupo bacteriano (NATARO *et al.*, 1995).

Atualmente, EAEC é um reconhecido enteropatógeno causador de diarreia infantil persistente em países em desenvolvimento, contexto no qual sua patogênese foi originalmente definida (OKEKE; NATARO, 2001). Inúmeros autores têm relatado a associação do microorganismo com quadros diarréicos com duração superior a 14 dias (BARDHAN *et al.*, 1998; GEYID; OLSVIK; LJUNGH, 1998; KOOPMANS *et al.*, 1997). Segundo Henry *et al.* (1992), a identificação de EAEC nas fezes no início da diarreia é preditivo do prolongamento do episódio.

Como a maioria dos trabalhos precursores que identificaram EAEC como agente etiológico diarréico foi realizada em países em desenvolvimento, a idéia inicial era de que esse patógeno somente era encontrado em tais países (OKEKE; NATARO, 2001). Entretanto, a bactéria tem sido cada vez mais associada com a doença em países desenvolvidos, estando relacionada especialmente com casos agudos e surtos em crianças e adultos (HUANG *et al.*, 2006; NATARO *et al.*, 2006; SCAVIA *et al.*, 2008). No maior surto até então reportado, 2697 crianças japonesas estudantes de 16 escolas diferentes apresentaram diarréia aguda severa após ingestão de merenda escolar contaminada (ITOH *et al.*, 1997). A ocorrência de diarréia aguda causada por EAEC também tem sido descrita em países em desenvolvimento (BUERIS *et al.*, 2007; MORENO *et al.*, 2008; PEREIRA *et al.*, 2007; PIVA *et al.*, 2003; PRESTERL *et al.*, 2003; SCALETISKY *et al.*, 2002). Smith *et al.* (1994) testaram 113 cepas de *E. coli* isoladas a partir de amostras fecais de adultos com diarréia, coletadas em diferentes países durante 25 anos de estudos. Os autores observaram que 85 delas apresentaram padrão de AA em células HEp-2 e hibridizaram com sondas específicas para esse fenótipo. Das 85 cepas de EAEC identificadas nesse trabalho, 36 foram isoladas de casos esporádicos e 49 de nove surtos diarréicos. Além disso, EAEC tem sido identificada em casos de diarréia de viajantes de países desenvolvidos para países subdesenvolvidos e pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (ADACHI *et al.*, 2002; BOUCKENOOGHE *et al.*, 2000; BROOK *et al.*, 1994; DURRER *et al.*, 2000; GÁSCON *et al.*, 1998; HUANG *et al.*, 2007; JIANG *et al.*, 2002; MAYER; WANKE, 1995; POLOTSKY *et al.*, 1997; SAMIE *et al.*, 2007b; VARGAS *et al.*, 1998; VILA *et al.*, 2000; WANKE *et al.*, 1998).

Em Fortaleza, EAEC é a principal bactéria causadora de diarréia persistente na infância, como demonstrado pelo trabalho realizado por Lima *et al.* (2000). Entretanto, o bacilo foi encontrado em proporções similares entre casos (diarréia aguda e persistente) e controles. Em um estudo caso-controle com crianças abaixo de cinco anos publicado no mesmo ano, na Tanzânia, também não houve associação do microorganismo com doença (GÁSCON *et al.*, 2000). Apesar de ser claramente associada com diarréia em alguns indivíduos, em outros, esse microorganismo parece causar apenas infecção sub-clínica ou colonização intestinal. Segundo Steiner *et al.* (1998), crianças com infecções sintomáticas e, até

mesmo assintomáticas, causadas por EAEC podem apresentar inflamação intestinal e prejuízos ao desenvolvimento.

Uma pesquisa realizada em hospitais americanos detectou EAEC como o agente bacteriano mais comum de diarreia e significativamente associado com a doença ($p < 0,02$). O microorganismo causou doença em pacientes de todas as idades (NATARO *et al.*, 2006). Em 798 crianças com diarreia atendidas em hospitais alemães, EAEC representou 9,5% de todos os patógenos bacterianos identificados e não foi diagnosticada em nenhuma das crianças do grupo controle. A idade média das crianças infectadas pelo bacilo foi de 15 meses (HUPPERTZ *et al.*, 1997). Entre crianças africanas, a diarreia causada por EAEC foi mais comum na faixa etária entre seis e 24 meses (PRESTERL *et al.*, 2003). Um estudo caso-controle realizado com crianças nigerianas com até cinco anos de idade obteve uma prevalência do microorganismo de 39% entre os casos e 27,7% entre os controles ($p < 0,04$). Quando estratificado por idade, EAEC foi significativamente mais isolado de casos em crianças com mais de seis meses. Todas as crianças com idade superior a 15 meses em que EAEC foi detectada pertenciam ao grupo dos casos (OKEKE *et al.*, 2000a).

1.8.3 Fatores de Virulência

Os mecanismos através dos quais EAEC causa diarreia não são completamente compreendidos, entretanto, muitos genes relacionados à virulência do microorganismo têm sido descritos (PIVA *et al.*, 2003).

1.8.3.1 Adesão

A aderência agregativa à mucosa intestinal é o primeiro passo na infecção por EAEC. Inúmeros fatores de virulência têm sido associados com a capacidade de adesão de EAEC (HUANG *et al.*, 2004).

Nataro *et al.* (1992), empregando técnicas genéticas que permitiram o desenvolvimento de cepas mutantes, clonaram um fragmento de 12Kb do plasmídeo de 65MDa (designado plasmídeo AA ou pAA), que confere o fenótipo AA à EAEC,

previamente descrito por Savarino *et al.* (1991) e Vial *et al.* (1988). O fragmento foi clonado da cepa protótipo de EAEC 17-2, isolada de uma criança com diarreia aquosa no Chile, e foi introduzido na cepa de *E. coli* não aderente HB101. A análise da cepa mutante através de microscopia eletrônica identificou a presença de uma estrutura fimbrial flexível, de cerca de 2nm de diâmetro, denominada fímbria de aderência agregativa I (*aggregative adherence fimbriae I* – AAF/I). Pesquisas *in vitro* demonstraram o papel de AAF/I na aderência agregativa em células HEP-2, na auto-aglutinação bacteriana em caldo de cultura e na atividade de hemaglutinação de eritrócitos humanos (NATARO *et al.*, 1992). Estudos posteriores identificaram duas regiões plasmidiais, separadas por um intervalo de 9Kb de DNA, responsáveis pela síntese de AAF/I na cepa 17-2. A região um contém os genes necessários para a síntese e montagem, incluindo a subunidade estrutural da fímbria. A região dois codifica um ativador transcricional de AAF/I, denominado de regulador da aderência agregativa de EAEC (*EAEC aggregative adherence regulator* – *aggR*), que mostrou homologia com outros genes reguladores positivos da expressão de fímbrias em *E. coli*. Adesão, auto-aglutinação e hemaglutinação somente foram observadas quando ambas as regiões estavam presentes na mesma bactéria (NATARO *et al.*, 1993; 1994; SAVARINO *et al.*, 1994).

No ano seguinte, a cepa 17-2 mostrou-se avirulenta, por não causar diarreia em um estudo com adultos voluntários. Nesse estudo, somente a cepa de EAEC O42 foi capaz de causar a doença e sua análise por microscopia eletrônica e hibridização revelou que ela não expressava AAF/I (NATARO *et al.*, 1995). Czeczulin *et al.* (1997) reportaram que apenas uma minoria das cepas de EAEC expressava AAF/I e identificaram uma segunda fímbria de aderência agregativa (*aggregative adherence fimbriae II* – AAF/II), distinta morfológica e geneticamente de AAF/I. Apesar de também ser codificada em duas regiões distintas do plasmídeo e de ter sua expressão controlada pelo gene *aggR*, AAF/II mostrou-se uma fibra rígida de 5nm de diâmetro e a seqüência de DNA de sua subunidade estrutural apresentou apenas 25% de identidade com a subunidade estrutural de AAF/I. Harrington *et al.* (2005) reportaram a liberação de IL-8 de células epiteliais intestinais causada por algum componente fimbrial da cepa O42, sugerindo uma participação da adesina na

resposta inflamatória causada por EAEC. A **Figura 4** mostra os dois tipos de fímbrias expressos pelas cepas de EAEC.

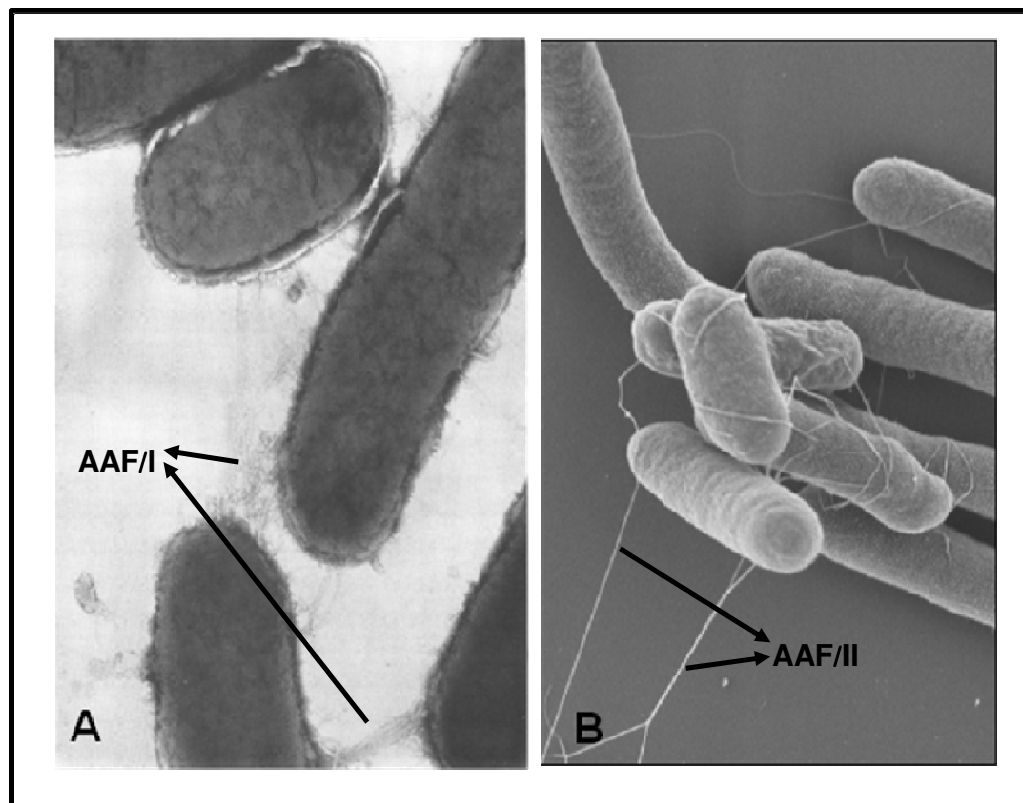


FIGURA 4 – Fotomicrografia de transmissão eletrônica mostrando as fímbrias de aderência agregativa AAF/I, estrutura fimbrial flexível de cerca de 2nm de diâmetro (4A), e AAF/II, fibra rígida de 5nm de diâmetro (4B), entre as EAECs.

Fonte: Nataro *et al.*, 1992 (4A); Okeke; Nataro, 2001 (4B).

A identificação do fenótipo agregativo em cepas de EAEC que não produziam estruturas fimbriais características ou que não hibridizavam com sondas específicas sugeriu a presença de fatores de adesão adicionais (BAUDRY *et al.*, 1990; DEBROY *et al.*, 1994; KNUTTON *et al.*, 1992; YAMAMOTO *et al.*, 1991). Debroy *et al.* (1995) sugeriram a associação de uma proteína da membrana externa, expressa na presença do plasmídeo AA, com a aderência de EAEC. Wai, Takade e Amako (1996) reportaram uma única proteína da membrana externa, com 38kDa, que apresentou função importante na aderência agregativa das cepas de EAEC estudadas. Monteiro-Neto *et al.* (2003) identificaram uma proteína plasmidial da

membrana externa de EAEC O111:H12, com 58kDa, que denominaram Ap58, associada com as capacidades de aderência e hemaglutinação. Apesar da descrição de fatores de aderência não fimbriais, estudos genéticos têm sido realizados somente com as AAFs. Recentemente, duas outras fímbrias de aderência agregativa (*aggregative adherence fimbriae* III – AAF/III e *aggregative adherence fimbriae* IV – AAF/IV) foram descritas (BERNIER; GOUNON; LE BOUGUÉNEC, 2002; BOISEN *et al.*, 2008).

1.8.3.2 Dispersão

A capacidade de adesão representa um passo fundamental na virulência de EAEC, entretanto mecanismos patogênicos adicionais são requeridos para o desenvolvimento dos sintomas diarreicos (LAW; CHART, 1998).

Outro fator de virulência importante na infecção causada por EAEC é a dispersina. Czeuczulin *et al.* (1999) reportaram a existência de um gene localizado na seqüência imediatamente anterior à do gene *aggR* no plasmídeo AA e o denominaram de proteína secretada U de EAEC (EAEC *secreted protein U* – *aspU*). Embora não soubessem a função dessa proteína, o gene *aspU* foi detectado em 80% das cepas de EAEC testadas. Em 2002, Sheikh *et al.* caracterizaram esse gene, descrevendo a proteína de baixo peso molecular secretada (10,2kDa), imunogênica, que também tem sua codificação regulada pelo gene *aggR*. De acordo com os autores, a proteína reveste a superfície bacteriana e permanece associada a ela através de ligações não-covalentes, promovendo sua dispersão pela mucosa intestinal, estabelecendo novos focos de infecção e, conseqüentemente, facilitando a colonização. O mecanismo proposto para essa dispersão inclui a neutralização da carga altamente hidrofóbica das fímbrias de aderência agregativa (*aggregative adherence fimbriae* – AAFs). Essa hidrofobicidade favoreceria a auto-aglutinação da bactéria em ambiente aquoso. A análise através de microscopia eletrônica revelou alterações morfológicas nas AAFs na ausência da proteína de baixo peso molecular. Cepas mutantes exibiram elevado padrão de agregação em cultura de células e na superfície da mucosa intestinal. Em virtude desse fenótipo, os autores renomearam o gene de proteína anti-agregação de EAEC (EAEC *anti-aggregation protein* – *aap*) e denominaram a proteína secretada de dispersina. Velarde *et al.* (2007) analisaram a estrutura da dispersina e sugeriram que sua ligação não-covalente com EAEC

ocorre através do lipopolissacarídeo bacteriano e confirmaram sua função de neutralização da atração eletrostática entre as AAFs e a superfície bacteriana.

A regulação única da expressão de dois fatores de colonização foi considerada comum pelos autores, entretanto o uso do mesmo regulador para expressar tanto as adesinas quanto um modulador negativo de adesão foi considerado intrigante (SHEIKH *et al.*, 2002). Estudos posteriores revelaram que a dispersina é secretada no espaço periplasmático e seu transporte através da membrana bacteriana externa é realizado por um complexo transportador da família de proteínas transportadoras ABC, que também é codificado em uma região plasmidial sob controle do gene *aggR*. Essa região, denominada *aat-P ABCD*, inclui cinco genes, dentre os quais se destacam uma permease da membrana interna (*aatP*), uma proteína de ligação à adenosina trifosfato (ATP) (*aatC*) e uma proteína da membrana externa semelhante à *ToIC* (*aatA*) (NISHI *et al.*, 2003).

Alguns autores têm proposto o termo “EAEC típica” para designar a bactéria que carrega o gene regulador *aggR* e o termo “EAEC atípica” para as cepas que carecem desse gene (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; NATARO, 2005).

1.8.3.3 Citotoxinas e Enterotoxinas

Ao estudar o plasmídeo AA da cepa 17-2, Savarino *et al.* (1991), utilizando modelo *in vitro* de mucosa ileal de coelho em câmara de Ussing, identificaram um gene que codifica uma enterotoxina termo-estável, que eles denominaram de enterotoxina termoestável 1 de EAEC (*enteroaggregative Escherichia coli heat-stable enterotoxin 1* – EAST-1). Essa proteína composta por 38 aminoácidos apresenta homologia estrutural à toxina termo-estável de ETEC (STa), ambas apresentando quatro resíduos de cisteína, mas com diferenças genéticas e imunológicas (SAVARINO *et al.*, 1991; 1993). A função exata dessa enterotoxina na secreção causada por EAEC ainda não está clara, entretanto trabalhos com amostras positivas para EAST-1 demonstram que ela parece contribuir para a diarreia aquosa e está presente em 40% das cepas de EAEC. Segundo Uzzau e Fasano (2000), essa enterotoxina provoca secreção de Cl⁻, através da ativação de monofosfato de guanosina cíclico (cGMP). Apesar disso, a presença de cepas de

EAEC expressando a toxina foi similar entre doentes e pessoas saudáveis (NATARO; KAPER, 1998). Trabalhos posteriores demonstraram que o gene *astA*, que codifica a proteína EAST-1, está presente em outras categorias de *E. coli*, tendo sido reportada em 38% de cepas não-patogênicas (MÉNARD; DUBREUIL, 2002; SAVARINO *et al.*, 1996; YAMAMOTO; ECHEVERRIA, 1996). Cepas de *E. coli* produzindo EAST-1 têm sido associadas com diarreia em vários estudos (FLORES *et al.*, 2008; JAIN *et al.*, 2008; YATSUYANAGI *et al.*; 2003; ZHOU *et al.*, 2002).

Alguns autores têm demonstrado efeitos citotóxicos causados por EAEC em células HEp-2 durante o teste de adesão, na superfície epitelial intestinal humana em cultura e em monocamadas de células intestinais polarizadas (HICKS; CANDY; PHILLIPS, 1996a; KNUTTON *et al.*, 1992; NATARO *et al.*, 1996). Pesquisadores mexicanos e americanos analisaram dois surtos de EAEC em hospitais mexicanos e observaram a presença de necrose na mucosa ileal de crianças que morreram durante esses surtos. A partir do sobrenadante da cultura das amostras isoladas no período, eles identificaram duas proteínas de alto peso molecular (108kDa e 116kDa), que induziram acúmulo de fluido e efeitos citotóxicos em modelo de alça ileal de rato. As proteínas foram encontradas em abundância no sobrenadante da cultura das amostras do surto e foram detectadas no soro dos pacientes infectados (ESLAVA *et al.*, 1993). Uma das proteínas (108kDa) causou diminuição da resistência elétrica de mucosa intestinal de rato montada em Câmara de Ussing, além de dano tecidual *in vitro*. Esse efeito não foi observado com a cepa O42 desprovida do plasmídeo AA, sugerindo que essa era uma proteína sintetizada por um gene plasmidial (NAVARRO-GARCÍA *et al.*, 1995; 1998). Essa enterotoxina foi clonada, seqüenciada e caracterizada pelo mesmo grupo, que a denominou de toxina codificada por plasmídeo (*plasmid-encoded toxin* – Pet). A análise da seqüência gênica revelou que essa toxina pertencia à sub-família das serino-proteases auto-transportadoras secretadas por espécies da família das *Enterobacteriaceae* (SPATEs), representando a primeira enterotoxina entre as SPATEs (ESLAVA *et al.*, 1998). As SPATEs apresentam como característica principal a presença do sistema de secreção contido dentro do precursor da própria proteína a ser secretada (HENDERSON; NAVARRO-GARCÍA; NATARO, 1998). Henderson *et al.* (1999b) sugeriram a participação de Pet no efeito citotóxico de EAEC O42 em cultura de tecido intestinal humano ao observar que a cepa mutante

(deletada da capacidade de produzir a proteína) gerou significativamente menos anormalidades na mucosa, caracterizadas por dilatação no diâmetro de abertura das criptas, arredondamento celular, desenvolvimento de fissuras entre as criptas e diminuição da camada mucóide. Os autores relataram, ainda, que o dano à linhagem celular epitelial de adenocarcinoma de cólon humano (T84) não foi dependente exclusivamente da toxina, sugerindo a participação de outros mecanismos de EAEC, além do Pet, no dano à mucosa. Navarro-García *et al.* (1999; 2001; 2007ab) reportaram a indução na contração do citoesqueleto e perda das fibras de actina, seguidos por arredondamento e descolamento de monocamadas em células epiteliais de cólon humano (HT29/C1) e em HEp-2 causados por Pet. Segundo os autores, a internalização via endocitose, o trânsito através do sistema vesicular e a atividade serino-protease da toxina são essenciais na geração dos efeitos citopáticos. Villaseca *et al.* (2000) reportaram os efeitos citotóxicos de Pet na membrana de eritrócitos e em células HEp-2, causando a degradação das cadeias de proteínas componentes do citoesqueleto celular. Canizalez-Roman e Navarro-García (2003) confirmaram a ação do Pet na clivagem de α -fodrina, levando à desorganização do citoesqueleto de células epiteliais.

A segunda proteína de alto peso molecular (116kDa) descrita pelos pesquisadores durante o surto mexicano, foi clonada e seqüenciada por Henderson *et al.* (1999a), que a denominaram de proteína envolvida na colonização intestinal (*protein involved in intestinal colonization* – Pic). Pic, outro membro da família das SPATEs envolvido na infecção por EAEC, é o único fator de virulência cromossomal descrito em EAEC. Ele é sintetizado como um precursor, que é processado durante a secreção pelo mecanismo de sistema autotransportador, liberando a proteína madura. Experimentos *in vitro* revelaram seu efeito de mucinase, de resistência sérica e hemaglutinação (HENDERSON *et al.*, 1999a). Evidências sobre a existência de fatores de virulência cromossomais em EAEC foram sugeridas por Czeuczulin *et al.* (1999). Essa toxina, inicialmente descrita em amostras de *Shigella flexneri*, vem sendo cada vez mais observada em cepas de EAEC e UPEC (ABE *et al.*, 2008; GUTIÉRREZ-JIMÉNES; ARCINIEGA; NAVARRO-GARCÍA, 2008; HEIMER *et al.*, 2004; PARHAM *et al.*, 2004). Behrens, Sheikh e Nataro (2002) relataram que ela é sintetizada por um gene localizado em uma região cromossomal altamente conservadora. Seu mecanismo de ação ainda é desconhecido, mas testes com

células epiteliais demonstraram que, ao contrário de Pet, Pic não causa efeitos citopáticos e não cliva as proteínas do citoesqueleto. Além disso, Pic não degrada as proteínas de defesa do hospedeiro presentes na camada mucóide intestinal, como imunoglobulina A (IgA) e lisozima. A integridade do domínio serino-protease é requerida para seu efeito mucinolítico, que é dose-dependente. A ligação entre Pic e a mucina foi bloqueada competitivamente por um monossacarídeo constituinte da cadeia oligossacarídica da mucina, o que sugere que sua atividade de hemaglutinina pode ter alguma semelhança com as lectinas. Sua atividade de mucinase foi reduzida após a remoção do ácido siálico da mucina (GUTIÉRREZ-JIMÉNES; ARCINIEGA; NAVARRO-GARCÍA, 2008). Pic parece promover a colonização intestinal de EAEC em ratos, através de mecanismos ainda desconhecidos (NATARO, 2005).

Recentemente, Mendez-Arancibia *et al.* (2008) demonstraram que 20,9% dos isolados de EAEC oriundos de crianças diarréicas na Tanzânia secretavam uma toxina autotransportadora secretada (*secreted autotransporter toxin* – Sat), inicialmente descrita em cepas de UPEC e DAEC (GUYER *et al.*, 2000; HENDERSON; NATARO, 2001). Alguns autores têm evidenciado seu efeito citotóxico em cultura de células urinárias (GUYER *et al.*, 2002; TADDEI *et al.*, 2005). A atividade enterotóxica de Sat foi descrita em tecido intestinal de íleo de coelho montado em câmara de Ussing, com acúmulo de líquido nas alças e necrose nos vilos (TADDEI *et al.*, 2005). Maroncle *et al.* (2006) sugeriram que o mecanismo de ação de Sat seria similar ao descrito para o Pet, com entrada da toxina nas células epiteliais do hospedeiro e clivagem da espectrina. A integridade da atividade serino-protease seria essencial para a desorganização do citoesqueleto, mas não para a liberação da proteína madura. Guignot *et al.* (2007) reportaram a ação de Sat em cultura de células epiteliais intestinais polarizadas. A toxina promoveu lesões nas TJs, induzindo rearranjos nas proteínas ZO-1, ZO-3 e ocludina e aumentando a permeabilidade paracelular, sem interferir com a resistência elétrica transmembrana. Os efeitos foram novamente dependentes da atividade serino-protease.

Dutta *et al.* (2002), ao comparar as proteínas SPATEs, identificaram uma homologia na seqüência de aminoácidos variando entre 35 e 55%. Pet e Sat causaram alterações morfológicas similares em cultura de células epiteliais e a

clivagem das sub-unidades de α - e β -espectrina, confirmando seus efeitos citopáticos *in vitro*. Além disso, Pet mostrou-se capaz de clivar a pepsina, o que seria útil na passagem da bactéria pelo estômago, caso essa atividade seja comprovada *in vivo*. Pic confirmou sua atividade mucinolítica. As três toxinas mostraram a capacidade de clivar o fator de coagulação V humano, atividade até então não descrita em EAEC.

Outras toxinas têm sido descritas na infecção causada por EAEC. A enterotoxina de *Shigella* 1 (*Shigella enterotoxin 1* – ShET1) é uma toxina oligomérica inicialmente descrita em *Shigella flexneri*, codificada pelo gene *set* e com atividade tóxica em modelo de alça ileal de coelho (FASANO *et al.*, 1995). Henderson *et al.* (1999a) identificaram a presença desse gene na fita oposta da mesma região cromossomal que codifica a proteína Pic de EAEC. A produção de uma hemolisina tem sido observada por EAEC *in vitro* (GOMES; ABE; MARQUES, 1995; HAQUE *et al.*, 1994). Cepas mostrando tal atividade hibridizaram com uma sonda específica para o gene *hly*, um gene cromossomal determinante da produção de hemolisina em *E. coli* (MARQUES *et al.*, 1995; WELCH; HULL; FALKOW, 1983). A presença de genes codificadores de sideróforos em *Yersinia* sp. e de uma toxina letal ao citoesqueleto (*cytolethal distending toxin* – cdt), inicialmente descrita em espécies de *Campylobacter* e *Shigella*, também tem sido descrita em cepas de *E. coli*, incluindo EAEC (ALBERT *et al.*, 1996; SCHUBERT *et al.*, 1998; 2000; SUZART *et al.*, 2001).

1.8.3.4 Inflamação

Em estudos preliminares realizados com crianças da área pobre de Fortaleza observou-se haver associação entre a infecção por EAEC e danos ao crescimento, que foi independente da presença de diarreia. Essa observação levantou a hipótese de que a EAEC produziria uma resposta inflamatória no intestino com implicações fisiológicas além da indução de diarreia. Em suporte a essa hipótese, as crianças infectadas por EAEC tiveram níveis elevados de lactoferrina (LFF), interleucina (IL)-1 (IL-1) e IL-8 fecais, comparados às coortes controles, que não tiveram diarreia nem os patógenos entéricos detectáveis. Esta inflamação foi novamente independente da presença de diarreia (STEINER *et al.*, 1998).

Na tentativa de entender a inflamação induzida por EAEC, observou-se que a cultura do sobrenadante da bactéria causava a liberação de IL-8 de células de carcinoma de cólon humano (Caco-2) *in vitro*. Tal liberação era mediada através de um fator solúvel, termo-estável e de alto peso molecular (STEINER *et al.*, 1998). Dois anos mais tarde, essa liberação foi atribuída a um componente do flagelo bacteriano, um novo tipo de flagelina, que foi clonada e seqüenciada pelo mesmo grupo de pesquisa (STEINER *et al.*, 2000). Trabalhos subseqüentes identificaram o receptor *Toll-like 5* (*Toll-like receptor-5* – TLR5) como a proteína do hospedeiro responsável pela inflamação induzida pela flagelina, observando duas regiões não-adjacentes da flagelina de EAEC que atuam através da ativação da proteína ativada por mitógeno (MAP) quinase p38 dependente do TLR5 para a secreção de IL-8 (DONELLY; STEINER, 2002; GEWIRTZ *et al.*, 2001; HAYASHI *et al.*, 2001; KHAN; KANG; STEINER, 2004).

Desde então, a interação flagelina / TLR5 tem sido considerada crucial para o reconhecimento da resposta imune inata de microorganismos potencialmente patogênicos. Entretanto, a importância clínica dessa interação permanece relativamente desconhecida. A única doença em que um defeito na sinalização do TLR5 tem mostrado relevância é na pneumonia causada por *Legionella pneumophila*. Um estudo de casos e controles de uma epidemia holandesa dessa bactéria mostrou uma resposta diminuída à flagelina em voluntários heterozigotos para TLR5 392 *stop*, sugerindo que esta mutação poderia atuar de uma maneira negativa dominante. Um polimorfismo em um único nucleotídeo (*single nucleotide polymorphism* – SNP) na posição 1174 do gene desse receptor, ocasionando a troca de uma citosina por uma timina nessa posição, causa uma alteração no aminoácido 392, resultando em um códon de parada. Essa mutação resulta em um receptor defeituoso ao nível do domínio extracelular e causa a perda do domínio transmembrana e da sinalização com a porção citoplasmática (HAWN *et al.*, 2003).

Uma função mais direta para a inflamação observada na diarreia causada por EAEC, mas não na infecção assintomática, foi sugerida por um estudo de SNPs no gene da IL-8 em viajantes americanos para o México. A ocorrência de um SNP comum na região promotora (-251) da IL-8 foi fortemente associada com uma maior severidade de diarreia por EAEC. Pacientes com o genótipo AA apresentaram

significativamente maiores concentrações de IL-8 fecal (JIANG *et al.*, 2003). Esse genótipo tem sido previamente associado com aumento da transcrição de IL-8 em infecções por outros microorganismos (HAMAJIMA *et al.*, 2003; HULL; THOMSON; KWIATKOWSKI, 2000; MA *et al.*, 2003).

1.8.4 Fisiopatologia

O curso da doença seguindo uma infecção por um patógeno entérico pode envolver quatro níveis de manifestação fenotípica: 1) infecção do hospedeiro humano; 2) desenvolvimento de sintomas diarréicos; 3) inflamação intestinal e má-absorção; 4) desenvolvimento de seqüelas a longo prazo (GUERRANT *et al.*, 2002a). Há um amplo espectro no curso da infecção após a exposição aos patógenos, bem como na natureza e severidade dos sintomas a curto e longo prazo.

A patogênese da infecção causada por EAEC permanece incerta. O principal obstáculo na definição do mecanismo pelo qual o microorganismo causa diarréia é a heterogeneidade das amostras. Numerosos fatores de virulência têm sido reportados como relevantes na patogênese da infecção, entretanto a presença desses fatores não é comum a todas as cepas de EAEC. O microorganismo tem sido claramente associado com diarréia em alguns indivíduos, mas em outros parece causar infecção sub-clínica ou apenas colonização intestinal (HUANG *et al.*, 2004).

Baseados em estudos *in vitro* e com animais, alguns autores sugerem a ocorrência de três estágios (**FIGURA 5**). Inicialmente, haveria aderência da bactéria à mucosa intestinal e/ou à sua camada mucóide através das AAFs ou outros fatores de aderência do microorganismo. Em seguida, ocorreria um aumento na produção de muco pela bactéria e pelas células do hospedeiro, que seria depositado como um biofilme na superfície dos enterócitos. Conseqüentemente, haveria uma resposta inflamatória com liberação de citocinas e secreção intestinal (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006; HUANG *et al.*, 2004; KHAN; STEINER, 2002; NATARO; KAPER, 1998).

O sítio da infecção por EAEC no intestino humano permanece incerto. Yamamoto, Echeverria e Yokota (1992) relataram a adesão de EAEC à mucosa ileal. Para Knutton *et al.* (1992), EAEC adere às mucosas do íleo e cólon. Por sua vez, Hicks, Candy e Phillips (1996a) relataram que EAEC é capaz de aderir aos intestinos delgado e grosso. A adesão ocorreu preferencialmente à mucosa jejunal, apesar do microorganismo também ter aderido ao íleo e cólon (HICKS; CANDY; PHILLIPS, 1996b). Segundo Nataro e Kaper (1998), os resultados discrepantes obtidos poderiam ser resultantes das diferentes técnicas utilizadas pelos autores na cultura intestinal, como utilização ou não de fixação das mucosas com formalina antes da adição de EAEC e diferentes tempos de incubação.

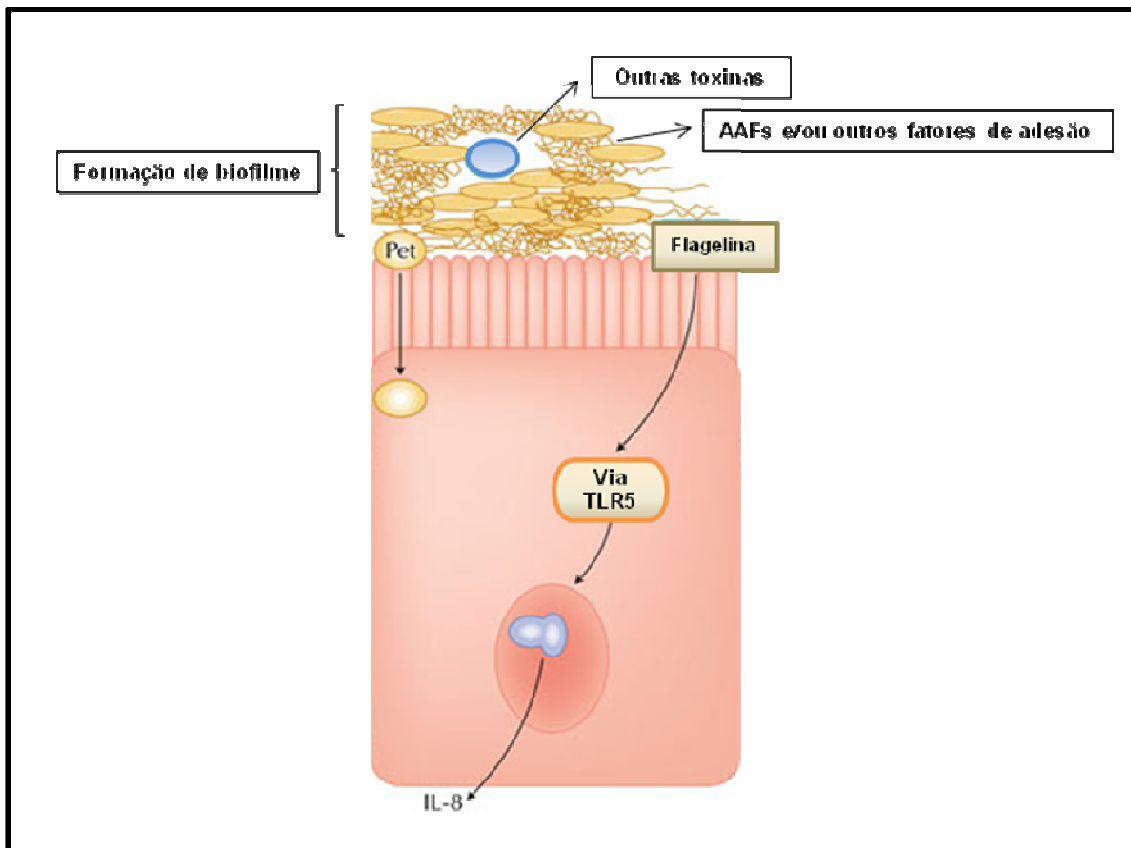


FIGURA 5 – Representação esquemática dos três estágios sugeridos para a patogênese da infecção por EAEC. I) aderência da bactéria à mucosa intestinal e/ou à sua camada mucóide através das AAFs ou outros fatores de adesão; II) aumento na produção de muco pela bactéria e pelas células do hospedeiro, com a formação de biofilme na superfície dos enterócitos. III) resposta inflamatória.

Fonte: Adaptado de Khan; Steiner, 2002.

Estudos com cultura de mucosa intestinal humana, modelos animais e voluntários têm demonstrado excesso na secreção de muco intestinal e a formação de biofilme após a infecção por EAEC (HICKS; CANDY; PHILLIPS, 1996a; NATARO *et al.*, 1995; TZIPORI *et al.*, 1992; VIAL *et al.*, 1988). A função dessa característica importante do microorganismo na fisiopatologia da doença é incerta, mas alguns autores sugerem que o muco facilitaria a multiplicação da bactéria e a colonização intestinal. Além disso, a camada de muco seria capaz de proteger EAEC dos mecanismos de defesa do hospedeiro e de outros microorganismos da microbiota intestinal (ELLIOTT; NATARO, 1995; KHAN; STEINER, 2002). Mudanças na concentração intracelular de cálcio aumentaram a secreção de muco na infecção causada por *Helicobacter pylori* (MICOTS *et al.*, 1993). Segundo Baldwin *et al.* (1992), o tratamento de células HEp-2 com EAEC causa elevação do nível de cálcio, provavelmente em decorrência da ação de uma hemolisina, o que poderia favorecer a produção de muco (LAW; CHART, 1998).

O dano à mucosa intestinal pôde ser observado por meio da incubação *in vitro* de mucosa intestinal infantil, obtida através de biópsia, com EAEC (HICKS; CANDY; PHILLIPS, 1996a). A inflamação causada por EAEC pôde ser observada em crianças e em estudos com animais (STEINER *et al.*, 1998; VIAL *et al.*, 1988).

Evidências sugerem que algumas cepas de EAEC teriam a capacidade de invadir a superfície da mucosa (ABE *et al.*, 2001; BENJAMIN; FEDERMAN; WANKE, 1995). Utilizando testes de invasão bacteriana e microscopia eletrônica, Pereira *et al.* (2008) relataram a internalização de EAEC pelas células epiteliais intestinais Caco-2 e T84, sugerindo que essas cepas poderiam utilizar a invasão à célula do hospedeiro como mecanismo na colonização da mucosa intestinal. O bacilo mostrou-se capaz de sobreviver intracelularmente por até 72 horas. Segundo os autores, tal estratégia poderia conferir vantagens ao microorganismo, uma vez que ele estaria protegido contra os mecanismos de defesa do hospedeiro e do tratamento com antibióticos. Essa capacidade de colonização, sobrevivência e multiplicação intracelular de EAEC poderia facilitar o desenvolvimento de diarréia persistente associado ao microorganismo.

1.8.5 Manifestações Clínicas

As manifestações clínicas das infecções causadas por EAEC variam desde infecções assintomáticas a quadros diarreicos agudos e persistentes, de intensidade leve a severa (HUANG *et al.*, 2004). A dose infecciosa exata necessária para causar doença é desconhecida, mas a realização de um estudo com adultos voluntários mostrou que a ingestão de 10^{10} UFC de EAEC foi capaz de provocar diarreia em três dos cinco adultos que ingeriram o microorganismo. O período de incubação nesses voluntários que desenvolveram diarreia variou de sete a 22 horas, com média de 14 horas (NATARO *et al.*, 1995). Outros autores relatam um período de incubação de oito a 18 horas (HUANG *et al.*, 2004).

Em geral, a doença caracteriza-se por diarreia aquosa, que pode ser associada com dor abdominal e febre baixa (HUANG *et al.*, 2004; OKEKE; NATARO, 2001). Estudos realizados na Índia têm relatado a associação do microorganismo com diarreia secretória (BHAN *et al.*, 1989b; PAUL *et al.*, 1994). Nos Estados Unidos, Nataro *et al.* (2006) não encontraram uma apresentação clínica característica das infecções por EAEC. Pacientes infectados pelo bacilo apresentaram diarreia aquosa, com febre, vômito, dor abdominal e generalizada, sintomas freqüentemente relatados por pacientes não infectados por EAEC. Dor abdominal foi o principal sintoma relatado por crianças com diarreia aguda aquosa causada por EAEC na Alemanha. Algumas crianças desse estudo, que desenvolveram diarreia persistente pelo bacilo, tiveram uma perda de peso significativa durante a doença e recuperaram o peso inicial após a eliminação da bactéria do intestino (HUPPERTZ *et al.*, 1997). A presença de sangue nas fezes foi reportada em 1/3 das crianças colonizadas com EAEC no México (CRAVIOTO *et al.*, 1991). A associação de EAEC com diarreia sanguinolenta também foi reportada por Benítez *et al.* (1991). No Gabão, crianças com EAEC desenvolveram diarreia severa e apresentaram vômitos. A temperatura média observada foi de 37,6°C, variando entre 36,5 e 40,5°C. Um pequeno percentual dessas crianças apresentou sangue fecal (PRESTERL *et al.*, 2003). No Brasil, Steiner *et al.* (1998) encontraram que a infecção por EAEC foi comumente associada com diarreia persistente e com a presença de lactoferrina e das citocinas pró-inflamatórias IL-8 e IL-1 β nas fezes. A natureza inflamatória da infecção por EAEC também foi reportada por

Bouckenooghe *et al.* (2000). Turistas americanos e europeus apresentando diarreia após viagens para México e Índia apresentaram presença significativa de leucócitos, sangue oculto e lactoferrina fecais.

A variabilidade nos sinais e sintomas bem como na duração da doença é atribuída à heterogeneidade das cepas de EAEC, à dose de bactéria ingerida bem como aos fatores do hospedeiro (HUANG *et al.*, 2004).

1.8.6 Diagnóstico e Caracterização das Cepas de EAEC

O padrão ouro no diagnóstico de EAEC continua sendo a avaliação do padrão de aderência em células HEp-2 (NATARO; KAPER, 1995; OKEKE; NATARO, 2001). Diferentes técnicas têm sido propostas para a realização desse teste, com variações na superfície de crescimento das células, no grau de confluência da monocamada, no número de lavagens realizadas, no número e duração de incubações (CLAUSEN; CHRISTIE, 1982; MATHEWSON *et al.*, 1985; NATARO *et al.*, 1987; PEREIRA *et al.*, 2007). Entretanto, os resultados de estudos comparativos mostraram que a técnica original descrita por Cravioto *et al.* (1979), que consiste em um período único de incubação das células com a bactéria durante 3 horas, sem lavagens nem mudança de meio durante a avaliação, é mais eficaz na diferenciação entre os três padrões de aderência (DA, LA e AA) (HAIDER *et al.*, 1992; VIAL *et al.*, 1990). O crescimento de EAEC para incubação com a linhagem celular deve ser realizado em cultura estática a 37°C, para expressão máxima das fímbrias de adesão (NATARO *et al.*, 1992). A manutenção de uma linhagem celular saudável e sem contaminação requer pessoal treinado, com considerável experiência e trabalho em tempo integral (TORTORA *et al.*, 2000). Uma vez que utiliza colônias cultivadas a partir das amostras fecais e necessita ser realizado em mais de uma colônia, a avaliação do padrão de aderência não permite o teste de um grande número de amostras clínicas simultaneamente (LAW; CHART, 1998; HUANG *et al.*, 2004). Além disso, outros patógenos entéricos parecem compartilhar com EAEC o fenótipo agregativo, o que torna necessária a confirmação da espécie bacteriana antes da realização do teste do padrão de aderência (OKEKE; NATARO, 2001). A fixação da monocamada celular de HEp-2 com formalina previne o descolamento das células durante o teste, aumenta a disponibilidade das células

HEp-2 e diminui o risco de contaminação, sem alteração na capacidade de adesão de EAEC (MIQDADY *et al.*, 2002; SPENCER *et al.*, 1997). Quando comparada à técnica tradicional, o teste de adesão com células fixadas com formalina mostrou sensibilidade entre 92 e 98%, com especificidade e valor preditivo positivo de 100% e valor preditivo negativo de 83 a 96% (MIQDADY *et al.*, 2002). Apesar dos bons resultados, esse método ainda necessita de validação antes de poder ser empregado na identificação de EAEC (HUANG *et al.*, 2004).

Na tentativa de facilitar o diagnóstico das infecções por EAEC, muitos autores recorreram à biologia molecular. Baudry *et al.* (1990) desenvolveram uma sonda, chamada CVD432, específica para uma região do plasmídeo AA da bactéria. Evidências anteriores sugeriram a presença desse grande plasmídeo com alto grau de homologia entre a maioria das cepas de EAEC (VIAL *et al.*, 1988). Na primeira avaliação realizada, os autores encontraram 89% de sensibilidade e 99% de especificidade da sonda em relação ao padrão ouro na identificação de EAEC (BAUDRY *et al.*, 1990). Estudos posteriores confirmaram a alta especificidade da sonda mas diferiram quanto à sensibilidade, que variou entre 15 e 90% (BOUZARI *et al.*, 2001; FARUQUE *et al.*, 1992; GIOPPO *et al.*, 2000; GOMES *et al.*, 1998; OKEKE *et al.*, 2000b; RICH *et al.*, 1999). Desde então, outras sondas específicas para diferentes regiões do DNA de EAEC têm sido desenvolvidas e testadas (DEBROY *et al.*, 1994; RICH *et al.*, 1999).

Desde a publicação da reação em cadeia da polimerase (PCR) por Saiki *et al.* (1985), inúmeros testes diagnósticos utilizando essa reação têm sido descritos (WRIGHT; WYNFORD-THOMAS, 1990). A amplificação do segmento do DNA de EAEC que hibridiza com a sonda CVD432 forneceu resultados rápidos, simples e altamente sensíveis (DURRER *et al.*, 2000; DUTTA *et al.*, 1999; SCHMIDT *et al.*, 1995). Tsukamoto (1996) propôs um método diagnóstico para EAEC baseado na amplificação do gene *aggR*. Cerna, Nataro e Estrada-Garcia (2003) desenvolveram um multiplex PCR para o diagnóstico simultâneo de três alvos plasmidiais, *aggR*, *aap* e o segmento que hibridiza com a sonda CVD432. A grande dificuldade do diagnóstico de EAEC através de PCR consiste na escolha de seqüências de DNA alvo correspondentes a um gene conservado para o desenvolvimento de iniciadores específicos, o que é dificultado pela heterogeneidade das cepas (BAUDRY *et al.*,

1990). O aprimoramento das técnicas de extração do DNA fecal e da estabilidade do ácido nucléico bacteriano diminui o custo e o trabalho na realização de PCR para detecção de enteropatógenos (AMAR *et al.*, 2005; HOLLAND *et al.*, 2000). Técnicas moleculares não substituem os métodos convencionais, mas constituem uma boa alternativa de diagnóstico, principalmente na detecção de microorganismos de difícil cultivo. A possibilidade de realização dos testes diretamente das fezes economiza tempo e trabalho laboratorial. Além disso, permitem um estudo mais detalhado da infecção ao fornecer informações sobre a caracterização da interação patógeno-hospedeiro e a distribuição de genes possivelmente determinantes da ocorrência da doença (FOXMAN; RILEY, 2001).

Inúmeros métodos não-moleculares têm sido descritos na caracterização de cepas de EAEC, como testes imunológicos para detecção de imunoglobulinas contra EAEC, produção de colicina e hemolisina, sorotipagem, coloração da cápsula, testes de hemaglutinação e de agregação na presença de sulfato de amônia, produção de biofilme e *microarray*, entre outros (AL-KHALDI *et al.*, 2002; BANGAR; BALLAL, 2008; CHART *et al.*, 1997; GREENBERG *et al.*, 2002; JENKINS *et al.*, 2005; JIANG *et al.*, 2002; OKEKE *et al.*, 2000b; RICH *et al.*, 1999; SPENCER; SMITH; CHART, 1999; SUTJITA *et al.*, 2000)

O diagnóstico definitivo de EAEC ocorre através da identificação da bactéria a partir das fezes do doente, o que não garante sua associação como agente etiológico responsável pelos sintomas. Considera-se EAEC como causa da diarreia quando o paciente desenvolve a doença durante um surto documentado do microorganismo, quando o isolado pertence a um sorotipo já associado com doença ou quando a bactéria é isolada repetidamente, principalmente se o paciente apresenta diarreia persistente e na ausência de diagnóstico de outro enteropatógeno (NATARO; KAPER, 1995; OKEKE; NATARO, 2001).

2 JUSTIFICATIVA

As doenças diarréicas ainda representam um relevante problema de saúde pública, gerando uma elevada demanda sobre os serviços ambulatoriais e, secundariamente, sobrecarregando a rede hospitalar (VASCONCELOS; BATISTA FILHO, 2008). Além dos prejuízos econômicos, a ocorrência de infecções intestinais freqüentes e desnutrição infantil causam aumento das necessidades metabólicas, má-absorção intestinal, distúrbios no transporte e re-captção de nutrientes essenciais à saúde humana e inflamação. O impacto desse ciclo vicioso a longo prazo inclui danos físicos e cognitivos, além de prejuízos à absorção de drogas necessárias ao tratamento de outras doenças sérias (GUERRANT *et al.*, 2008).

Crianças de países em desenvolvimento são particularmente susceptíveis às doenças diarréicas em decorrência das más condições de saneamento básico em que vivem (MÖNKEMÜLLER; WILCOX, 2001). Relatórios da Organização Mundial da Saúde mostram a importância dessas doenças como causa de morbidade e mortalidade infantil nos últimos anos. Juntamente com as infecções respiratórias, as doenças diarréicas estão entre as principais causas de morbi-mortalidade em crianças abaixo de cinco anos em países em desenvolvimento (WHO, 1995b; 1996; 1997; 1998; 1999; 2000; 2001; 2002; 2003; 2004; 2005b). A melhoria das condições higiênico-sanitárias permanece um grande desafio nesses países. Atualmente, 1,1 bilhão de pessoas não têm acesso à água potável e cerca de 2,5 bilhões, 40% da população mundial, carecem de saneamento básico adequado. Como resultado, mais de 4500 crianças menores de cinco anos de idade morrem todos os dias por doenças facilmente evitáveis, sendo a diarréia uma das mais comuns (PANDEY, 2006; WHO, 2007).

Considerando o papel das doenças diarréicas na população infantil, torna-se de fundamental importância o estudo de tais quadros infecciosos. Este trabalho teve como base estudos preliminares de campo, desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa desde 1989. Tais estudos forneceram informações importantes sobre a magnitude das enfermidades entéricas em comunidades desfavorecidas da cidade de Fortaleza, Ceará, definindo os principais agentes etiológicos, os mecanismos relevantes e o impacto dessas doenças no estado nutricional, na função absorptiva, na barreira funcional intestinal e no desenvolvimento físico e cognitivo infantil. Os prejuízos a longo prazo ocasionados pelas doenças diarréicas no início da infância

podem ser bastante dispendiosos, sendo, então, imprescindível a realização de estudos mais detalhados que possam fornecer dados úteis sobre essas doenças.

Escherichia coli enteroagregativa é um importante patógeno entérico causador de diarréias persistentes na infância em muitas partes do mundo, incluindo as favelas de Fortaleza, e desde então vem sendo associada com surtos diarréicos (HUANG *et al.*, 2006; LIMA *et al.*, 2000; OKEKE; NATARO, 2001). O grande impacto das infecções causadas por esse microorganismo em crianças tem sido descrito, sendo observada associação de infecções sintomáticas e assintomáticas com inflamação intestinal e prejuízos ao crescimento (STEINER *et al.*, 1998).

Estudos prévios sobre as infecções causadas por EAEC têm sugerido que genes específicos do microorganismo poderiam influenciar o curso da infecção (NATARO, 2005; NATARO; KAPER, 1998). Apesar das informações disponíveis, o papel dos fatores genéticos permanece obscuro. Tendo em vista a heterogeneidade das cepas de EAEC e a associação do microorganismo com diarréia apenas em alguns indivíduos, esse trabalho fornece uma grande oportunidade de definir a importância de alguns fatores de virulência no grau de severidade das doenças diarréicas causadas por EAEC.

Postulamos que certas diferenças genéticas, como a presença de genes de virulência e/ou polimorfismos em certos genes do microorganismo, interferem no curso da infecção.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Determinar a prevalência de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) e o papel de seus genes de virulência, bem como avaliar o impacto das infecções causadas pelo microorganismo na inflamação intestinal e no estado nutricional entre casos (crianças com diarreia) e controles (crianças sem diarreia) residentes nas comunidades Gonçalves Dias e Parque Universitário, em Fortaleza, Ceará.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a prevalência de EAEC entre crianças, com e sem diarreia, residentes em comunidades carentes de Fortaleza, Ceará;
- Determinar o impacto nutricional da infecção por EAEC em crianças com diarreia e naquelas apenas colonizadas pela bactéria;
- Avaliar a relação entre a presença dos genes de virulência *aggR*, *aap*, *pic*, *pet* e *astA* na indução de diarreia por EAEC;
- Definir a influência de polimorfismos no gene *aggR* entre as cepas de EAEC diagnosticadas a partir de amostras fecais de casos e controles no curso da infecção;
- Avaliar a ocorrência de inflamação nas infecções causadas por EAEC, através da avaliação de lactoferrina e citocinas (interleucinas 4 e 10, fator de necrose tumoral alfa e interferon gama) fecais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESCRIÇÃO DO ESTUDO

4.1.1 Considerações Éticas

Esse estudo constitui um dos objetivos do projeto de pesquisa intitulado “Intervenção com Micronutrientes e Impacto a Longo Prazo no Brasil”, que foi aprovado com recomendações pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) (registro n°. 12729, processo n°. 25000.017262/2006-38, parecer n°. 760/2006) em 14 de julho de 2006 e recebeu parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da UFC (COMEPE/UFC) (ofício n°. 550/2006, protocolo n°. 238/05) em 22 de setembro de 2006, após atendimento das recomendações exigidas (ANEXOS A e B). O início das atividades foi autorizado pelo COMEPE/UFC em 31 de outubro de 2006 (ofício n°. 701/06) (ANEXO C).

4.1.1.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO D) foi revisado e aprovado pelo COMEPE/UFC (ofício n°. 550/2006, protocolo n°. 238/05) em 22 de setembro de 2006 e em 25 de maio de 2007 (complementações, ofício n°. 407/07) (ANEXOS B e E).

Os pais ou responsáveis forneceram um consentimento por escrito, assinando um documento que descrevia os objetivos do trabalho, os procedimentos a serem realizados com a criança, os riscos e benefícios da participação no estudo, questões relacionadas à confidencialidade e telefones de contato em caso de dúvidas. Todos eles receberam uma cópia do termo.

4.1.1.2 Confidencialidade dos Dados

As crianças receberam números codificados, não sendo identificadas pelo nome em nenhum documento do estudo. Os dados foram mantidos em local seguro no Sistema de Segurança e Gerenciamento de Dados (SSGD), na Unidade de Pesquisas Clínicas/Instituto de Biomedicina (UPC/IBIMED), na UFC.

4.1.2 Local do Estudo

O estudo foi realizado em duas áreas carentes vizinhas, a comunidade Gonçalves Dias e o Parque Universitário, localizadas na zona urbana da cidade de Fortaleza, capital do estado do Ceará.

O Ceará está localizado na região nordeste do Brasil e apresenta uma área territorial de 148.825,602Km², dividida entre 184 municípios. De acordo com os dados do censo populacional de 2000 e da contagem da população de 2007 realizados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a população estimada do estado é de 8.125.286 habitantes.

Fortaleza está situada no litoral do Ceará e tem como limites o oceano Atlântico ao norte, as cidades de Maracanaú, Pacatuba e Itaitinga ao sul, Aquiraz e Eusébio a leste e Caucaia a oeste, compreendendo uma área territorial de 313Km². Segundo o IBGE, a cidade abriga uma população de 2.431.415 habitantes.

A comunidade Gonçalves Dias está localizada a 1Km de distância da Unidade de Pesquisas Clínicas / Instituto de Biomedicina (UPC/IBIMED), localizada na Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC), em Fortaleza. Gonçalves Dias compreende uma área de quatro quarteirões habitados por 1826 pessoas (dados de fevereiro de 1993), dos quais 247 (13,5%) são crianças com até cinco anos de idade (**FIGURA 6**).

O Parque Universitário, situado a cerca de 5Km ao sul da UPC/IBIMED, é composto por 3.420 residências e uma população de 11.018 habitantes, de acordo com um censo realizado na comunidade em 2006 (**FIGURA 6**). Destes, 2.755 (25,0%) são menores de 12 anos e 504 (4,6%) são crianças na faixa etária entre dois e 36 meses. Um levantamento realizado em 2007 com 330 residências do local revelou que 198 (60,0%) delas são compostas por até quatro compartimentos, 253 (76,7%) contam com até dois quartos, 122 (37,0%) têm banheiros com descarga e 264 (80,0%), água encanada. Quase 3/4 (238 - 72,1%) das famílias pesquisadas vivem com renda mensal de até dois salários mínimos.

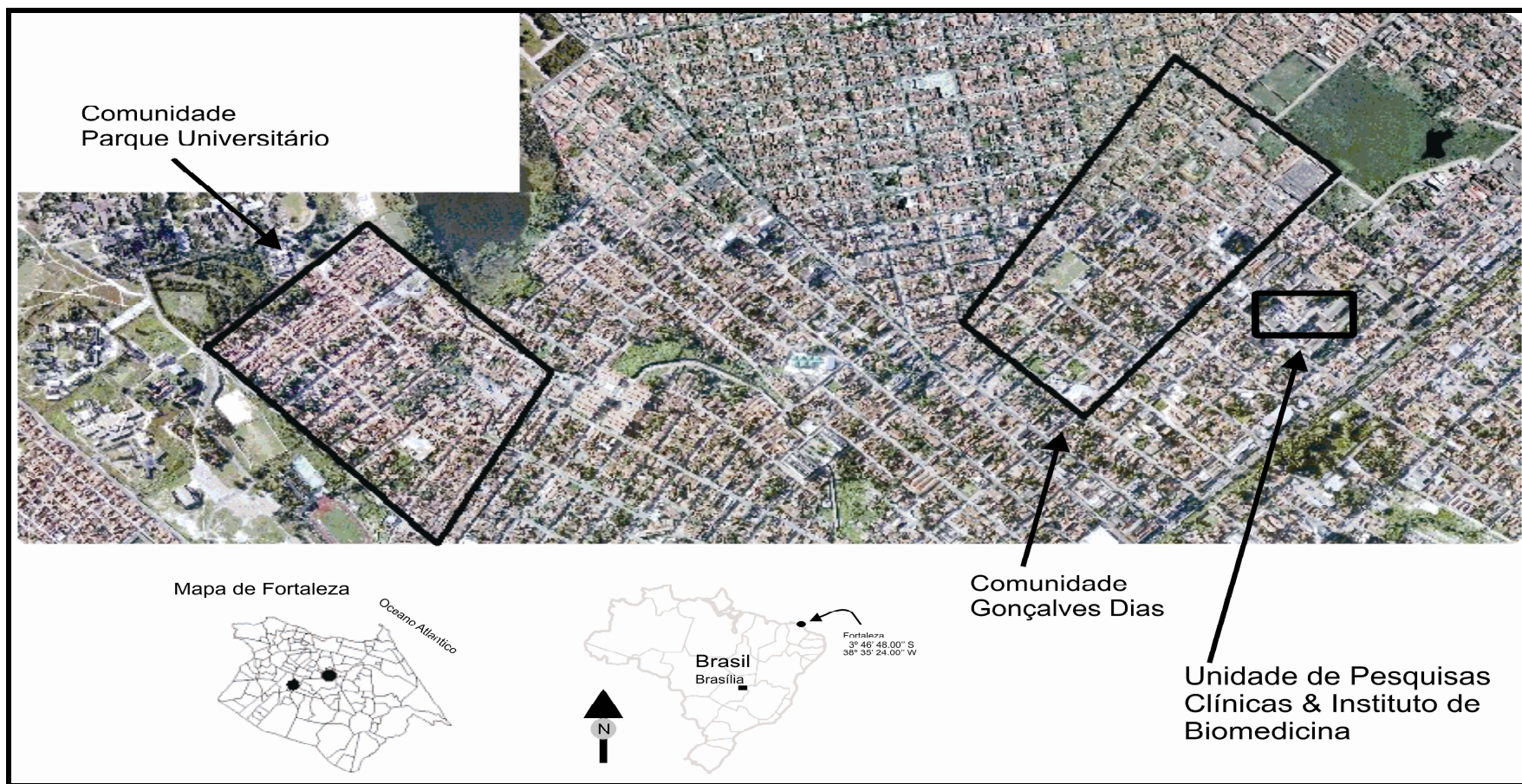


FIGURA 6 – Localização geográfica das comunidades Gonçalves Dias e Parque Universitário, situadas a cerca de 1 e 5Km, respectivamente, da Unidade de Pesquisas Clínicas / Instituto de Biomedicina (UPC/IBIMED), da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará (UFC), em Fortaleza. Gonçalves Dias está localizada a aproximadamente 3°74' ao sul da linha do Equador e 38°55' a oeste do meridiano de Greenwich. A comunidade Parque Universitário está situada a cerca de 3°44' ao sul da linha do Equador e 38°34' a oeste do meridiano de Greenwich.

Fonte: Prefeitura Municipal de Fortaleza.

4.1.3 Critérios de Inclusão e Exclusão da População do Estudo

A seleção dos participantes do estudo foi baseada nos seguintes critérios de inclusão:

- Crianças com idade variando entre dois e 36 meses;
- Crianças residentes em um dos dois locais de estudo;
- Obtenção de consentimento escrito do pai ou responsável pela criança.

Foram excluídas do estudo crianças que não obedeceram a qualquer um dos critérios de inclusão.

4.1.4 Tipo e Período do Estudo

Este foi um estudo do tipo observacional, analítico, caso-controle, realizado durante um período de 16 meses, de março de 2007 a julho de 2008. A coleta de dados e amostras de fezes foi realizada entre os meses de março a julho de 2007, período do ano chuvoso e com maior incidência de casos diarreicos na cidade de Fortaleza (FAÇANHA; PINHEIRO, 2005).

4.2 TRIAGEM, ENTREVISTA E PREENCHIMENTO DA FICHA EPIDEMIOLÓGICA

Cada participante do estudo foi inscrito individualmente por integrantes de um grupo experiente, constituído por uma enfermeira e por agentes de saúde treinados, que moram na área e são bem conhecidos das famílias. Esse grupo foi responsável, ainda, por toda a coleta de dados e amostras.

No momento da triagem, os pais ou responsáveis, após serem informados sobre os dados constantes no TCLE (ANEXO D), assinaram o documento e foram entrevistados para o preenchimento da ficha epidemiológica (formulário ambiental e sócio-econômico – ANEXO F). As crianças foram, então, submetidas a um breve exame físico para obtenção das medidas antropométricas, como descrito a seguir.

Informações sobre ocorrência de diarreias nos últimos 15 dias anteriores à visita, número e tipo de evacuações por dia foram obtidas através da entrevista e utilizadas na definição dos grupos caso e controle (ANEXO G).

4.3 MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS

A equipe de campo mediu estatura, peso, circunferência braquial e espessura da prega cutânea de todas as crianças. A aferição da estatura foi realizada com as crianças descalças na posição vertical, utilizando-se um antropômetro com precisão de 0,1cm. As crianças menores de dois anos foram medidas deitadas, na posição supina (medida do comprimento). Para aferição da massa corporal, as crianças foram pesadas trajando roupas leves e descalças, utilizando-se uma balança digital portátil. A circunferência do braço foi obtida através do emprego de uma fita métrica confeccionada em material flexível e resistente, específica para a medição de circunferências e para uso pediátrico. A fita foi utilizada aderida à pele, na altura do ponto médio braquial. A medida da espessura da prega cutânea foi medida a partir do ponto médio posterior do braço não dominante, com o uso de um paquímetro.

As medidas antropométricas foram convertidas em escores-z de HAZ, WAZ e peso-por-altura (*weight-for-height* – WHZ), utilizando *software* antropométrico. Estes escores-z antropométricos correspondem ao número de desvios padrão acima ou abaixo do valor médio fornecido pelo *National Center for Health Statistics* (NCHS, *National Health and Nutrition Examination Survey*, Centers for Disease Control and Prevention, Hyattsville, MD) e *International Reference Population* (*Global Database on Child Growth and Malnutrition*, World Health Organization, Geneva, SZ). O cálculo do índice de massa corporal (IMC) foi realizado dividindo-se o peso (Kg) pela altura (m) ao quadrado.

4.4 COLETA E TRANSPORTE DAS AMOSTRAS DE FEZES

Após os procedimentos de triagem, assinatura do TCLE, entrevista, preenchimento da ficha epidemiológica e medidas antropométricas, os pais ou responsáveis receberam um copo de plástico, estéril, apropriado para a coleta de

fezes e foram orientados pela equipe de campo sobre o procedimento de coleta. No dia seguinte, o membro da equipe retornou à residência da criança para o recebimento da amostra coletada. Caso o espécime fecal não tivesse sido coletado, o grupo de campo retornava à residência por até cinco dias úteis consecutivos, quando a criança era, então, excluída do estudo por falta de material. A amostra coletada foi armazenada entre 2 e 8°C e, no prazo máximo de quatro horas, transportada em caixa térmica contendo gelo para o Laboratório de Doenças Infecciosas (LDI), da UPC/IBIMED, da Faculdade de Medicina, da UFC.

4.5 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS FECAIS

Ao chegar ao laboratório, as amostras foram acondicionadas na temperatura entre 2 e 8°C até seu processamento. No máximo seis horas após a coleta, os espécimes fecais foram observados quanto aos seus aspectos, aliquotados em dois tubos estéreis com capacidade para 1,8mL e armazenados abaixo de -70°C para posterior extração do DNA fecal e realização de outros testes descritos abaixo.

Uma alíquota do material restante foi empregada no diagnóstico de helmintos e protozoários através de microscopia fecal. Inicialmente, foi realizada uma concentração dos parasitas fecais, para melhorar a sensibilidade do exame direto para parasitas intestinais (ZIERDT, 1978; 1984). Utilizou-se o *Fecal Parasite Concentrator Kit* (Evergreen, Los Angeles, CA), que se baseia no método de Ritchie modificado (concentração pelo álcool-éter). O éter age como solução excretora para a gordura fecal e demais detritos, e o formol age como anti-séptico, resultando em uma boa concentração de oocistos de *Cryptosporidium* spp., cistos de protozoários, larvas e ovos de helmintos.

Para a identificação de ovos de helmintos e cistos de protozoários nas amostras de fezes, foi preparado um esfregaço a partir do material concentrado, como descrito por Brown e Neva (1983). Uma mistura de 1:1 desse material com solução salina foi misturada com 1 gota de Lugol e examinada entre lâmina e lamínula. Essa preparação foi, então, examinada sob microscópio óptico (Eclipse E-

200, Nikon Corporation, Chiyoda, TO) em aumento de 10X para identificação de helmintos e em aumento de 40X para identificação de protozoários.

Outro esfregaço feito a partir do material concentrado foi corado através da técnica de Ziehl-Nielsen modificada para a pesquisa de *Cryptosporidium* spp.. O esfregaço foi inicialmente corado com o corante primário carbol-fucsina, descorado com uma mistura de álcool-ácido e contra-corado com azul de metileno. Como os oocistos de *Cryptosporidium* spp. são álcool-ácido resistentes, eles retêm a cor do corante primário, diferenciando-se dos demais materiais fecais que se coram com a coloração de fundo do contra-corante (HENRIKSEN; POHLENZ, 1981). A **Figura 7** mostra o fluxograma corresponde às etapas realizadas desde a triagem das crianças incluídas no estudo até o processamento das amostras fecais obtidas.

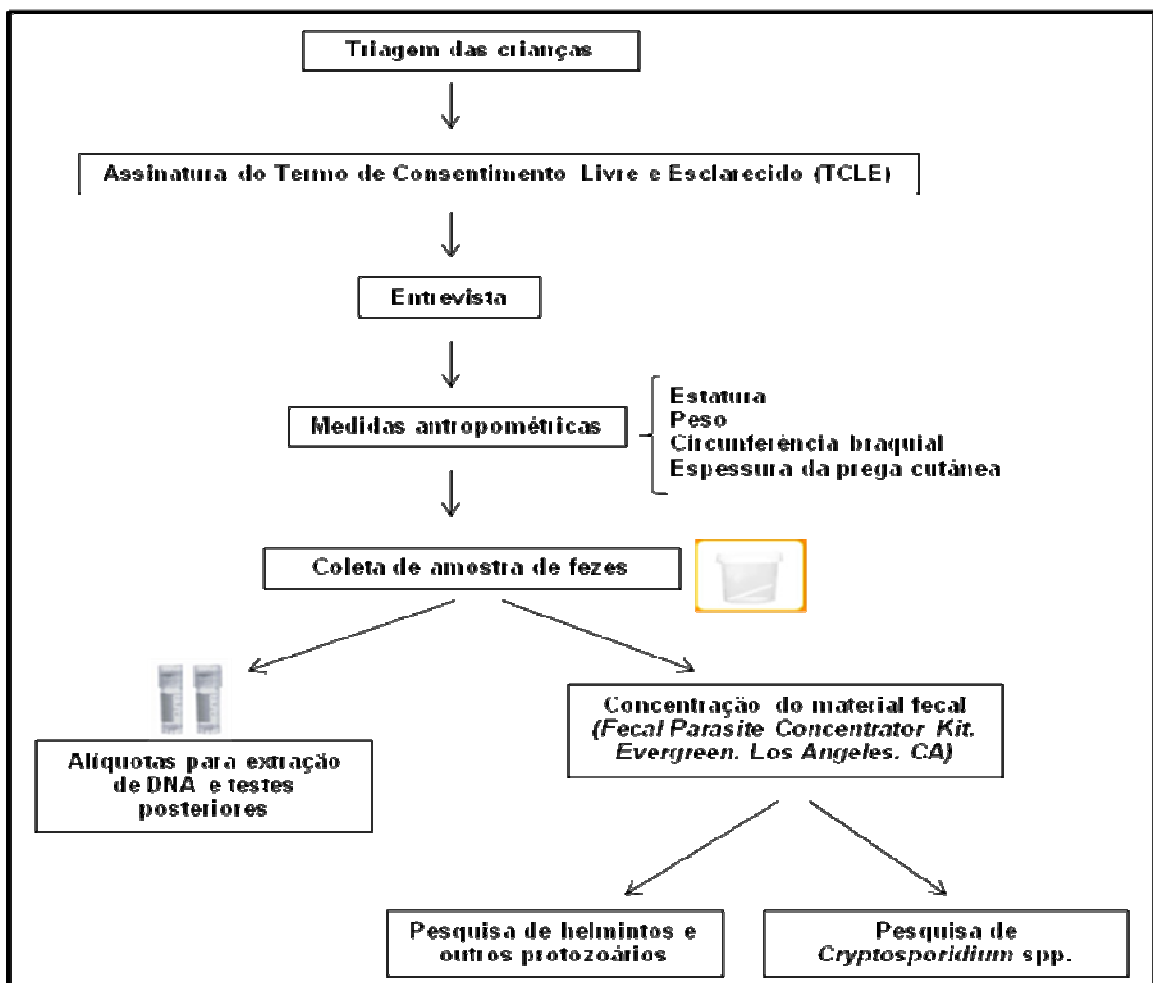


FIGURA 7 – Representação esquemática das etapas realizadas desde a triagem das crianças incluídas no estudo ao processamento das amostras fecais.

4.6 EXTRAÇÃO DO DNA FECAL

O DNA fecal foi extraído utilizando o *QIAamp DNA Stool Mini Kit* (Qiagen, Valencia, CA), seguindo as instruções do fabricante. Cerca de 200mg ou 200µL de fezes foram incubadas com 1,4mL de tampão ASL, que promove a lise celular e remove substâncias inibidoras presentes nas fezes. Para prevenir a degradação do DNA, a solução de lise foi adicionada antes do descongelamento das amostras fecais. A mistura foi agitada por 1 minuto ou até que as amostras estivessem totalmente homogêneas e foi, então, incubada por 5 minutos a 95°C. A elevação da temperatura é recomendada pelo fabricante e tem o objetivo de facilitar a ação do tampão em células difíceis de lisar, aumentando em três a cinco vezes a concentração final de DNA.

O lisado foi homogêneo por 15 segundos e centrifugado por 1 minuto para precipitação das partículas fecais. Em seguida, 1,2mL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo de 2mL contendo *InhibitEX*, um componente do *kit* em forma de comprimido, que adsorve inibidores de PCR e substâncias lesivas ao DNA presentes nas fezes. A transferência do comprimido a partir de sua embalagem original para o tubo foi realizada sem contato direto para evitar a contaminação cruzada. O tubo contendo o lisado e o comprimido foi agitado em um agitador de tubos imediatamente e continuamente por 1 minuto ou até que o comprimido estivesse totalmente dissolvido. A mistura foi incubada por 1 minuto a temperatura ambiente com o objetivo de permitir a adsorção dos inibidores pela matriz. O processo de remoção dos inibidores foi finalizado por um passo de centrifugação durante 3 minutos. Todo o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5mL e submetido a uma nova centrifugação por 3 minutos.

O processo de purificação do DNA envolveu, ainda, a digestão de proteínas, ligação do DNA a uma membrana de sílica-gel, lavagens com tampões adequados para remoção de impurezas e eluição do DNA. Para a digestão das proteínas, 200µL do sobrenadante foram transferidos para um tubo de 1,5mL contendo 15µL de proteinase K. Em seguida, adicionou-se ao tubo 200µL de tampão AL, constituído de hidrocloreto de guanidina. Segundo Fonseca *et al.* (2006), a ação desnaturante do hidrocloreto de guanidina poderia ser decorrente de elevações na

solubilidade de grupos da proteína na solução aquosa do desnaturante. A mistura foi, então, aquecida a 70°C durante 10 minutos, temperatura e tempo adequados para a ação dos desnaturantes. Para completar o passo de desnaturação protéica, adicionou-se 200µL de etanol a 96-100%, que é um agente caotrópico anfifílico, com um segmento hidrocarbonado hidrofóbico (-CH₂-CH₂-) e um grupo hidrofílico (-OH). Ele pode se misturar com a água e acomodar melhor no solvente os grupos apolares da proteína, atenuando a força hidrofóbica, de tal forma a desfavorecer o estado nativo em detrimento do estado desnaturado (FONSECA *et al.*, 2006).

Após centrifugação rápida para remoção de gotas presentes na tampa e paredes do tubo, a mistura foi transferida para um tubo contendo um filtro composto de uma membrana de sílica-gel. O DNA foi adsorvido à membrana durante uma breve centrifugação (1 minuto). O filtro e o DNA foram transferidos para um novo tubo coletor, sendo o filtrado descartado. As condições do lisado, como concentração de sais e pH, dificultam a ligação de proteínas digeridas e outras impurezas à membrana. Com o intuito de remover qualquer impureza residual, o DNA adsorvido foi, então, lavado em dois passos de centrifugação. No primeiro deles, 500µL do tampão AW1 foram adicionados à membrana e submetidos à centrifugação durante 1 minuto. A membrana ligada ao DNA foi transferida para um novo tubo coletor e o filtrado foi descartado. No segundo passo de lavagem, 500µL do tampão AW2 foram adicionados à membrana e submetidos à centrifugação durante 3 minutos. Para que nenhum excesso de tampão permanecesse na amostra antes da eluição final, o filtrado foi descartado e o filtro foi colocado de volta ao mesmo tubo coletor e submetido a uma nova centrifugação de 1 minuto. A membrana contendo o DNA concentrado e purificado foi transferida para um novo tubo de 1,5mL. Adicionou-se, então, 200µL do tampão de eluição AL e incubou-se por 1 minuto à temperatura ambiente. A concentração de sal do tampão permite a eluição do DNA ligado à membrana, livre de proteínas, nucleases, inibidores e outras impurezas. A centrifugação durante 1 minuto completou o processo. O produto obtido foi armazenado a -20°C em duas alíquotas contendo 100µL cada uma para posterior análise. Todas as centrifugações foram realizadas a 20.000xg à temperatura ambiente. Os passos da extração de DNA fecal estão ilustrados na **Figura 8**.

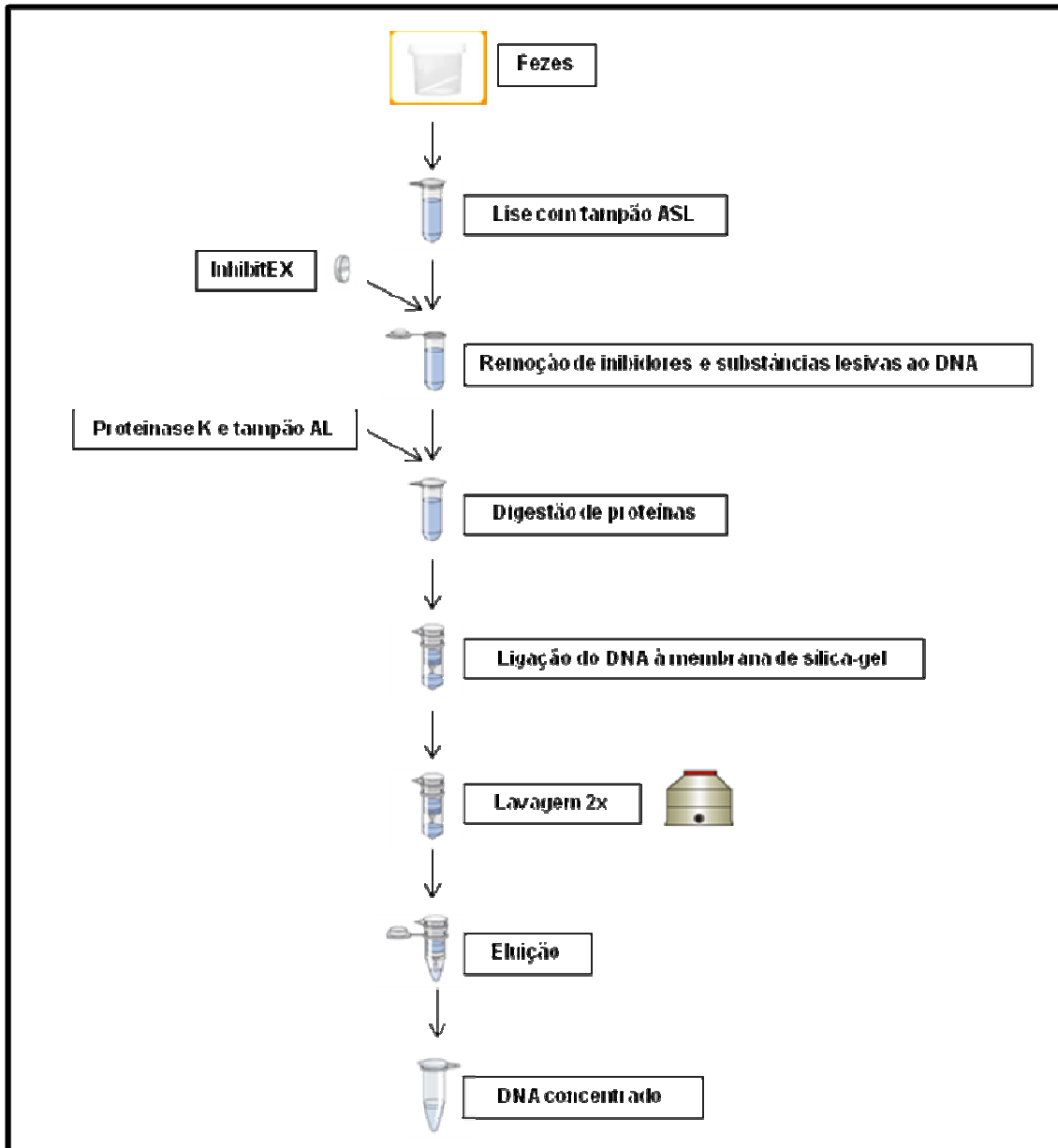


FIGURA 8 – Fluxograma da técnica de extração de DNA fecal utilizando o *QIAamp DNA Stool Mini Kit* (Qiagen, Valencia, CA).

Fonte: Adaptado do manual do usuário do *QIAamp DNA Stool Mini Kit*.

Essa técnica de extração foi escolhida em nosso laboratório após a realização de testes para quatro diferentes tipos de pré-tratamento. Avaliamos: 1) pré-tratamento químico – as fezes foram pré-tratadas com KOH 1M (50 μ L) e dithiothreitol (DTT) 1M (18 μ L) durante 1 hora a 65°C, neutralizadas com HCl 25% (8 μ L) e tamponadas com Tris-HCl 2M, pH=8,0 (80 μ L); 2) pré-tratamento físico – as amostras fecais foram submetidas a sucessivos ciclos de congelamento em

nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 95°C, ambos por 1 minuto (um e três ciclos foram testados); 3) pré-tratamento físico + químico – as fezes foram tratadas com dois ciclos de congelamento/descongelamento antes de serem submetidas ao tratamento químico descrito anteriormente; 4) sem pré-tratamento (SAMIE *et al.*, 2007) . Todas as alíquotas foram, então, submetidas à extração do DNA fecal com o *QIAamp DNA Stool Mini Kit*. A amplificação por PCR utilizando o gene *aggR* de EAEC indicou diferenças entre as intensidades das bandas obtidas, embora todos as técnicas testadas tenham possibilitado a visualização da banda pesquisada. Em virtude da maior intensidade da banda obtida após a extração do DNA fecal sem a adição de uma etapa de pré-tratamento (banda 5) em comparação com as bandas resultantes dos outros métodos de extração testados (bandas 1 a 4), como mostra a **Figura 9**, essa foi a técnica escolhida para a realização desse trabalho, o que economizou tempo e trabalho laboratorial.

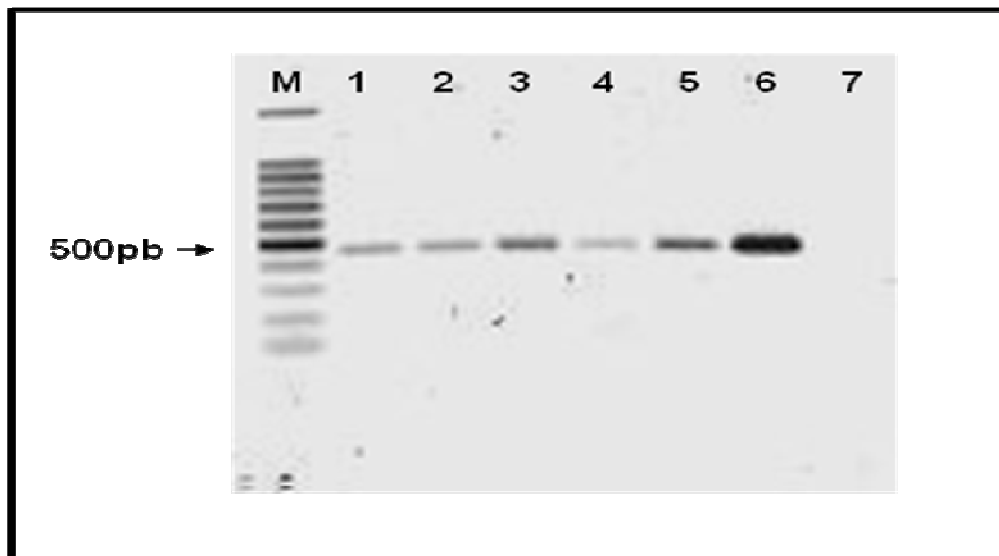


FIGURA 9 – Comparação de cinco métodos de extração de DNA a partir de amostras fecais positivas para EAEC. As amostras foram pré-tratadas com dois ciclos de congelamento/descongelamento com nitrogênio líquido seguido por tratamento alcalino com KOH e DTT (linha 1), tratamento alcalino com KOH e DTT (linha 2), um ciclo de congelamento/descongelamento com nitrogênio líquido (linha 3), três ciclos de congelamento/descongelamento com nitrogênio líquido (linha 4) e sem pré-tratamento (linha 5). As amostras foram submetidas à extração de DNA através do *QIAamp DNA Stool Mini Kit*. A amplificação do gene *aggR* foi visualizada através de eletroforese em gel de agarose a 1,2% e coloração com brometo de etídio. M = marcador molecular de 100pb; linha 6 = controle positivo (EAEC O42); linha 7 = controle negativo (água).

4.7 QUANTIFICAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO

A presença de DNA foi confirmada no produto da extração através de espectrofotometria (*BioPhotometer, Eppendorf, Westbury, NY*). O teste indica a qualidade e a quantidade do material ao final do processo. O DNA extraído foi avaliado nos comprimentos de onda de 260, 280 e 320nm. A leitura em 260nm nos fornece a quantidade de DNA da amostra como resultado da multiplicação do valor observado pelo fator de diluição e pela constante 50 para leitura final na concentração de mg/mL. A razão 260/280nm fornece uma estimativa da qualidade e pureza da amostra extraída, demonstrando se ela apresenta ou não contaminação de ácido ribonucléico (*ribonucleic acid* – RNA), proteína ou reagentes, como o ácido etilenodiamino-tetra-acético (*ethylenediaminetetraacetic acid* – EDTA), por exemplo. A leitura em 320nm reduz a influência da leitura da absorbância do *background*. A leitura de DNA deve ter razão $260/280 \geq 1,8$ para demonstrar falta de contaminantes (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Quando o resultado da verificação não foi satisfatório, realizou-se uma nova extração antes da amplificação.

4.8 DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE EAEC

O diagnóstico molecular de EAEC nas fezes foi baseado na pesquisa de dois genes do microorganismo, um cromossomal (*aaiC*) e outro plasmidial (*aatA*). O gene *aaiC* codifica uma proteína de 168 aminoácidos, que carece da seqüência sinalizadora N-terminal hidrofóbica e não apresenta homologia aparente com qualquer outro gene descrito no *GenBank* (*National Center for Biotechnology Information* – NCBI, *Bethesda, MD*). Essa proteína é secretada por um conjunto de 16 genes cromossomais contíguos (*aaiA* a *aaiP*) regulados pelo gene plasmidial *aggR*. Oito deles (*aaiA*, *aaiB*, *aaiE*, *aaiF*, *aaiJ*, *aaiL*, *aaiN* e *aaiO*) são similares a grupos de genes encontrados em outras bactérias Gram-negativas (DUDLEY *et al.*, 2006). A presença desses genes em *Vibrio cholerae* foi descrita recentemente por Pukatzki *et al.* (2006), que os denominaram de sistema de secreção tipo VI (*type VI secretion system* – T6SS). Segundo os autores, outros cinco tipos de sistema de secreção (I a V) têm sido descritos nos organismos procarióticos, mas nenhum deles está associado à secreção de proteínas que não apresentam o domínio N-terminal. Além de EAEC e *V. cholerae*, somente *Edwardsiella tarda* tem sido reportada como

capaz de secretar esse tipo de proteína (SRINIVASA RAO *et al.*, 2004). Apesar da semelhança estrutural, as proteínas secretadas por *V. cholerae* e *E. tarda* apresentam apenas 21% de identidade quanto à seqüência de DNA e ambas são completamente distintas da proteína codificada pelo gene *aaiC* de EAEC (DUDLEY *et al.*, 2006). O gene *aatA* codifica uma proteína da membrana externa semelhante à *TolC*, uma proteína homotrimérica em forma de canal, especializada no transporte de moléculas do meio intracelular para o extracelular, estando associada com o efluxo de drogas (SHARFF *et al.*, 2001; THANABALU *et al.*, 1998; WANDERSMAN; DELEPELAIRE, 1990). *TolC* e *aatA* apresentam apenas 25% de identidade na seqüência gênica, entretanto ambas compartilham importantes determinantes estruturais. Quando comparada a outras seqüências de DNA depositadas no banco de dados do NCBI, o gene *aatA* não apresenta qualquer homologia significativa. A proteína codificada pelo gene *aatA* contém 412 aminoácidos e faz parte de um complexo transportador responsável pela secreção da dispersina através da membrana bacteriana externa. A região plasmidial responsável pela codificação do complexo está sob controle de *aggR*. O gene *aatA* coincide com o segmento utilizado para o desenvolvimento da seqüência da sonda CVD432, primeira sonda empregada no diagnóstico de EAEC (NISHI *et al.*, 2003). Esse par de iniciadores voltado para a amplificação do segmento do DNA de EAEC que hibridiza com a sonda CVD432 foi desenvolvido por Schmidt *et al.* (1995) e, desde então, tem sido utilizado por vários grupos de pesquisa no diagnóstico de EAEC (DURRER *et al.*, 2000; DUTTA *et al.*, 1999; NGUYEN *et al.*, 2005; SVENUNGSSON *et al.*, 2000)

A pesquisa dos genes *aaiC* e *aatA* a partir do DNA fecal foi realizada utilizando o reagente *AmpliTaq Gold PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster, CA), que contém todos os componentes necessários para a PCR (DNA polimerase, tampão salino, deoxinucleotídeos, cloreto de magnésio e estabilizadores), exceto iniciadores e DNA. Aos 12,5µL do reagente, foram adicionados 2,5µL de uma solução de cada iniciador (2µM), 1 a 2,5µL de DNA fecal (dependendo da concentração de DNA fecal presente no produto final da extração) e um volume de água miliQ autoclavada que completasse o volume final de 25µL da reação. Os parâmetros usados na reação de PCR incluíram uma desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de 95°C por 20 segundos, 57°C por 20

segundos, e 72°C por 1 minuto. Uma extensão final foi realizada a 72°C por 10 minutos. Os fragmentos foram separados por eletroforese (aproximadamente 1h sob voltagem constante de 80V) em gel de agarose a 1,2% e corados com brometo de etídio para visualização e fotodocumentação sob luz ultravioleta (UV), através do sistema *ChemiDoc XRS* (*Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA*). Os iniciadores utilizados e os tamanhos dos produtos amplificados estão descritos na Tabela 2. A reação foi considerada positiva quando bandas de tamanho correto foram observadas, sem a presença de bandas extras. Considerou-se como EAEC amostras apresentando um ou ambos os genes pesquisados. A cepa O42 (O44:H18), isolada de uma criança com diarreia em Lima, no Peru, em 1983, é uma cepa padrão de EAEC capaz de causar diarreia em voluntários e foi utilizada como controle positivo em todos os testes. A amostra de *E. coli* comensal HS, que não causa diarreia em humanos, e água foram utilizadas como controle negativo (NATARO *et al.*, 1995; 1996). As cepas controles nos foram fornecidas pelo Dr. Richard Guerrant, da UVA.

4.9 PESQUISA DE GENES RELACIONADOS À VIRULÊNCIA

As amostras positivas para EAEC foram testadas quanto à presença de seqüências gênicas codificadoras de fatores de virulência, que incluíram os genes *aggR*, *aap*, *astA*, *pic* e *pet*. Os genes *aggR* e *pet* foram amplificados através de reações uniplex, utilizando o *AmpliTaq Gold PCR Master Mix* (*Applied Biosystems, Foster City, CA*), como descrito acima. *Aap*, *pic* e *astA* foram submetidos a uma reação de multiplex (*QIAGEN Multiplex PCR Kit, Qiagen, Valencia, CA*), seguindo as instruções do fabricante. O *kit* é composto por uma DNA polimerase pré-otimizada, deoxinucleotídeos e cloreto de magnésio diluídos em tampão específico. Seu emprego possibilita a amplificação de dois ou mais produtos simultaneamente em um único tubo de reação. As reações de PCR incluíram um passo inicial de desnaturação (95°C), seguido por 35 a 40 ciclos de desnaturação (95°C), anelamento (*aggR* – 58°C, *aap*, *pic*, *astA* e *pet* – 55°C) e extensão (72°C), além de uma extensão final (72°C). Os iniciadores utilizados nas reações estão descritos na **Tabela 2**. Os produtos de PCR foram visualizados e fotografados (*ChemiDoc XRS, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA*) após eletroforese em gel de agarose a 1,2% e

marcação com brometo de etídio. A cepa protótipo de EAEC O42, que possui todos os genes descritos acima, foi utilizada como controle positivo; a cepa comensal HS e a água foram empregadas como controle negativo em todas as reações.

TABELA 2 – Genes alvo, iniciadores utilizados e tamanhos dos produtos obtidos.

Gene	Iniciadores	Produto (pb)	Fonte
Genes de Diagnóstico			
<i>aaiC</i> ^a (proteína que carece do domínio N-terminal)	5'-ATTGTCCTCAGGCATTTCA-3' 5'-ACGACACCCCTGATAAACAA-3'	215	Desenvolvidos por nosso grupo
<i>aatA</i> ^b (proteína integrante do complexo secretor da dispersina)	5'-CTGGCGAAAGACTGTATCAT-3' 5'-CAATGTATAGAAATCCGCTGTT-3'	630	Schmidt <i>et al.</i> , 1995
Genes de Virulência			
<i>aap</i> ^b (proteína dispersina)	5'-ATGAAAAAATTAAGTTTGTATCTT-3' 5'-CGATATTATTTAACCCATTCGG-3'	356	Sheikh <i>et al.</i> , 2002 (S) ^c Desenvolvido por nosso grupo (A) ^d
<i>aggR</i> ^b (proteína reguladora transcricional)	5'-ATGAAATTAACAAAATATCGA-3' 5'-TCATTGGCTTTTAAAATAAGTCAA-3'	798	Desenvolvidos por nosso grupo
<i>astA</i> ^b (enterotoxina termoestável)	5'-GCCATCAACACAGTATATCCGA-3' 5'-GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT-3'	112	Desenvolvido por nosso grupo (S) ^c Piva <i>et al.</i> , 2003 (A) ^d
<i>pet</i> ^b (enterotoxina)	5'-TGACAGTGGATCAGGCGTGT-3' 5'-TTCTGTGCGCCAAGAATGAC-3'	558	Desenvolvidos por nosso grupo
<i>pic</i> ^a (enterotoxina)	5'-TTCAGCCGAAAGACGAAATCG-3' 5'-TCTGCGCATTTCATACCAACAT-3'	517	Desenvolvidos por nosso grupo

^a Genes cromossomais

^b Genes plasmidiais

^c S = Senso

^d A = Anti-senso

4.10 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR

Os produtos de PCR destinados ao seqüenciamento foram purificados para a remoção de resíduos de proteínas, RNA, sais, compostos químicos orgânicos, detergentes, excessos de deoxinucleotídeos, iniciadores, enzimas, tampões e outros componentes capazes de prejudicar o desempenho do seqüenciador. O processo de purificação foi realizado através do *QIAquick Purification Kit* (Qiagen, Valencia, CA), seguindo as instruções do fabricante.

Uma alíquota do produto da reação de PCR foi misturada ao tampão PBI, composto por hidrocloreto de guanidina e isopropanol. O tampão foi adicionado em um volume cinco vezes maior do que o volume do produto de PCR e a observação da cor da mistura, determinada pelo indicador de pH presente no tampão, foi analisada como um parâmetro na avaliação da qualidade do produto obtido. O processo de purificação do DNA requer um $\text{pH} \leq 7,5$ e nessa faixa de pH a mistura apresenta uma cor amarela. A presença de um pH da solução superior a esse excede a capacidade de tamponamento da solução fornecida pelo *kit*, o que requer sua correção através do uso de acetato de sódio a 3M. Essa mistura foi aplicada a um tubo coletor contendo uma coluna filtrante e cada amostra foi centrifugada. A concentração de sal e o pH da solução permitem a adsorção eficiente do DNA pela membrana de sílica. O filtrado foi descartado e a coluna filtrante re-colocada no tubo coletor. Adicionou-se 750 μL do tampão PE contendo etanol a 100% e centrifugou-se. O filtrado foi descartado e novamente centrifugado. A lavagem com tampão PE tem o objetivo de remover as impurezas presentes no produto de PCR sem interferir no DNA ligado à membrana. A realização de uma lavagem adicional remove qualquer resíduo do tampão capaz de interferir com as reações enzimáticas do seqüenciamento. A membrana com o DNA ligado foi transferida para um novo tubo coletor e eluída em 30 μL do tampão EB por centrifugação. A análise espectrofotométrica foi utilizada para quantificar o DNA purificado. Todas as centrifugações foram realizadas a 17.900xg por 1 minuto. A **Figura 10** mostra a representação esquemática do processo de purificação dos produtos de PCR.

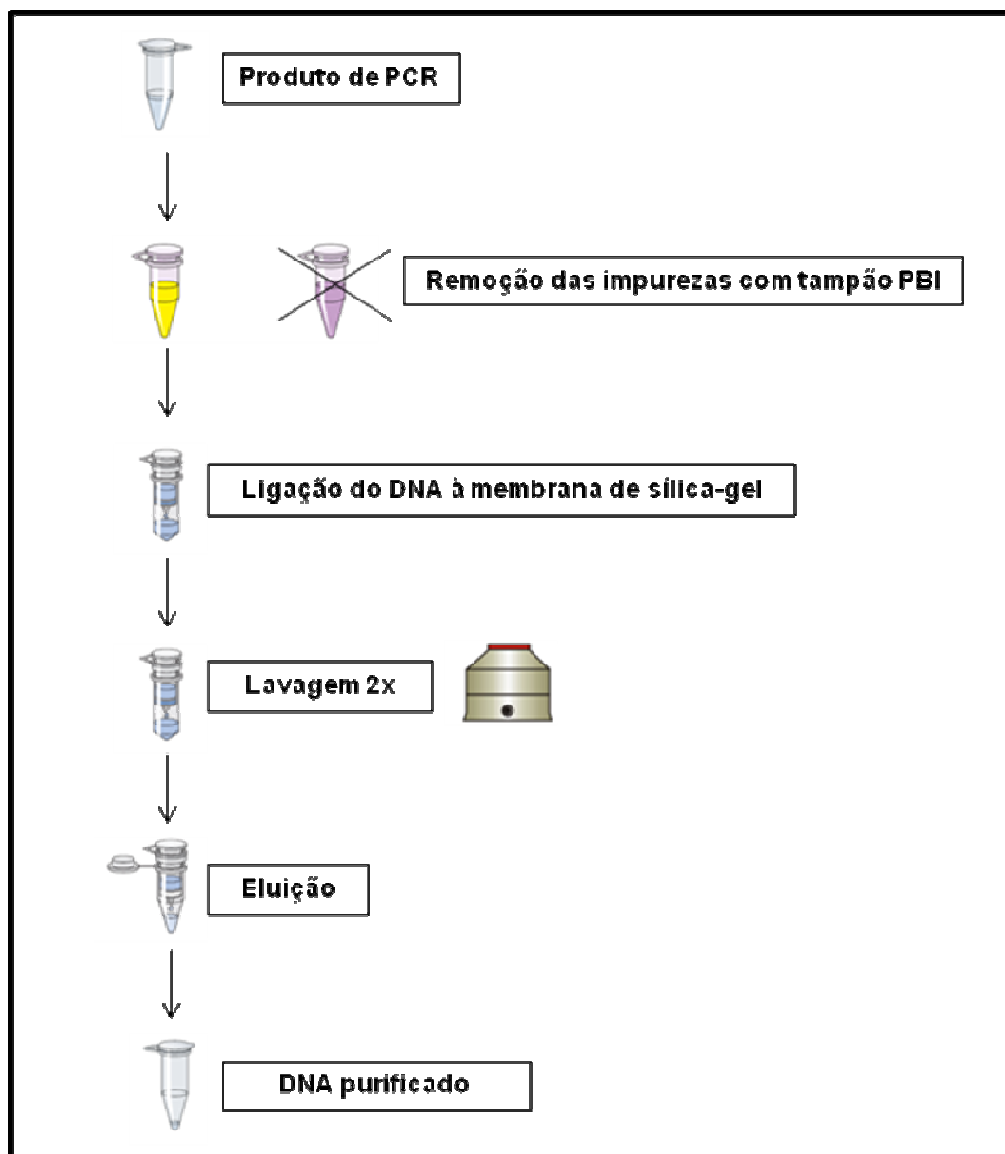


FIGURA 10 – Fluxograma da técnica de purificação dos produtos de PCR utilizando o *QIAquick Purification Kit* (Qiagen, Valencia, CA).

Fonte: Adaptado do manual do usuário do *QIAquick Purification Kit*.

4.11 SEQUENCIAMENTO DO GENE *aggR*

Amostras positivas para o gene *aggR* foram analisadas quanto à variação genética nesse importante regulador transcricional de fatores de virulência plasmidiais e cromossomais de EAEC. Os produtos obtidos a partir da reação de amplificação para esse gene (descritos no item 4.7.) foram seqüenciados em triplicata para a pesquisa de SNPs.

As reações de seqüenciamento foram preparadas a partir do produto de PCR purificado e foram realizadas no analisador genético *ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, Foster, CA)*. Estas reações continham para cada 1 μ L (aproximadamente 3 a 10ng de DNA para produtos de até 500pb) de produto de PCR purificado, 0,5 μ L do reagente de reação, 2,5 μ L de tampão salino, ambos fornecidos pelo *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster, CA)*, 2 μ L de iniciadores (2 μ M) senso ou antisenso e água miliQ autoclavada para completar o volume final das reações (10 μ L). O reagente de reação utilizado contém uma enzima específica para esse tipo de reação e tampão salino, além de deoxinucleotídeos normais e modificados, marcados ou não com fluorescência.

As amostras foram aplicadas em poços individuais de uma placa com 96 poços e submetidas a um processo de amplificação em um termociclador de placa (*MyCycler Personal Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA*). As reações foram efetuadas de acordo com a seguinte programação: desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto, seguida de 40 ciclos a 96°C por 30 segundos, 59°C por 30 segundos e 60°C por 4 minutos. Após o término da reação, adicionou-se a cada poço 40 μ L de isopropanol a 65%. Após incubação por 20 minutos à temperatura ambiente, as amostras em placa foram centrifugadas em velocidade de 3000xg durante 35 minutos. O sobrenadante foi descartado por inversão das placas seguida por centrifugação invertida rápida durante 1 minuto a 3000xg. Para precipitação dos marcadores não incorporados, acrescentou-se ao precipitado 150 μ L de etanol a 60% e centrifugou-se por 5 minutos em velocidade de 3000xg. O etanol foi completamente removido por inversão das placas seguida novamente de centrifugação invertida por 2 minutos na velocidade de 3000xg. Em seguida, aplicou-se a cada poço 20 μ L de formamida deionizada e ultra-pura (*Hi-Di™ Formamide, Applied Biosystems, Hercules, CA*). Ao término da re-diluição das amostras em formamida, as placas foram levadas novamente ao termociclador para aquecimento a 96°C por 2 minutos e rapidamente resfriadas em gelo por mais 2 minutos. Aplicadas ao seqüenciador, as amostras tiveram tempo de injeção de 30 segundos à 2KV e a eletroforese procedeu com uma voltagem de 12,2KV por 1,5 hora. Os resultados foram analisados a partir do programa *Sequencer Scanner* versão 1.0 (*Applied Biosystems, Hercules, CA*).

4.12 AVALIAÇÃO DE LACTOFERRINA FECAL (LFF)

A concentração de LFF, um marcador sensível e específico da presença de inflamação intestinal expresso por neutrófilos ativados, foi avaliada através de teste imunoenzimático (*enzyme linked immunosorbent assay* – ELISA), utilizando o *IBD-Scan* (*Techlab, Blacksburg, VA*) (KANE *et al.*, 2003). Esse *kit* contém uma placa para microensaio com poços sensibilizados com anticorpos policlonais contra lactoferrina. Diluições padronizadas das fezes (1:100 e 1:1000) foram adicionadas aos poços. Se estiver presente em níveis detectáveis, a lactoferrina se liga ao anticorpo durante os 30 minutos de incubação a 37°C. Após lavagem, o conjugado, composto de anticorpo policlonal conjugado com peroxidase, foi adicionado, incubado por 30 minutos a 37°C, ligando-se à lactoferrina capturada durante a primeira fase de incubação. Qualquer material não-ligado foi removido através de lavagens. Em seguida, o substrato da enzima (peróxido de hidrogênio) e uma substância cromógena (tetra-metil-benzidina) foram adicionados e incubados para gerar uma reação de cor, a partir de complexos enzima-anticorpo-antígeno, formados na presença de lactoferrina. A absorbância, diretamente proporcional à concentração de LFF presente, foi avaliada em um leitor de ELISA (*Microwell System Reader 230S, Organon Teknika, Durham, NC*) a 450nm. Uma curva padrão foi gerada através de lactoferrina humana purificada padrão (6,25 a 100ng/mL) e foi utilizada para confecção de um gráfico de valores de absorbância *versus* concentração de lactoferrina, determinando a concentração de lactoferrina final nas fezes. O resultado obtido foi codificado em escores: negativo (0 a 7,00µg/g de fezes), positivo + (7,01 a 25,00µg/g de fezes), positivo ++ (25,01 a 50,00µg/g de fezes), positivo +++ (>50µg/g de fezes)

4.13 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS FECAIS

Alíquotas das amostras fecais foram avaliadas quanto aos níveis das citocinas antiinflamatórias IL-4 e IL-10 e pró-inflamatórias fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon gama (IFN- γ), segundo técnica descrita por Alcântara *et al.* (2003). As alíquotas de fezes foram removidas do freezer abaixo de -70°C, descongeladas e diluídas em tampão salina-fosfato (*phosphate-buffered saline* –

PBS) 1:2 (peso:volume), contendo inibidor de tripsina (1mg/mL) e fluoreto de benzenosulfonil (1mg/mL) (*Sigma, St. Louis, MO*). Após homogeneização e centrifugação por 10 minutos a 12.000xg, os sobrenadantes foram coletados e testados para quantificação das citocinas fecais através dos seguintes kits disponíveis comercialmente: *Human IL-4 Imunoassay, IL-10 EASIA, Human TNF- α Imunoassay* e *Human IFN- γ Imunoassay (Invitrogen, Carlsbad, CA)*. Os kits se baseiam em uma reação de ELISA e cada teste foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Amostras, padrões e controles foram pipetados em poços pré-sensibilizados com anticorpos monoclonais específicos para cada citocina pesquisada. Substâncias não-ligadas durante a primeira fase de incubação foram removidas através de sucessivas lavagens. Na seqüência, os poços foram adicionados de anticorpo policlonal conjugado com estreptavidina-peroxidase, do substrato da enzima (peróxido de hidrogênio) e da solução cromógena (tetra-metil-benzidina). Essa enzima catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e a reação é sinalizada pela mudança de cor gerada a partir da substância cromógena. A intensidade da cor desenvolvida ao final da reação é proporcional à concentração da citocina ligada e foi avaliada em um leitor de ELISA (*Microwell System Reader 230S, Organon Teknika, Durham, NC*) a 450nm. A geração de uma curva padrão, através de citocinas humanas purificadas de concentrações conhecidas, possibilitou a confecção de um gráfico de valores de absorvância *versus* concentração de citocinas, que foi utilizado para a quantificação final das citocinas fecais.

4.14 GERENCIAMENTO E ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os dados foram incorporados no computador duas vezes por duas pessoas diferentes do SSGD, da UPC/IBIMED, UFC, e as digitações foram comparadas através do programa *Access (Microsoft Corporation, New York, NY)*.

A análise estatística foi realizada utilizando-se o *Statistical Package for Social Sciences* versão 11.0 (*SPSS Inc., Chicago, IL*). Para a análise descritiva e estatística dos dados foram utilizadas tabelas e figuras e, no caso de variáveis contínuas, empregaram-se medidas de resumo. As figuras foram obtidas utilizando-se o programa *GraphPad Prism* versão 4.00 para *Windows (GraphPad Software,*

San Diego, CA). Utilizou-se o programa *EpiInfo* versão 6.0 (*Center for Diseases Control, Atlanta, GA*) para o cálculo dos escores-z a partir das medidas antropométricas.

O teste de *Shapiro-Wilk* foi empregado para verificar a normalidade dos dados e o teste de *Levene* para checar a igualdade das variâncias. Os testes não pareados t de *Student* foram utilizados para verificar a existência de diferenças entre grupos de dados contínuos e com distribuição normal. No caso de não normalidade da distribuição, utilizou-se o teste de *Mann-Whitney*. O teste do Qui-quadrado foi empregado para comparar a proporção de ocorrência de uma variável entre os grupos. A correlação de *Spearman* foi utilizada para analisar a relação entre a concentração de citocinas fecais e os escores-z, os níveis de citocinas fecais e as características da doença e dessas com os escores-z. O nível de significância de 5% foi empregado em todos os testes.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA

Durante os quatro meses de coleta, 325 crianças na faixa etária entre dois e 36 meses foram incluídas no estudo, sendo 43 residentes na comunidade Gonçalves Dias e 282 no Parque Universitário. As crianças foram provenientes de 295 residências, das quais 268 (90,9%) tinham apenas 1 criança/residência, como mostra a **Tabela 3**.

TABELA 3 – Distribuição da população incluída no estudo de acordo com o local de origem e o número de crianças por residência.

Crianças por residência	Gonçalves Dias		Parque Universitário		Total	
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%
1	35	11,9	233	79,0	268	90,9
2	2	0,7	23	7,8	25	8,5
3	0	0,0	1	0,3	1	0,3
4	1	0,3	0	0,0	1	0,3
Total	38	12,9	257	87,1	295	100,0

Em média, as residências abrigavam 5,5 moradores em 4,0 compartimentos, sendo 1,9 deles utilizados para dormir. A grande maioria das casas era construída de alvenaria, abastecida com água encanada e contava com sanitário no seu interior (98,3%; 85,5% e 83,0%, respectivamente). Pouco mais de 1/3 (35,4%) utilizavam sanitário com descarga d'água.

Considerando 297 fichas epidemiológicas em que o quesito “renda familiar” foi preenchido, 125 (42,1%) dessas famílias sobreviviam com até um salário mínimo por mês.

Em relação ao sexo das crianças, foi verificada uma predominância do sexo masculino (52,9%). A relação masculino/feminino foi de 1,14:1 (**TABELA 4**).

Quanto à idade, 67,4% das crianças incluídas nesse estudo tinham mais de 12 meses. Apenas 11,4% delas apresentavam idade na faixa entre dois e seis meses. As crianças tiveram, em média, 18,0 meses, variando de 2,0 a 35,9 meses (**TABELA 4**).

TABELA 4 – Distribuição da população de estudo de acordo com o sexo e a idade.

Parâmetros	Nº.	%
Sexo		
Masculino	172	52,9
Feminino	151	46,5
Não informado	2	0,6
Idade (meses)		
2 – 6	37	11,4
6 – 12	69	21,2
12 – 24	118	36,3
24 – 36	101	31,1
Total	325	100,0

Os índices antropométricos, que incluíram estatura, peso, circunferência braquial e espessura da prega cutânea, foram obtidos em, pelo menos, 280 crianças e, juntamente com a idade, foram utilizados para o cálculo dos escores-z e do IMC. As medidas de resumo dos índices antropométricos da população estudada estão descritas na **Tabela 5**.

TABELA 5 – Medidas de resumo dos dados antropométricos coletados da população de estudo.

Medidas antropométricas	Nº.	Média	Desvio padrão
Altura (cm)	280	81,9	9,1
Peso (Kg)	283	11,7	2,5
Circunferência do braço (cm)	280	16,0	1,8
Prega cutânea (mm)	281	7,4	1,8
IMC (Kg/m ²) ^a	280	17,4	1,9
HAZ ^b	280	-0,4	1,2
WAZ ^b	283	-0,1	1,3
WHZ ^b	280	0,6	1,2

^a IMC = divisão do peso (Kg) pela altura (m) ao quadrado;

^b Os escores-z altura-por-idade (HAZ), peso-por-idade (WAZ) e peso-por-altura (WHZ) foram convertidos a partir da altura, peso e idade das crianças e os valores obtidos foram comparados com o valor médio da população.

A característica das fezes foi observada nas amostras de 304 crianças. Mais de 70% delas foram consideradas como formadas (**TABELA 6**).

TABELA 6 – Distribuição da população de estudo segundo a característica das fezes coletadas.

Característica das fezes	Nº.	%
Formadas	244	75,1
Semi-formadas	31	9,5
Não formadas	13	4,0
Líquidas	16	4,9
Não informado	21	6,5
Total	325	100,0

Quando questionados sobre a ocorrência de diarreia nos últimos 14 dias, 25,8% dos pais ou responsáveis responderam “sim” (**TABELA 7**).

TABELA 7 – Distribuição da população de estudo quanto à ocorrência de diarreia nos últimos 14 dias.

Ocorrência de diarreia nos últimos 14 dias	Nº.	%
Sim	84	25,8
Não	241	74,2
Total	325	100,0

Como esse foi o critério adotado para a definição dos grupos a serem analisados, as crianças incluídas nesse estudo foram divididas em casos (84) e controles (241). A amostra de um dos casos não foi utilizada na análise por falta de seqüência no processamento laboratorial. As 241 crianças do grupo controle receberam números randômicos, que foram organizados em ordem crescente. As primeiras 83 crianças da lista controle foram selecionadas para a realização dos testes. Dessa forma, esse estudo foi composto por 83 crianças-caso e 83 crianças-controle.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DA SUB-POPULAÇÃO CASO-CONTROLE

Entre as 83 crianças do grupo caso estudadas, 57,8% eram do sexo feminino, resultando em uma proporção masculino/feminino de 0,7:1. Essa predominância do sexo feminino também foi observada entre o grupo de 83 crianças aparentemente saudáveis analisadas. Como demonstrado na **Tabela 8**, os grupos caso e controle não diferiram quanto ao sexo das crianças estudadas ($p=0,486$).

Em relação à idade das crianças analisadas, todos os grupos etários entre dois e 36 meses foram incluídos. A maior proporção de crianças foi observada

no grupo com faixa etária entre 12 e 36 meses. Entre os casos, 72,3% das crianças tinham idade superior a 12 meses. Entre os controles, esse percentual foi de 57,8%. O grupo controle apresentou um maior percentual de crianças na faixa etária entre dois e seis meses ($p=0,020$) (**TABELA 8**).

TABELA 8 – Distribuição da sub-população caso-controle segundo o sexo e a idade.

Parâmetros	Casos		Controles		p
	Nº.	%	Nº.	%	
Sexo					
Masculino	35	42,2	39	47,0	
Feminino	48	57,8	43	51,8	0,486
Não informado	0	0,0	1	1,2	
Idade (meses)					
2 – 6	3	3,6	14	16,9	
6 – 12	20	24,1	21	25,3	0,020*
12 – 24	33	39,8	21	25,3	
24 – 36	27	32,5	27	32,5	
Total	83	100,0	83	100,0	

* $p<0,05$

As medidas antropométricas altura, peso, circunferência do braço, espessura da prega cutânea, IMC e escores-z, obtidas das crianças dos grupos caso e controle, estão resumidas na **Tabela 9**. Os grupos apresentaram diferença significativa quanto à espessura da prega cutânea ($p=0,040$), IMC ($p=0,035$) e os escores-z WAZ (0,023) e WHZ ($p=0,014$).

TABELA 9 – Medidas de resumo dos dados antropométricos coletados da sub-população caso e controle.

Medidas antropométricas	Nº.	Média	Desvio padrão	p
Casos				
Altura (cm)	71	82,7	8,1	0,180
Peso (Kg)	71	11,8	2,4	0,653
Circunferência do braço (cm)	71	15,7	1,4	0,076
Prega cutânea (mm)	71	7,1	1,9	0,040*
IMC (Kg/m ²) ^a	71	17,2	2,0	0,035*
HAZ ^b	71	-0,6	1,3	0,339
WAZ ^b	71	-0,3	1,3	0,023*
WHZ ^b	71	0,3	1,3	0,014*
Controles				
Altura (cm)	70	80,5	11,1	
Peso (Kg)	73	11,6	2,9	
Circunferência do braço (cm)	71	16,2	1,9	
Prega cutânea (mm)	70	7,8	2,1	
IMC (Kg/m ²) ^a	70	17,9	1,9	
HAZ ^b	73	-0,4	1,2	
WAZ ^b	73	0,2	1,3	
WHZ ^b	73	0,8	1,1	

^a IMC = divisão do peso (Kg) pela altura (m) ao quadrado;

^b Os escores-z altura-por-idade (HAZ), peso-por-idade (WAZ) e peso-por-altura (WHZ) foram convertidos a partir da altura, peso e idade das crianças e os valores obtidos foram comparados com o valor médio da população;

* p<0,05

Em torno de 76% das amostras fecais analisadas de crianças com ocorrência de diarreia nos últimos 14 dias, segundo informação dos pais ou responsáveis, apresentaram-se formadas quando observadas durante o processamento laboratorial. Apenas 6,1% delas apresentaram aspecto líquido. Entre as crianças sem histórico de diarreia, esses percentuais foram de 79,5% e 6,1%, respectivamente (**TABELA 10**).

TABELA 10 – Distribuição da sub-população caso-controle segundo a característica das fezes coletadas.

Característica das fezes	Casos		Controles	
	Nº.	%	Nº.	%
Formadas	63	75,9	66	79,5
Semi-formadas	9	10,8	3	3,6
Não formadas	3	3,6	4	4,7
Líquidas	5	6,1	5	6,1
Não informado	3	3,6	5	6,1
Total	83	100,0	83	100,0

5.3 PREVALÊNCIA DE EAEC ENTRE CASOS E CONTROLES

Dos 83 casos analisados, 33 (39,8%) foram positivos no PCR para o gene *aaiC* e 16 (19,3%) para o gene *aatA*, isoladamente ou em combinação. Entre os controles, o percentual de positividade para os mesmos genes foi 31 (37,3%) e 19 (22,9%), respectivamente. Entre os 33 casos e 31 controles positivos para o gene *aaiC*, 15 (45,5%) e 16 (51,6%), respectivamente, também foram positivos para *aatA*. Apenas 1 caso e 3 controles foram positivos somente para o gene *aatA*. A **Tabela 11** mostra a distribuição de positividade desses genes entre crianças dos grupos caso e controle.

Como descrito no item 4.6 da seção Material e Métodos, o diagnóstico molecular de EAEC foi baseado na presença de pelo menos um dos genes pesquisados (*aaiC* e *aatA*). Considerando esse critério, os grupos caso e controle não diferiram quanto à positividade para EAEC ($p=1,000$). Dos 83 casos, 34 (41,0%) foram positivos para EAEC. O mesmo percentual de positividade foi obtido entre o grupo controle (**TABELA 12**). A **Figura 11** exemplifica as bandas obtidas após amplificação dos genes *aaiC* e *aatA*. Os produtos foram visualizados após eletroforese, sob voltagem constante, em gel de agarose a 1,2% e coloração com brometo de etídio.

TABELA 11 – Distribuição dos casos e controles quanto à positividade para os genes *aaiC* e *aatA* através de PCR.

Resultado da PCR	Casos	Controles	Total
	Nº. (%)	Nº. (%)	
Positivo somente para o gene <i>aaiC</i>	18 (21,7)	15 (18,1)	33
Positivo somente para o gene <i>aatA</i>	1 (1,2)	3 (3,6)	4
Positivo para ambos os genes	15 (18,1)	16 (19,3)	31
Negativo para ambos os genes	49 (59,0)	49 (59,0)	98
Total	83 (100,0)	83 (100,0)	166

TABELA 12 – Distribuição dos casos e controles quanto à positividade para EAEC, de acordo com o resultado da PCR para os genes *aaiC* e/ou *aatA*.

Positivo para EAEC	Casos	Controles	Total	p
	Nº. (%)	Nº. (%)		
Sim	34 (41,0)	34 (41,0)	68	1,000
Não	49 (59,0)	49 (59,0)	98	
Total	83 (100,0)	83 (100,0)	166	

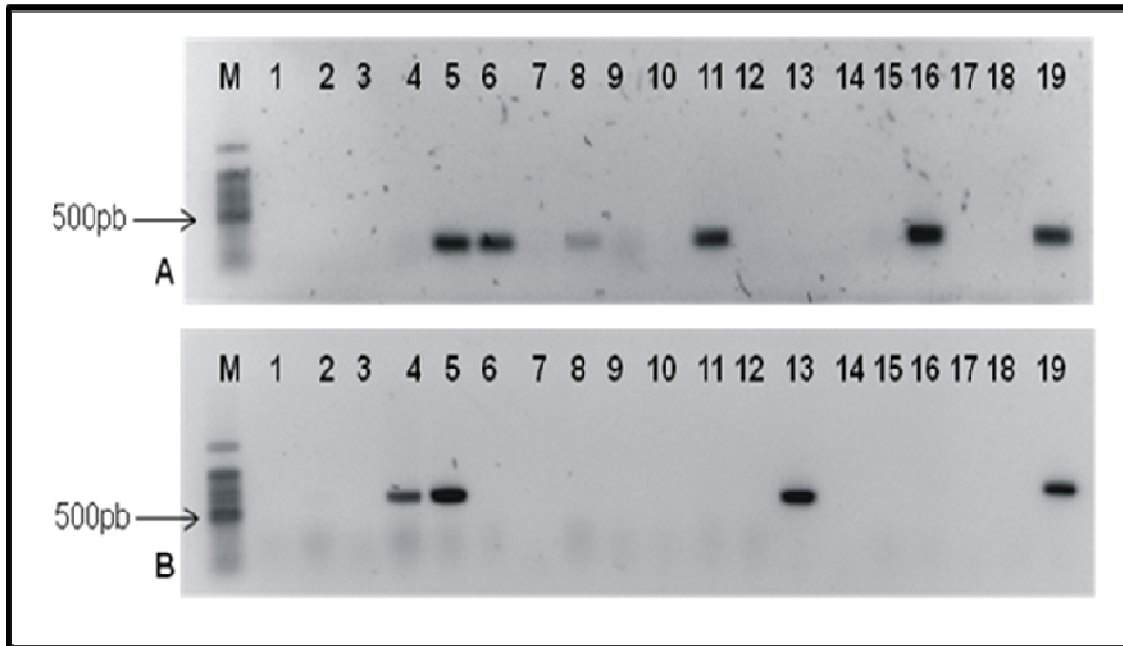


FIGURA 11 – Visualização das bandas obtidas após amplificação por PCR dos genes *aaiC* (11A) e *aatA* (11B), utilizados para o diagnóstico de EAEC. Os produtos obtidos apresentaram tamanhos de 215pb e 630pb, respectivamente. As amostras foram submetidas à extração de DNA através do *QIAamp DNA Stool Mini Kit*. A amplificação dos genes foi visualizada através de eletroforese em gel de agarose a 1,2% e coloração com brometo de etídio. M = marcador molecular de 100pb; linha 1 a 16 = amostras; linha 17 = controle negativo (água); linha 18 = controle negativo (amostra comensal HS); linha 19 = controle positivo (EAEC O42).

5.4 CARACTERIZAÇÃO DA DOENÇA DIARRÉICA

As crianças doentes com infecção confirmada por EAEC não apresentaram diferença estatística na duração da diarreia e no número de evacuações líquidas durante 24h quando comparadas às crianças doentes sem infecção por EAEC ($p=0,752$ e $p=0,635$, respectivamente). Entre os 83 casos diarréicos estudados, a doença durou, em média, 4,2 dias, variando de 1 a 18 dias. As crianças tiveram, em média, 4,1 evacuações líquidas no período de 24h. O grupo dos casos infectados com EAEC apresentou média de 4,3 dias com diarreia e 4,0 evacuações líquidas em 24h, enquanto nos casos não-infectados com a bactéria essas médias foram de 4,2 e 4,1, respectivamente. As médias de dias de diarreia e

do número de evacuações líquidas em crianças infectadas ou não por EAEC estão demonstradas na **Figura 12**.

Apenas 3 dos 83 casos (3,6%) apresentaram doença com duração superior a 14 dias e foram classificados como diarreia persistente. Destes, 2/3 (66,7%) foram positivos para EAEC. Dos 80 casos de diarreia aguda pesquisados, 32 (40,0%) foram positivos para a bactéria através do método de diagnóstico molecular empregado (**FIGURA 13**).

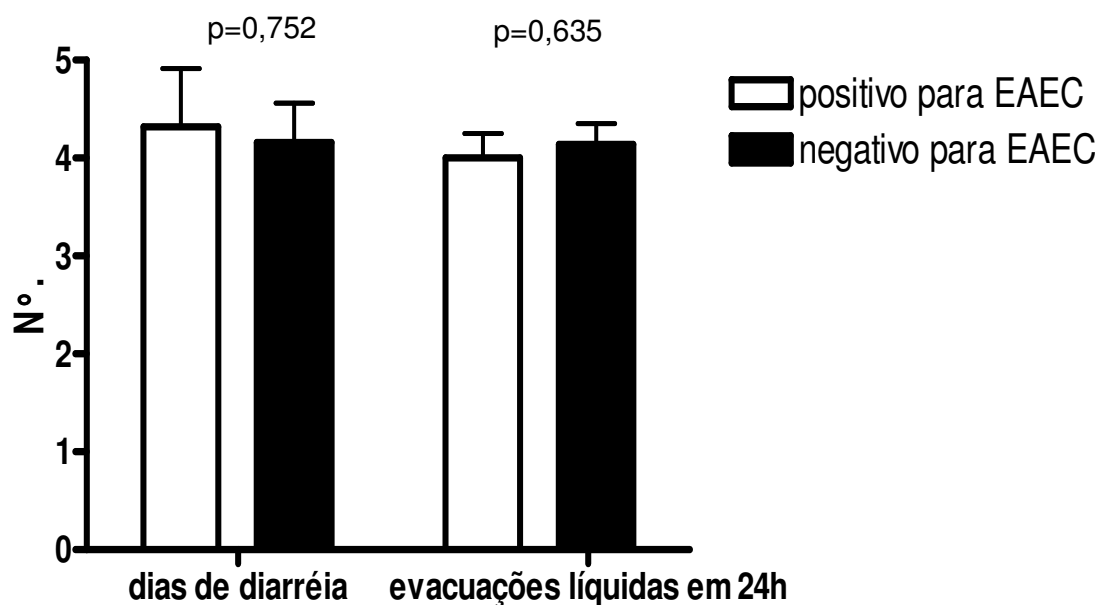


FIGURA 12 – Caracterização da doença diarreica (duração em dias e número de evacuações líquidas no período de 24h) dos casos positivos e negativos para EAEC.

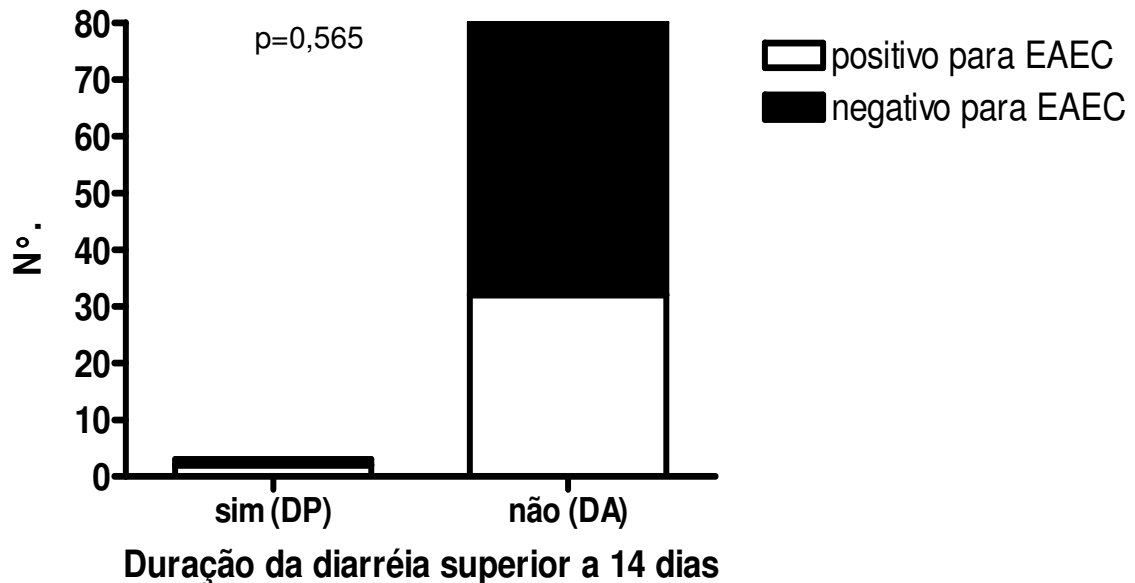


FIGURA 13 – Número de casos de diarreia com duração superior a 14 dias entre crianças doentes infectadas ou não por EAEC. DP = diarreia persistente; DA = diarreia aguda.

5.5 AVALIAÇÃO DAS MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS

Não se observou associação significativa entre EAEC e os escores-z em nenhum dos grupos (casos: HAZ $p=0,653$; WAZ $p=0,222$ e WHZ $p=0,087$; controles: HAZ $p=0,129$; WAZ $p=0,124$ e WHZ $p=0,910$) (**FIGURA 14**). O mesmo ocorreu com os demais índices antropométricos avaliados (casos: circunferência braquial $p=0,972$; prega cutânea $p=0,896$ e IMC $p=0,060$; controles: circunferência braquial $p=0,495$; prega cutânea $p=0,078$ e IMC $p=0,713$) (**FIGURA 15**).

Quanto à severidade da doença, pode-se observar na **Figura 16**, utilizando a correlação de *Spearman*, que não existe associação entre os dias de diarreia e o número de evacuações líquidas nas últimas 24h e os índices antropométricos convertidos em escores-z pesquisados.

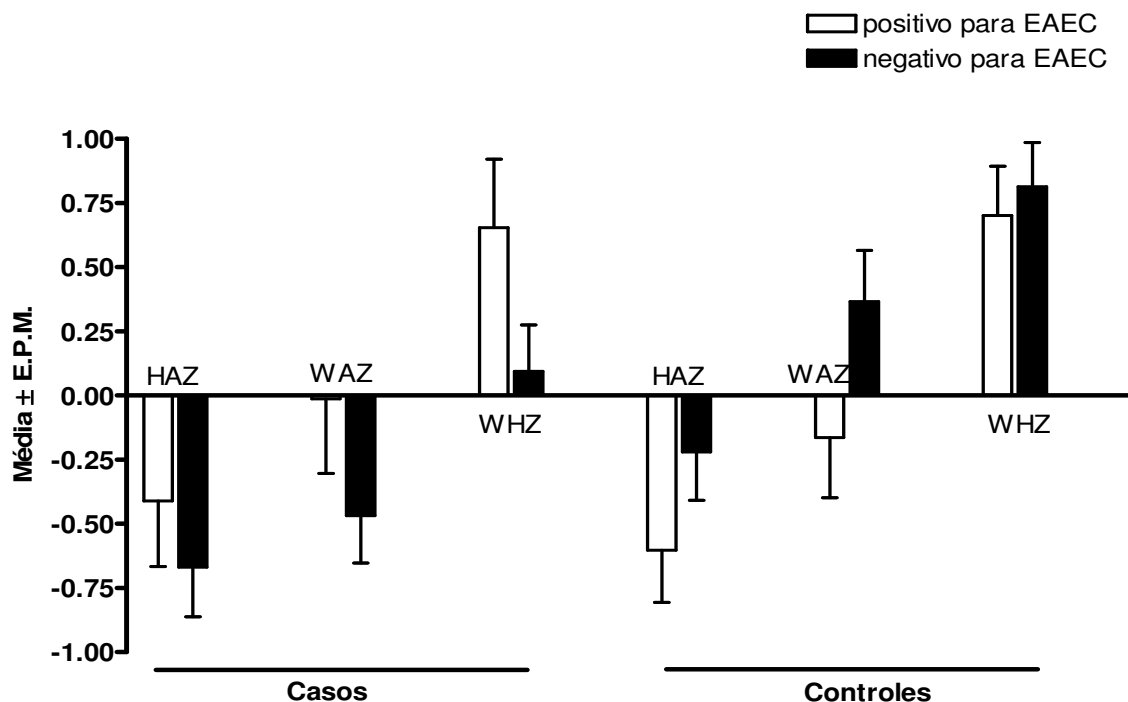


FIGURA 14 – Comparação das médias \pm erro padrão dos escores-z altura-por-idade (HAZ), peso-por-idade (WAZ) e peso-por-altura (WHZ) entre casos e controles positivos e negativos para EAEC. Os escores-z foram convertidos a partir da altura, peso e idade das crianças e os valores obtidos foram comparados com o valor médio da população.

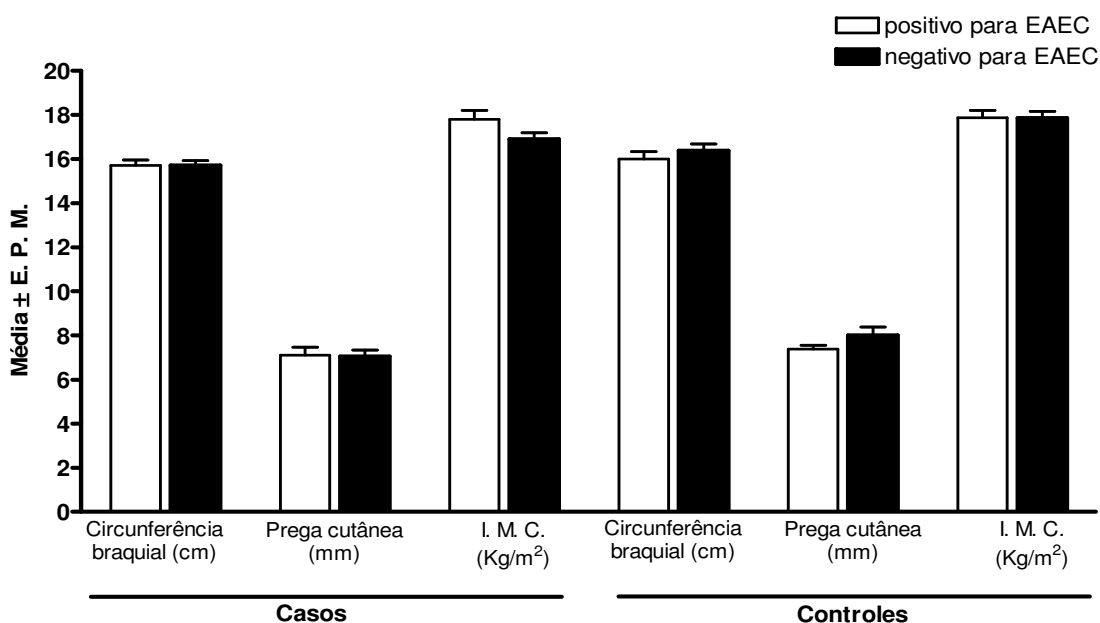


FIGURA 15 – Comparação das médias \pm erro padrão da circunferência braquial, espessura da prega cutânea e índice de massa corpórea (IMC) entre casos e controles positivos e negativos para EAEC. O IMC é resultante da divisão do peso (Kg) pela altura (m) ao quadrado.

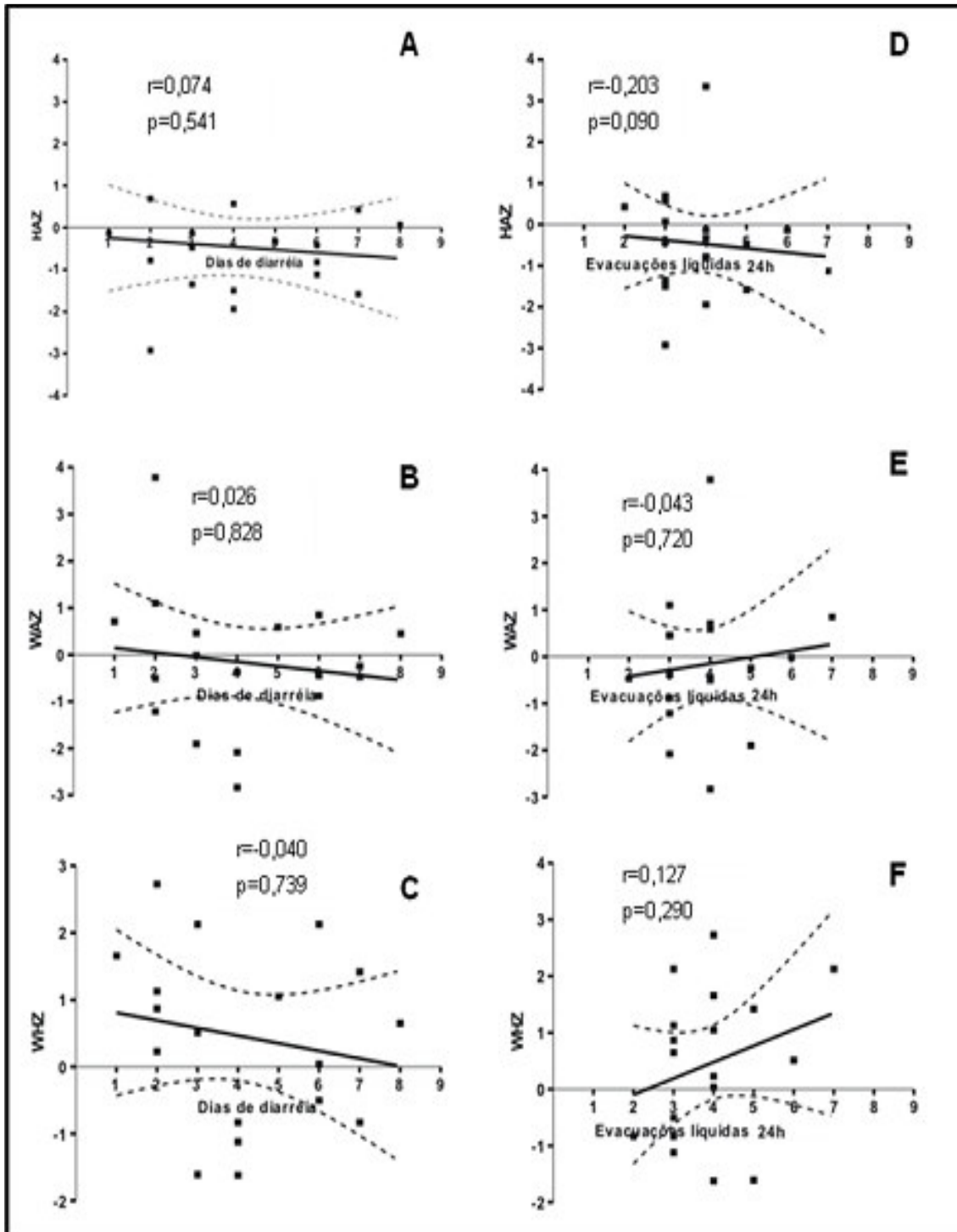


FIGURA 16 – Representação gráfica das correlações entre os escores-z altura-por-idade (HAZ), peso-por-idade (WAZ) e peso-por-altura (WHZ) e a severidade da doença, caracterizada pelo número de dias com diarreia (16A, 16B e 16C) e de evacuações líquidas em 24 horas (16D, 16E e 16F), entre crianças com diarreia. Os escores-z foram convertidos a partir da altura, peso e idade das crianças e os valores obtidos foram comparados com o valor médio da população. A análise da associação foi realizada através da correlação de *Spearman* (r).

5.6 PESQUISA DOS GENES DE VIRULÊNCIA

Não se observou diferença estatística quanto à presença isolada dos genes de virulência entre os grupos caso e controle. Entre as amostras positivas para EAEC, o gene *aggR* foi detectado em 16 casos (47,1% - 16/34) e 17 controles (50,0% - 17/34); o gene *pet* foi encontrado em 14 casos (41,2% - 14/34) e 7 controles (20,6% - 7/34); *pic* foi observado no mesmo número de casos e controles (97,1% - 33/34); *aap* foi observado em 18 casos (52,9% - 18/34) e 20 controles (58,8% - 20/34) e *astA* foi detectado na maioria das amostras de casos e controles (97,1% - 33/34 e 88,2% - 30/34, respectivamente). Duas amostras do grupo controle foram positivas para o gene *aggR* e negativas para *aaiC*. Algumas cepas de EAEC carregavam o regulador *aggR*, mas careciam de seus genes regulados *aap* (2 casos e 4 controles) e *aatA* (1 caso e 1 controle).

As **Tabelas 13 e 14** mostram a distribuição de positividade dos genes *aggR*, *pet*, *pic*, *aap* e *astA*, isoladamente e em combinação, entre as amostras positivas para EAEC dos grupos caso e controle. Quando observadas as frequências combinadas dos genes pesquisados, houve associação significativa entre a presença do gene *pet* e a doença associada com EAEC ($p=0,022$) (**TABELA 15**). Os **Anexos H e I** trazem os resultados de positividade individuais de cada amostra obtida a partir das crianças dos grupos caso e controle, respectivamente, quanto aos genes pesquisados. A **Figura 17** exemplifica as bandas obtidas após amplificação desses genes. Os produtos foram visualizados após eletroforese, sob voltagem constante, em gel de agarose a 1,2% e coloração com brometo de etídio.

TABELA 13 – Percentual de positividade dos genes codificadores de fatores de virulência isolados entre amostras positivas para EAEC dos grupos caso e controle.

Positivo para genes de virulência	Casos	Controles	Total	p
	Nº. (%)	Nº. (%)		
Gene <i>aggR</i>				
Sim	16 (47,1)	17 (50,0)	33	1,000
Não	18 (52,9)	17 (50,0)	35	
Total	34 (100,0)	34 (100,0)	68	
Gene <i>pet</i>				
Sim	14 (41,2)	7 (20,6)	21	0,114
Não	20 (58,8)	27 (79,4)	47	
Total	34 (100,0)	34 (100,0)	68	
Gene <i>pic</i>				
Sim	33 (97,1)	33 (97,1)	66	1,000
Não	1 (2,9)	1(2,9)	2	
Total	34 (100,0)	34 (100,0)	68	
Gene <i>aap</i>				
Sim	18 (52,9)	20 (58,8)	38	0,807
Não	16 (47,1)	14 (41,2)	30	
Total	34 (100,0)	34 (100,0)	68	
Gene <i>astA</i>				
Sim	33 (97,1)	30 (88,2)	63	0,356
Não	1 (2,9)	4 (88,2)	5	
Total	34 (100,0)	34 (100,0)	68	

TABELA 14 – Percentual de positividade dos genes codificadores de fatores de virulência em combinação entre amostras positivas para EAEC dos grupos caso e controle.

Genes de virulência	Casos	Controles	Total
	Nº. (%)	Nº. (%)	
Gene <i>pic</i> ^a	1 (2,9)	0 (0,0)	1
Gene <i>astA</i> ^b	0 (0,0)	1 (2,9)	1
Genes <i>pic</i> + <i>aap</i>	0 (0,0)	1 (2,9)	1
Genes <i>pic</i> + <i>astA</i> I	10 (29,5)	7 (20,7)	17
Genes <i>aggR</i> + <i>pet</i> + <i>pic</i>	0 (0,0)	1 (2,9)	1
Genes <i>aggR</i> + <i>pic</i> + <i>aap</i>	0 (0,0)	1 (2,9)	1
Genes <i>aggR</i> + <i>pic</i> + <i>astA</i>	1 (2,9)	2 (5,9)	3
Genes <i>pet</i> + <i>pic</i> + <i>astA</i>	3 (8,9)	2 (5,9)	5
Genes <i>pic</i> + <i>aap</i> + <i>astA</i>	3 (8,9)	5 (14,7)	8
Genes <i>aggR</i> + <i>pet</i> + <i>aap</i> + <i>astA</i>	1 (2,9)	0 (0,0)	1
Genes <i>aggR</i> + <i>pet</i> + <i>pic</i> + <i>astA</i>	1 (2,9)	1 (2,9)	2
Genes <i>aggR</i> + <i>pic</i> + <i>aap</i> + <i>astA</i>	5 (14,7)	10 (29,5)	15
Genes <i>pet</i> + <i>pic</i> + <i>aap</i> + <i>astA</i>	1 (2,9)	1 (2,9)	2
Genes <i>aggR</i> + <i>pet</i> + <i>pic</i> + <i>aap</i> + <i>astA</i>	8 (23,5)	2 (5,9)	10
Total	34 (100,0)	34 (100,0)	68

^a Uma amostra do grupo caso foi positiva somente para o gene *pic*;

^b Uma amostra do grupo controle foi positiva somente para o gene *astA*.

TABELA 15 – Comparação da combinação dos genes relacionados à virulência de EAEC pesquisados na presença / ausência do gene *pet*.

Genes de Virulência	Casos	Controles	Total	p
	Nº. (%)	Nº. (%)		
Genes <i>aggR</i> + <i>pic</i> + <i>aap</i> + <i>astA</i>	5 (38,5)	10 (83,3)	15	
Genes <i>aggR</i> + <i>pet</i> + <i>pic</i> + <i>aap</i> + <i>astA</i>	8 (61,5)	2 (16,7)	10	0,022*
Total	13 (100,0)	12 (100,0)	25	

* p<0,05

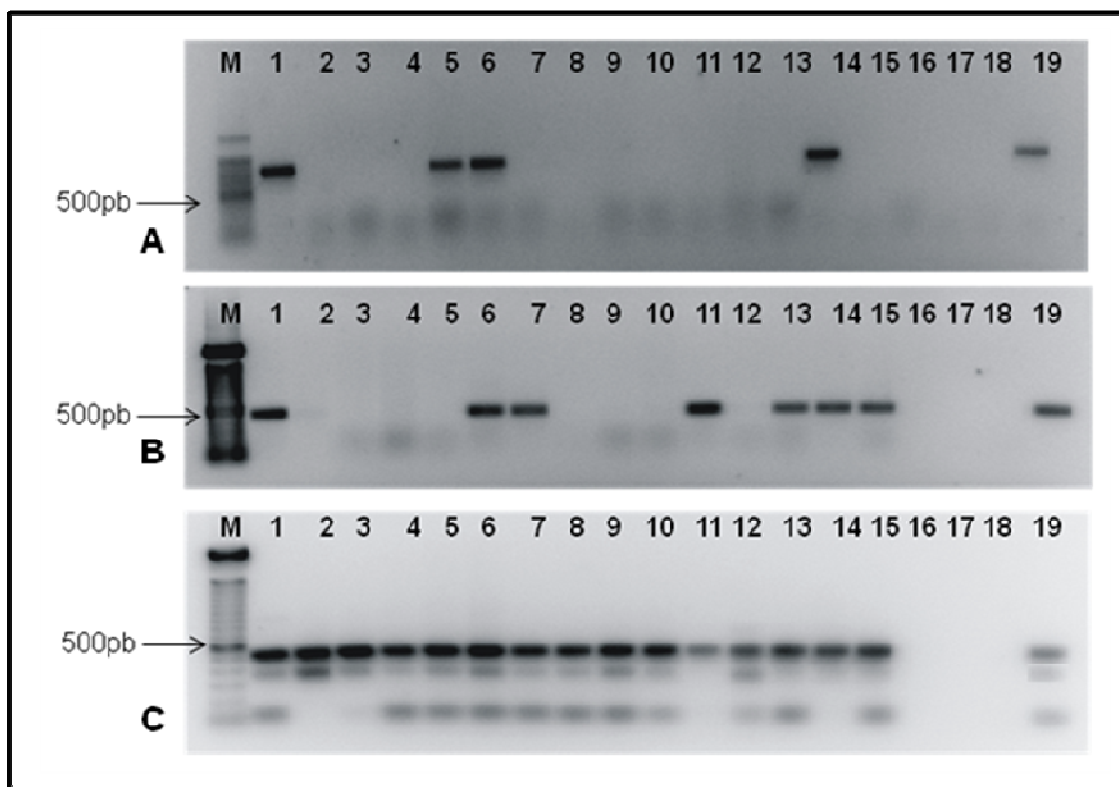


FIGURA 17 – Visualização das bandas obtidas após amplificação por PCR dos genes codificadores de fatores de virulência *aggR* (17A), *pet* (17B), *pic*, *aap* e *astA* (amplificados através de uma reação multiplex – 17C). Os produtos obtidos apresentaram tamanhos de 798pb, 558pb, 517pb, 356pb e 112pb, respectivamente. As amostras foram submetidas à extração de DNA através do *QIAamp DNA Stool Mini Kit*. A amplificação dos genes foi visualizada através de eletroforese em gel de agarose a 1,2% e coloração com brometo de etídio. M = marcador molecular de 100pb; linha 1 a 16 = amostras; linha 17 = controle negativo (água); linha 18 = controle negativo (amostra comensal HS); linha 19 = controle positivo (EAEC O42).

5.7 SEQÜENCIAMENTO DO GENE *aggR*

Sete amostras de cada grupo foram submetidas à análise da seqüência nucleotídica após resultado positivo na PCR para o gene *aggR* (43,8% - 7/16 e 41,2% - 7/17 dos casos e controles, respectivamente). O par de iniciadores utilizado na reação foi desenhado para anelar exatamente nos códons sinalizadores de iniciação (ATG) e parada (TGA) de codificação da proteína, com o intuito de amplificar ao máximo a seqüência codificadora do gene regulador *aggR*.

Dos 798 aminoácidos que compõem o gene, 580 (72,7%) puderam ser analisados e comparados com a seqüência fornecida pelo NCBI, depositada no *GenBank* com o código de acesso número Z32523, e com a cepa padrão de EAEC O42, utilizada como controle positivo da reação. A análise dos nucleotídeos localizados entre as posições 63 e 643 do gene *aggR* revelou a existência de 27 SNPs. Cinco amostras do grupo caso (71,4% - 5/7) e três do controle (42,9% - 3/7) que foram seqüenciadas apresentaram, pelo menos, um nucleotídeo polimórfico, distribuídos entre os genótipos homocigoto e heterocigoto. Nove polimorfismos (34,6% - 9/26) foram observados na cepa padrão de EAEC O42. A **Figura 18** ilustra os resultados obtidos no seqüenciamento e a análise dos genótipos homocigoto e heterocigoto. A **Tabela 16** mostra a posição dos SNPs encontrados nas amostras de casos e controles, com os seus respectivos genótipos.

Dos 27 SNPs encontrados, apenas 6 resultaram em aminoácidos diferentes e com características bioquímicas distintas dos aminoácidos originais. Dezesesseis deles não ocasionaram mudanças no aminoácido resultante e 5 originaram aminoácidos diferentes do original mas com características bioquímicas semelhantes (**TABELA 17**). A **Figura 19** ilustra a seqüência nucleotídica do gene *aggR*, com seus respectivos aminoácidos codificados, e as mudanças resultantes da ocorrência dos 27 SNPs descritos.

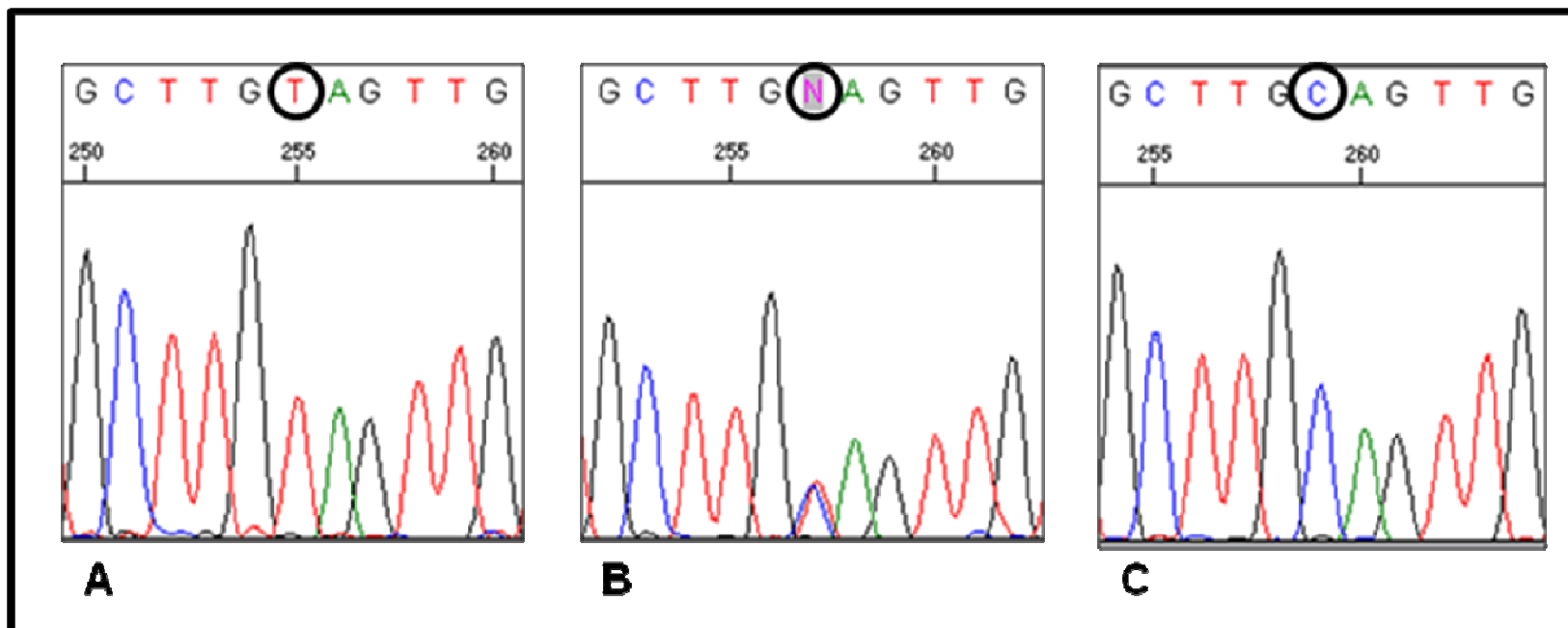


FIGURA 18 – Representação gráfica de um polimorfismo em um único nucleotídeo (SNP) na posição 300 do gene regulador *aggR*. O DNA fecal foi extraído através do *QIAamp DNA Stool Mini Kit* e submetido à amplificação gênica. O produto de PCR foi purificado (*QIAquick Purification Kit*) e seqüenciado no analisador genético *ABI Prism 3100*. A cepa EAEC O42 é homozigota na posição 300, apresentando uma timina (18A); uma das amostras seqüenciadas é heterozigota nessa posição (T/C) (18B), enquanto a outra é homozigota, com o genótipo C/C (18C).

TABELA 16 – Ocorrência de polimorfismos em um único nucleotídeo (SNPs) do gene *aggR* entre amostras dos grupos caso e controle positivas para EAEC.

Nº. Seq.	SNP (posição)	Amostra (genótipo)	Grupo
1	Troca de C por T (130)	228 (T/T)	Caso
2	Troca de A por C (136)	89 (C/A) 99 (C/C) 255 (C/C)	Controle Controle Caso
3	Troca de A por G (159)	228 (G/G)	Caso
4	Troca de C por T (200)	218 (C/T)	Caso
5	Troca de T por C (203)	EAEC O42 (C/C) 89 (T/C) 99 (C/C) 165 (C/C) 218 (T/C) 228 (C/C) 255 (C/C)	Controle Controle Caso Caso Caso Caso
6	Troca de T por A (207)	89 (T/A) 99 (A/A) 255 (A/A)	Controle Controle Caso
7	Troca de G por A (230)	89 (G/A) 99 (A/A) 255 (A/A)	Controle Controle Caso
8	Troca de G por A (264)	99 (A/A) 255 (A/A)	Controle Caso
9	Troca de C por T (300)	EAEC O42 (T/T) 87 (T/T) 89 (C/T) 99 (T/T) 165 (T/T) 202 (T/T) 218 (C/T) 228 (T/T) 255 (T/T)	Controle Controle Controle Caso Caso Caso Caso Caso

Continuação da **Tabela 16**

Nº. Seq.	SNP (posição)	Amostra (genótipo)	Grupo
10	Troca de T por A (342)	89 (T/A) 99 (A/A) 255 (A/A)	Controle Controle Caso
11	Troca de C por A (375)	99 (A/A) 255 (A/A)	Controle Caso
12	Troca de T por G (378)	89 (G/T) 99 (G/G) 255 (G/G)	Controle Controle Caso
13	Troca de C por A (379)	EAEC O42 (A/A) 165 (A/A) 218 (C/A) 228 (A/A)	Caso Caso Caso
14	Troca de A por G (396)	89 (A/G) 99 (G/G) 255 (G/G)	Controle Controle Caso
15	Troca de A por G (400)	89 (A/G) 99 (G/G) 255 (G/G)	Controle Controle Caso
16	Troca de C por T (438)	89 (C/T) 99 (T/T) 255 (T/T)	Controle Controle Caso
17	Troca de G por A (443)	EAEC O42 (A/A) 165 (A/A) 228 (A/A)	Caso Caso
18	Troca de G por A (444)	EAEC O42 (A/A) 89 (G/A) 99 (A/A) 165 (A/A) 218 (A/A) 228 (A/A) 255 (A/A)	Controle Controle Caso Caso Caso Caso

Continuação da **Tabela 16**

Nº. Seq.	SNP (posição)	Amostra (genótipo)	SNP (posição)
19	Troca de C por T (489)	EAEC O42 (T/T) 165 (T/T)	Caso
20	Troca de G por A (495)	EAEC O42 (A/A) 165 (A/A) 218 (A/A) 228 (A/A)	Caso Caso Caso
21	Troca de C por T (504)	89 (C/T) 99 (T/T) 255 (T/T)	Controle Controle Caso
22	Troca de C por T (506)	EAEC O42 (T/T) 165 (T/T) 218 (T/T) 228 (T/T)	Caso Caso Caso
23	Troca de A por C (507)	89 (C/C) 99 (C/C) 255 (C/C)	Controle Controle Caso
24	Troca de G por A (516)	EAEC O42 (A/A) 89 (G/A) 99 (A/A) 165 (A/A) 218 (A/A) 228 (A/A) 255 (A/A)	Controle Controle Caso Caso Caso Caso
25	Troca de G por A (528)	89 (A/A) 99 (A/A) 255 (A/A)	Controle Controle Caso
26	Troca de A por C (529)	89 (C/C) 99 (C/C) 255 (C/C)	Controle Controle Caso
27	Troca de T por C (564)	89 (C/T) 99 (C/C) 255 (C/C)	Controle Controle Caso

TABELA 17 – Aminoácidos resultantes após a ocorrência de polimorfismos em um único nucleotídeo (SNPs) do gene *aggR* entre amostras dos grupos caso e controle positivas para EAEC.

Nº. Seq.	SNP (posição)	Aminoácido original	Aminoácido modificado	Característica da mudança
1	C-T (130)	Leucina	Fenilalanina	Ambos hidrofóbicos e apolares
2	A-C (136)	Asparagina	Histidina	Aminoácido polar sem carga para aminoácido polar básico (+)
3	A-G (159)	Arginina	Arginina	-
4	C-T (200)	Treonina	Isoleucina	Aminoácido polar para apolar
5	T-C (203)	Valina	Alanina	Ambos apolares
6	T-A (207)	Asparagina	Lisina	Aminoácido polar sem carga para aminoácido polar básico (+)
7	G-A (230)	Serina	Asparagina	Ambos polares sem carga
8	G-A (264)	Leucina	Leucina	-
9	C-T (300)	Cisteína	Cisteína	-
10	T-A (342)	Alanina	Alanina	-
11	C-A (375)	Isoleucina	Isoleucina	-
12	T-G (378)	Aspartato	Glutamato	Ambos polares e ácidos (-)

Continuação da **Tabela 17**

Nº. Seq.	SNP (posição)	Aminoácido original	Aminoácido modificado	Característica da mudança
13	C-A (379)	Histidina	Asparagina	Aminoácido polar básico (+) para aminoácido polar sem carga
14	A-G (396)	Arginina	Arginina	-
15	A-G (400)	Treonina	Alanina	Aminoácido polar sem carga para aminoácido apolar
16	C-T (438)	Asparagina	Asparagina	-
17	G-A (443)	Arginina	Lisina	Ambos polares e básicos
18	G-A (444)	Arginina	Arginina	-
19	C-T (489)	Serina	Serina	-
20	G-A (495)	Lisina	Lisina	-
21	C-T (504)	Asparagina	Asparagina	-
22	C-T (506)	Treonina	Isoleucina	Aminoácido polar sem carga para aminoácido apolar
23	A-C (507)	Treonina	Treonina	-
24	G-A (516)	Lisina	Lisina	-
25	G-A (528)	Lisina	Lisina	-
26	A-C (529)	Arginina	Arginina	-
27	T-C (564)	Asparagina	Asparagina	-

Aminoácidos	M	K	L	K	Q	N	I	E	K	E	I	I	K	I	N	N	I	R	I	
Nucleotídeos	ATG	AAA	TTA	AAA	CAA	AAT	ATC	GAA	AAA	GAG	ATT	ATA	AAA	ATT	AAC	AAT	ATC	AGA	ATA	57
Aminoácidos	H	Q	Y	T	V	L	Y	T	S	N	C	T	I	D	V	Y	T	K	E	
Nucleotídeos	CAT	CAG	TAC	ACT	GTA	CTA	TAT	ACA	TCT	AAT	TGT	ACA	ATC	GAT	GTA	TAC	ACA	AAA	GAA	114
Aminoácidos	G	S	N	T	Y	L	R	N	E	L	I	F	L	E	R	G	I	N	I	
Nucleotídeos	GGA	AGC	AAT	ACA	TAT	CTT	AGA	AAT	GAA	CTC	ATA	TTT	CTT	GAG	AGA	GGA	ATA	AAT	ATA	171
Aminoácidos	S	V	R	L	Q	K	K	K	S	T	V	N	P	F	I	A	I	R	L	
Nucleotídeos	TCA	GTA	AGA	TTG	CAA	AAG	AAG	AAA	TCA	ACA	GTA	AAT	CCA	TTT	ATC	GCA	ATC	AGA	TTA	228
Aminoácidos	S	S	D	T	L	R	R	L	K	D	A	L	M	I	I	Y	G	I	S	
Nucleotídeos	AGC	AGC	GAT	ACA	TTA	AGA	CGC	CTA	AAG	GAT	GCC	CTG	ATG	ATA	ATA	TAC	GGA	ATA	TCA	285
Aminoácidos	K	V	D	A	C	S	C	P	N	W	S	K	G	I	I	V	A	D	A	
Nucleotídeos	AAA	GTA	GAT	GCT	TGC	AGT	TGT	CCG	AAT	TGG	TCA	AAA	GGA	ATA	ATT	GTA	GCT	GAT	GCT	342
Aminoácidos	D	D	S	V	L	D	T	F	K	S	I	D	H	N	D	D	S	R	I	
Nucleotídeos	GAC	GAT	TCT	GTA	TTA	GAT	ACA	TTC	AAG	AGT	ATC	GAT	CAT	AAT	GAT	GAT	TCA	AGA	ATT	399
Aminoácidos	T	S	D	L	I	Y	L	I	S	K	I	E	N	N	R	K	I	I	E	
Nucleotídeos	A CT	TCA	GAT	TTG	ATA	TAT	CTT	ATA	TCA	AAG	ATC	GAA	AAC	AAC	AGG	AAA	ATT	ATA	GAG	456
Aminoácidos	S	I	Y	I	S	A	V	S	F	F	S	D	K	V	R	N	T	I	E	
Nucleotídeos	TCA	ATT	TAT	ATA	TCG	GCT	GTA	AGC	TTC	TTT	TCC	GAT	AAG	GTC	AGA	AAC	ACA	ATC	GAG	513
Aminoácidos	K	D	L	S	K	R	W	T	L	A	I	I	A	D	E	F	N	V	S	
Nucleotídeos	AAG	GAC	TTA	TCA	AAG	AGA	TGG	ACT	CTA	GCT	ATT	ATT	GCA	GAT	GAA	TTT	AAT	GTA	TCA	570
Aminoácidos	E	I	T	I	R	K	R	L	E	S	E	Y	I	T	F	N	Q	I	L	
Nucleotídeos	GAG	ATA	ACA	ATA	AGG	AAA	AGA	CTT	GAG	TCA	GAG	TAT	ATT	ACT	TTT	AAC	CAG	ATC	CTT	627
Aminoácidos	M	Q	S	R	M	S	K	A	A	L	L	L	L	D	N	S	Y	Q	I	
Nucleotídeos	ATG	CAA	TCA	AGA	ATG	AGC	AAA	GCA	GCA	TTG	CTG	TTG	CTT	GAT	AAC	TCA	TAT	CAG	ATA	648
Aminoácidos	S	Q	I	S	N	M	I	G	F	S	S	T	S	Y	F	I	R	L	F	
Nucleotídeos	TCA	CAG	ATA	TCT	AAT	ATG	ATA	GGA	TTT	TCC	AGT	ACA	TCA	TAT	TTC	ATT	AGG	CTT	TTT	741
Aminoácidos	V	K	H	F	G	I	T	P	K	Q	F	L	T	Y	F	K	S	Q		
Nucleotídeos	GTA	AAA	CAT	TTT	GGC	ATA	ACA	CCA	AAA	CAA	TTC	TTG	ACT	TAT	TTT	AAA	AGC	CAA	TGA	798

FIGURA 19 – Seqüência nucleotídica do gene *aggR*, obtida do NCBI, com seus respectivos aminoácidos codificados, e as localizações dos 27 polimorfismos em um único nucleotídeo (SNPs) encontrados. Em vermelho – códons de iniciação e parada, Em amarelo – SNPs encontrados, Em negrito e sublinhado – SNPs resultando em aminoácidos diferentes dos originais e com mudança de característica bioquímica.

5.8 AVALIAÇÃO DE LACTOFERRINA FECAL (LFF)

A grande maioria das crianças apresentou níveis de LFF acima do limite considerado normal (86,7% - 72/83 dos casos e 82,9% - 69/82 dos controles). Entre as crianças doentes, houve associação significativa entre a presença de EAEC e elevados níveis de LFF ($p=0,014$), desde que nenhuma criança com EAEC do grupo-caso apresentou níveis de LFF basais (**FIGURA 20**). Essa associação não foi observada quando se comparou as concentrações de LFF e a presença dos genes de virulência *aggR*, *pet*, *pic*, *aap* e *astA* entre amostras positivas para EAEC dos grupos caso e controle (**FIGURAS 21 a 25**).

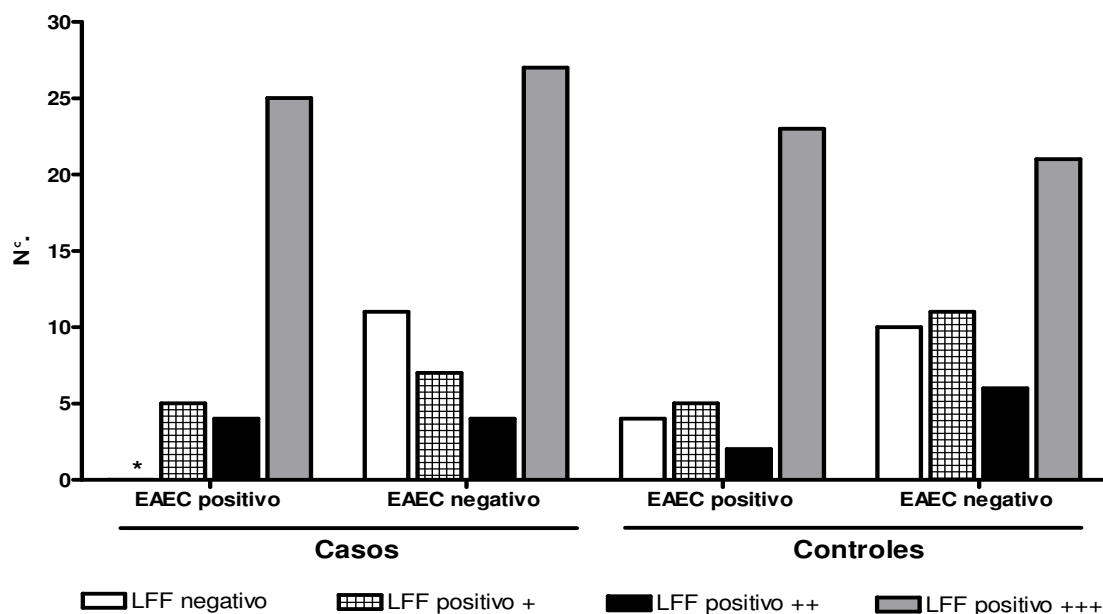


FIGURA 20 – Concentração de lactoferrina fecal entre os casos e controles positivos e negativos para EAEC. A lactoferrina foi quantificada através de ELISA utilizando-se o kit utilizando o *IBD-Scan*. Os resultados obtidos foram codificados nos seguintes escores: negativo (0 a 7,00 μ g/g de fezes), positivo + (7,01 a 25,00 μ g/g de fezes), positivo ++ (25,01 a 50,00 μ g/g de fezes), positivo +++ (>50 μ g/g de fezes). * $p<0,05$

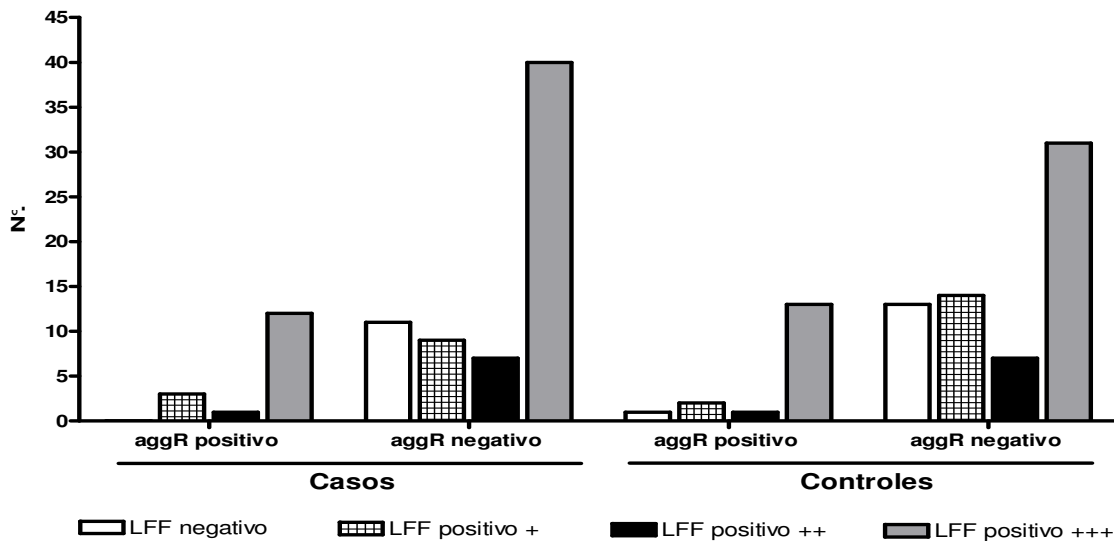


FIGURA 21 – Concentração de lactoferrina fecal entre os casos e controles positivos para EAEC e positivos ou negativos para o gene *aggR*. A lactoferrina foi quantificada através de ELISA utilizando-se o kit utilizando o *IBD-Scan*. Os resultados obtidos foram codificados nos seguintes escores: negativo (0 a 7,00µg/g de fezes), positivo + (7,01 a 25,00µg/g de fezes), positivo ++ (25,01 a 50,00µg/g de fezes), positivo +++ (>50µg/g de fezes).

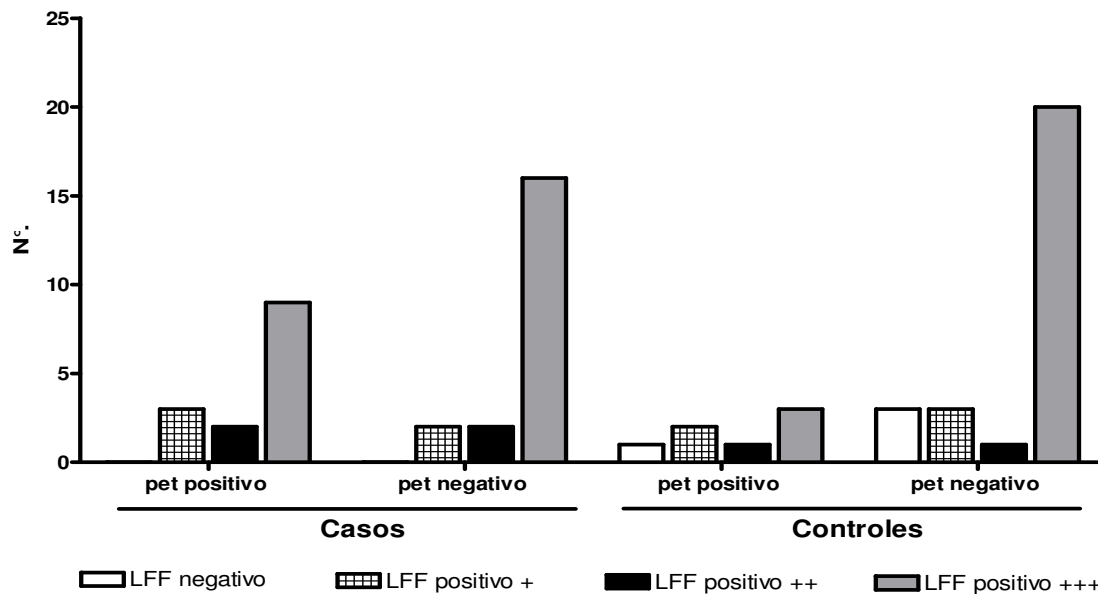


FIGURA 22 – Concentração de lactoferrina fecal entre os casos e controles positivos para EAEC e positivos ou negativos para o gene *pet*. A lactoferrina foi quantificada através de ELISA utilizando-se o kit utilizando o *IBD-Scan*. Os resultados obtidos foram codificados nos seguintes escores: negativo (0 a 7,00µg/g de fezes), positivo + (7,01 a 25,00µg/g de fezes), positivo ++ (25,01 a 50,00µg/g de fezes), positivo +++ (>50µg/g de fezes).

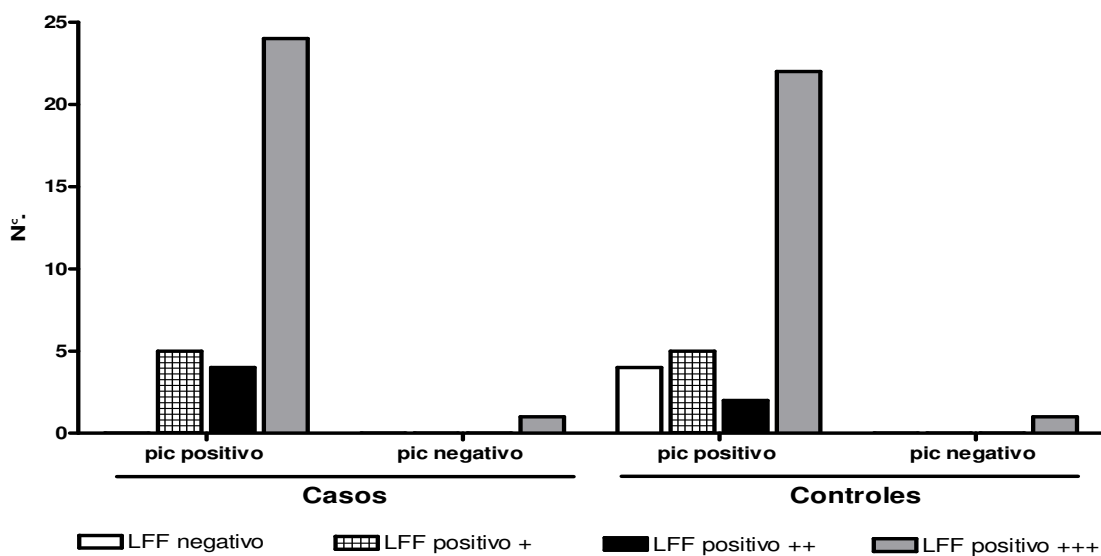


FIGURA 23 – Concentração de lactoferrina fecal entre os casos e controles positivos para EAEC e positivos ou negativos para o gene *pic*. A lactoferrina foi quantificada através de ELISA utilizando-se o kit utilizando o *IBD-Scan*. Os resultados obtidos foram codificados nos seguintes escores: negativo (0 a 7,00µg/g de fezes), positivo + (7,01 a 25,00µg/g de fezes), positivo ++ (25,01 a 50,00µg/g de fezes), positivo +++ (>50µg/g de fezes).

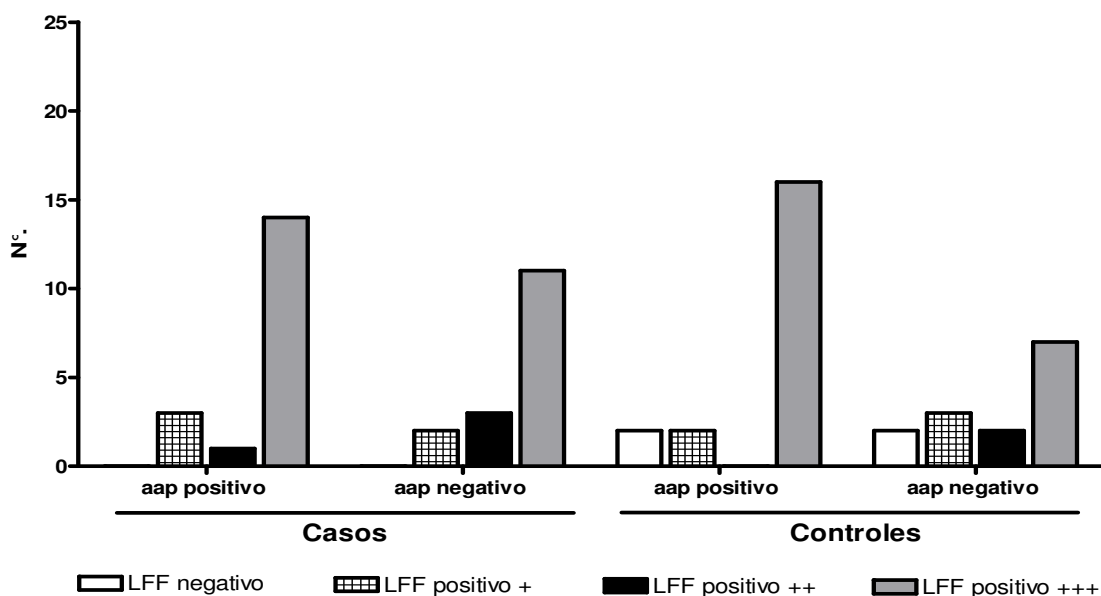


FIGURA 24 – Concentração de lactoferrina fecal entre os casos e controles positivos para EAEC e positivos ou negativos para o gene *aap*. A lactoferrina foi quantificada através de ELISA utilizando-se o kit utilizando o *IBD-Scan*. Os resultados obtidos foram codificados nos seguintes escores: negativo (0 a 7,00µg/g de fezes), positivo + (7,01 a 25,00µg/g de fezes), positivo ++ (25,01 a 50,00µg/g de fezes), positivo +++ (>50µg/g de fezes).

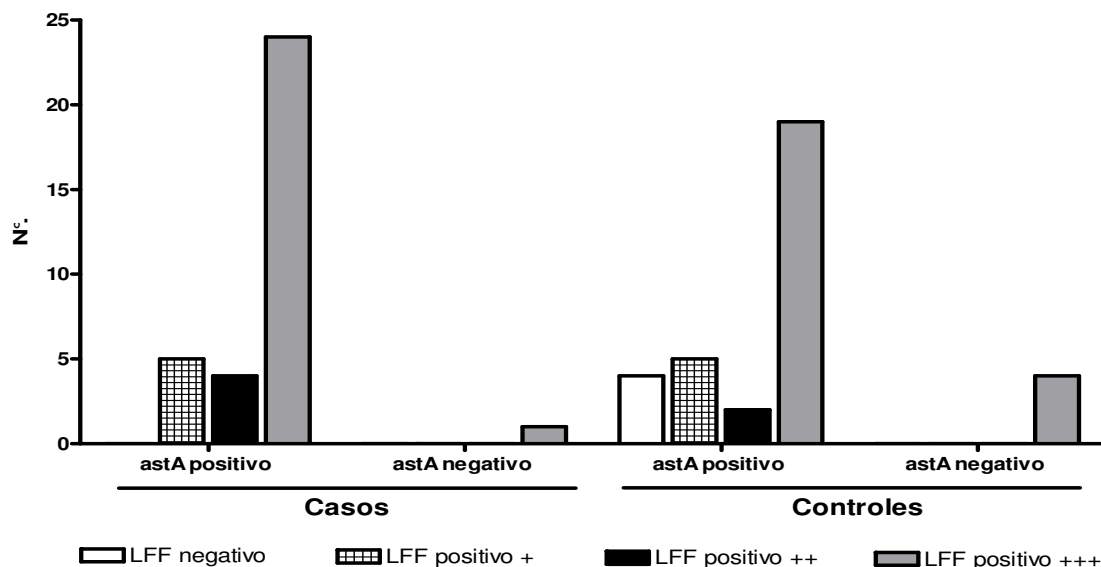


FIGURA 25 – Concentração de lactoferrina fecal entre os casos e controles positivos para EAEC e positivos ou negativos para o gene *astA*. A lactoferrina foi quantificada através de ELISA utilizando-se o *kit* utilizando o *IBD-Scan*. Os resultados obtidos foram codificados nos seguintes escores: negativo (0 a 7,00µg/g de fezes), positivo + (7,01 a 25,00µg/g de fezes), positivo ++ (25,01 a 50,00µg/g de fezes), positivo +++ (>50µg/g de fezes).

5.9 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS FECAIS

Dos 83 casos e 83 controles, 22 alíquotas fecais de cada grupo foram testadas quanto aos níveis de citocinas. Pela **Figura 26**, pode-se observar que não houve diferença estatística entre casos e controles quanto à média das concentrações de IL-4 ($p=0,908$, mediana dos casos=5,1pg/mL, mediana dos controles=5,7pg/mL), IL-10 ($p=0,857$, mediana dos casos=0,0pg/mL, mediana dos controles=0,3pg/mL), TNF- α ($p=0,563$, mediana dos casos=8,0pg/mL, mediana dos controles=13,0pg/mL) e IFN- γ fecais ($p=0,839$, mediana dos casos=20,3pg/mL, mediana dos controles=18,0pg/mL). Não houve associação estatística entre os níveis fecais das citocinas e a severidade da doença, caracterizada pela duração da diarreia em dias (IL-4 – $r=0,005$ e $p=0,984$; IL-10 – $r=0,243$ e $p=0,976$; TNF- α – $r=0,393$ e $p=0,071$; IFN- γ – $r=0,129$ e $p=0,567$) e número de evacuações líquidas em 24h (IL-4 – $r=0,013$ e $p=0,953$; IL-10 – $r=0,058$ e $p=0,796$; TNF- α – $r=0,071$ e $p=0,752$; IFN- γ – $r=0,033$ e $p=0,894$).

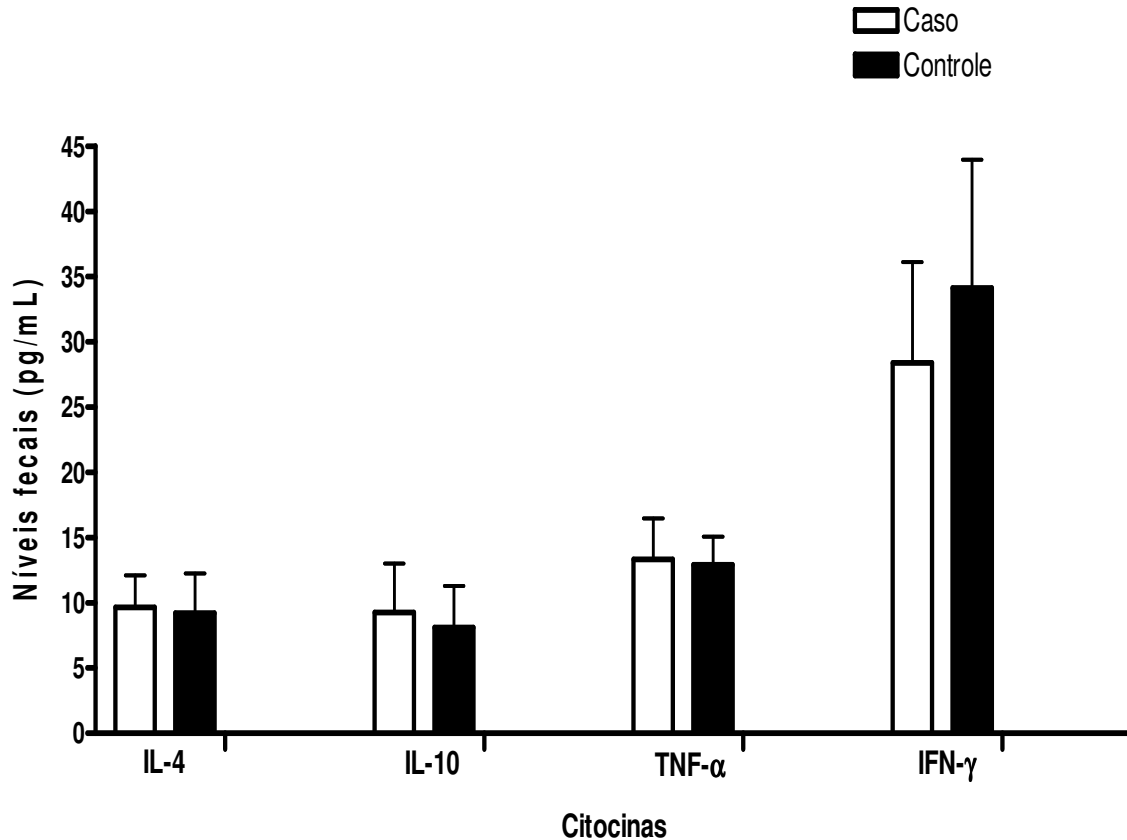


FIGURA 26 – Quantificação dos níveis fecais das citocinas IL-4, IL-10, TNF- α e IFN- γ (pg/mL) entre crianças dos grupos caso e controle. As citocinas foram quantificadas através de ELISA utilizando-se os kits *Human IL-4 Imunoassay*, *IL-10 EASIA*, *Human TNF- α Imunoassay* e *Human IFN- γ Imunoassay* (Invitrogen, Carlsbad, CA).

5.10 AS CO-INFECÇÕES

Dos 34 casos positivos para EAEC, 6 (17,6%) foram positivos para parasitas intestinais através da microscopia fecal. Entre os controles, 5 (14,7%) foram positivos para helmintos e/ou protozoários. Entre os casos, esse percentual foi de 17,6% (6). A associação EAEC e *Trichuris trichiura* foi a mais encontrada (**TABELA 18**).

TABELA 18 – Distribuição da ocorrência de co-infecções com parasitas em casos e controles positivos para EAEC.

Co-infecções ^a	Casos	Controles	Total
	Nº. (%)	Nº. (%)	
EAEC + <i>Endolimax nana</i>	1 (2,9)	0 (0,0)	1
EAEC + <i>Giardia lamblia</i>	0 (0,0)	2 (5,9)	2
EAEC + <i>Ascaris lumbricóides</i>	2 (6,0)	1 (2,9)	3
EAEC + <i>Trichuris trichiura</i>	1 (2,9)	2 (5,9)	3
EAEC + <i>Entamoeba coli</i> + <i>A. lumbricóides</i> + <i>T. trichiura</i>	1 (2,9)	0 (0,0)	1
EAEC + <i>E. coli</i> + <i>G. lamblia</i> + <i>T. trichiura</i>	1 (2,9)	0 (0,0)	1
Total	6 (17,6)	5 (14,7)	11

^a A pesquisa de parasitas fecais foi realizada através de microscopia a partir do concentrado fecal.

6 DISCUSSÃO

A diarreia infantil é um problema mundial, que apresenta variações regionais substanciais na prevalência dos patógenos associados com sua etiologia, no grau de prevenção obtido e na disponibilidade de meios de diagnóstico e tratamento (GUERRANT *et al.*, 2001). Os primeiros estudos realizados sobre o impacto da morbi-mortalidade causada por essa doença analisaram crianças com até cinco anos de idade residentes nos países da África, Ásia e América Latina e reportaram a ocorrência de 744-1000 milhões de episódios diarréicos e aproximadamente cinco milhões de mortes a cada ano, com base na população estimada nos anos 80. Estudos posteriores relataram um declínio nas taxas de mortalidade infantil atribuídas às doenças diarréicas nas últimas décadas, fenômeno não observado com a morbidade associada a essas doenças (FAGUNDES-NETO; SCALETSKY, 2000).

Apesar de não distinguir classe social, raça ou sexo, as doenças diarréicas afetam mais comumente crianças de países em desenvolvimento, havendo uma relação direta entre a pobreza e o número e severidade dos episódios diarréicos. A pobreza está, em geral, associada com condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, aglomeração de pessoas habitando a mesma residência, estocagem inadequada dos alimentos e dificuldade de acesso à água potável em quantidade suficiente e à disposição apropriada dos dejetos fecais, além de co-habitação com animais domésticos que podem abrigar muitos patógenos humanos (KEUSCH *et al.*, 2006). Aproximadamente 1/5 da população mundial sobrevive com até US\$ 1 por dia e a metade com até US\$ 2. Cerca de 1,7 milhões de mortes que ocorrem a cada ano são atribuídas a condições precárias de higiene e de abastecimento de água, destacando-se as diarreias infecciosas. Nove em cada dez dessas mortes ocorrem em crianças de países em desenvolvimento (WHO, 2002). Recentemente, uma análise do perfil da ocorrência de doenças em 192 países revelou que um percentual entre 13 e 37% delas, dependendo da região, são atribuídas a fatores ambientais, podendo ser prevenidas através de melhorias na qualidade do ar e nas condições higiênicas, sanitárias e de fornecimento de água (PRÜSS-ÜSTÜN; BONJOUR; CORVALÁN, 2008). Além da carência de saneamento básico, a pobreza restringe tanto a disponibilidade de uma dieta nutricional balanceada, apropriada para a fase de desenvolvimento infantil, quanto a possibilidade de modificação alimentar durante o curso da diarreia, essencial para o reparo ao dano causado à mucosa

gastrointestinal. O impacto das doenças diarréicas nas crianças de países pobres é exacerbado pela dificuldade de acesso rápido e adequado aos serviços de saúde durante o período da doença (KEUSCH *et al.*, 2006).

Vários trabalhos têm relatado as conseqüências das infecções entéricas, mesmo as assintomáticas, e da desnutrição ocorridas nos primeiros anos de vida no crescimento e desenvolvimento das crianças. As doenças diarréicas infantis estão associadas com prejuízos ao ganho de peso e altura, com conseqüente risco para o desenvolvimento de desnutrição, que, por sua vez, gera um aumento na freqüência e duração de novos episódios diarréicos. O impacto desse ciclo vicioso a longo prazo inclui distúrbios metabólicos, com deficiências na absorção e re-captção intestinal de nutrientes e drogas, gerando danos físicos e cognitivos e dificuldade no tratamento de outras doenças sérias (GUERRANT *et al.*, 2008).

A desnutrição e seus problemas associados atingem todas as idades, mas são mais prevalentes entre crianças com até cinco anos de idade. A Organização Mundial de Saúde estima que cerca de 27% das crianças nessa faixa etária sofram desse mal, que foi responsável por 138 milhões de anos de vida saudável perdidos por morte prematura ou incapacidade (*disability associated life years – DALY*), 9,5% do total global de DALYs no ano de 2001 (WHO, 2002). Além dos prejuízos a longo prazo, as doenças diarréicas sobrecarregam os serviços ambulatoriais e hospitalares, gerando custos econômicos consideráveis (GUERRANT *et al.*, 2001; VASCONCELOS; BATISTA FILHO, 2008).

O TGI normal regula a absorção e secreção de água e eletrólitos de acordo com as necessidades fisiológicas corporais. Mais de 98% do volume de água que chega ao intestino diariamente são re-absorvidos (KEUSCH, 2001). As TJs são estruturas dinâmicas, capazes de adaptação a diversas condições fisiológicas e patológicas, e representam a principal barreira entre os enterócitos, controlando o movimento de água e solutos entre o lúmen intestinal e o espaço intersticial (ANDERSON; VAN ITALLIE, 1995). Um elevado número de microorganismos tem se mostrado capaz de exercer efeitos lesivos diretos e indiretos às TJs e a outras estruturas intestinais, comprometendo, assim, o papel do epitélio intestinal como

mediador central na interação entre o organismo e o ambiente externo (FASANO; NATARO, 2004; GEWIRTZ *et al.*, 2002; UZZAU; FASANO, 2000).

EAEC é um importante enteropatógeno associado com a etiologia de diarreia infantil. Esse patótipo de *E. coli* é definido pelo padrão de aderência observado quando o microorganismo é incubado com células HEp-2, caracterizado por uma auto-aglutinação bacteriana na superfície da monocamada celular e no suporte utilizado para o crescimento das células, assumindo uma configuração semelhante a “tijolos empilhados” (HUANG *et al.*, 2004; LAW; CHART, 1998). Apesar de representar o padrão ouro no diagnóstico de EAEC, esse método é limitado, uma vez que não é capaz de distinguir entre isolados patogênicos e não-patogênicos da bactéria (COHEN *et al.*, 2005). O diagnóstico dos agentes etiológicos envolvidos com as doenças diarreicas é de suma importância no armazenamento de dados epidemiológicos, constituindo uma ferramenta valiosa de saúde pública, útil na elaboração de programas de controle, manejo dos casos e prevenção dessas doenças (KEUSCH *et al.*, 2006).

Cepas de *E. coli* capazes de causar diarreia foram os primeiros patógenos para os quais os métodos moleculares de diagnóstico foram desenvolvidos. Eles representam as técnicas mais populares e confiáveis na diferenciação entre os membros da microbiota intestinal e os microorganismos patogênicos, além de permitir a distinção entre os últimos (NATARO; KAPER, 1998).

A PCR constitui o principal avanço no diagnóstico molecular de patógenos, incluindo *E. coli*. A principal vantagem dessa técnica é a grande sensibilidade na detecção *in situ* de seqüências-alvo específicas do microorganismo pesquisado, através da construção de iniciadores que amplificam uma seqüência nucleotídica de tamanho conhecido a partir do DNA isolado do patógeno. Ultimamente, inúmeros iniciadores têm sido desenvolvidos com sucesso para a pesquisa dos patótipos de *E. coli* causadores de diarreia. O método permite, ainda, a identificação de genes relacionados com a virulência e de seus produtos, diferenciando microorganismos que parecem ser idênticos e gerando novas perspectivas para o estudo da epidemiologia das doenças diarreicas. Entretanto, inúmeras substâncias presentes nas fezes apresentam interferência com a reação,

reduzindo sua sensibilidade. Grandes progressos têm sido obtidos nos últimos anos nas técnicas de extração do DNA fecal para a remoção desses inibidores e no desenvolvimento de iniciadores e métodos baseados na PCR (HOLLAND *et al.*, 2000; KEUSCH *et al.*, 2006; NATARO; KAPER, 1998; PETRI JR., *et al.*, 2008; WRIGHT; WYNFORD-THOMAS, 1990).

Esse estudo avaliou crianças na faixa etária entre dois e 36 meses residentes em duas comunidades pobres, localizadas na zona urbana da cidade de Fortaleza, Ceará. Com o intuito de determinar a prevalência de EAEC, o papel de seus fatores de virulência e o impacto das infecções diarréicas nessa população, amostras fecais foram coletadas de crianças com e sem a doença e submetidas ao diagnóstico molecular, através de PCR, para a pesquisa da presença do microorganismo e de seus genes codificadores de fatores de virulência.

Foram analisadas crianças de todas as idades compreendidas na faixa etária entre dois e 36 meses. O grupo controle apresentou um maior percentual de crianças entre dois e seis meses de idade quando comparado ao grupo dos casos, o que pode já era esperado em virtude da proteção conferida pelo leite materno, alimentação predominante nessa faixa etária. O leite materno, especialmente o colostro, apresenta elevadas concentrações de imunoglobulinas, com predominância da IgA. Esses anticorpos integram-se à mucosa gastrointestinal, dificultando a aderência e colonização da mucosa do trato digestivo infantil por patógenos entéricos. Outras células imunes, como macrófagos, neutrófilos e eosinófilos, e substâncias com propriedades probióticas e antibióticas, como a lisozima e o fator bífido, também estão presentes no leite materno e contribuem para a sua característica protetora, combatendo a instalação de agentes envolvidos na etiologia das doenças diarréicas (ARAÚJO *et al.*, 2007).

As fezes foram coletadas após evacuação espontânea em recipientes de boca larga, estéreis, fechados através de tampa hermética, apropriados para a coleta e armazenamento do material até seu processamento. A coleta de uma amostra de fezes já emitida é uma medida não-invasiva, que não representa qualquer risco físico para os participantes e, em geral, fornece material de qualidade e em quantidade suficiente para a detecção de microorganismos e realização de

testes adicionais, quando necessário. Cohen *et al.* (2005) compararam a utilização de fezes já emitidas e *swabs* fecais na pesquisa de *E. coli* através de técnicas microbiológicas e moleculares e não observaram influência do tipo de amostra no resultado obtido.

O diagnóstico molecular de EAEC foi baseado na amplificação de dois genes bacterianos que não apresentam homologia com outras seqüências nucleotídicas até então conhecidas. O gene *aaiC*, recentemente descrito por Dudley *et al.* (2006), está localizado no DNA cromossômico da bactéria, que é organizado em formato circular, compactado cerca de 1000 vezes e ocupa em torno de 15% do volume celular (REYES-LAMOTHE; WANG; SHERRATT, 2008). O gene *aatA* é utilizado na pesquisa de EAEC desde 1990, quando Baudry *et al.* desenvolveram a primeira sonda específica para o diagnóstico do microorganismo. O segundo par de iniciadores empregado nesse trabalho foi construído por Schmidt *et al.* (1995) e é voltado para a amplificação do segmento do DNA plasmidial de EAEC que hibridiza com essa sonda.

A prevalência de EAEC observada nesse estudo foi similar entre casos e controles (41,0%). As taxas de prevalência da bactéria entre crianças com diarreia relatadas na literatura variam de 8 a 51% em países em desenvolvimento (BHAN *et al.*, 1989bc; BHATNAGAR *et al.*, 1993; BOUZARI *et al.*, 1994; BROOKS *et al.*, 2006; CRAVIOTO *et al.*, 1991; GONZÁLEZ *et al.*, 1997; HENRY *et al.*, 1992; KANG; MATHAN; MATHAN, 1995; NATARO *et al.*, 1987; OKEKE *et al.*, 2000a; PAUL *et al.*, 1994; RATCHTRACHENCHAI *et al.*, 2004) e de 2 a 4% em regiões desenvolvidas (CHAN *et al.*, 1994; HUPPERTZ *et al.*, 1997; NATARO *et al.*, 2006). No Brasil, as taxas descritas são de 11,1 a 45% (BUERIS *et al.*, 2007; GIOPPO *et al.*, 2000; MORENO *et al.*, 2008; PEREIRA *et al.*, 2007; PIVA *et al.*, 2003; SCALETISKY *et al.*, 2002; SOUZA *et al.*, 2002). A identificação do microorganismo em percentuais semelhantes entre grupos de crianças doentes e aparentemente saudáveis é reportada desde os primeiros estudos realizados com EAEC, fato responsável pelas incertezas quanto à sua função como patógeno humano durante os primeiros anos após sua descrição. Trabalhos de diferentes regiões geográficas registram a ocorrência de EAEC entre zero e 34,8% de crianças sem desordens gastrointestinais aparentes (BHAN *et al.*, 1989bc; BHATNAGAR *et al.*, 1993;

BOUZARI *et al.*, 1994; BUERIS *et al.*, 2007; GIOPPPO *et al.*, 2000; GONZÁLEZ *et al.*, 1997; HENRY *et al.*, 1992; HUPPERTZ *et al.*, 1997; KANG; MATHAN; MATHAN, 1995; MORENO *et al.*, 2008; NATARO *et al.*, 1987; 2006; OKEKE *et al.*, 2000a; PAUL *et al.*, 1994; PEREIRA *et al.*, 2007; PIVA *et al.*, 2003; SCALETISKY *et al.*, 2002; SOUZA *et al.*, 2002).

O primeiro estudo sobre a carga da doença causada por EAEC em países industrializados foi realizado em Londres, na Inglaterra. Chan *et al.* (1994) isolaram o microorganismo a partir de crianças doentes em frequência semelhante à de outros patógenos diarreicos clássicos. Utilizando técnicas de biologia molecular combinadas com a avaliação do padrão de aderência, Huppertz *et al.* (1997) reportaram uma prevalência de 2% do microorganismo entre crianças menores de 16 anos de idade admitidas em duas unidades hospitalares da cidade de Würzburg, Alemanha. Nenhuma das 580 crianças do grupo controle foi positiva para EAEC. Nataro *et al.* (2006), ao analisar pacientes atendidos em hospitais nas cidades de Baltimore e New Haven, nos Estados Unidos, relataram prevalências de 5,3 e 4% entre os casos e de 1,9 e 1,3% entre os controles, respectivamente. Apesar da reduzida prevalência quando comparada às taxas descritas em países em desenvolvimento, EAEC foi a causa bacteriana de diarreia mais comum entre a população pesquisada. Em um estudo realizado por Cohen *et al.* (2005), EAEC foi isolada 2,8 vezes mais de crianças americanas com diarreia quando comparadas a crianças sem a patologia (IC=1,6-4,8, $p < 0,001$).

A prevalência de EAEC entre as crianças de Fortaleza vem sendo avaliada por nosso grupo de pesquisa desde o ano de 1992. Cinco trabalhos baseados em vigilância domiciliar e hospitalar foram realizados desde então, fornecendo prevalências da bactéria que variaram entre 10 e 68% entre crianças doentes (FANG *et al.*, 1995; KOOPMANS *et al.*, 1997; LIMA *et al.*, 1992; 2000; WANKE *et al.*, 1991). A pesquisa mais recente sobre a frequência do microorganismo em nossa cidade foi desenvolvida em uma das comunidades estudadas nesse trabalho (Gonçalves Dias) e, à semelhança dos nossos resultados, Lima *et al.* (2000) reportaram prevalências semelhantes de EAEC entre casos e controles.

Em relação à duração da doença, apenas 3,6% dos casos estudados foram classificados como diarreia persistente. Destes, 66,7% foram positivos para EAEC. Entre os casos agudos, a bactéria foi encontrada em um percentual de 40%. Em virtude do reduzido número de casos diarreicos persistentes incluídos nesse estudo, não houve diferença entre a média dos dias de diarreia observados entre casos infectados ou não com EAEC. O mesmo ocorreu com o número de evacuações líquidas no intervalo de 24h. A severidade da doença causada pela infecção por EAEC envolve uma complexa interação patógeno-hospedeiro e varia desde apenas colonização intestinal ao desenvolvimento de diarreia persistente (HUANG *et al.*, 2004). A associação do microorganismo em casos de diarreia persistente em países subdesenvolvidos foi o contexto inicial no qual EAEC foi descrita (OKEKE; NATARO, 2001). Muitos autores continuam relatando esse tipo de associação (BARDHAN *et al.*, 1998; FANG *et al.*, 1995; GEYID; OLSVIK; LJUNGH, 1998; KOOPMANS *et al.*, 1997). Porém, a bactéria tem sido cada vez mais encontrada em casos diarreicos agudos. Através de uma meta-análise, Huang *et al.* (2006) examinaram 354 estudos sobre EAEC publicados no período compreendido entre agosto de 1985 e janeiro de 2006. Após seleção pelo critério de inclusão utilizado, pesquisa da associação entre diarreia aguda e a excreção de EAEC, 41 estudos do tipo caso-controle foram incluídos. Os autores concluíram que EAEC é uma importante causa de doença diarreica aguda entre diferentes sub-populações residindo tanto em países subdesenvolvidos quanto em regiões desenvolvidas. As variadas manifestações clínicas desenvolvidas após a exposição ao patógeno poderiam ser explicadas através da heterogeneidade desse grupo bacteriano, com a existência de cepas virulentas e avirulentas, além do tamanho do inóculo ingerido, da resposta imune, fatores nutricionais e susceptibilidade genética do hospedeiro (HUANG *et al.*, 2004; LAW; CHART, 1998).

A antropometria é uma ferramenta simples, não-invasiva e de baixo custo empregada para avaliar tamanho, proporções e composição do corpo humano. Considerando a importância e o significado dessas medidas, a antropometria pode ser utilizada como preditora da saúde, bem-estar, nutrição, desempenho e sobrevivência dos indivíduos e da população em geral (WHO, 1995a). As curvas de crescimento vêm sendo utilizadas há muito tempo pelos pediatras na avaliação da saúde e do desenvolvimento infantil (DIBLEY *et al.*, 1987). No campo nutricional, as

medidas relacionadas à altura, peso e espessura da camada de gordura subcutânea têm sido empregadas como indicadores clássicos de desnutrição e obesidade. As aplicações da antropometria incluem, ainda, a avaliação de respostas fisiológicas a doenças e intervenções. Os índices antropométricos representam uma combinação dessas medidas e são essenciais para sua interpretação, visto que o valor absoluto isolado de uma medida não apresenta qualquer significado (WHO, 1995a).

As medidas antropométricas estatura, peso, circunferência braquial e espessura da prega cutânea foram obtidas de crianças classificadas em ambos os grupos estudados. As medidas estatura e peso foram convertidos em escores-z, que são calculados baseados em valores de referência disponíveis e avaliam essas medidas em função da idade da criança. A principal vantagem desse sistema é a possibilidade de cálculo da média e desvio padrão da população estudada (WHO, 1995a). O IMC foi outro índice antropométrico utilizado. Crianças com diarreia apresentaram redução significativa na espessura da prega cutânea, IMC e escores-z WAZ e WHZ. A observação de casos e controles positivos e negativos para EAEC não evidenciou impacto da infecção sintomática ou assintomática causada pela bactéria no estado nutricional. Os índices antropométricos analisados também não mostraram relação significativa com a severidade da doença, caracterizada pelo número de dias de diarreia e de evacuações líquidas no período de 24h. As consequências dos casos diarreicos persistentes na população infantil têm sido reportadas. Os estudos revelam a existência de um ciclo vicioso, em que as diarreias, principalmente os quadros diarreicos persistentes, exacerbam a desnutrição e esta aumenta a incidência e a duração de novos episódios diarreicos (ALASFOOR *et al.*, 2007; BLACK; BROWN; BECKER, 1984; GUERRANT *et al.*, 1992b; 2002b; 2008; KOSEK; BERN; GUERRANT, 2003; HUMPHREY, 2008; LIMA *et al.*, 1992; 2000; MOORE *et al.*, 2000; 2001; SCHORLING *et al.*, 1990a; WEISSTAUB; ARAYA, 2008). Um estudo caso-controle analisou crianças indianas e observou uma associação entre reduzido WAZ e a ocorrência de diarreia persistente. Essa redução não foi relatada entre crianças que desenvolveram diarreia aguda nem naquelas que não apresentaram a doença (BHANDARI *et al.*, 1989). A associação entre desnutrição e diarreia persistente também foi relatada entre crianças nigerianas (SODEINDE *et al.*, 1997). Lima *et al.* (2000), em um estudo desenvolvido em nossa cidade que acompanhou crianças desde o nascimento,

reportaram um impacto negativo da diarreia persistente nos escores-z WAZ e WHZ. A associação com a doença só não foi observada com o escore-z HAZ, que é um marcador de desnutrição a longo prazo. A falta de associação entre a doença e os índices antropométricos obtidos nesse trabalho pode ser resultante do elevado percentual de casos diarreicos agudos analisados.

A fisiopatologia da infecção causada por EAEC permanece obscura, entretanto muitos candidatos a fatores de virulência têm sido descritos como capazes de influenciar o curso da infecção (NATARO, 2005; NATARO; KAPER, 1998). Na tentativa de avaliar o papel de alguns genes codificadores de fatores de virulência no grau de severidade das doenças diarreicas causadas por EAEC, esse trabalho pesquisou a presença dos genes *aggR*, *pet*, *pic*, *aap* e *astA* entre as amostras positivas para o microorganismo de ambos os grupos. Nenhum dos genes isolados apresentou diferença significativa na frequência obtida entre casos e controles. Entretanto, quando foram observadas suas frequências combinadas, a presença do gene *pet* foi associada com a doença causada por EAEC. Cepas carregando os genes *aggR*, *pet*, *pic*, *aap* e *astA* foram isoladas em frequência significativamente superior a partir das amostras fecais de crianças doentes, enquanto que cepas carregando os genes *aggR*, *pic*, *aap* e *astA* foram mais encontradas em crianças do grupo controle.

Ao contrário de outros estudos publicados, o gene *aggR* foi detectado somente em 47,1% dos casos e 50% dos controles nesse trabalho. Esse resultado é surpreendente, visto o papel regulador que o gene exerce sobre outros fatores plasmidiais e cromossômicos de EAEC. Alguns autores têm, inclusive, sugerido a utilização da pesquisa desse gene em combinação com outras seqüências gênicas e/ou com a avaliação do padrão de aderência como critério no diagnóstico de EAEC, o que poderia sub-estimar a prevalência do microorganismo (CERNA; NATARO; ESTRADA-GARCIA, 2003; SAMIE *et al.*, 2007b; SARANTUYA *et al.*, 2004). Análises epidemiológicas prévias têm evidenciado o isolamento de amostras carregando o gene *aggR* mais frequentemente de pacientes com diarreia do que em indivíduos sem patologias gastrointestinais, sugerindo a importância desse gene regulador como marcador de virulência entre as cepas de EAEC (HUANG *et al.*, 2007; SARANTUYA *et al.*, 2004). Na Nigéria, Okeke *et al.* (2000a) relataram a presença do

gene em 100% das cepas de EAEC isoladas tanto de crianças doentes quanto das aparentemente saudáveis. Apesar de não estar presente em todas as cepas de EAEC, o gene *aggR* é detectado exclusivamente entre amostras desse grupo bacteriano (BOUZARI; JAFARI; ZAREPOUR, 2005). O termo “EAEC atípica” tem sido proposto por alguns autores para designar as cepas de EAEC que não apresentam o gene *aggR* (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; NATARO, 2005).

Apesar de ter sido observado em frequência duas vezes maior nos casos (41,2%) quando comparados aos controles (20,6%), o gene *pet* isoladamente não mostrou diferença estatística entre os grupos. A prevalência do gene descrita na literatura varia de 0 a 73,7% (BOUZARI; JAFARI; ZAREPOUR, 2005; ESLAVA *et al.*, 1998; GIOPPO *et al.*, 2000; HUANG *et al.*, 2007; OKEKE *et al.*, 2000a; PEREIRA *et al.*, 2007; PIVA *et al.*, 2003; PRESTERL *et al.*, 2003; VILA *et al.*, 2000). Eslava *et al.* (1993; 1998), que descreveram a existência da proteína resultante no sobrenadante da cultura de amostras de EAEC isoladas durante dois surtos no México e, posteriormente, clonaram, seqüenciaram e caracterizaram o gene, observaram que apenas 15% das cepas de EAEC obtidas durante esses surtos foram positivas para *pet*. Esse baixo percentual de frequência do gene foi observado, ainda, entre cepas isoladas de viajantes espanhóis com diarreia (4,3%) (VILA *et al.*, 2000). Quando foram comparadas as prevalências do gene entre casos e controles, *pet* foi detectado em percentuais que variaram de 1 a 43,8% entre indivíduos com diarreia e de 0 a 48,2% entre grupos aparentemente saudáveis. Em nenhum desses estudos, o gene foi associado com a doença (HUANG *et al.*, 2007; OKEKE *et al.*, 2000a; PEREIRA *et al.*, 2007; PIVA *et al.*, 2003). Alguns autores têm reportado a detecção do *pet* entre outros patótipos de *E. coli* diferentes de EAEC (BOUZARI; JAFARI; ZAREPOUR, 2005; HUANG *et al.*, 2007; PRESTERL *et al.*, 2003).

O gene *pic* foi detectado em percentuais semelhantes de amostras de EAEC extraídas de ambos os grupos (97,1%). Essa é a mais elevada taxa de prevalência reportada para o gene na literatura. Entre viajantes espanhóis que desenvolveram ou não diarreia, o gene foi detectado em uma frequência de 56,5%. O reduzido número de indivíduos assintomáticos incluídos em tal estudo não permitiu a determinação da importância de *pic* no desenvolvimento da diarreia causada pela infecção por EAEC. Outro ponto relevante nesse trabalho foi a

detecção de cepas apresentando o gene mas sem a produção da proteína. De acordo com os autores, esse gene seria altamente prevalente, porém, o desenvolvimento de mutações poderia abolir a expressão do fator. À semelhança do gene *pet*, *pic* foi detectado entre outras categorias de *E. coli* (VILA *et al.*, 2000). Dois trabalhos realizados no Brasil apresentaram resultados diferentes quanto à associação do gene com a diarreia causada por EAEC. Piva *et al.* (2003) observaram haver diferença significativa na detecção de *pic* entre crianças doentes e controles (56,4% *versus* 0%) com idades variando de zero a 24 meses, atendidas em três unidades hospitalares de Brasília. Essa associação não foi relatada entre adultos com diarreia. Pereira *et al.* (2007) não encontraram associação entre a presença do gene e o desenvolvimento da doença entre crianças com até cinco anos de idade atendidas em hospitais localizados na mesma cidade.

O gene *aap*, codificador da proteína dispersina, foi observado em proporções similares entre amostras fecais de crianças com e sem diarreia (52,9% e 58,8%, respectivamente). Em virtude de sua recente caracterização (SHEIKH *et al.*, 2002), pouco existe descrito na literatura sobre a prevalência desse gene entre as cepas de EAEC. O gene *aap* está localizado na seqüência nucleotídica imediatamente anterior à do gene *aggR* no plasmídeo AA e sua transcrição e secreção estão sob controle desse regulador (CZECZULIN *et al.*, 1999; SHEIKH *et al.*, 2002). Segundo Cerna, Nataro e Estrada-Garcia (2003), essa região plasmidial é encontrado especificamente entre as cepas de EAEC, o que levou os autores a desenvolverem uma reação de PCR multiplex baseada em três genes do plasmídeo AA (*aatA*, *aggR* e *aap*) para o diagnóstico molecular de EAEC. A análise de 28 cepas previamente diagnosticadas como EAEC revelou que 86% delas foram positivas para pelo menos um dos três genes pesquisados através do multiplex. Essa especificidade do gene *aap* entre as cepas de EAEC foi ratificada por Bouzari, Jafari e Zarepour (2005). Recentemente, Samie *et al.* (2007b) empregaram a técnica de multiplex desenvolvida no diagnóstico de EAEC entre adultos e crianças em Venda, na África do Sul, e encontraram um percentual de positividade de 16,5% para um ou mais dos genes. À semelhança dos resultados descritos por Bouzari, Jafari e Zarepour (2005), esse trabalho detectou algumas cepas de EAEC obtidas tanto dos casos quanto dos controles que foram positivas para o gene *aggR* e negativas para os genes sob seu controle.

Um elevado percentual de cepas de EAEC associadas ou não com diarreia apresentaram reação positiva para o gene *astA* (97,1% dos casos e 88,2% dos controles). À semelhança do que ocorreu com o gene *pic*, essa frequência supera as taxas descritas na literatura. O gene *astA* foi detectado em 59,6% e 44,7% de cepas de EAEC isoladas de crianças africanas e brasileiras, respectivamente (GIOPPO *et al.*, 2000; PRESTERL *et al.*, 2003). A pesquisa da associação do gene com a doença tem mostrado resultados controversos. Enquanto Pereira *et al.* (2007) observaram a ocorrência do gene em uma frequência duas vezes maior entre crianças-caso do que entre controles (27% *versus* 14,1%, $p < 0,05$), Okeke *et al.* (2000a) relataram a detecção de *astA* em 23,3% e 20,7% das cepas de EAEC isoladas de crianças nigerianas doentes e saudáveis, respectivamente (OR=1,6; IC=0,57-4,6). Piva *et al.* (2003) observaram uma prevalência superior de *astA* entre crianças doentes quando comparadas a adultos doentes (82% *versus* 57,9%). Entre residentes em países desenvolvidos viajando para o México, Índia e Guatemala, amostras de EAEC carregando os genes *aggR*, *aap* e *astA* foram identificadas mais frequentemente nas fezes de indivíduos que desenvolveram diarreia ($p < 0,05$). Isolados de EAEC com dois ou três desses genes foram associados com diarreia quando comparados a isolados que não apresentaram nenhum desses fatores de virulência ($p < 0,05$) (HUANG *et al.*, 2007). A detecção de *astA* em outros patótipos de *E. coli*, inclusive em cepas comensais, tem sido descrita (HUANG *et al.*, 2004; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). A proteína codificada por *astA* foi relatada em proporções significativas de isolados de *E. coli* provenientes de crianças de países em desenvolvimento (SAVARINO *et al.*, 1991). Presterl *et al.* (2003) reportaram a existência do gene em 13% das crianças africanas com diarreia sem diagnóstico de EAEC. Vila *et al.* (2000) encontraram *astA* entre cepas de EAEC, DAEC e *E. coli* não-patogênicas isoladas de viajantes espanhóis. Nos três grupos de microorganismos, o gene foi detectado em frequência superior entre amostras dos controles. Essa toxina parece ser comum na população de *E. coli*, não sendo restrita a EAEC. Sua contribuição na virulência e diarreia causada por EAEC permanecem incertos, uma vez que os dados sugerem que ela é insuficiente para causar a doença na ausência de outro fator de virulência (PRESTERL *et al.*, 2003; VILA *et al.*, 2000).

A variação na presença dos diferentes genes codificadores de fatores de virulência entre cepas de EAEC isoladas de casos e controles confirmam a heterogeneidade do grupo. A presença dos fatores pesquisados nem sempre está relacionada com a doença. Segundo Huang *et al.* (2007) e Presterl *et al.* (2003), o número desses genes presentes nas cepas poderia ser um marcador de virulência e a combinação de genes plasmidiais resultaria no aumento da virulência das cepas. Nesse trabalho, inúmeras cepas de EAEC isoladas que apresentaram mais de um dos genes de virulência pesquisados foram extraídas de amostras de crianças aparentemente saudáveis. A combinação de até quatro (*aggR*, *pic*, *aap* e *astA*) dos cinco genes analisados não mostrou associação com a doença causada por EAEC. Entretanto, a presença de gene *pet* em combinação com os demais genes foi observada com maior frequência entre crianças com diarreia associada com EAEC. Nenhum dos fatores de virulência pesquisados mostrou-se conservado entre todas as cepas de EAEC e três deles (*pic*, *pet* e *astA*) não são exclusivos da categoria. Segundo Okeke e Nataro (2001), isso dificulta a definição genotípica de EAEC e o desenvolvimento de um modelo acurado de fisiopatologia da doença. Todas as 68 cepas de EAEC analisadas mostraram similaridade com alguma das seqüências gênicas testadas. Apesar disso, como nenhum dos cinco genes pesquisados apresentou associação com a diarreia, torna-se necessário o teste dessas cepas para outros marcadores de virulência plasmidiais e cromossomais conhecidos.

No intuito de observar a ocorrência de SNPs no gene regulador *aggR* e a possível influência desses polimorfismos no desenvolvimento da doença, sete amostras de EAEC de cada grupo, positivas para o gene *aggR* por PCR, foram submetidas à análise de sua seqüência gênica. O seqüenciamento foi realizado no analisador genético *ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, Foster, CA)*, que utiliza como princípio a técnica descrita na década de 80. Fragmentos de DNA marcados com fluorescência são gerados através de reações enzimáticas. Essas seqüências apresentam nucleotídeos modificados, apresentando um grupo hidrogênio no carbono 3 ao invés de uma hidroxila, substituição que previne a adição de novos nucleotídeos (SANGER *et al.*, 1981). Os fragmentos obtidos são separados através de eletroforese capilar de alta performance e detectados dentro de capilares delgados preenchidos com gel (COHEN; NAJARIAN; KARGER, 1990; DROSSMAN *et al.*, 1990; HEIGER; COHEN; KARGER, 1990; LUCKEY *et al.*, 1990; SWERDLOW;

GESTELAND, 1990). O desenvolvimento desse método de detecção permitiu a redução do tempo requerido para a separação dos fragmentos, que constituía a grande limitação da tecnologia anterior, baseada na detecção de fluorescência através de laser em conjunto com a eletroforese em gel convencional (DROSSMAN *et al.*, 1990; LUCKEY *et al.*, 1990). Pesquisas na tentativa de melhorar a matriz para a separação do DNA têm resultado no desenvolvimento de polímeros que permitem o seqüenciamento de seqüências nucleotídicas cada vez maiores (BARBIER; VIOVY, 2003; DETWILER; HAMP; KAZIM, 2004).

Dessa forma, 72,7% dos 798 aminoácidos que compõem a seqüência do gene *aggR* puderam ser analisados. Das 14 amostras seqüenciadas, 71,4% dos casos e 42,9% dos controles apresentaram, pelo menos, um nucleotídeo alterado e, no total, 27 SNPs foram descritos na seqüência analisada. Os nucleotídeos seqüenciados a partir das amostras foram comparados com a seqüência padrão do gene *aggR* de EAEC, publicada no NCBI, e com a cepa controle positivo de EAEC O42, cuja seqüência nucleotídica apresentou nove polimorfismos em relação à seqüência depositada no *GenBank*. Dos 27 SNPs observados, apenas seis resultaram na codificação de um aminoácido diferente e na alteração das características bioquímicas em relação ao aminoácido original. A influência de SNPs em genes do hospedeiro no curso da doença tem sido descrita na infecção por EAEC e outros microorganismos, como *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori* e vírus sincicial respiratório (HAMAJIMA *et al.*, 2003; HAWN *et al.*, 2003; HULL; THOMSON; KWIATKOWSKI, 2000; JIANG *et al.*, 2003; MA *et al.*, 2003). Alguns autores têm reportado que mutações em genes de *Edwardsiella tarda*, *Salmonella typhimurium*, *Mycobacterium bovis* e *Escherichia coli* associada com septicemia em porcos poderiam afetar a virulência dessas bactérias (COLLINS *et al.*, 2003; DAIGLE; FAIRBROTHER; HAREL, 1995; LUCAS *et al.*, 2000; SRINIVASA RAO; LIM; LEUNG, 2003; SRINIVASA RAO *et al.*, 2004). Entretanto, o papel de polimorfismos em genes de EAEC é completamente desconhecido. A realização de estudos mais detalhados será necessária para esclarecer a função dos SNPs aqui descritos no curso da infecção causada por EAEC.

A classificação da doença diarréica em inflamatória e não-inflamatória tem importante implicação terapêutica (BOUCKENOOGHE *et al.*, 2000). A pesquisa de leucócitos fecais tem sido empregada como marcador de diarréia causada por patógeno invasor desde que Harris, DuPont e Hornick (1972) sugeriram que a ruptura da mucosa colônica resultaria na liberação de leucócitos nas fezes. A marcação com azul de metileno distingue claramente os leucócitos dos debrís fecais. Apesar de bastante utilizada, a pesquisa de leucócitos fecais através do uso do azul de metileno requer a análise de fezes frescas pouco tempo após a coleta. A utilização de LFF como marcador da infiltração de leucócitos na mucosa intestinal surgiu como alternativa à pesquisa de leucócitos fecais na triagem da doença diarréica inflamatória (GUERRANT *et al.*, 1992a). LFF é uma glicoproteína de 80kDa, ligante do ferro, que compõe os grânulos secundários dos neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) (GUERRANT *et al.*, 1992a; KANE *et al.*, 2003). Embora esteja presente em alguns líquidos corporais, como saliva (4,7 a 26ng/μL) e muco vaginal (3,8 a 218μg/mg), LFF pode ser encontrada em concentrações substancialmente mais elevadas em pacientes com enterite inflamatória, a partir do número de leucócitos tipicamente vistos nesses indivíduos (COHEN *et al.*, 1987; GUERRANT *et al.*, 1992a; TENOVUO *et al.*, 1986). Essa glicoproteína não é detectada em linfócitos e monócitos, sendo encontrada em grânulos específicos nos PMNs, e sua concentração é proporcional ao número de leucócitos fecais. LFF mantém-se estável nas amostras fecais mesmo após os processos de transporte, estocagem e destruição morfológica dos leucócitos (GREEN; KIRKPATRICK; DALE, 1971; GUERRANT *et al.*, 1992a; MASSON; HEREMANS; SCHONNE, 1969).

Huicho *et al.* (1996) realizaram uma extensiva meta-análise para avaliar a sensibilidade e especificidade dos diferentes marcadores de infecção entérica como preditores da existência de um patógeno invasor e concluíram que a pesquisa de LFF é o mais acurado entre os testes. A comparação dos três testes de triagem fecal (pesquisa de leucócitos, sangue oculto e LFF) com amostras de 125 crianças apresentando diarréia aguda revelou uma sensibilidade superior de LFF quando comparada à pesquisa de leucócitos fecais ou sangue oculto na detecção de diarréia infantil invasiva (HUICHO *et al.*, 1997). O valor da pesquisa de LFF como preditor de um episódio diarréico inflamatório foi ratificado em amostras fecais de crianças colombianas com diarréia aguda, onde esse teste apresentou sensibilidade e

especificidade comparáveis à pesquisa de leucócitos fecais (RUIZ-PELÁEZ; MATTAR, 1999). Venkataraman *et al.* (2003) reportaram a utilização desse teste como altamente sensível para a triagem de infecções causadas por enteropatógenos invasores.

A grande maioria das crianças desse estudo apresentou elevados níveis de LFF, independente da presença de EAEC e do desenvolvimento de diarreia (86,7% dos casos e 82,9% dos controles). Todas as crianças com infecção por EAEC que desenvolveram a doença apresentaram concentrações de LFF acima do limite considerado como negativo ($p=0,014$). Nenhum dos genes de virulência pesquisados apresentou associação com as concentrações de LFF. Alguns estudos têm fornecido evidências da associação da infecção por EAEC com uma resposta inflamatória intestinal. Em um estudo realizado em nossa cidade, crianças infectadas pela bactéria, com doença sintomática ou assintomática, apresentaram elevados níveis fecais de LFF e das citocinas pró-inflamatórias IL-8 e IL-1 β (STEINER *et al.*, 1998). A ocorrência de inflamação intestinal no curso da infecção por EAEC foi sugerida, ainda, entre viajantes americanos e europeus para o México e Índia. A positividade no teste para LFF nos casos foi estatisticamente significativa quando comparada ao resultado obtido entre turistas com infecção assintomática ou sem infecção por EAEC (BOUCKENOOGHE *et al.*, 2000; GREENBERG *et al.*, 2002). Os elevados níveis de LFF entre casos e controles negativos para EAEC observados nesse trabalho poderiam ser explicados pela infecção por outros patógenos invasores, não pesquisados nesse estudo, ou pela existência de outros fatores associados ao recrutamento de leucócitos para a mucosa intestinal.

Muitos estudos têm sugerido que a produção local de citocinas exerce papel importante na mediação da inflamação na mucosa intestinal (ALCÂNTARA *et al.*, 2003). As citocinas são proteínas reguladoras, que possuem ação pleiotrópica e muitas delas apresentam um espectro de ações sobrepostas (VILCEK, 2003). Uma grande variedade de células periféricas e centrais, imunológicas ou não, são capazes de produzir citocinas, tais como os monócitos, macrófagos, linfócitos T e B, células exterminadoras (*natural killer* – NK), astrócitos e células endoteliais vasculares (ABBAS; POBER, 2000; JONES *et al.*, 1995; VILCEK, 2003). As citocinas coordenam componentes complexos da resposta imunológica, incluindo as

respostas inata e adaptativa. Na resposta inata, elas exercem papel na ativação de neutrófilos, células NK e macrófagos. Posteriormente, na resposta adaptativa, as citocinas auxiliam na ativação de células T e B, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos. Em conjunto, esses aspectos da resposta inflamatória fornecem anticorpos e defesas celulares imediatas não-específicas e, posteriormente, específicas contra as infecções (ABBAS; POBER, 2000).

As citocinas podem ser classificadas, segundo suas ações ou propriedades, em pró-inflamatórias e antiinflamatórias. As primeiras promovem a ativação do processo inflamatório, auxiliando na eliminação de patógenos e na resolução do processo inflamatório. A elevação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias leva à ativação dos macrófagos, células NK, linfócitos T e B, proliferação de células T e B, além de proliferação e secreção de imunoglobulinas. Ao nível sistêmico, essas citocinas demonstraram induzir febre e aumentar a síntese de proteínas da fase aguda. Localmente, promovem o recrutamento de células inflamatórias para os sítios da inflamação. Por sua vez, o segundo grupo de citocinas reduz a resposta inflamatória através da diminuição das citocinas pró-inflamatórias e da supressão da ativação de monócitos (REMICK, 2003). As citocinas podem ser classificadas, ainda, de acordo com o tipo de linfócito T auxiliar que as produzem (T auxiliar 1 – T *helper* 1 (Th-1) ou T auxiliar 2 – T *helper* 2 (Th-2)). Os linfócitos Th-1 liberam citocinas que ativam macrófagos, células NK, neutrófilos, linfócitos citotóxicos, ampliando, assim, a resposta imunológica celular e exercendo ação predominantemente pró-inflamatória. Por outro lado, as citocinas Th-2 ampliam a resposta humoral por meio da ativação das células B e são principalmente antiinflamatórias. O equilíbrio entre as citocinas pró- e antiinflamatórias é essencial para a manutenção da homeostase no organismo e seu desequilíbrio (Th1 *versus* Th2) está envolvido na patogênese de muitas doenças humanas (CIZZA *et al.*, 2001).

Vinte e duas amostras fecais de cada grupo foram testadas quanto aos níveis das citocinas antiinflamatórias IL-4 e IL-10 e pró-inflamatórias TNF- α e IFN- γ , não sendo observada diferença entre as concentrações obtidas em casos e controles. Os níveis fecais das citocinas também não mostraram associação com a severidade da doença. Apesar de não ter sido observado nesse trabalho, elevados

níveis de marcadores de inflamação intestinal têm sido descritos em crianças brasileiras com doença diarréica (ALCÂNTARA *et al.*, 2003). Como apenas 8 amostras fecais positivas para EAEC foram analisadas de cada grupo, não foi possível observar uma associação específica do microorganismo com a quantificação fecal das citocinas.

O componente inflamatório no curso da infecção causada por EAEC tem sido atribuído principalmente à flagelina, proteína componente do flagelo do microorganismo, que seria capaz de provocar a liberação de IL-8 através de ligação com o TLR5 do hospedeiro (STEINER *et al.*, 2000). A infecção de monocamadas celulares intestinais com cepas de EAEC O42 revelou que esse componente do flagelo bacteriano é responsável pela secreção de outras citocinas, que incluem IL-6, IL-1 α , TNF- α , oncogenes relacionados ao crescimento alfa e gama (*growth-related oncogene* – GRO), molécula de adesão intercelular 1 (*inter-cellular adhesion molecule* – ICAM) e fator estimulante de granulócitos e macrófagos (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* – GM-CSF). Entretanto, cepas de EAEC O42 que apresentaram deleção do gene da flagelina mantiveram a capacidade de causar a liberação de IL-8, sugerindo a participação de outras estruturas bacterianas no desenvolvimento da inflamação (HARRINGTON *et al.*, 2005). Os mecanismos de EAEC que podem estar associados ao dano à mucosa, com conseqüente inflamação, incluem aderência celular, secreção de toxinas, formação de camada mucóide e, possivelmente, invasão celular (HARRINGTON *et al.*, 2005; HICKS; CANDY; PHILLIPS, 1996a; NATARO; KAPER, 1998; NATARO *et al.*, 1995). Vários autores têm relatado a quantificação de níveis elevados de citocinas fecais em pacientes infectados por EAEC e por outros enteropatógenos (ALCÂNTARA *et al.*, 2003; BOUCKENOOGHE *et al.*, 2000; JIANG *et al.*, 2002; RAQIB *et al.*, 1995ab; STEINER *et al.*, 1998). A ocorrência de SNPs em regiões regulatórias de alguns genes de citocinas têm mostrado influência no tipo de resposta imune desenvolvida em diferentes condições patológicas (DASER *et al.*, 1996; HOBBS *et al.*, 1998; ROSENWASSER, 1999). Esses polimorfismos poderiam explicar, pelo menos em parte, as variações observadas nas manifestações clínicas após a exposição a um patógeno entérico (HUANG *et al.*, 2004).

A ocorrência de co-infecções intestinais entre diferentes bactérias e destas com vírus e parasitas em crianças doentes já foi relatada em outros trabalhos em percentuais que alcançaram os 44%. Entre os controles, a identificação de infecções mistas chegou aos 7,2% (CHAN *et al.*, 1994; FANG *et al.*, 1995; PEREIRA *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2002). Brooks *et al.* (2006) reportaram a existência de infecções por cepas de *E. coli* patogênicas em combinação com outros microorganismos em 28% dos pacientes apresentando diarreia aguda, atendidos em quatro centros rurais do Quênia. No presente estudo, a ocorrência de co-infecções com EAEC e parasitas intestinais foi observada em um percentual de 17,6% entre os casos e 14,7% entre os controles. A análise microscópica do concentrado fecal permitiu a identificação de *Ascaris lumbricoides*, *Endolimax nana*, *Entamoeba coli*, *Giardia lamblia* e *Trichuris trichiura*. Nenhuma das crianças apresentou infecção por *Cryptosporidium*. A presença de infecções mistas entre EAEC e outras bactérias e vírus não foi investigada nesse trabalho.

Esse estudo demonstra o papel relevante de EAEC na colonização intestinal e no desenvolvimento de diarreia entre crianças carentes de Fortaleza. A variabilidade na presença de genes descritos como codificadores de fatores de virulência do microorganismo confirmam a heterogeneidade desse grupo bacteriano. A grande frequência do gene *pet*, em combinação com outros genes relacionados à virulência do microorganismo, em cepas isoladas de crianças com diarreia por EAEC demonstra a importância desse gene na fisiopatologia da doença causada pela bactéria. Sugerimos uma análise mais aprofundada sobre a influência dos inúmeros polimorfismos detectados na sequência nucleotídica do gene regulador *aggR* de EAEC. Dada a alta prevalência da bactéria entre casos e controles, são necessários novos estudos para avaliar o impacto nutricional da infecção por EAEC. Em relação à inflamação, os elevados níveis de LFF detectados na grande maioria das crianças estudadas sugerem a existência de fatores adicionais desencadeadores do processo inflamatório. A quantificação dos níveis fecais de citocinas diferentes daquelas avaliadas nesse trabalho pode esclarecer aspectos da inflamação intestinal associada à infecção por EAEC.

7 CONCLUSÕES

- A prevalência de EAEC encontrada na população estudada foi de 41,0% entre os casos e 41,0% entre os controles;
- Crianças com diarréia apresentaram redução significativa na espessura da prega cutânea, IMC e nos escores-z WAZ e WHZ quando comparadas a crianças sem a doença;
- A presença ou ausência de EAEC nos casos não causou alteração significativa nos parâmetros nutricionais avaliados. Achados similares foram observados entre crianças do grupo controle. Essa conclusão é limitada pela elevada prevalência de EAEC nos casos e controles e pelo tamanho da amostra analisada;
- Os genes codificadores de fatores de virulência *aggR*, *aap*, *pic*, *pet* e *astA* foram identificados isoladamente em proporções semelhantes entre cepas de EAEC isoladas das fezes de crianças que desenvolveram ou não diarréia;
- A combinação de genes codificadores de fatores de virulência mostrou que a presença do *pet* está associada com a doença causada por EAEC, o que demonstra a importância desse gene na virulência do microorganismo e no desenvolvimento de diarréia;
- Um percentual elevado de cepas de EAEC isoladas de casos e controles apresentou polimorfismos na seqüência nucleotídica do gene *aggR*, mas os dados sugerem que não existe um polimorfismo específico associado com o curso da infecção;
- Crianças com e sem diarréia, independente da presença de EAEC e de seus genes de virulência, apresentaram elevado grau de inflamação intestinal, caracterizado pelos níveis de LFF;
- A presença de EAEC está significativamente associada com uma maior frequência de positividade e uma concentração elevada de LFF em pacientes com diarréia quando comparados com os controles;
- Crianças dos grupos caso e controle apresentaram níveis fecais semelhantes das citocinas IL-4, IL-10, TNF- α e IFN- γ .

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, K. A.; POBER, J. S. Effectors mechanisms of immune responses. In: ABBAS, K. A.; POBER, J. S. (Eds.) **Cellular and molecular immunology**. 4 ed. Philadelphia: Saunders, 2000. v. 1, p. 553-572.
- ABE, C. M.; KNUTTON, S.; PEDROSO, M. Z.; FREYMÜLLER, E.; GOMES, T. A. An enteroaggregative *Escherichia coli* strain of serotype O111:H12 damages and invades cultured T84 cells and human colonic mucosa. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 203, n. 2, p. 199-205, 2001.
- ABE, C. M.; SALVADOR, F. A.; FALSETTI, I. N.; VIEIRA, M. A.; BLANCO, J.; BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; MACHADO, A. M.; ELIAS, W. P.; HERNANDES, R. T.; GOMES, T. A. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 52, n. 3, p. 397-406, 2008.
- ADACHI, J. A.; ERICSSON, C. D.; JIANG, Z. D.; DUPONT, M. W.; PALLEGAR, S. R.; DUPONT, H. L. Natural history of enteroaggregative and enterotoxigenic *Escherichia coli* infection among US travelers to Guadalajara, Mexico. **J. Infect. Dis.**, v. 185, n. 11, p. 1681-1683, 2002.
- AGNEW, D. G.; LIMA, A. A. M.; NEWMAN, R. D.; WUHIB, T.; MOORE, R. D.; GUERRANT, R. L.; SEARS, C. L. Cryptosporidiosis in northeastern Brazilian children: association with increased diarrhea morbidity. **J. Infect. Dis.**, v. 177, n. 3, p. 754-760, 1998.
- ALASFOOR, D.; TRAISSAC, P.; GARTNER, A.; DELPEUCH, F. Determinants of persistent underweight among children, aged 6-35 months, after huge economic development and improvements in health services in Oman. **J. Health Popul. Nutr.**, v. 25, n. 3, p. 359-369, 2007.
- ALBERT, M. J.; FARUQUE, S. M.; FARUQUE, A. S.; BETTELHEIM, K. A.; NEOGI, P. K.; BHUIYAN, N. A.; KAPER, J. B. Controlled study of cytolethal distending toxin-producing *Escherichia coli* infections in Bangladeshi children. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n. 3, p. 717-719, 1996.
- ALBERT, M. J.; FARUQUE, S. M.; FARUQUE, A. S.; NEOGI, P. K.; ANSARUZZAMAN, M.; BHUIYAN, N. A.; ALAM, K.; AKBAR, M. S. Controlled study of *Escherichia coli* diarrheal infections in Bangladeshi children. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 4, p. 973-977, 1995.
- ALCANTARA, C. S.; YANG, C. H.; STEINER, T. S.; BARRETT, L. J.; LIMA, A. A.; CHAPPELL, C. L.; OKHUYSEN, P. C.; WHITE JR., A. C.; GUERRANT, R. L. Interleukin-8, tumor necrosis factor-alpha, and lactoferrin in immunocompetent hosts with experimental and Brazilian children with acquired cryptosporidiosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 68, n. 3, p. 325-328, 2003.
- AL-KHALDI, S. F.; MARTIN, S. A.; RASOOLY, A.; EVANS, J. D. DNA microarray technology used for studying foodborne pathogens and microbial habitats: minireview. **J. AOAC Int.**, v. 85, n. 4, p. 906-910, 2002.

ALY, N. Y.; AL-MOUSA, H. H.; AL ASAR, S. M. Nosocomial infections in a medical-surgical intensive care unit. **Med. Princ. Pract.**, v. 17, n. 5, p. 373-377, 2008.

AMAR, C. F. L.; EAST, C. L.; GRANT, K. A.; GRAY, J.; ITURRIZA-GOMARA, M.; MACLURE, A.; MCLAUCHLIN, J. Detection of viral, bacterial, and parasitological RNA or DNA of nine intestinal pathogens in fecal samples archived as part of the English Infectious Intestinal Disease study. **Diagn. Mol. Pathol.**, v. 14, n. 2, p. 90-96, 2005.

ANDERSON, J. M.; VAN ITALLIE, C. M. Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. **Am. J. Physiol.**, v. 269, p. G467-G475, 1995.

ARAÚJO, M. F. M.; FERREIRA, A. B.; GONDIM, K. M.; CHAVES, E. S. A prevalência de diarreia em crianças não amamentadas ou com amamentação por tempo inferior a seis meses. **Cienc. Cuid. Saud**, v. 6, n. 1, p. 76-84, 2007.

BALDWIN, T. J.; KNUTTON, S.; SELLERS, L.; HERNANDEZ, H. A.; AITKEN, A.; WILLIAMS, P. H. Enteroaggregative *Escherichia coli* strains secrete a heat-labile toxin antigenically related to *E. coli* hemolysin. **Infect. Immun.**, v. 60, n. 5, p. 2092-2095, 1992.

BANGAR, R.; BALLAL, M. Identification of enteroaggregative *Escherichia coli* in infants with acute diarrhea based on biofilm production in Manipal, south India. **Indian J. Med. Sci.**, v. 62, n.1, p. 8-12, 2008.

BAQUI, A. H.; SACK, R. B.; BLACK, R. E.; HAIDER, K.; HOSSAIN, A.; ALIM, A. R.; YUNUS, M.; CHOWDHURY, H. R.; SIDDIQUE, A. K. Enteropathogens associated with acute and persistent diarrhea in Bangladeshi children less than 5 years of age. **J. Infect. Dis.**, v. 166, n. 4, p. 792-796, 1992.

BARBIER, V.; VIOVY, J. L. Advanced polymers for DNA separation. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 14, n. 1, p. 51-57, 2003.

BARBOZA JR., M. S.; SILVA, T. M. J.; GUERRANT, R. L.; LIMA, A. A. M. Measurement of intestinal permeability using mannitol and lactulose in children with diarrheal diseases. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 32, n. 12, p. 1499-1504, 1999.

BARDHAN, P. K.; ALBERT, M. J.; ALAM, N. H.; FARUQUE, S. M.; NEOGI, P. K.; MAHALANABIS, D. Small bowel and fecal microbiology in children suffering from persistent diarrhea in Bangladesh. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 26, n. 1, p. 9-15, 1998.

BAUDRY, B.; SAVARINO, S. J.; VIAL, P.; KAPER, J. B.; LEVINE, M. M. A sensitive and specific DNA probe to identify enteroaggregative *Escherichia coli*, a recently discovered diarrheal pathogen. **J. Infect. Dis.**, v. 161, n. 6, p. 1249-1251, 1990.

BEHRENS, M.; SHEIKH, J.; NATARO, J. P. Regulation of the Overlapping *pic/set* Locus in *Shigella flexneri* and Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 6, p. 2915-2925, 2002.

BENÍTEZ, O.; URIBE, F.; NAVARRO, A.; HERNÁNDEZ, D.; RUIZ, J.; CRAVIOTO, A. Etiology of bloody diarrhea in children from a rural community. **Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.**, v. 48, n. 2, p. 65-70, 1991.

BENJAMIN, P.; FEDERMAN, M.; WANKE, C. A. Characterization of an invasive phenotype associated with enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 63, n. 9, p. 3417-3421, 1995.

BERKMAN, D. S.; LESCANO, A. G.; GILMAN, R. H.; LOPEZ, S. L.; BLACK, M. M. Effects of stunting, diarrhoeal disease, and parasitic infection during infancy on cognition in late childhood: a follow-up study. **Lancet**, v. 359, n. 9306, p. 564-571, 2002.

BERN, C.; MARTINES, J.; ZOYSA, I.; GLASS, R. I. The magnitude of the global problema of diarrhoeal disease: a ten-year update. **Bull World Health Organ.**, v. 70, n. 6, p. 705-714, 1992.

BERNIER, C.; GOUNON, P.; LE BOUGUÉNEC, C. Identification of an aggregative adhesion fimbria (AAF) type III-encoding operon in enteroaggregative *Escherichia coli* as a sensitive probe for detecting the AAF-encoding operon family. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 8, p. 4302-4311, 2002.

BETTELHEIM, K. A. Biochemical characteristics of *Escherichia coli*. In: GYLES, C. L. (Ed.) ***Escherichia coli in domestic animals and humans***. Wallingford: CAB International, 1994. p. 3-30.

BHAN, M. K.; BHANDARI, N.; SAZAWAL, S.; CLEMENS, J.; RAJ, P.; LEVINE, M. M.; KAPER, J. B. Descriptive epidemiology of persistent diarrhoea among young children in rural northern India. **Bull World Health Organ.**, v. 67, n. 3, p. 281-288, 1989a.

BHAN, M. K.; KHOSHOO, V.; SOMMERFELT, H.; RAJ, P.; SAZAWAL, S.; SRIVASTAVA, R. Enteroaggregative *Escherichia coli* and *Salmonella* associated with nondysenteric persistent diarrhea. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 8, n. 8, p. 499-502, 1989b.

BHAN, M. K.; RAJ, P.; LEVINE, M. M.; KAPER, J. B.; BHANDARI, N.; SRIVASTAVA, R.; KUMAR, R.; SAZAWAL, S. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with persistent diarrhea in a cohort of rural children in India. **J. Infect. Dis.**, v. 159, n. 6, p. 1061-1064, 1989c.

BHAN, M. K.; SAZAWAL, S.; RAJ, P.; BHANDARI, N.; KUMAR, R.; BHARDWAJ, Y.; SHRIVASTAVA, R.; BHATNAGAR, S. Aggregative *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Shigella* are associated with increasing duration of diarrhea. **Indian J. Pediatr.**, v. 56, n. 1, p. 81-86, 1989d.

BHANDARI, N.; BHAN, M. K.; SAZAWAL, S.; CLEMENS, J. D.; BHATNAGAR, S.; KHOSHOO, V. Association of antecedent malnutrition with persistent diarrhoea: a case-control study. **BMJ**, v. 298, n. 6683, p. 1284-1287, 1989.

BHATNAGAR, S.; BHAN, M. K.; SOMMERFELT, H.; SAZAWAL, S.; KUMAR, R.; SAINI, S. Enteroaggregative *Escherichia coli* may be a new pathogen causing acute and persistent diarrhea. **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 25, n. 5, p. 579-583, 1993.

BHUTTA, Z. A.; NELSON, E. A.; LEE, W. S.; TARR, P. I.; ZABLAH, R.; PHUA, K. B.; LINDLEY, K.; BASS, D.; PHILLIPS, A. Recent advances and evidence gaps in persistent diarrhea. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 47, n. 2, p. 260-265, 2008.

BLACK, R. E.; BROWN, K. H.; BECKER, S. Malnutrition is a determining factor in diarrheal duration but not incidence among young children in a longitudinal study in rural Bangladesh. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 39, p. 87-94, 1984.

BLACK, M. M.; LANATA, C. F. Epidemiology of diarrheal diseases in developing countries. In: BLASER, M. J.; SMITH, P. D.; RAVDIN, J. I.; GREENBERG, H. B.; GUERRANT, R. L. (Ed.) **Infectious of the gastrointestinal tract**. 2 ed. Philadelphia: Lippincott, 2002. p. 11-29.

BOISEN, N.; STRUVE, C.; SCHEUTZ, F.; KROGFELT, K. A.; NATARO, J. P. New adhesin of enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF family. **Infect. Immun.**, v. 76, n. 7, p. 3281-3292, 2008.

BORGES, C. V. D.; VEIGA, A. P. B.; BARROSO, G. S.; JESUS, E. F. O.; SERPA, R. F. B.; MOREIRA, S.; SALLES-COSTA, R. Associação entre concentrações séricas e minerais, índices antropométricos e ocorrência de diarréia entre crianças de baixa renda da região metropolitana do Rio de Janeiro. **Rev. Nutr.**, v. 20, n. 2, p. 159-169, 2007.

BOUCKENOOGHE, A. R.; DUPONT, H. L.; JIANG, Z. D.; ADACHI, J.; MATHEWSON, J. J.; VERENKAR, M. P.; RODRIGUES, S.; STEFFEN, R. Markers of enteric inflammation in enteroaggregative *Escherichia coli* diarrhea in travelers. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 62, n. 6, p. 711-713, 2000.

BOUZARI, S.; JAFARI, A.; AZIZI, A.; OLOOMI, M.; NATARO, J. P. Short report: characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from Iranian children. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 65, n. 1, p. 13-14, 2001.

BOUZARI, S.; JAFARI, A.; FARHOUDI-MOGHADDAM, A. A.; SHOKOUHI, F.; PARSI, M. Adherence of non-enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **J. Med. Microbiol.**, v. 40, n. 2, p. 95-97, 1994.

BOUZARI, S.; JAFARI, A.; ZAREPOUR, M. Distribution of virulence related genes among enteroaggregative *Escherichia coli* isolates: using multiplex PCR and hybridization. **Infect. Genet. Evol.**, v. 5, n. 1, p. 79-83, 2005.

BROOK, M. G.; SMITH, H. R.; BANNISTER, B. A.; MCCONNELL, M.; CHART, H.; SCOTLAND, S. M.; SAWYER, A.; SMITH, M.; ROWE, B. Prospective study of verocytotoxin-producing, enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli* in different diarrhoeal states. **Epidemiol. Infect.**, v. 112, n. 1, p. 63-67, 1994.

BROOKS, J. T.; OCHIENG, J. B.; KUMAR, L.; OKOTH, G.; SHAPIRO, R. L.; WELLS, J. G.; BIRD, M.; BOPP, C.; CHEGE, W.; BEATTY, M. E.; CHILLER, T.; VULULE, J. M.; MINTZ, E.; SLUTSKER, L. Surveillance for bacterial diarrhea and antimicrobial resistance in rural Western Kenya, 1997–2003. **Clin. Infect. Dis.**, v. 43, p. 393-401, 2006.

BROWN, H. W.; NEVA, F. A. Technical diagnostic methods. In: BROWN, W. H.; NEVA, F. A. (Eds.) Basic clinical parasitology. 5 ed. Connecticut: Appleton-Century-Crofts, 1983. p.315-325.

BUERIS, V.; SIRCILI, M. P.; TADDEI, C. R.; SANTOS, M. F.; FRANZOLIN, M. R.; MARTINEZ, M. B.; FERRER, S. R.; BARRETO, M. L.; TRABULSI, L. R. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 7, p. 839-844, 2007.

BUSHEN, O. Y.; KOHLI, A.; PINKERTON, R. C.; DUPNIK, K.; NEWMAN, R. D.; SEARS, C. L.; FAYER, R.; LIMA, A. A. M.; GUERRANT, R. L. Heavy cryptosporidial infections in children in northeast Brazil: comparison of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 101, n. 4, p. 378-384, 2007.

CAMPOS, L. C.; FRANZOLIN, M. R.; TRABULSI, L. R. Diarrheagenic *Escherichia coli* categories among the traditional enteropathogenic *E. coli* O serogroups - a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 6, p. 545-552, 2004.

CANIZALEZ-ROMAN, A.; NAVARRO-GARCÍA, F. Fodrin CaM-binding domain cleavage by Pet from enteroaggregative *Escherichia coli* leads to actin cytoskeletal disruption. **Molec. Microbiol.**, v. 48, n. 4, p. 947–958, 2003.

CAPLAN, M. J.; SEO-MAYER, P.; ZHANG, L. Epithelial junctions and polarity: complexes and kinases. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.**, v. 17, n. 5, p. 506-512, 2008.

CEREIJIDO, M. Evolution of ideas on the tight junction. In: CEREIJIDO, M. **Tight junctions**. Florida: CRC, 1992. p. 1-13.

CERNA, J. F.; NATARO, J. P.; ESTRADA-GARCIA, T. Multiplex PCR for detection of three plasmid-borne genes of enteroaggregative *Escherichia coli* strains. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 5, p. 2138-2140, 2003.

CHAN, K. N.; PHILLIPS, A. D.; KNUTTON, S.; SMITH, H. R.; WALKER-SMITH, J. A. Enteroaggregative *Escherichia coli*: another cause of acute and chronic diarrhoea in England? **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 18, n. 1, p. 87-91, 1994.

CHANDRAN, P.; SATTHAPORN, S.; ROBINS, A.; EREMIN, O. Inflammatory bowel disease: dysfunction of GALT and gut bacterial flora (II). **Surg. J. R. Coll. Surg. Edinb. Irel.**, v. 1, n. 3, p. 125-136, 2003.

CHART, H.; SPENCER, J.; SMITH, H. R.; ROWE, B. Identification of entero-aggregative *Escherichia coli* based on surface properties. **J. Appl. Microbiol.**, v. 83, p. 712-717, 1997.

CHECKLEY, W.; BUCKLEY, G.; GILMAN, R. H.; ASSIS, A. M.; GUERRANT, R. L.; MORRIS, S. S.; MØLBAK, K.; VALENTINER-BRANTH, P.; LANATA, C. F.; BLACK, R. E. Multi-country analysis of the effects of diarrhoea on childhood stunting. **Int. J. Epidemiol.**, v. 37, n. 4, p. 816-830, 2008.

CHECKLEY, W.; EPSTEIN, L. D.; GILMAN, R. H.; BLACK, R. E.; CABRERA, L.; STERLING, C. R. Effects of *Cryptosporidium parvum* infection in Peruvian children: growth faltering and subsequent catch-up growth. **Am. J. Epidemiol.**, v. 148, n. 5, p. 497-506, 1998.

CHECKLEY, W.; EPSTEIN, L. D.; GILMAN, R. H.; CABRERA, L.; BLACK, R. E. Effects of acute diarrhea on linear growth in Peruvian children. **Am. J. Epidemiol.**, v. 157, n. 2, p. 166-175, 2003.

CHECKLEY, W.; GILMAN, R. H.; BLACK, R. E.; LESCANO, A. G.; CABRERA, L.; TAYLOR, D. N.; MOULTON, L. H. Effects of nutritional status on diarrhea in Peruvian children. **J. Pediatr.**, v. 140, n. 2, p. 210-218, 2002.

CHECKLEY, W.; GILMAN, R. H.; EPSTEIN, L. D.; SUAREZ, M.; DIAZ, J. F.; CABRERA, L.; BLACK, R. E.; STERLING, C. R. Asymptomatic and symptomatic cryptosporidiosis: their acute effect on weight gain in Peruvian children. **Am. J. Epidemiol.**, v. 145, n. 2, p. 156-163, 1997.

CHENG, H.; LEBLOND, C. P. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. unitarian theory of the origin of the four epithelial cell types. **Am. J. Anat.**, v. 141, n. 4, p. 537-561, 1974.

CHINA CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Review research on the literature of diarrhea disease in China (1990-2004)**. Beijing: China CDC, National Center for Rural Water Supply Technical Guidance, 2005. 75 p.

CIZZA, G.; RAVN, P.; CHROUSOS, G. P.; GOLD, P. W. Depression: a major, unrecognized risk factor for osteoporosis? **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 12, n. 5, p. 198-203, 2001.

CLAUSEN, C. R.; CHRISTIE, D. L. Chronic diarrhea in infants caused by adherent enteropathogenic *Escherichia coli*. **J. Pediatr.**, v. 100, p. 358-361, 1982.

COHEN, A. S.; NAJARIAN, D. R.; KARGER, B. L. Separation and analysis of DNA sequence reaction products by capillary gel electrophoresis. **J. Chromatogr.**, v. 516, n. 1, p. 49-60, 1990.

COHEN, M. S.; BRITIGAN, B. E.; FRENCH, M.; BEAN, K. Preliminary observations on lactoferrin secretion in human vaginal mucus: variation during the menstrual cycle, evidence of hormonal regulation, and implications for infection with *Neisseria gonorrhoeae*. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 157, n. 5, p. 1122-1125, 1987.

COHEN, M. B.; NATARO, J. P.; BERNSTEIN, D. I.; HAWKINS, J.; ROBERTS, N.; STAAT, M. A. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in acute childhood enteritis: a prospective controlled study. **J. Pediatr.**, v. 146, p. 54-61, 2005.

COLLINS, D. M.; KAWAKAMI, R. P.; BUDDLE, B. M.; WARDS, B. J.; DE LISLE, G. W. Different susceptibility of two animal species infected with isogenic mutants of *Mycobacterium bovis* identifies *phoT* as having roles in tuberculosis virulence and phosphate transport. **Microbiology**, v. 149, p. 3203-3212, 2003.

CRAVIOTO, A.; GROSS, R. J.; SCOTLAND, S. M.; ROWE, B. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. **Curr. Microbiol.**, v. 3, p. 95-99, 1979.

CRAVIOTO, A.; TELLO, A.; NAVARRO, A.; RUIZ, J.; VILLAFÁN, H.; URIBE, F.; ESLAVA, C. Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhea. **Lancet.**, v. 337, n. 8736, p. 262-264, 1991.

CZECZULIN, J. R.; BALEPUR, S.; HICKS, S.; PHILLIPS, A.; HALL, R.; KOTHARY, M. H.; NAVARRO-GARCIA, F.; NATARO, J. P. Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 65, n. 10, p. 4135-4145, 1997.

CZECZULIN, J. R.; WHITTAM, T. S.; HENDERSON, I. R.; NAVARRO-GARCIA, F.; NATARO, J. P. Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 6, p. 2692-2699, 1999.

DAIGLE, F.; FAIRBROTHER, J. M.; HAREL, J. Identification of a mutation in the *pst-phoU* operon that reduces pathogenicity of an *Escherichia coli* strain causing septicemia in pigs. **Infect. Immun.**, v. 63, n. 12, p. 4924-4927, 1995.

DASER, A.; MITCHISON, H.; MITCHISON, A.; MÜLLER, B. Non-classical-mhc genetics of immunological disease in man and mouse. The key role of pro-inflammatory cytokine genes. **Cytokine**, v. 8, n. 8, p. 593-597, 1996.

DEBROY, C.; BRIGHT, B. D.; WILSON, R. A.; YEALY, J.; KUMAR, R.; BHAN, M. K. Plasmid-coded DNA fragment developed as a specific gene probe for the identification of enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Med. Microbiol.**, v. 41, n. 6, p. 393-398, 1994.

DEBROY, C.; YEALY, J.; WILSON, R. A.; BHAN, M. K.; KUMAR, R. Antibodies raised against the outer membrane protein interrupt adherence of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 63, n. 8, p. 2873-2879, 1995.

DETWILER, M. M.; HAMP, T. J.; KAZIM, A. L. DNA sequencing using the liquid polymer POP-7 on an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer. **Biotechniques**, v. 36, n. 6, p. 932-933, 2004.

DHAMA, K.; CHAUHAN, R. S.; MAHENDRAN, M.; MALIK, S. V. Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals. **Vet. Res. Commun.**, 2008. *In Press*.

- DIBLEY, M. J.; GOLDSBY, J. B.; STAEHLING, N. W.; TROWBRIDGE, F. L. Development of normalized curves for the international growth reference: historical and technical considerations. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 46, n. 5, p. 736-748, 1987.
- DOBBING, J. Boyd orr memorial lecture. Early nutrition and later achievement. **Proc. Nutri. Soc.**, v. 49, n. 2, p. 103-118, 1990.
- DOBBING, J. Infant nutrition and later achievement. **Nutr. Rev.**, v. 42, n. 1, p. 1-7, 1984.
- DOBBING, J. Infant nutrition and later achievement. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 41, Suppl. 2, p. 477-484, 1985.
- DOBBING, J.; SANDS, J. Cell size and cell number in tissue growth and development. An old hypothesis reconsidered. **Arch. Fr. Pediatr.**, v. 42, n. 3, p. 199-203, 1985.
- DOBBING, J.; SANDS, J. Vulnerability of developing brain not explained by cell number/cell size hypothesis. **Early Hum. Dev.**, v. 5, n. 3, p. 227-231, 1981.
- DONNELLY, M. A.; STEINER, T. S. Two nonadjacent regions in enteroaggregative *Escherichia coli* flagellin are required for activation of toll-like receptor 5. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 43, p. 40456-40461, 2002.
- DONNENBERG, M. S. Pathogenic strategies of enteric bacteria. **Nature**, v. 406, n. 17, p. 768-774, 2000.
- DRASAR, B. S.; HILL, M. J. **Human intestinal flora**. London: Academic Press Ltd., 1974. p. 36-43.
- DROSSMAN, H.; LUCKEY, J. A.; KOSTICHKA, A. J.; D'CUNHA, J.; SMITH, L. M. High-speed separations of DNA sequencing reactions by capillary electrophoresis. **Anal. Chem.**, v. 62, n. 9, p. 900-903, 1990.
- DUDLEY, E. G.; THOMSON, N. R.; PARKHILL, J.; MORIN, N. P.; NATARO, J. P. Proteomic and microarray characterization of the *AggR* regulon identifies a *pheU* pathogenicity island in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 61, n. 5, p. 1267-1282, 2006.
- DURRER, P.; ZBINDEN, R.; FLEISCH, F.; ALTWEGG, M.; LEDERGERBER, B.; KARCH, H.; WEBER, R. Intestinal infection due enteroaggregative *Escherichia coli* among human immunodeficiency virus-infected persons. **J. Infect. Dis.**, v. 182, n. 5, p. 1540-1544, 2000.
- DUTTA, P. R.; CAPPELLO, R.; NAVARRO-GARCÍA, F.; NATARO, J. P. Functional comparison of serine protease autotransporters of *Enterobacteriaceae*. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 12, p. 7105-7113, 2002.

DUTTA, S.; PAL, S.; CHAKRABARTI, S.; DUTTA, P.; MANNA, B. Use of PCR to identify enteroaggregative *Escherichia coli* as an important cause of acute diarrhoea among children living in Calcutta, India. **J. Med. Microbiol.**, v. 48, n. 11, p. 1011-1016, 1999.

ECHEVERRIA, P.; SERICHANTALERG, O.; CHANGCHAWALIT, S.; BAUDRY, B.; LEVINE, M. M.; ORSKOV, F.; ORSKOV, I. Tissue culture-adherent *Escherichia coli* in infantile diarrhea. **J. Infect. Dis.**, v. 165, n. 1, p. 141-143, 1992.

ELLIOTT, S. J.; NATARO, J. P. Enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. **Rev. Med. Microbiol.**, v. 6, n. 3, p. 196-206, 1995.

ESLAVA, C.; NAVARRO-GARCÍA, F.; CZECZULIN, J. R.; HENDERSON, I. R.; CRAVIOTO, A.; NATARO, J. P. Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 7, p. 3155-3163, 1998.

ESLAVA, C.; VILLASECA, J.; MORALES, R.; NAVARRO, A.; CRAVIOTO, A. Identification of a protein with toxigenic activity produced by enteroaggregative *Escherichia coli*. In: **Abstracts of the 93rd General Meeting of the American Society for Microbiology**, 1993. Washington D. C.: American Society for Microbiology, Abstr. B-105, p. 44, 1993.

FAÇANHA, M. C.; PINHEIRO, A. C. Comportamento das doenças diarréicas agudas em serviços de saúde de Fortaleza, Ceará, Brasil, entre 1996 e 2001. **Cad. Saúde Pública**, v. 21, n. 1, p. 49-54, 2005.

FAGUNDES-NETO, U.; DE MARTINI-COSTA, S.; PEDROSO, M. Z.; SCALETSKY, I. C. A. Studies of the small bowel surface by scanning electron microscopy in infants with persistent diarrhea. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 33, n. 12, p. 1437-1442, 2000.

FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I. C. A. *Escherichia coli* infections and malnutrition. **Lancet**, v. 356, Suppl. 1, p. S27, 2000.

FANG, G. D.; LIMA, A. A.; MARTINS, C. V.; NATARO, J. P.; GUERRANT, R. L. Etiology and epidemiology of persistent diarrhea in northeastern Brazil: a hospital-based, prospective, case-control study. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 21, n. 2, p. 137-144, 1995.

FANNING, A. S.; MITIC, L. L.; ANDERSON, J. M. Transmembrane proteins in the tight junction barrier. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 10, n. 6, p. 1337-1345, 1999.

FARUQUE, S. M.; HAIDER, K.; RAHMAN, M. M.; ABDUL ALIM, A. R.; BAQUI, A. H.; AHMAD, Q. S.; HOSSAIN, K. M.; ALBERT, M. J. Evaluation of a DNA probe to identify enteroaggregative *Escherichia coli* from children with diarrhoea in Bangladesh. **J. Diarrhoeal Dis. Res.**, v. 10, n. 1, p. 31-34, 1992.

FASANO, A. Cellular microbiology: can we learn cell physiology from microorganisms? **Am. J. Physiol. – Cell Physiol.**, v. 276, n. 4, p. C765-C776, 1999.

- FASANO, A. Intestinal zonulin: open sesame! **Gut**, v. 49, n. 2, p. 159-162, 2001.
- FASANO, A. Toxins and the gut: role in human disease. **Gut**, v. 50, Suppl. III, p. iii9-iii14, 2002.
- FASANO, A.; NATARO, J. P. Intestinal epithelial tight junctions as targets for enteric bacteria-derived toxins. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 56, n. 6, p. 795-807, 2004.
- FASANO, A.; NORIEGA, F. R.; MANEVAL JR., D. R.; CHANASONGCRAM, S.; RUSSELL, R.; GUANDALINI, S.; LEVINE, M. M. *Shigella* enterotoxin 1: an enterotoxin of *Shigella flexneri* 2a active in rabbit small intestine in vivo and in vitro. **J. Clin. Invest.**, v. 95, n. 6, p. 2853-2861, 1995.
- FERRAZ, M. M. G. **Estudo da patogenicidade de *Escherichia coli* diarreogênicas isolados de crianças portadoras do HIV**. 2003. 76p. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 2003.
- FERRER, S. R.; STRINA, A.; JESUS, S. R.; RIBEIRO, H. C.; CAIMCROSS, S.; RODRIGUES, L. C.; BARRETO, M. L. A hierarchical model for studying risk factors for childhood diarrhoea: a case-control study in a middle-income country. **Int. J. Epidemiol.**, v. 37, p. 805-815, 2008.
- FIELD, M. Intestinal ion transport and the pathophysiology of diarrhea. **Science Med.**, v. 111, n. 7, p. 931-943, 2003.
- FLORES, J.; DUPONT, H. L.; JIANG, Z. D.; BELKIND-GERSON, J.; MOHAMED, J. A.; CARLIN, L. G.; PADDA, R. S.; PAREDES, M.; MARTINEZ-SANDOVAL, J. F.; VILLA, N. A.; OKHUYSSEN, P. C. Enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-labile toxin seroconversion in US travelers to Mexico. **J. Travel Med.**, v. 15, n. 3, p. 156-161, 2008.
- FONSECA, L. C.; CORRÊA, N. C. R.; GARROTE-FILHO, M. S.; CUNHA, C. C.; PENHA-SILVA, N. Efeito da composição do solvente sobre a estabilidade de proteínas em soluções aquosas. **Quím. Nova**, v. 29, n. 3, p. 543-548, 2006.
- FORDTRAN, J. S. Speculations on the pathogenesis of diarrhea. **Fed. Proc.**, v. 26, n. 5, p. 1405-1414, 1967.
- FOXMAN, B.; RILEY, L. Molecular epidemiology: focus on infection. **Am. J. Epidemiol.**, v. 153, n. 12, p. 1135-1141, 2001.
- FRAGOSO, M.; KUMAR, A.; MURRAY, D. L. Rotavirus in nasopharyngeal secretions of children with upper respiratory tract infections. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 4, n. 1, p. 87-88, 1986.
- FURUSE, M.; FUJITA, K.; HIIRAGI, T.; FUJIMOTO, K.; TSUKITA, S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. **J. Cell Biol.**, v. 141, n. 7, p. 1539-1550, 1998.

FURUSE, M.; HIRASE, T.; ITOH, M.; NAGAFUCHI, A.; YONEMURA, S.; TSUKITA, S.; TSUKITA, S. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. **J. Cell Biol.**, v. 123, n. 6, p. 1777-1788, 1993.

FURUSE, M.; ITOH, M.; HIRASE, T.; NAGAFUCHI, A.; YONEMURA, S.; TSUKITA, S.; TSUKITA, S. Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. **J. Cell Biol.**, v. 127, n. 6, p. 1617-1626, 1994.

FURUSE, M.; SASAKI, H.; TSUKITA, S. Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. **J. Cell Biol.**, v. 147, n. 4, p. 891-903, 1999.

GASCÓN, J.; VARGAS, M.; QUINTÓ, L.; CORACHÁN, M.; JIMENEZ DE ANTA, M. T.; VILA, J. Enteroaggregative *Escherichia coli* strains as a cause of traveler's diarrhea: a case-control study. **J. Infect. Dis.**, v. 177, n. 5, p. 1409-1412, 1998.

GASCÓN, J.; VARGAS, M.; SCHELLEMBERG, D.; URASSA, H.; CASALS, C.; KAHIGWA, E.; APONTE, J. J.; MSHINDA, H.; VILA, J. Diarrhea in children under 5 years of age from Ifakara, Tanzania: a case-control study. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 12, p. 4459-4462, 2000.

GEWIRTZ, A. T.; LIU, Y.; SITARAMAN, S. V.; MADARA, J. L. Intestinal epithelial pathobiology: past, present and future. **Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, v. 16, n. 6, p. 851-867, 2002.

GEWIRTZ, A. T.; NAVAS, T. A.; LYONS, S.; GODOWSKI, P. J.; MADARA, J. L. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. **J. Immunol.**, v. 167, n. 4, p. 1882-1885, 2001.

GEYID, A.; OLSVIK, O.; LJUNGH, A. Virulence properties of *Escherichia coli* isolated from Ethiopian patients with acute or persistent diarrhoea. **Ethiop. Med. J.**, v. 36, n. 2, p. 123-139, 1998.

GHOSH, A. R.; PAUL, M.; PAL, S. C.; SEN, D. Etiological agents of diarrhoea. **Indian J. Public Health.**, v. 34, n. 1, p. 54-61, 1990.

GIOPPO, N. M.; ELIAS JR., W. P.; VIDOTTO, M. C.; LINHARES, R. E.; SARIDAKIS, H. O.; GOMES, T. A.; TRABULSI, L. R.; PELAYO, J. S. Prevalence of HEp-2 cell-adherent *Escherichia coli* and characterization of enteroaggregative *E. coli* and chain-like adherent *E. coli* isolated from children with and without diarrhoea, in Londrina, Brazil. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 190, n. 2, p. 293-298, 2000.

GOMES, T. A.; ABE, C. M.; MARQUES, L. R. Detection of HeLa cell-detaching activity and alpha-hemolysin production in enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from feces of Brazilian children. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 12, p. 3364, 1995.

GOMES, T. A.; BLAKE, P. A.; TRABULSI, L. R. Prevalence of *Escherichia coli* strains with localized, diffuse, and aggregative adherence to HeLa cells in infants with diarrhea and matched controls. **J. Clin. Microbiol.**, v. 27, n. 2, p. 266-269, 1989.

GOMES, T. A.; VIEIRA, M. A.; ABE, C. M.; RODRIGUES, D.; GRIFFIN, P. M.; RAMOS, S. R Adherence patterns and adherence-related DNA sequences in *Escherichia coli* isolates from children with and without diarrhea in São Paulo city, Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, n. 12, p. 3609-3613, 1998.

GONZÁLEZ, R.; DÍAZ, C.; MARIÑO, M.; CLORALT, R.; PEQUENEZE, M.; PÉREZ-SCHAEL, I. Age-specific prevalence of *Escherichia coli* with localized and aggregative adherence in Venezuelan infants with acute diarrhea. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, n. 5, p. 1103-1107, 1997.

GREEN, I.; KIRKPATRICK, C. H.; DALE, D. C. Lactoferrin--specific localization in the nuclei of human polymorphonuclear neutrophilic leukocytes. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 137, n. 4, p. 1311-1317, 1971.

GREENBERG, D. E.; JIANG, Z. D.; STEFFEN, R.; VERENKER, M. P.; DUPONT, H. L. Markers of inflammation in bacterial diarrhea among travelers, with a focus on enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenicity. **J. Infect. Dis.**, v. 185, n. 7, p. 944-949, 2002.

GUERRANT, D. I.; MOORE, S. R.; LIMA, A. A.; PATRICK, P. D.; SCHORLING, J. B.; GUERRANT, R. L. Association of early childhood diarrhea and cryptosporidiosis with impaired physical fitness and cognitive function four-seven years later in a poor urban community in northeast Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 61, n. 5, p. 707-713, 1999.

GUERRANT, R. L.; ARAUJO, V.; SOARES, E.; KOTLOFF, K.; LIMA, A. A. M.; COOPER, W. H.; LEE, A. G. Measurement of fecal lactoferrin as a marker of fecal leukocytes. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, n. 5, p. 1238-1242, 1992a.

GUERRANT, R. L.; GILDER, T. V.; STEINER, T. S.; THIELMAN, N. M.; SLUTSKER, L.; TAUXE, R. V.; HENNESSY, T.; GRIFFIN, P. M.; DUPONT, H.; SACK, R. B.; TARR, P.; NEILL, M.; NACHAMKIN, I.; RELLER, L. B.; OSTERHOLM, M. T.; BENNISH, M. L.; PICKERING, L. K. Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. **Clin. Infect. Dis.**, v. 32, p. 331-350, 2001.

GUERRANT, R. L.; KIRCHHOFF, L. V.; SHIELDS, D. S.; NATIONS, M. K.; LESLIE, J.; DE SOUSA, M. A.; ARAUJO, J. G.; CORREIA, L. L.; SAUER, K. T.; MCCLELLAND, K. E. Prospective study of diarrheal illnesses in northeastern Brazil: patterns of disease, nutritional impact, etiologies, and risk factors. **J. Infect. Dis.**, v. 148, n. 6, p. 986-997, 1983.

GUERRANT, R. L.; KOSEK, M.; LIMA, A. A.; LORNTZ, B.; GUYATT, H. L. Updating the DALYs for diarrhoeal disease. **Trends Parasitol.**, v. 18, n. 5, p. 191-193, 2002a.

GUERRANT, R. L.; KOSEK, M.; MOORE, S.; LORNTZ, B.; BRANTLEY, R.; LIMA, A. A. Magnitude and impact of diarrheal diseases. **Arch. Med. Res.**, v. 33, n. 4, p. 351-355, 2002b.

GUERRANT, R. L.; LIMA, A. A.; BARBOZA, M.; YOUNG, S.; SILVA, T.; BARRETT, L.; BAO, Y.; FOX, J.; MOORE, S. Mechanisms and impact of enteric infections. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 473, p. 103-112, 1999.

GUERRANT, R. L.; ORIÁ, R. B.; MOORE, S. R.; ORIÁ, M. O. B.; LIMA, A. A. M. Malnutrition as an enteric infectious disease with long-term effects on child development. **Nutr. Rev.**, v. 66, n. 9, p. 487-505, 2008.

GUERRANT, R. L.; SCHORLING, J. B.; MCAULIFFE, J. F.; DE SOUZA, M. A. Diarrhea as a cause and effect of malnutrition: diarrhea prevents catch-up growth and malnutrition increases diarrhea frequency and duration. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 47, n. 1, p. 28-35, 1992b.

GUIGNOT, J.; CHAPLAIS, C.; COCONNIER-POLTER, M. H.; SERVIN, A. L. The secreted autotransporter toxin, Sat, functions as a virulence factor in Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* by promoting lesions in tight junction of polarized epithelial cells. **Cell. Microbiol.**, v. 9, n. 1, p. 204-221, 2007.

GUION, C. E.; OCHOA, T. J.; WALKER, C. M.; BARLETTA, F.; CLEARY, T. G. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* by use of melting-curve analysis and real-time multiplex PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, n. 5, p. 1752-1757, 2008.

GUTIÉRREZ-JIMÉNEZ, J.; ARCINIEGA, I.; NAVARRO-GARCÍA, F. The serine protease motif of Pic mediates a dose-dependent mucolytic activity after binding to sugar constituents of the mucin substrate. **Microb. Pathog.**, v. 45, n. 2, p. 115-123, 2008.

GUY, R. A.; XIAO, C.; HORGAN, P. A. Real-time PCR assay for detection and genotype differentiation of *Giardia lamblia* in stool specimens. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 7, p. 3317-3320, 2004.

GUYER, D. M.; HENDERSON, I. R.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Identification of Sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. **Molec. Microbiol.**, v. 38, n. 1, p. 53-6, 2000.

GUYER, D. M.; RADULOVIC, S.; JONES, F. E.; MOBLEY, H. L. T. Sat, the secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*, is a vacuolating cytotoxin for bladder and kidney epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 8, p. 4539-4546, 2002.

HAIDER, K.; FARUQUE, S. M.; ALBERT, M. J.; NAHAR, S.; NEOGI, P. K.; HOSSAIN, A. Comparison of a modified adherence assay with existing assay methods for identification of enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, n. 6, p. 1614-1616, 1992.

HAMAJIMA, N.; KATSUDA, N.; MATSUO, K.; SAITO, T.; HIROSE, K.; INOUE, M.; ZAKI, T. T.; TAJIMA, K.; TOMINAGA, S. High anti-*Helicobacter pylori* antibody seropositivity associated with the combination of IL-8-251TT and IL-10-819TT genotypes. **Helicobacter**, v. 8, n. 2, p. 105-110, 2003.

HAQUE, M. A.; OHKI, K.; KIKUCHI, M.; KOHASHI, O. Contact hemolysin production by strains of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from children with diarrhea. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, n. 4, p. 1109-1111, 1994.

HARRINGTON, S. M.; DUDLEY, E. G.; NATARO, J. P. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 254, n. 1, p. 12-18, 2006.

HARRINGTON, S. M.; STRAUMAN, M. C.; ABE, C. M.; NATARO, J. P. Aggregative adherence fimbriae contribute to the inflammatory response of epithelial cells infected with enteroaggregative *Escherichia coli*. **Cell. Microbiol.**, v. 7, n. 11, p. 1565-1578, 2005.

HARRIS, J. C.; DUPONT, H. L.; HORNICK, R. B. Fecal leukocytes in diarrheal illness. **Ann. Intern. Med.**, v. 76, n. 5, p. 697-703, 1972.

HAWN, T. R.; VERBON, A.; LETTINGA, K. D.; ZHAO, L. P.; LI, S. S.; LAWS, R. J.; SKERRETT, S. J.; BEUTLER, B.; SCHROEDER, L.; NACHMAN, A.; OZINSKY, A.; SMITH, K. D.; ADEREM, A. A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to legionnaires' disease. **J. Exp. Med.**, v. 198, n. 10, p. 1563-1572, 2003.

HAYASHI, F.; SMITH, K. D.; OZINSKY, A.; HAWN, T. R.; YI, E. C.; GOODLETT, D. R.; ENG, J. K.; AKIRA, S.; UNDERHILL, D. M.; ADEREM, A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. **Nature**, v. 410, n. 6832, p. 1099-1103, 2001.

HEIGER, D. N.; COHEN, A. S.; KARGER, B. L. Separation of DNA restriction fragments by high performance capillary electrophoresis with low and zero crosslinked polyacrylamide using continuous and pulsed electric fields. **J. Chromatogr.**, v. 516, n. 1, p. 33-48, 1990.

HEIMER, S. R.; RASKO, D. A.; LOCKATELL, V.; JOHNSON, D. E.; MOBLEY, L. T. Autotransporter genes *pic* and *tsh* are associated with *Escherichia coli* strains that cause acute pyelonephritis and are expressed during urinary tract infection. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 1, p. 593-597, 2004.

HENDERSON, I. R.; CZECZULIN, J.; ESLAVA, C.; NORIEGA, F.; NATARO, J. P. Characterization of *pic*, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 11, p. 5587-5596, 1999a.

HENDERSON, I. R.; HICKS, S.; NAVARRO-GARCIA, F.; ELIAS, W. P.; PHILIPS, A. D.; NATARO, J. P. Involvement of the enteroaggregative *Escherichia coli* plasmid-encoded toxin in causing human intestinal damage. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 10, p. 5338-5344, 1999b.

HENDERSON, I. R.; NATARO, J. P. Virulence functions of autotransporter proteins. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 3, p. 1231-1243, 2001.

HENDERSON, I. R.; NAVARRO-GARCIA, F.; NATARO, J. P. The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. **Trends Microbiol.**, v. 6, n. 9, p. 370-378, 1998.

HENRIKSEN, S. A.; POHLENZ, J. F. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. **Acta Vet. Scand.**, v. 22, n. 3-4, p. 594-596, 1981.

HENRY, F. J.; UDOY, A. S.; WANKE, C. A.; AZIZ, K. M. Epidemiology of persistent diarrhea and etiologic agents in Mirzapur, Bangladesh. **Acta Paediatr. Suppl.**, v. 381, p. 27-31, 1992.

HICKS, S.; CANDY, D. C. A.; PHILLIPS, A. D. Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa in vitro. **Infect. Immun.**, v. 64, n. 11, p. 4751-4760, 1996a.

HICKS, S.; CANDY, D. C. A.; PHILLIPS, A. D. Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to formalin-fixed intestinal and ureteric epithelia from children. **J. Med. Microbiol.**, v. 44, n. 5, p. 362-371, 1996b.

HOBBS, K.; NEGRI, J.; KLINNERT, M.; ROSENWASSER, L. J.; BORISH, L. Interleukin-10 and transforming growth factor- β promoter polymorphisms in allergies and asthma. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 158, n. 6, p. 1958-1962, 1998.

HOLLAND, J. L.; LOUIE, L.; SIMOR, A. E.; LOUIE, M. PCR detection of *Escherichia coli* O157:H7 directly from stools: evaluation of commercial extraction methods for purifying fecal DNA. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 11, p. 4108-4113, 2000.

HOOPER, L. V.; BRY, L.; FALK, P. G.; GORDON, J. I. Host-microbial symbiosis in the mammalian intestine: exploring an internal ecosystem. **Bioessays**, v. 20, n. 4, p. 336-343, 1998.

HUANG, D. B.; NATARO, J. P.; DUPONT, H. L.; KAMAT, P. P.; MHATRE, A. D.; OKHUUSEN, P. C.; CHIANG, T. Enteroaggregative *Escherichia coli* is a cause of acute diarrheal illness: a meta-analysis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 43, p. 556-563, 2006.

HUANG, D. B.; MOHAMED, J. A.; NATARO, J. P.; DUPONT, H. L.; JIANG, Z. D.; OKHUUSEN, P. C. Virulence characteristics and the molecular epidemiology of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from travelers to developing countries. **J. Med. Microbiol.**, v. 56, p. 1386-1392, 2007.

HUANG, D. B.; OKHUYSEN, P. C.; JIANG, Z. D.; DUPONT, H. L. Enteroaggregative *Escherichia coli*: an emerging enteric pathogen. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 99, n. 2, p. 383-389, 2004.

HUBER, J. D.; EGLETON, R. D.; DAVIS, T. P. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. **Trends Neurosci.**, v. 24, n. 12, p. 719-725, 2001.

HUICHO, L.; CAMPOS, M.; RIVERA, J.; GUERRANT, R. L. Fecal screening tests in the approach to acute infectious diarrhea: a scientific overview. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 15, n. 6, p. 486-494, 1996.

HUICHO, L.; GARAYCOCHEA, V.; UCHIMA, N.; ZERPA, R.; GUERRANT, R. L. Fecal lactoferrin, fecal leukocytes and occult blood in the diagnostic approach to childhood invasive diarrhea. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 16, n. 7, p. 644-647, 1997.

HULL, J.; THOMSON, A.; KWIATKOWSKI, D. Association of respiratory syncytial virus bronchiolitis with the interleukin 8 gene region in UK families. **Thorax**, v. 55, n. 12, p. 1023-1027, 2000.

HUMPHREY, J. H. Underweight malnutrition in infants in developing countries: an intractable problem. **Arch. Pediatr. Adolesc. Med.**, v. 162, n. 7, p. 692-694, 2008.

HUNTER, P. R. Drinking water and diarrhoeal disease due to *Escherichia coli*. **J. Water Health**, v. 1, n. 2, p. 65-72, 2003.

HUNTER, P. R.; HUGHES, S.; WOODHOUSE, S.; SVED, Q.; VERLANDER, N. Q.; CHALMERS, R. M.; MORGAN, K.; NICHOLS, G.; BEECHING, N.; OSBORN, K. Sporadic cryptosporidiosis case-control study with genotyping. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 10, n. 7, p. 1241-1249, 2004.

HUPPERTZ, H. I.; RUTKOWSKI, S.; ALEKSIC, S.; KARCH, H. Acute and chronic diarrhoea and abdominal *colic* associated with enteroaggregative *Escherichia coli* in young children living in western Europe. **Lancet**, v. 349, p. 1660-1662, 1997.

INSTITUTE OF MEDICINE. The burden of disease resulting from diarrhea. In: INSTITUTE OF MEDICINE. **New vaccine development: establishing priorities - diseases of importance in developing countries**. Washington D. C.: National Academy Press, 1986. v. 2, p. 159-169.

ITOH, M.; NAGAFUCHI, A.; YONEMURA, S.; KITANI-YASUDA, T.; TSUKITA, S.; TSUKITA, S. The 220-kD protein colocalizing with cadherins in non-epithelial cells is identical to ZO-1, a tight junction-associated protein in epithelial cells: cDNA cloning and immunoelectron microscopy. **J. Cell Biol.**, v. 121, n. 3, p. 491-502, 1993.

ITOH, Y.; NAGANO, I.; KUNISHIMA, M.; EZAKI, T. Laboratory investigation of enteroaggregative *Escherichia coli* O untypeable: H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, n. 10, p. 2546-2550, 1997.

JAIN, S.; CHEN, L.; DECHET, A.; HERTZ, A. T.; BRUS, D. L.; HANLEY, K.; WILSON, B.; FRANK, J.; GREENE, K. D.; PARSONS, M.; BOPP, C. A.; TODD, R.; HOEKSTRA, M.; MINTZ, E. D.; RAM, P. K. An outbreak of enterotoxigenic *Escherichia coli* associated with sushi restaurants in Nevada, 2004. **Clin. Infect. Dis.**, v. 47, n. 1, p. 1-7, 2008.

JALLAT, C.; LIVRELLI, V.; DARFEUILLE-MICHAUD, A.; RICH, C.; JOLY, B. *Escherichia coli* strains involved in diarrhea in France: high prevalence and heterogeneity of diffusely adhering strains. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, n. 8, p. 2031-2037, 1993.

JENKINS, C.; VAN IJPEREN, C.; DUDLEY, E. G.; CHART, H.; WILLSHAW, G. A.; CHEASTY, T.; SMITH, H. R.; NATARO, J. P. Use of microarray to assess the distribution of plasmid and chromosomal virulence genes in strains of enteroaggregative *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 253, p. 119-124, 2005.

JIANG, Z. D.; GREENBERG, D.; NATARO, J. P.; STEFFEN, R.; DUPONT, H. L. Rate of occurrence and pathogenic effect of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in international travelers. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 11, p. 4185-4190, 2002.

JIANG, Z. D.; OKHUYSEN, P. C.; GUO, D. C.; HE, R.; KING, T. M.; DUPONT, H. L.; MILEWICZ, D. M. Genetic susceptibility to enteroaggregative *Escherichia coli* diarrhea: polymorphism in the interleukin-8 promotor region. **J. Infect. Dis.**, v. 188, n. 4, p. 506-511, 2003.

JONES, A. P.; WEBB, L. M.; ANDERSON, A. O.; LEONARD, E. J.; ROT, A. Normal human sweat contains interleukin-8. **J. Leukoc. Biol.**, v. 57, n. 3, p. 434-437, 1995.

KANE, S. V.; SANDBORN, W. J.; RUFO, P. A.; ZHOLUDEV, A.; BOONE, J.; LYERLY, D.; CAMILLERI, M.; HANAUER, S. B. Fecal lactoferrin is a sensitive and specific marker in identifying intestinal inflammation. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 98, n. 6, p. 1309-1314, 2003.

KANG, G.; MATHAN, M. M.; MATHAN, V. I. Evaluation of a simplified HEp-2 cell adherence assay for *Escherichia coli* isolated from south Indian children with acute diarrhea and controls. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 8, p. 2204-2205, 1995.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat. Rev.**, v. 2, n. 2, p. 123-140, 2004.

KATZ, H. B.; DAVIES, C. A.; DOBBING, J. Effects of undernutrition at different ages early in life and later environmental complexity on parameters of the cerebrum and hippocampus in rats. **J. Nutr.**, v. 112, n. 7, p. 1362-1368, 1982.

KEUSCH, G. T. Toxin-associated gastrointestinal disease: a clinical overview. In: SUSSMAN, M. (Ed.) **Molecular medical microbiology**. New York: Academic Press, 2001. p. 1083-1088.

KEUSCH, G. T.; FONTAINE, O.; BHARGAVA, A.; BOSCHI-PINTO, C.; BHUTTA, Z. A.; GOTUZZO, E.; RIVERA, J.; CHOW, J.; SHAHID-SALLES, S. A.; LAXMINARAYAN, R. Diarrheal Diseases. In: JAMISON, D. T.; BREMAN, J. G.; MEASHAM, A. R.; ALLEYNE, G.; CLAESON, M.; EVANS, D. B.; JHA, P.; MILLS, A.; MUSGROV, P. (Ed.) **Disease control priorities in developing countries**. 2 ed. New York: Oxford University Press, 2006. p. 371-387.

KHAN, M. A.; KANG, J.; STEINER, T. S. Enteroaggregative *Escherichia coli* flagellin-induced interleukin-8 secretion requires Toll-like receptor 5-dependent p38 MAP kinase activation. **Immunology**, v. 112, n. 4, p. 651-660, 2004.

KHAN, M. A.; STEINER, T. S. Mechanisms of emerging diarrheagenic *Escherichia coli* infection. **Curr. Infect. Dis. Rep.**, v. 4, n. 2, p. 112-117, 2002.

KOOPMANS, M. P. G.; GOOSEN, E.; SIMONE, M.; LIMA, A. A. M.; MCAULIFFE, I. T.; NATARO, J. P.; BARRETT, L. J.; GLASS, R. I.; GUERRANT, R. L. Association of torovirus with acute and persistent diarrhea in children. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 16, n. 5, p. 504-507, 1997.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR., W. C. *Enterobacteriaceae*. In: KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR., W. C. **Diagnóstico microbiológico – texto e atlas colorido**. 5 ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. p. 177-261.

KOSEK, M.; BERN, C.; GUERRANT, R.L. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. **Bull World Health Organ.**, v. 81, n. 3, p. 197-204, 2003.

KNUTTON, S.; SHAW, R. K.; BHAN, M. K.; SMITH, H. R.; MCCONNELL, M. M.; CHEASTY, T.; WILLIAMS, P. H.; BALDWIN, T. J. Ability of enteroaggregative *Escherichia coli* strains to adhere in vitro to human intestinal mucosa. **Infect. Immun.**, v. 60, n. 5, p. 2083-2091, 1992.

LAW, D.; CHART, H. Enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Appl. Microbiol.**, v. 84, n. 5, p. 685-697, 1998.

LIMA, A. A.; FANG, G.; SCHORLING, J. B.; DE ALBUQUERQUE, L.; MCAULIFFE, J. F.; MOTA, S.; LEITE, R.; GUERRANT, R. L. Persistent diarrhea in northeast Brazil: etiologies and interactions with malnutrition. **Acta Paediatr.**, v. 81, Suppl. 381, p. 39-44, 1992.

LIMA, A. A.; GUERRANT, R. L. Persistent diarrhea in children: epidemiology, risk factors, pathophysiology, nutritional impact, and management. **Epidemiol. Rev.**, v. 14, p. 222-242, 1992.

LIMA, A. A. M.; MOORE, S. R.; BARBOZA JR., M.S.; SOARES, A. M.; SCHLEUPNER, M. A.; NEWMAN, R. D.; SEARS, C. L.; NATARO, J. P.; FEDORKO, D. P.; WUHIB, T.; SCHORLING, J. B.; GUERRANT, R. L. Persistent diarrhea signals a critical period of increased diarrhea burdens and nutritional shortfalls: a prospective cohort study among children in northeastern Brazil. **J. Infect. Dis.**, v. 181, n. 5, p. 1643-1651, 2000.

LIMA, A. A.; SILVA, T. M.; GIFONI, A. M.; BARRRET, L. J.; MCAULIFFE, I. T.; BAO, Y.; FOX, J. W.; FEDORKO, D. P.; GUERRANT, R. L. Mucosal injury and disruption of intestinal barrier function in HIV- infected individuals with and without diarrhea and cryptosporidiosis in northeast Brazil. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 92, n. 10, p. 1861-1866, 1997.

LORNTZ, B.; SOARES, A. M.; MOORE, S. R.; PINKERTON, R.; GANSNEDER, B.; BOVBJERG, V. E.; GUYATT, H.; LIMA, A. M.; GUERRANT, R. L. Early childhood diarrhea predicts impaired school performance. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 25, n. 6, p. 513-520, 2006.

LUCAS, R. L.; LOSTROH, C. P.; DIRUSSO, C. C.; SPECTOR, M. P.; WANNER, B. L.; LEE, C. A. Multiple factors independently regulate hilA and invasion gene expression in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*. **J. Bacteriol.**, v. 182, n. 7, p. 1872-1882, 2000.

LUCKEY, J. A.; DROSSMAN, H.; KOSTICHKA, A. J.; MEAD, D. A.; D'CUNHA, J.; NORRIS, T. B.; SMITH, L. M. High speed DNA sequencing by capillary electrophoresis. **Nucleic Acids Res.**, v. 18, n. 15, p. 4417-4421, 1990.

LUNN, P. G. The impact of infection and nutrition on gut function and growth in childhood. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 59, p. 147-154, 2000.

MA, X.; REICH, R. A.; WRIGHT, J. A.; TOOKER, H. R.; TEETER, L. D.; MUSSER, J. M.; GRAVISS, E. A. Association between interleukin-8 gene alleles and human susceptibility to tuberculosis disease. **J. Infect. Dis.**, v. 188, n. 3, p. 349-355, 2003.

MADARA, J. L. The chameleon within: improving antigen delivery. **Science**, v. 277, n. 5328, p. 910-911, 1997.

MADARA, J. L.; TRIER, J. S. Functional morphology of the mucosa of the small intestine. In: JOHNSON, L. R. (Ed.) **Physiology of the gastrointestinal tract**. 3 ed. New York: Raven, 1994. p. 1577-1622.

MAGALHÃES, M.; AMORIM, R. J.; TAKEDA, Y.; TSUKAMOTO, T.; ANTAS, M. G.; TATENO, S. Localized, diffuse, and aggregative-adhering *Escherichia coli* from infants with acute diarrhea and matched-controls. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 87, n. 1, p. 93-97, 1992.

MANDOMANDO, I. M.; MACETE, E. V.; RUIZ, J.; SANZ, S.; ABACASSAMO, F.; VALLÈS, X.; SACARLAL, J.; NAVIA, M. M.; VILA, J.; ALONSO, P. L.; GASCON, J. Etiology of diarrhea in children younger than 5 years of age admitted in a rural hospital of southern Mozambique. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 76, n. 3, p. 522-527, 2007.

MANRIQUE-ABRIL, F. G.; TIGNE, D. B. Y.; BELLO, S. E.; OSPINA, J. M. Agentes causantes de diarrea en niños menores de 5 años en Tunja, Colombia. *Rev. Salud Pública*, v. 8, n. 1, p. 88-97, 2006.

MARANHÃO, H. S.; MEDEIROS, M. C. C.; SCALETSKY, I. C. A.; FAGUNDES-NETO, U.; MORAIS, M. B. The epidemiological and clinical characteristics and nutritional development of infants with acute diarrhoea, in north-eastern Brazil. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 102, n. 4, p. 357-365, 2008.

MARONCLE, N. M.; SIVICK, K. E.; BRADY, R.; STOKES, F. E.; MOBLEY, H. L. T. Protease activity, secretion, cell entry, cytotoxicity, and cellular targets of secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 11, p. 6124-6134, 2006.

MARQUES, L. R.; ABE, C. M.; GRIFFIN, P. M.; GOMES, T. A. Association between alpha-hemolysin production and HeLa cell-detaching activity in fecal isolates of *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 10, p. 2707-2709, 1995.

MARTÍN-PADURA, I.; LOSTAGLIO, S.; SCHNEEMANN, M.; WILLIAMS, L.; ROMANO, M.; FRUSCELLA, P.; PANZERI, C.; STOPPACCIARO, A.; RUCO, L.; VILLA, A.; SIMMONS, D.; DEJANA, E. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. **J. Cell Biol.**, v. 142, n. 1, p. 117-127, 1998.

MARTINES, J.; PHILLIPS, M. Diarrheal diseases. In: JAMISON, D. T.; MOSLEY, W. H.; MEASHAM, A. R.; BOBADILLA, J. L. (Ed.). **Disease control priorities in developing countries**. New York: Oxford University Press, 1993. p. 91-116.

MASSON, P. L.; HEREMANS, J. F.; SCHONNE, E. Lactoferrin, an iron-binding protein in neutrophilic leukocytes. **J. Exp. Med.**, v. 130, n. 3, p. 643-658, 1969.

MATHEWSON, J. J.; JOHNSON, P. C.; DUPONT, H. L.; MORGAN, D. R.; THORNTON, S. A.; WOOD, L. V.; ERICSSON, C. D. A newly recognized cause of traveler's diarrhea: enteroadherent *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.**, v. 151, n. 3, p. 471-475, 1985.

MATHEWSON, J. J.; JOHNSON, P. C.; DUPONT, H. L.; SATTERWHITE, T. K.; WINSOR, D. K. Pathogenicity of enteroadherent *Escherichia coli* in adult volunteers. **J. Infect. Dis.**, v. 154, n. 3, p. 524-527, 1986.

MATHEWSON, J. J.; OBERHELMAN, R. A.; DUPONT, H. L.; DE LA CABADA, F. J.; GARIBAY, E. V. Enteroadherent *Escherichia coli* as a cause of diarrhea among children in Mexico. **J. Clin. Microbiol.**, v. 25, n. 10, p. 1917-1919, 1987.

MAYER, H. B.; WANKE, C. A. Enteroaggregative *Escherichia coli* as a possible cause of diarrhea in an HIV-infected patient. **N. Engl. J. Med.**, v. 332, n. 4, p. 273-274, 1995.

MCAULIFFE, J. F.; SHIELDS, D. S.; AUXILIADORA DE SOUSA, M.; SAKELL, J.; SCHORLING, J.; GUERRANT, R. L. Prolonged and recurring diarrhea in the northeast of Brazil: examination of cases from a community-based study. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 5, n. 6, p. 902-906, 1986.

MELO, M. C. N.; TADDEI, J. A. A. C.; DINIZ-SANTOS, D. R.; MAY, D. S.; CARNEIRO, N. B.; SILVA, L. R. Incidence of diarrhea: poor parental recall ability. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 11, n. 6, p. 571-579, 2007.

MELO, M. C. N.; TADDEI, J. A. A. C.; DINIZ-SANTOS, D. R.; VIEIRA, C.; CARNEIRO, N. B.; MELO, R. F.; SILVA, L. R. Incidence of diarrhea in children living in urban slums in Salvador, Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 12, n. 1, p. 89-93, 2008.

MÉNARD, L. P.; DUBREUIL, J. D. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1): a new toxin with an old twist. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 28, n. 1, p. 43-60, 2002.

MENDEZ-ARANCIBIA, E.; VARGAS, M.; SOTO, S.; RUIZ, J.; KAHIGWA, E.; SCHELLENBERG, D.; URASSA, H.; GASCÓN, J.; VILA, J. Prevalence of different virulence factors and biofilm production in enteroaggregative *Escherichia coli* isolates causing diarrhea in children in Ifakara (Tanzania). **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 78, n. 6, p. 985-989, 2008.

MICOTS, I.; AUGERON, C.; LABOISSE, C. L.; MUZEAU, F.; MÉGRAUD, F. Mucin exocytosis: a major target for *Helicobacter pylori*. **J. Clin. Pathol.**, v. 46, n. 3, p. 241-245, 1993.

MIQDADY, M. S.; JIANG, Z. D.; NATARO, J. P.; DUPONT, H. L. Detection of enteroaggregative *Escherichia coli* with formalin-preserved HEp-2 cells. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 8, p. 3066-3067, 2002.

MÖNKEMÜLLER, K. E.; WILCOX, C. M. Gastrointestinal infections in children. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 17, n. 1, p. 35-39, 2001.

MONTEIRO, R. A.; SCHMITZ, B. A. S. Principais causas básicas de mortalidade infantil no Distrito Federal, Brasil: 1990 a 2000. **Rev. Bras. Saúde Matern. Infant.**, v. 4, n. 4, p. 413-421, 2004.

MONTEIRO-NETO, V.; BANDO, S. Y.; MOREIRA-FILHO, C. A.; GIRÓN, J. A. Characterization of an outer membrane protein associated with haemagglutination and adhesive properties of enteroaggregative *Escherichia coli* O111:H12. **Cell Microbiol.**, v. 5, n. 8, p. 533-547, 2003.

MOORE, S. R.; LIMA, A. A.; CONAWAY, M. R.; SCHORLING, J. B.; SOARES, A. M.; GUERRANT, R. L. Early childhood diarrhoea and helminthiasis associate with long-term linear growth faltering. **Int. J. Epidemiol.**, v. 30, n. 6, p. 1457-1464, 2001.

MOORE, S. R.; LIMA, A. A.; SCHORLING, J. B.; BARBOZA JR., M. S.; SOARES, A. M.; GUERRANT, R. L. Changes over time in the epidemiology of diarrhea and malnutrition among children in an urban Brazilian shantytown, 1989 to 1996. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 4, n. 4, p. 179-186, 2000.

MOORE, S. R.; LORNTZ, B.; LIMA, A. A. M.; GUERRANT, R. L. Risk factors for adverse outcomes in developing countries. **Lancet**, v. 369, n. 9564, p. 824-825, 2007.

MORELLI, R.; BALDASSARRI, L.; FALBO, V.; DONELLI, G.; CAPRIOLI, A. Detection of enteroadherent *Escherichia coli* associated with diarrhoea in Italy. **J. Med. Microbiol.**, v. 41, n. 6, p. 399-404, 1994.

MORENO, A. C. R.; FERNANDES FILHO, A.; GOMES, T. A. T.; RAMOS, S. T. S.; MONTEMOR, L. P. G.; TAVARES, V. C.; SANTOS FILHO, L.; IRINO, K.; MARTINEZ, M. B. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, 2008. *In Press*.

MOSSORO, C.; GLAZIOU, P.; YASSIBANDA, S.; LAN, N. T. P.; BEKONDI, C.; MINSSART, P.; BERNIER, C.; LE BOUGUE'NEC, C.; GERMANI, Y. Chronic diarrhea, hemorrhagic colitis, and hemolytic-uremic syndrome associated with HEp-2 adherent *Escherichia coli* in adults infected with human immunodeficiency virus in Bangui, Central African Republic. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 8, p. 3086-3088, 2002.

MURRAY, C. J. L.; LOPEZ, A. D. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: global burden of disease study. **Lancet**, v. 349, n. 9063, p. 1436-1442, 1997.

MURRAY, C. J. L.; LOPEZ, A. D.; MATHERS, C. D.; STEIN, C. **The global burden of disease 2000 project: aims, methods and data sources**. Geneva, WHO, 2001. 57p.

NATARO, J. P. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 21, n. 1, p. 4-8, 2005.

NATARO, J. P.; DENG, Y.; COOKSON, S.; CRAVIOTO, A.; SAVARINO, S. J.; GUERS, L. D.; LEVINE, M. M.; TACKET, C. O. Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated in volunteers. **J. Infect. Dis.**, v. 171, n. 2, p. 465-468, 1995.

NATARO, J. P.; DENG, Y.; MANEVAL, D. R.; GERMAN, A. L.; MARTIN, W. C.; LEVINE, M. M. Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. **Infect. Immun.**, v. 60, n. 6, p. 2297-2304, 1992.

NATARO, J. P.; HICKS, S.; PHILLIPS, A. D.; VIAL, P. A.; SEARS, C. L. T84 cells in culture as a model for enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. **Infect. Immun.**, v. 64, n. 11, p. 4761-4768, 1996.

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

NATARO, J. P.; KAPER, J. B.; ROBINS-BROWNE, R.; PRADO, V.; VIAL, P.; LEVINE, M. M. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 6, n. 9, p. 829-831, 1987.

NATARO, J. P.; MAI, V.; JOHNSON, J.; BLACKWELDER, W. C.; HEIMER, R.; TIRRELL, S.; EDBERG, S. C.; BRADEN, C. R.; GLENN MORRIS JR., J.; HIRSHON, J. M. Diarrheagenic *Escherichia coli* infection in Baltimore, Maryland, and New Haven, Connecticut. **Clin. Infect. Dis.**, v. 43, n. 4, p. 402-407, 2006.

NATARO, J. P.; SCALETSKY, I. C. A.; KAPER, J. B.; LEVINE, M. M.; TRABULSI, L. R. Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 48, n. 2, p. 378-383, 1985.

NATARO, J. P.; YIKANG, D.; GIRON, J. A.; SAVARINO, S. J.; KOTHARY, M. H.; HALL, R. Aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli* requires two unlinked plasmid regions. **Infect. Immun.**, v. 61, n. 3, p. 1126-1131, 1993.

NATARO, J. P.; YIKANG, D.; YINGKANG, D.; WALKER, K. *AggR*, a transcriptional activator of aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 176, n. 15, p. 4691-4699, 1994.

NAVARRO-GARCÍA, F.; CANIZALEZ-ROMAN, A.; BURLINGAME, K. E.; TETER, K.; VIDAL, J. E. Pet, a non-AB toxin, is transported and translocated into epithelial cells by a retrograde trafficking pathway. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 5, p. 2101-2109, 2007a.

NAVARRO-GARCÍA, F.; CANIZALEZ-ROMAN, A.; VIDAL, J. E.; SALAZAR, M. I. Intoxication of epithelial cells by plasmid-encoded toxin requires clathrin-mediated endocytosis. **Microbiology**, v. 153, p. 2828-2838, 2007b.

NAVARRO-GARCÍA, F.; CANIZALEZ-ROMAN, A.; LUNA, J.; SEARS, C.; NATARO, J. P. Plasmid-encoded toxin of enteroaggregative *Escherichia coli* is internalized by epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 2, p. 1053-1060, 2001.

NAVARRO-GARCÍA, F.; ESLAVA, C.; VILLASECA, J. M.; LÓPEZ-REVILLA, R.; CZECZULIN, J. R.; SRINIVAS, S.; NATARO, J. P.; CRAVIOTO, A. In vitro effects of a high-molecular-weight heat-labile enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 7, p. 3149-3154, 1998.

NAVARRO-GARCIA, F.; VILLASECA, J. M.; ESLAVA, C.; LÓPEZ-REVILLA, R.; CRAVIOTO, A. Toxicogenic activity in Ussing chambers of a heat-labile protein secreted by enteroaggregative *Escherichia coli*. In: **Abstracts of the 95th General Meeting of the American Society for Microbiology**, 1995. Washington D. C.: American Society for Microbiology, Abstr. B-105, p. 23, 1995.

NAVARRO-GARCÍA, F.; SEARS, C.; ESLAVA, C.; CRAVIOTO, A.; NATARO, J. P. Cytoskeletal effects induced by pet, the serine protease enterotoxin of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 5, p. 2184-2192, 1999.

NEWMAN, R. D.; MOORE, S. R.; LIMA, A. A.; NATARO, J. P.; GUERRANT, R. L.; SEARS, C. L. A longitudinal study of *Giardia lamblia* infection in north-east Brazilian children. **Trop. Med. Int. Health**, v. 6, n. 8, p. 624-634, 2001.

NEWMAN, R. D.; SEARS, C. L.; MOORE, S. R.; NATARO, J. P.; WUHIB, T.; AGNEW, D. A.; GUERRANT, R. L.; LIMA, A. A. M. Longitudinal study of *Cryptosporidium* infection in children in northeastern Brazil. **J. Infect. Dis.**, v. 180, n. 1, p. 167-175, 1999.

NEWMAN, R. D.; ZU, S. X.; WUHIB, T.; LIMA, A. A. M.; GUERRANT, R. L.; SEARS, C. L. Household epidemiology of *Cryptosporidium parvum* infection in an urban community in northeast Brazil. **Ann. Inter. Med.**, v. 120, n. 6, p. 500-505, 1994.

NGUYEN, T. V.; LE VAN, P.; LE HUY, C.; GIA, K. N.; WEINTRAUB, A. Detection and characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* from young children in Hanoi, Vietnam. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n. 2, p. 755–760, 2005.

NIANGUÉ-BEUGRÉ, N. N.; COUITCHÉRE, L.; OULAI, S. M.; CISSÉ, L.; ENOH, J. Aspects épidémiologiques, cliniques et étiologiques des diarrhées aiguës dès enfants âgés de 1 mois à 5 ans reçus dans le service de pédiatrie du CHU de Treichville. **Arch. Pédiatr.**, v. 13, n. 4, p. 395–396, 2006.

NIEHAUS, M. D.; MOORE, S. R.; PATRICK, P. D.; DERR, L. L.; LORNTZ, B.; LIMA, A. A.; GUERRANT, R. L. Early childhood diarrhea is associated with diminished cognitive function 4 to 7 years later in children in a northeast Brazilian shantytown. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 66, n. 5, p. 590-593, 2002.

NISHI, J.; SHEIKH, J.; MIZUGUCHI, K.; LUISI, B.; BURLAND, V.; BOUTIN, A.; ROSE, D. J.; BLATTNER, F. R.; NATARO, J. P. The export of coat protein from enteroaggregative *Escherichia coli* by a specific ATP-binding cassette transporter system. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 46, p. 45680-45689, 2003.

OKEKE, I. N.; LAMIKANRA, A.; CZEGZULIN, J.; DUBOVSKY, F.; KAPER, J. B.; NATARO, J. P. Heterogeneous virulence of enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from children in Southwest Nigeria. **J. Infect. Dis.**, v. 181, p. 252–260, 2000a.

OKEKE, I. N.; LAMIKANRA, A.; STEINRÜCK, H.; KAPER, J. B. Characterization of *Escherichia coli* strains from cases of childhood diarrhea in Provincial Southwestern Nigeria. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 1, p. 7-12, 2000b.

OKEKE, I. N.; NATARO, J. P. Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Lancet Infect. Dis.**, v. 1, p. 304–313, 2001.

PANDEY, S. Water pollution and health. **Kathmandu Univ. Med. J. (KUMJ)**, v. 4, n. 1, p. 128-134, 2006.

- PARASHAR, U. D.; BRESEE, J. S.; GENTSCH, J. R.; GLASS, R. I. Rotavirus. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 4, n. 4, p. 561-570, 1998.
- PARASHAR, U. D.; HUMMELMAN, E. G.; BRESEE, J. S.; MILLER, M. A.; GLASS, R. I. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 9, n. 5, p. 565-572, 2003.
- PARHAM; N. J.; SRINIVASAN, U.; DESVAUX, M.; FOXMAN, B.; MARRS, C. F.; HENDERSON, I. R. PicU, a second serine protease autotransporter of uropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 230, p. 73-83, 2004.
- PARKS, C. G.; MOE, C. L.; RHODES, D.; LIMA, A.; BARRETT, L.; TSENG, F.; BARIC, R.; TALAL, A.; GUERRANT, R. Genomic diversity of "Norwalk like viruses" (NLVs): pediatric infections in a Brazilian shantytown. **J. Med. Virol.**, v. 58, n. 4, p. 426-434, 1999.
- PATRICK, P. D.; ORIA, R. B.; MADHAVAN, V.; PINKERTON, R. C.; LORNTZ, B.; LIMA, A. A.; GUERRANT, R. L. Limitation in verbal fluency following heavy burdens of early childhood diarrhea in Brazilian shantytown children. **Child. Neuropsychol.**, v. 11, n. 3, p. 233-244, 2005.
- PAUL, M.; TSUKAMOTO, T.; GHOSH, A. R.; BHATTACHARYA, S. K.; MANNA, B.; CHAKRABARTI, S.; NAIR, G. B.; SACK, D. A.; SEN, D.; TAKEDA, Y. The significance of enteroaggregative *Escherichia coli* in the etiology of hospitalized diarrhoea in Calcutta, India and the demonstration of a new honey-combed pattern of aggregative adherence. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 117, n. 3, p. 319-325, 1994.
- PEREIRA, A. C. M.; BRITTO-FILHO, J. D.; CARVALHO, J. J.; DE LUNA, M. G.; ROSA, A. C. P. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) strains enter and survive within cultured intestinal epithelial cells. **Microb. Pathog.**, 2008. *In Press*.
- PEREIRA, A. L.; FERRAZ, L. R.; SILVA, R. S.; GIUGLIANO, L. G. Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence markers: positive association with distinct clinical characteristics and segregation into 3 enteropathogenic *E. coli* serogroups. **J. Infect. Dis.**, v. 195, n. 3, p. 366-374, 2007.
- PETRI JR., W. A.; MILLER, M.; BINDER, H. J.; LEVINE, M. M.; DILLINGHAM, R.; GUERRANT, R. L. Enteric infectious, diarrhea, and their impact on function and development. **J. Clin. Invest.**, v. 118, n. 4, p. 1277-1290, 2008.
- PIVA, I. C.; PEREIRA, A. L.; FERRAZ, L. R.; SILVA, R. S. N.; VIEIRA, A. C.; BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; BLANCO, J.; GIUGLIANO, L. G. Virulence markers of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from children and adults with diarrhea in Brasilia, Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 5, p. 1827-1832, 2003.
- PODEWILS, L. J.; MINTZ, E. D.; NATARO, J. P.; PARASHAR, U. D. Acute, infectious diarrhea among children in developing countries. **Semin. Pediatr. Infect. Dis.**, v. 15, n. 3, p. 155-168, 2004.

POLOTSKY, Y.; NATARO, J. P.; KOTLER, D.; BARRETT, T. J.; ORENSTEIN, J. M. HEp-2 cell adherence patterns, serotyping, and DNA analysis of *Escherichia coli* isolates from eight patients with AIDS and chronic diarrhea. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, n. 8, p. 1952-1958, 1997.

PONTUAL, J. P. S.; FALBO, A. R.; GOUVEIA, J. S. Estudo etiológico da diarréia em crianças hospitalizadas no Instituto Materno Infantil Prof. Fernando Figueira, IMIP, em Recife, Pernambuco. **Rev. Bras. Saúde Matern. Infant.**, v. 6, Supl. 1, p. S11-S17, 2006.

PRESTERL, E.; ZWICK, R. H.; REICHMANN, S.; AICHELBERG, A.; WINKLER, S.; KREMSNER, P. G.; GRANINGER, W. Frequency and virulence properties of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Gabon. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 69, n. 4, p. 406-410, 2003.

PRÜSS-ÜSTÜN, A.; BONJOUR, S.; CORVALÁN, C. The impact of the environment on health by country: a meta-synthesis. **Environ. Health.**, v. 7, n. 7, 2008. *In Press*.

PUKATZKI, S.; MA, A. T.; STURTEVANT, D.; KRASTINS, B.; SARRACINO, D.; NELSON, W. C.; HEIDELBERG, J. F.; MEKALANOS, J. J. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the Dictyostelium host model system. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 103, n. 5, p. 1528-1533, 2006.

RAHNER, C.; MITIC, L. L.; ANDERSON, J. M. Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. **Gastroenterology**, v. 120, n. 2, p. 411-422, 2001.

RAQIB, R.; LINDBERG, A. A.; BJÖRK, L.; BARDHAN, P. K.; WRETLIND, B.; ANDERSSON, U.; ANDERSSON, J. Down-regulation of gamma interferon, tumor necrosis factor type I, interleukin 1 (IL-1) type I, IL-3, IL-4, and transforming growth factor b type I receptors at the local site during the acute phase of *Shigella* infection. **Infect. Immun.**, v. 63, n. 8, p. 3079-3087, 1995a.

RAQIB, R.; LINDBERG, A. A.; WRETLIND, B.; BARDHAN, P. K.; ANDERSSON, U.; ANDERSSON, J. Persistence of local cytokine production in shigellosis in acute and convalescent stages. **Infect. Immun.**, v. 63, n. 1, p. 289-296, 1995b.

RATCHTRACHENCHAI, O. A.; SUBPASU, S.; HAYASHI, H.; BA-THEIN, W. Prevalence of childhood diarrhoea-associated *Escherichia coli* in Thailand. **J. Med. Microbiol.**, v. 53, p. 237-243, 2004.

REMICK, D. G. Cytokines and cytokine receptors: principles of action. In: KRONFOL, Z. (Ed.) **Cytokines and mental health**. Boston: Kluwer Academic, 2003. p. 1-14.

REYES-LAMOTHE, R.; WANG, X.; SHERRATT, D. *Escherichia coli* and its chromosome. **Trends Microbiol.**, v. 16, n. 5, p. 238-245, 2008.
ROCKY MOUNTAIN LABORATORIES. ***Escherichia coli* – biodefense: image library**. Bethesda: National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institute of Health, 2008. Disponível em:
<http://www3.niaid.nih.gov/topics/BiodefenseRelated/Biodefense/PublicMedia/image_library.htm>. Acesso em 24 de julho de 2008.

RICH, C.; FAVRE-BONTE, S.; SAPENA, F.; JOLY, B.; FORESTIER, C.
Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 173, n. 1, p. 55-61, 1999.

ROHDE, J. E. Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing world. XV. Acute diarrhea. **Rev. Infect. Dis.**, v. 6, n. 6, p. 850-854, 1984.

ROSENWASSER, R. J. Promoter polymorphism in the candidate genes, IL-4, IL-9, TGF- β 1, for atopy and asthma. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 118, n. 2-4, p. 268-270, 1999.

RUIZ-PELÁEZ, J. G.; MATTAR, S. Accuracy of fecal lactoferrin and other stool tests for diagnosis of invasive diarrhea at a Colombian pediatric hospital. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 18, n. 4, p. 342-346, 1999.

RWEGO, I. B.; GILLESPIE, T. R.; ISABIRYE-BASUTA, G.; GOLDBERG, T. L. High rates of *Escherichia coli* transmission between livestock and humans in rural Uganda. **J. Clin. Microbiol.**, 2008. *In Press*.

SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, n. 4732, p. 1350-1354, 1985.

SAITOU, M.; ANDO-AKATSUKA, Y.; ITOH, M.; FURUSE, M.; INAZAWA, J.; FUJIMOTO, K.; TSUKITA, S. Mammalian occludin in epithelial cells: its expression and subcellular distribution. **Eur. J. Cell Biol.**, v. 73, n. 3, p. 222-231, 1997.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. The basic polymerase chain reaction. In: SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning – a laboratory manual**. 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. v. 3, p. 8.19-8.24.

SAMIE, A.; BESSONG, P. O.; OBI, C. L.; SEVILLEJA, J. E.; STROUP, S.; HOUP, E.; GUERRANT, R. L. *Cryptosporidium* species: preliminary descriptions of the prevalence and genotype distribution among school children and hospital patients in the Venda region, Limpopo Province, South Africa. **Exp. Parasitol.**, v. 114, n. 4, p. 314-322, 2006a.

SAMIE, A.; OBI, C. L.; BARRETT, L. J.; POWELL, S. M.; GUERRANT, R. L. Prevalence of *Campylobacter* species, *Helicobacter pylori* and *Arcobacter* species in stool samples from the Venda region, Limpopo, South Africa: studies using molecular diagnostic methods. **J. Infect.**, v. 54, n. 6, p. 558-566, 2007a.

SAMIE, A.; OBI, C. L.; BESSONG, P. O.; HOUP, E.; STROUP, S.; NJAYOU, M.; SABETA, C.; MDULUZA, T.; GUERRANT, R. L. *Entamoeba histolytica*: genetic diversity of African strains based on the polymorphism of the serine-rich protein gene. **Exp. Parasitol.**, v. 118, n. 3, p. 354-361, 2008.

SAMIE, A.; OBI, L. C.; BESSONG, P. O.; STROUP, S.; HOUP, E.; GUERRANT, R. L. Prevalence and species distribution of *E. histolytica* and *E. dispar* in the Venda region, Limpopo, South Africa. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 75, n. 3, p. 565-571, 2006b.

SAMIE, A.; OBI, C. L.; DILLINGHAM, R.; PINKERTON, R. C.; GUERRANT, R. L. Enteroaggregative *Escherichia coli* in Venda, South Africa: distribution of virulence-related genes by multiplex polymerase chain reaction in stool samples of human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative individuals and primary school children. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 77, n. 1, p. 142-150, 2007b.

SANGER, F. Determination of nucleotide sequences in DNA. **Science**, v. 214, p. 1205-1210, 1981.

SANTOS, D. N.; ASSIS, A. M. O.; BASTOS, A. C.; SANTOS, L. M.; SANTOS, C. A. S. T.; STRINA, A.; PRADO, M. S.; ALMEIDA-FILHO, N. M.; RODRIGUES, L. C.; BARRETO, M. L. Determinants of cognitive function in childhood: A cohort study in a middle income context. **BMC Public Health**, v. 8, p. 202-216, 2008.

SARANTUYA, J.; NISHI, J.; WAKIMOTO, N.; ERDENE, S.; NATARO, J. P.; SHEIKH, J.; IWASHITA, M.; MANAGO, K.; TOKUDA, K.; YOSHINAGA, M.; MIYATA, K.; KAWANO, Y. Typical enteroaggregative *Escherichia coli* is the most prevalent pathotype among *E. coli* strains causing diarrhea in Mongolian children. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 1, p. 133-139, 2004.

SAVARINO, S. J.; FASANO, A.; ROBERTSON, D. C.; LEVINE, M. M. Enteroaggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an in vitro rabbit intestinal model. **J. Clin. Invest.**, v. 87, n. 4, p. 1450-1455, 1991.

SAVARINO, S. J.; FASANO, A.; WATSON, J.; MARTIN, B. M.; LEVINE, M. M.; GUANDALINI, S.; GUERRY, P. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, n. 7, p. 3093-3097, 1993.

SAVARINO, S. J.; FOX, P.; DENG, Y.; NATARO, J. P. Identification and characterization of a gene cluster mediating enteroaggregative *Escherichia coli* aggregative adherence fimbria I biogenesis. **J. Bacteriol.**, v. 176, n. 16, p. 4949-4957, 1994.

SAVARINO, S. J.; MCVEIGH, A.; WATSON, J.; CRAVIOTO, A.; MOLINA, J.; ECHEVERRIA, P.; BHAN, M. K.; LEVINE, M. M.; FASANO, A. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *E. coli*. **J. Infect. Dis.**, v. 173, n. 4, p. 1019-1022, 1996.

SAXENA, S.; MITTON, S. G.; POLLOK, R. Chronic diarrhoea in a teenager. **BMJ**, 2008. *In Press*.

SCALETSKY, I. C.; FABBRICOTTI, S. H.; SILVA, S. O.; MORAIS, M. B.; FAGUNDES-NETO, U. HEp-2-adherent *Escherichia coli* strains associated with acute infantile diarrhea, São Paulo, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, n. 8, p. 855-858, 2002.

SCALETSKY, I. C. A.; SILVA, M. L. M.; TRABULSI, L. R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infect. Immun.**, v. 45, n. 2, p. 534-536, 1984.

SCAVIA, G.; STAFFOLANI, M.; FISICHELLA, S.; STRIANO, G.; COLLETTA, S.; FERRI, G.; ESCHER, M.; MINELLI, F.; CAPRIOLI, A. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with a foodborne outbreak of gastroenteritis. **J. Med. Microbiol.**, v. 57, p. 1141-1146, 2008.

SCHMIDT, H.; KNOP, C.; FRANKE, S.; ALEKSIC, S.; HEESEMANN, J.; KARCH, H. Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 3, p. 701-705, 1995.

SCHORLING, J. B.; GUERRANT, R. L. Diarrhoea and catch-up growth. **Lancet**, v. 335, n. 8689, p. 599-600, 1990.

SCHORLING, J. B.; MCAULIFFE, J. F.; DE SOUZA, M. A.; GUERRANT, R. L. Malnutrition is associated with increased diarrhoea incidence and duration among children in an urban Brazilian slum. **Int. J. Epidemiol.**, v. 19, n. 3, p. 728-735, 1990a.

SCHORLING, J. B.; WANKE, C. A.; SCHORLING, S. K.; MCAULIFFE, J. F.; DE SOUZA, M. A.; GUERRANT, R. L. A prospective study of persistent diarrhea among children in an urban Brazilian slum. Patterns of occurrence and etiologic agents. **Am. J. Epidemiol.**, v. 132, n. 1, p. 144-156, 1990b.

SCHUBERT, S.; CUENCA, S.; FISCHER, D.; HEESEMANN, J. High-pathogenicity island of *Yersinia pestis* in *Enterobacteriaceae* isolated from blood cultures and urine samples: prevalence and functional expression. **J. Infect. Dis.**, v. 182, n. 4, p. 1268-1271, 2000.

SCHUBERT, S.; RAKIN, A.; KARCH, H.; CARNIEL, E.; HEESEMANN, J. Prevalence of the "high-pathogenicity island" of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 2, p. 480-485, 1998.

SCHULTSZ, C.; VAN DEN ENDE, J.; COBELENS, F.; VERVOORT, T.; VAN GOMPEL, A.; WETSTEYN, J. C. F. M.; DANKERT, J. Diarrheagenic *Escherichia coli* and acute and persistent diarrhea in returned travelers. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 10, p. 3550-3554, 2000.

SHARFF, A.; FANUTTI, C.; SHI, J.; CALLADINE, C.; LUISI, B. The role of the *TolC* family in protein transport and multidrug efflux. From stereochemical certainty to mechanistic hypothesis. **Eur. J. Biochem.**, v. 268, n. 19, p. 5011-5026, 2001.

SHEIKH, J.; CZECZULIN, J. R.; HARRINGTON, S.; HICKS, S.; HENDERSON, I. R.; LE BOUGUÉNEC, C.; GOUNON, P.; PHILLIPS, A.; NATARO, J. P. A novel dispersin protein in enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Clin. Invest.**, v. 110, n. 9, p. 1329-1337, 2002.

SHERMAN, P. M.; TARR, P. I. Confirmation of an old adage: you find what you seek. **J. Pediatr.**, v. 146, n. 1, p. 11-13, 2005.

SHULMAN, S. T.; FRIEDMANN, H. C.; SIMS, R. H. Theodor Escherich: the first pediatric infectious diseases physician? **Clin. Infect. Dis.**, v. 45, p. 1025-1029, 2007.

SMITH, H. R.; SCOTLAND, S. M.; WILLSHAW, G. A.; ROWE, B.; CRAVIOTO, A.; ESLAVA, C. Isolates of *Escherichia coli* O44:H18 of diverse origin are enteroaggregative. **J. Infect. Dis.**, v. 170, n. 6, p. 1610-1613, 1994.

SNYDER, J. D.; MERSON, M. H. The magnitude of the global problem of acute diarrhoeal disease: a review of active surveillance data. **Bull World Health Organ.**, v. 60, n. 4, 605-613, 1982.

SODEINDE, O.; ADEYEMO, A. A.; GBADEGESIN, R. A.; ADEMOWO, O. G. Persistent diarrhoea in Nigerian children aged less than five years: a hospital-based study. **J. Diarrhoeal Dis. Res.**, v. 15, n. 3, p. 155-160, 1997.

SOUZA, E. C.; MARTINEZ, M. B.; TADDEI, C. R.; MUKAI, L.; GILIO, A. E.; RACZ, M. L.; SILVA, L.; EJZENBERG, B.; OKAY, Y. Perfil etiológico das diarreias agudas de crianças atendidas em São Paulo. **J. Pediatr. (Rio J.)**, v. 78, n. 1, p. 31-38, 2002.

SPANO, L. C.; SADOVSKY, A. D.; SEGUI, P. N.; SAICK, K. W.; KITAGAWA, S. M. S.; PEREIRA, F. E. L.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I. C. A. Age-specific prevalence of diffusely adherent *Escherichia coli* in Brazilian children with acute diarrhoea. **J. Med. Microbiol.**, v. 57, p. 359-363, 2008.

SPENCER, J.; CHART, H.; SMITH, H. R.; ROWE, B. Improved detection of enteroaggregative *Escherichia coli* using formalin-fixed HEp-2 cells. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 25, n. 5, p. 325-326, 1997.

SPENCER, J.; SMITH, H. R.; CHART, H. Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from outbreaks of diarrhoeal disease in England. **Epidemiol. Infect.**, v. 123, p. 413-421, 1999.

SRINIVASA RAO, P. S.; LIM, T. M.; LEUNG, K. Functional genomics approach to the identification of virulence genes involved in *Edwardsiella tarda* pathogenesis. **Infect. Immun.**, v. 71, n. 3, p. 1343-1351, 2003.

SRINIVASA RAO, P. S.; YAMADA, Y.; TAN, Y. P.; LEUNG, K. Y. Use of proteomics to identify novel virulence determinants that are required for *Edwardsiella tarda* pathogenesis. **Mol. Microbiol.**, v. 53, n. 2, p. 573-586, 2004.

- STEINER, T. S.; LIMA, A. A. M.; NATARO, J. P.; GUERRANT, R. L. Enteroaggregative *Escherichia coli* produce intestinal inflammation and growth impairment and cause interleukin-8 release from intestinal epithelial cells. **J. Infect. Dis.**, v. 177, n. 1, p. 88-96, 1998.
- STEINER, T. S.; NATARO, J. P.; POTEET-SMITH, C. E.; SMITH, J. A.; GUERRANT, R. L. Enteroaggregative *Escherichia coli* expresses a novel flagellin that cause IL-8 release from intestinal epithelial cells. **J. Clin. Invest.**, v. 105, n. 12, p. 1769-1777, 2000.
- STEINER, T. S.; SAMIE, A.; GUERRANT, R. L. Infectious diarrhea: new pathogens and new challenges in developed and developing countries. **Clin. Infect. Dis.**, v. 43, n. 4, p. 408-410, 2006.
- STEINER, T. S.; THIELMAN, N. M.; GUERRANT, R. L. Protozoal agents: what are the dangers for the public water supply? **Annu. Rev. Med.**, v. 48, p. 329-340, 1997.
- STEVENSON, B. R.; SILICIANO, J. D.; MOOSEKER, M. S.; GOODENOUGH, D. A. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. **J. Cell Biol.**, v. 103, n. 3, p. 755-766, 1986.
- SULIK, A.; POGORZELSKA, E.; WOJTKOWSKA, M.; ROZKIEWICZ, D.; OŁDAK, E. Norovirus infection in children hospitalized with acute gastroenteritis in northeastern Poland. **Przegl. Epidemiol.**, v. 61, n. 3, p. 477-482, 2007.
- SUTJITA, M.; BOUCKENOOGHE, A. R.; ADACHI, J. A.; JIANG, Z. D.; MATHEWSON, J. J.; ERICSSON, C. D.; DUPONT, H. L. Intestinal secretory immunoglobulin A response to enteroaggregative *Escherichia coli* in travelers with diarrhea. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 7, n. 3, p. 501-503, 2000.
- SUZART, S.; GUTH, B. E.; PEDROSO, M. Z.; OKAFOR, U. M.; GOMES, T. A. Diversity of surface structures and virulence genetic markers among enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) strains with and without the EAEC DNA probe sequence. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 201, n. 2, p. 163-168, 2001.
- SVENUNGSSON, B.; LAGERGREN, A.; EKWALL, E.; EVENGÅRD, B.; HEDLUND, K. O.; KÄRNELL, A.; LÖFDAHL, S.; SVENSSON, L.; WEINTRAUB, A. Enteropathogens in adult patients with diarrhea and healthy control subjects: a 1-year prospective study in a Swedish clinic for infectious diseases. **Clin. Infect. Dis.**, v. 30, n. 5, p. 770-778, 2000.
- 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. **Infect. Immun.**, v. 64, n. 9, p. 3497-3503, 1996.
- SWERDLOW, H.; GESTELAND, R. Capillary gel electrophoresis for rapid, high resolution DNA sequencing. **Nucleic Acids Res.**, v. 18, n. 6, p. 1415-1419, 1990.

TADDEI, C. R.; FASANO, A.; FERREIRA, A. J. P.; TRABULSI, L. R.; MARTINEZ, M. B. Secreted autotransporter toxin produced by a diffusely adhering *Escherichia coli* strain causes intestinal damage in animal model assays. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 250, p. 263–269, 2005.

TALAL, A. H.; MOE, C. L.; LIMA, A. A. M.; WEIGLE, K. A.; BARRETT, L.; BANGDIWALA, S. I.; ESTES, M. K.; GUERRANT, R. L. Seroprevalence and seroincidence of Norwalk-like virus infection among Brazilian infants and children. **J. Med. Virol.**, v. 61, n. 1, p. 117-124, 2000.

TENOVUO, J.; LEHTONEN, O. P.; AALTONEN, A. S.; VILJA, P.; TUOHIMAA, P. Antimicrobial factors in whole saliva of human infants. **Infect. Immun.**, v. 51, n. 1, p. 49-53, 1986.

THANABALU, T.; KORONAKIS, E.; HUGHES, C.; KORONAKIS, V. Substrate-induced assembly of a contiguous channel for protein export from *E.coli*: reversible bridging of an inner-membrane translocase to an outer membrane exit pore. **EMBO J.**, v. 17, n. 22, p. 6487-6496, 1998.

THAPAR, N.; SANDERSON, I. R. Diarrhoea in children: an interface between developing and developed countries. **Lancet**, v. 363, p.641-653, 2004.

TORNIEPORTH, N. G.; JOHN, J.; SALGADO, K.; DE JESUS, P.; LATHAM, E.; MELO, M. C. N.; GUNZBURG, S. T.; RILEY, L. W. Differentiation of pathogenic *Escherichia coli* strains in Brazilian children by PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 5, p. 1371-1374, 1995.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Virus. In: TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000. p. 359-392.

TSUKAMOTO, T. PCR methods for detection of enteropathogenic *Escherichia coli* (localized adherence) and enteroaggregative *Escherichia coli*. **Kansenshogaku Zasshi.**, v. 70, n. 6, p. 569-573, 1996.

TSUKITA, S.; OISHI, K.; AKIYAMA, T.; YAMANASHI, Y.; YAMAMOTO, T.; TSUKITA, S. Specific proto-oncogenic tyrosine kinases of src family are enriched in cell-to-cell adherens junctions where the level of tyrosine phosphorylation is elevated. **J. Cell Biol.**, v. 113, n. 4, p. 867-879, 1991.

TZIPORI, S.; MONTANARO, J.; ROBINS-BROWNE, R. M.; VIAL, P.; GIBSON, R.; LEVINE, M. M. Studies with enteroaggregative *Escherichia coli* in the gnotobiotic piglet gastroenteritis model. **Infect. Immun.**, v. 60, n. 1, p. 5302-5306, 1992.

UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND. **The state of the world's children 2003**. New York: UNICEF, 2003. 126p.

UZZAU, S.; FASANO, A. Cross-talk between enteric pathogens and the intestine. **Cell. Microbiol.**, v. 2, n. 2, p. 83-69, 2000.

VALENTINER-BRANTH, P.; STEINSLAND, H.; FISCHER, T. K.; PERCH, M.; SCHEUTZ, F.; DIAS, F.; AABY, P.; MØLBAK, K.; SOMMERFELT, H. Cohort study of Guinean children: incidence, pathogenicity, conferred protection, and attributable risk for enteropathogens during the first 2 years of life. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 9, p. 4238-4245, 2003.

VARGAS, M.; GASCÓN, J.; CASALS, C.; SCHELLENBERG, D.; URASSA, H.; KAHIGWA, E.; RUIZ, J.; VILA, J. Etiology of diarrhea in children less than five years of age in Ifakara, Tanzania. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 70, n. 5, p. 536-539, 2004.

VARGAS, M.; GASCÓN, J.; GALLARDO, F.; JIMENEZ DE ANTA, M. T.; VILA, J. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains detected by PCR in patients with travelers' diarrhea. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 4, n. 12, p. 682-688, 1998.

VASCONCELOS, M. J. O. B.; BATISTA FILHO, M. Doenças diarreicas em menores de cinco anos no Estado de Pernambuco: prevalência e utilização de serviços de saúde. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 11, n. 1, p. 128-138, 2008.

VELARDE, J. J.; VARNEY, K. M.; INMAN, K. G.; FARFAN, M.; DUDLEY, E.; FLETCHER, J.; WEBER, D. J.; NATARO, J. P. Solution structure of the novel dispersin protein of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 66, n. 5, p. 1123-1135, 2007.

VENKATARAMAN, S.; RAMAKRISHNA, B. S.; KANG, G.; RAJAN, D. P.; MATHAN, V. I. Faecal lactoferrin as a predictor of positive faecal culture in south Indian children with acute diarrhoea. **Ann. Trop. Paediatr.**, v. 23, n. 1, p. 9-13, 2003.

VERNACCHIO, L.; VEZINA, R. M.; MITCHELL, A. A.; LESKO, S. M.; PLAUT, A. G.; ACHESON, D. W. Diarrhea in American infants and young children in the community setting: incidence, clinical presentation and microbiology. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 25, n. 1, p. 2-7, 2006.

VIAL, P. A.; MATHEWSON, J. J.; DUPONT, H. L.; GUERS, L.; LEVINE, M. M. Comparison of two assay methods for patterns of adherence to HEp-2 cells of *Escherichia coli* from patients with diarrhea. **J. Clin. Microbiol.**, v. 28, n. 5, p. 882-885, 1990.

VIAL, P. A.; ROBINS-BROWNE, R.; LIOR, H.; PRADO, V.; KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MANEVAL, D.; ELSAVED, A.; LEVINE, M. M. Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. **J. Infect. Dis.**, v. 158, n. 1, p. 70-79, 1988.

VICTORIA, C. G.; BRYCE, J.; FONTAIN, O.; MONASCH, R. Reducing deaths from diarrhoea through oral rehydration therapy. **Bull World Health Organ.**, v. 78, n. 10, p. 1246-1255, 2000.

VILA, J.; VARGAS, M.; HENDERSON, I. R.; GASCÓN, J.; NATARO, J. P. Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in traveler's diarrhea strains. **J. Infect. Dis.**, v. 182, p. 1780-1783, 2000.

VILCEK, J. The cytokines: an overview. In: LOTZE, M.; THOMPSON, M. T. (Eds.) **The cytokines handbook**. 4 ed. Amsterdam: Academic Press, 2003. v.1, p. 3-18.

VILLASECA, J. M.; NAVARRO-GARCÍA, F.; MENDOZA-HERNÁNDEZ, G.; NATARO, J. P.; CRAVIOTO, A.; ESLAVA, C. Pet toxin from enteroaggregative *Escherichia coli* produces cellular damage associated with fodrin disruption. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 10, p. 5920-5927, 2000.

WAI, S. N.; TAKADE, A.; AMAKO, K. The hydrophobic surface protein layer of enteroaggregative *Escherichia coli* strains. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 135, n. 1, p. 17-22, 1996.

WALKER, S. P.; WACHS, T. D.; GARDNER, J. M.; LOZOFF, B.; WASSERMAN, G. A.; POLLIT, E.; CARTER, J. A.; INTERNATIONAL CHILD DEVELOPMENT STEERING GROUP. Child development: risk factors for adverse outcomes in developing countries. **Lancet**, v. 369, p. 145-157, 2007.

WANDERSMAN, C.; DELEPELAIRE, P. *TolC*, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 87, n. 12, p. 4776-4780, 1990.

WANKE, C. A.; MAYER, H.; WEBER, R.; ZBINDEN, R.; WATSON, D. A.; ACHESON, D. Enteroaggregative *Escherichia coli* as a potential cause of diarrheal disease in adults infected with human immunodeficiency virus. **J. Infect. Dis.**, v. 178, n. 1, p. 185-190, 1998.

WANKE, C. A.; SCHORLING, J. B.; BARRETT, L. J.; DE SOUZA, M. A.; GUERRANT, R. L. Potential role of adherence traits of *Escherichia coli* in persistent diarrhea in an urban Brazilian slum. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 10, n. 10, p. 746-751, 1991.

WEBER, E.; BERTA, G.; TOUSSON, A.; ST. JOHN, P.; GREEN, M. W.; GOPALOKRISHNAN, U.; JILLING, T.; SORSCHER, E. J.; ELTON, T. S.; ABRAHAMSON, D. R.; KIRK, K. L. Expression and polarized targeting of a rab3 isoform in epithelial cells. **J. Cell Biol.**, v. 125, n. 3, p. 583-594, 1994.

WEISSTAUB, G.; ARAYA, M. Acute malnutrition in Latin America: the challenge of ending avoidable deaths. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 47, Suppl. 1, p. S10-S14, 2008.

WELCH, R. A.; HULL, R.; FALKOW, S. Molecular cloning and physical characterization of a chromosomal hemolysin from *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 42, n. 1, p. 178-186, 1983.

WERSHIL, B. K.; FURUTA, G. T. Gastrointestinal mucosal immunity. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 121, Suppl. 2, p. S380-S383, 2008.

WORLD BANK. **World development in health 1993: investing in health**. New York: Oxford University Press, 1993. 344p.

- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global burden of disease (GBD) 2002 estimates.** Geneva: WHO, 2004.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Physical status: the use and interpretation of anthropometry.** Geneva: WHO, 1995a. 36p.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The world health report 1995: bridging the gaps.** Geneva: WHO, 1995b. 123p.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The world health report 1996: fighting disease, fostering development.** Geneva: WHO, 1996. 143p.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The world health report 1997: conquering suffering, enriching humanity.** Geneva: WHO, 1997. 168p.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The world health report 1998: life in the 21st century – a vision for all.** Geneva: WHO, 1998. 226p.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The world health report 1999: making a difference.** Geneva: WHO, 1999. 136p.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The world health report 2000: health systems – improving performance.** Geneva: WHO, 2000. 215p.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The world health report 2001: mental health – new understanding, new hope.** Geneva: WHO, 2001. 169p.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The world health report 2002: reducing risks, promoting healthy life.** Geneva: WHO, 2002. 230p.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The world health report 2003: shaping the future.** Geneva: WHO, 2003. 204p.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The world health report 2004: changing history.** Geneva, WHO, 2004. 96p.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The treatment of diarrhoea: a manual for physicians and other senior health workers.** Geneva, WHO, 2005a. 50p.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The world health report 2005: make every mother and child count.** Geneva, WHO, 2005b. 243p.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The world health report 2007 – a safer future: global public health security in the 21st century.** Geneva, WHO, 2007. 96p.
- WRIGHT, P. A.; WYNFORD-THOMAS, D. The polymerase chain reaction: miracle or mirage? A critical review of its uses and limitations in diagnosis and research. **J. Pathol.**, v. 162, n. 2, p. 99-117, 1990.
- YAMAMOTO, T.; ECHEVERRIA, P. Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic *E. coli* strains pathogenic for humans. **Infect. Immun.**, v. 64, n. 4, p. 1441-1445, 1996.

YAMAMOTO, T.; ECHEVERRIA, P.; YOKOTA, T. Drug resistance and adherence to human intestines of enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.**, v. 165, n. 4, p. 744-749, 1992.

YAMAMOTO, T.; ENDO, S.; YOKOTA, T.; ECHEVERRIA, P. Characteristics of adherence of enteroaggregative *Escherichia coli* to human and animal mucosa. **Infect. Immun.**, v. 59, n. 10, p. 3722-3739, 1991.

YATSUYANAGI, J.; SAITO, S.; MIYAJIMA, Y.; AMANO, K.; ENOMOTO, K. Characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains harboring the *astA* gene that were associated with a waterborne outbreak of diarrhea in Japan. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 5, p. 2033-2039, 2003.

ZAHRAOUI, A.; JOBERTY, G.; ARPIN, M.; FONTAINE, J. J.; HELLIO, R.; TAVITIAN, A.; LOUVARD, D. A small rab GTPase is distributed in cytoplasmic vesicles in non polarized cells but colocalizes with the tight junction marker ZO-1 in polarized epithelial cells. **J. Cell Biol.**, v. 124, n. 1-2, p. 101-115, 1994.

ZHONG, Y.; SAITOH, T.; MINASE, T.; SAWADA, N.; ENOMOTO, K.; MORI, M. Monoclonal antibody 7H6 reacts with a novel tight junction-associated protein distinct from ZO-1, cingulin and ZO-2. **J. Cell Biol.**, v. 120, n. 2, p. 477-483, 1993.

ZHOU, Z.; OGASAWARA, J.; NISHIKAWA, Y.; SETO, Y.; HELANDER, A.; HASE, A.; IRITANI, N.; NAKAMURA, H.; ARIKAWA, K.; KAI, A.; KAMATA, Y.; HOSHI, H.; HARUKI, K. An outbreak of gastroenteritis in Osaka, Japan due to *Escherichia coli* serogroup O166:H15 that had a coding gene for enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1). **Epidemiol. Infect.**, v. 128, n. 3, p. 363-371, 2002.

ZIERDT, W. S. A simple device for concentration of parasite eggs, larvae, and protozoa. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 70, p. 89-93, 1978.

ZIERDT, W. S. Concentration and identification of *Cryptosporidium sp.* by use of a parasite concentrator. **J. Clin. Microbiol.**, v. 20, n. 5, p. 860-861, 1984.

ANEXOS

Cont. Parecer CONEP N° 760/2006

possível indução ao sujeito da pesquisa, infringindo a sua autonomia, uma vez que não se caracteriza realmente como benefício para os sujeitos, já que o acesso a tratamento deve ser garantido a todos. Tal frase poderia ser colocada, por exemplo, num item denominado "custos".

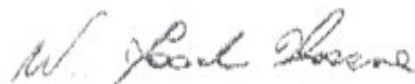
7. No TCLE específico para a pesquisa genética não cabe referências a administração do medicamento em estudo, mencionada em alguns itens. Rever.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96 manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto, com a seguinte recomendação a ser acompanhada pelo CEP que informará a CONEP:

- Que sejam atendidas as questões acima, antes do início do estudo.

Situação: Protocolo aprovado com recomendação

Brasília, 14 de julho de 2006.



WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/CNS/MS

ANEXO B



Universidade Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº 550/2006

Fortaleza, 22 de setembro de 2006

Protocolo nº 238/05

Pesquisador responsável: Aldo Ângelo Moreira Lima

Deptº./Serviço: Universidade Federal do Ceará-UFC

Título do Projeto: "Intervenção com micronutrientes e impacto a longo no Brasil" Protocolo (Re-ICDR) DMID 05-0071

Levamos ao conhecimento de V.Sª. que o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº196 de 10 de outubro de 1996 e complementares, aprovou o protocolo versão 3.0 – tradução revisada em 23/11/2005 e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do projeto supracitado na reunião do dia 26 de janeiro de 2006.

Outrossim, informamos, que após atendidas as recomendações feitas pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP no parecer 760/2006, o referido estudo foi aprovado.

Atenciosamente,

Dr. Fernando A. Frota Bezerra
Coordenador do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMEPE/UFC

ANEXO C



Universidade Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. N° 701/06

Fortaleza, 31 de outubro de 2006

Prezado Doutor,

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará – COMEPE de acordo com as Resoluções 196/96 e complementares, aprovou na reunião do dia 26 de outubro de 2006 a **autorização para início das atividades do estudo 238/05 "Intervenção com Micronutrientes e impacto a longo prazo no Brasil"**.

Atenciosamente,

Assinatura manuscrita em tinta preta, com uma linha diagonal cruzando-a.

Dr. Fernando A. Frota Bezerra
Coordenador do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMEPE/UFC

Ao Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima
Investigador

ANEXO D

*Intervenção com Micronutrientes e Impacto a Longo Prazo no Brasil
Parque Universitário, Estudo Baseado na Comunidade
(PU: Objetivos 1a, 2a, 2b e 2c do estudo)*

Nome do Participante _____ N° Casa _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O que estamos tentando descobrir:

Estamos convidando você, sua criança e todos os moradores de sua casa para participar de uma pesquisa de genética para infecções gastrintestinais e impedimento de crescimento e desenvolvimento. Este estudo tem colaboração internacional entre a Universidade Federal do Ceará e a Universidade da Virgínia, nos Estados Unidos. Células da boca, amostras de fezes e dados antropométricos serão coletadas para serem examinadas. Faremos testes de DNA nestas amostras coletadas para ver as características hereditárias que podem previamente produzir infecções gastrintestinais ou impedimento do crescimento e desenvolvimento.

O objetivo deste estudo é aprender sobre a tendência para infecções gastrintestinais e seus efeitos no desenvolvimento. O objetivo do teste genético é identificar os fatores que contribuem para o desenvolvimento de certas doenças.

Planejamos examinar detalhadamente a genética e as razões no ambiente das diarreias da primeira infância. Para fazer este tipo de teste, os investigadores obterão informações sobre todos os moradores da casa, pessoas da família ou não. Para maior proteção, os investigadores não revelarão informações médicas ou pessoais sobre nenhum participante do estudo. Para participar deste estudo você deve concordar em testarmos as características genéticas hereditárias realizadas nas amostras.

Você, sua criança e todos os moradores da casa foram selecionados porque moram no Parque Universitário ou na Comunidade Gonçalves Dias, bem como estão em nosso estudo em andamento.

O que acontecerá:

Existem duas partes para este estudo:

1. Um profissional de saúde (enfermeira e/ou agente de saúde) visitará sua casa e coletará duas amostras de fezes (uma no período chuvoso e outra no período seco) de todos os moradores da casa, quando possível;
2. Um profissional de saúde (enfermeira e/ou agente de saúde) coletará células bucais de todos os residentes (uma leve escovação de dentro da sua bochecha será realizada) e/ou uma técnica de enfermagem coletará uma amostra de sangue aproximadamente de 5ml de todos residentes da casa, quando possível;
3. Medidas antropométricas serão retiradas de todos os moradores da casa, quando possível;
4. Um psicólogo aplicará alguns testes que avaliam a capacidade de resolver problemas em sua criança que já faz parte de um estudo nosso;

Exclusões:

A psicóloga do estudo fará uma análise clínica para definir a participação. Sua criança não poderá participar do estudo se apresentar evidências de maiores desordens neuropsiquiátricas ou inabilidade para participar de um teste padronizado ou se tiver se mudado para uma área diferente.

Benefícios:

Não existem benefícios diretos pela participação neste estudo, embora outras pessoas possam algum dia se beneficiar da pesquisa a ser realizada usando suas amostras. Você não receberá benefícios financeiros se as suas amostras usadas na pesquisa levarem ao desenvolvimento de um produto comercial.

Riscos:

Não existem riscos sociais, psicológicos ou comunitários deste estudo.

Confidencialidade:

A confidencialidade e a privacidade dos seus dados ou de sua criança serão resguardados, segundo normas éticas brasileiras.

Responsabilidade e Compensação em Caso de Danos:

Se alguém de vocês apresentar qualquer dano como resultado direto do estudo, você deverá entrar em contato com o Dr. Aldo Lima no telefone: 33668437 para receber a terapia necessária. Qualquer dano resultante de sua participação será avaliado e tratado de acordo com os benefícios e assistência integral que você passa a ter direito ao assinar este formulário de consentimento e entrar na pesquisa, pois todo dano mediante o estudo é de inteira responsabilidade do pesquisador.

Para quem ligar:

Se você tem: (1) alguma questão sobre o estudo, por favor ligue para Dr Aldo A.M. Lima, Unidade de Pesquisa Clínica, UFC (Tel.: 33668445); (2) alguma questão sobre seus direitos como participante de um estudo, por favor ligue para Comitê de Ética em Pesquisa da UFC (COMEPE), Tel.: 3366.8346, ou peça a enfermeira do estudo para ajudar você a contatar com as pessoas citadas acima.

Direito de desistir:

Sua participação, de sua criança e de todos os moradores de casa neste estudo é completamente voluntária. Vocês são livres para se retirar do estudo a qualquer momento sem prejuízos. Apenas avise a um dos médicos ou enfermeiras que vocês não desejam continuar participando do estudo.

Número total de participantes e duração da participação:

O número total de participantes para este protocolo está estimado em 2000 pessoas. A participação estará completa depois da finalização dos testes que avaliam a capacidade de resolver problemas.

Nome do Sujeito
(Se < 18 anos)

_____ Pai ou Guardião Legal (NOME LETRA FORMA)	_____ Pai ou Guardião Legal (ASSINATURA)	____/____/____ dd/ mm/ ano
_____ Morador 1 (NOME LETRA FORMA)	_____ Morador 1 (ASSINATURA)	____/____/____ dd/ mm/ ano
_____ Morador 2 (NOME LETRA FORMA)	_____ Morador 2 (ASSINATURA)	____/____/____ dd/ mm/ ano
_____ Morador 3 (NOME LETRA FORMA)	_____ Morador 3 (ASSINATURA)	____/____/____ dd/ mm/ ano
_____ Morador 4 (NOME LETRA FORMA)	_____ Morador 4 (ASSINATURA)	____/____/____ dd/ mm/ ano
_____ Morador 5 (NOME LETRA FORMA)	_____ Morador 5 (ASSINATURA)	____/____/____ dd/ mm/ ano
_____ Morador 6 (NOME LETRA FORMA)	_____ Morador 6 (ASSINATURA)	____/____/____ dd/ mm/ ano
_____ Morador 7 (NOME LETRA FORMA)	_____ Morador 7 (ASSINATURA)	____/____/____ dd/ mm/ ano
_____ Morador 8 (NOME LETRA FORMA)	_____ Morador 8 (ASSINATURA)	____/____/____ dd/ mm/ ano
_____ Morador 9 (NOME LETRA FORMA)	_____ Morador 9 (ASSINATURA)	____/____/____ dd/ mm/ ano
_____ Morador 10 (NOME LETRA FORMA)	_____ Morador 10 (ASSINATURA)	____/____/____ dd/ mm/ ano
	_____ Assinatura da Testemunha	____/____/____ dd/ mm/ ano
	_____ Assinatura do Membro da Pesquisa	____/____/____ dd/ mm/ ano

ANEXO E



Universidade Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. N° 407/07

Fortaleza, 25 de maio de 2007

Prezado Doutor,

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará – COMEPE de acordo com as Resoluções 196/96 e complementares, aprovou na reunião do dia 24 de maio de 2007 o TCLE com complementação nos itens 1, 2, 3 referente ao estudo 238/05 intitulado: "Intervenção com micronutrientes e impacto a longo prazo no Brasil".

Atenciosamente,

Mirian Parente Monteiro

Dra. Mirian Parente Monteiro
Coordenadora Adjunta do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMEPE/UFC

Ao Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima
Investigador

ANEXO F



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
UNIDADE DE PESQUISAS CLÍNICAS
INSTITUTO DE BIOMEDICINA

Casa_ID
001

Projeto: UFC e UVa / CNPq – Genética
COMEPE: 238/05

Primeiro
Formulário

FORMULÁRIO AMBIENTAL E SÓCIO-ECONÔMICO DO PEDIGREE

A. Dados Demográficos:

- Endereço: _____ No. _____ Bloco: _____ GD () PU ()
- Quanto tempo mora neste endereço _____

B. Informação da Família:

- Quantas pessoas moram na casa? _____
- Quantos compartimentos possui a residência? _____
- Quantos compartimentos são utilizados para dormir? _____
- Alguém da casa é fumante? _____ (1 = sim; 2 = não)
- Quantas pessoas tem hábito de fumar na casa? _____ ()pai, ()mãe, ()outros, ()irmão
- Você é responsável pela preparação dos alimentos na casa? _____ (1 = sim; 2 = não)
- Antes de preparar os alimentos você tem tempo de lavar as mãos? _____ (1 = sim; 2 = não)
- Alguém da família é hipertenso? _____ (1=Sim, 2=Não); Quem? ()pai, ()mãe, ()filhos, () outros
- Alguém da família é diabético? _____ (1=Sim, 2=Não); Quem? ()pai, ()mãe, ()filhos, () outros

C. Condições Sócio-Econômicas e Sanitárias:

- Tipo de casa? _____ (1 = taipa; 2 = alvenaria; 3 = mista)
- A água para beber é proveniente de onde? (1 = sim; 2 = não)
 - encanada em casa?..... _____
 - chafariz?..... _____
 - bomba?..... _____
 - poço/cacimba?..... _____
 - carroça?..... _____
 - lagoa, riacho ou rio..... _____
 - água mineral (engarrafada) _____
 - outro, especificar: _____
- Quando você (ou sua criança) bebe água, normalmente esta água vem diretamente da torneira? _____ (1 = sim; 2 = não)
Se **não**, indicar com (1 = sim; 2 = não) se praticam as procedências abaixo listadas:
 - Água fervida? _____
 - Usa filtro na torneira? _____
 - Água refrigerada? _____
 - Outra, especificar: _____
- Existe recipiente na casa para guardar a água de beber? _____ (1 = sim; 2 = não)
Se sim, está o mesmo normalmente coberto? _____ (1 = sim; 2 = não)
Quantas pessoas bebem água do mesmo recipiente? _____



5. Qual o tipo de sistema de sanitário que existe em sua casa?
- a) Tipo de sanitário: _____ (1 = com descarga d'água; 2 = fossa; 3 = sem sanitário)
- b) Onde está localizado o sanitário da família: _____
1 = dentro de casa 3 = dentro e fora da casa 9 = desconhecido
2 = fora da casa 4 = outro. Especificar: _____
- c) O sanitário é compartilhado com outra(s) família(s)? _____ (1 = sim; 2 = não)
- d) Existe hoje água em casa para lavar mãos no banheiro ou próximo ao mesmo? _____
(1 = sim, 2 = não)
- e) Existe hoje sabão no local para lavar as mãos? _____ (1 = sim; 2 = não)

Favor de usar os números abaixo para responder os itens a e b da questão 6, que serão sobre coisas que as pessoas muito ocupadas normalmente não tem tempo para fazer:

1 = geralmente 80/90%	3 = algumas vezes, <50%	9 = desconhecido
2 = usualmente, 50/60%	4 = nunca, <5%	

6. Qual a frequência com que crianças < 5 anos de idade defecam ao redor da casa? _____
(responde com: 1-9)
7. Na casa existe algum animal? _____ (1 = sim; 2 = não; 9 = desconhecido)
Se sim, assinale o tipo de animal:
Quantidade
 Cachorro _____
 Gato _____
 Galinha _____
 Outro. Especificar: _____
8. Qual é aproximadamente, a renda mensal da família? _____ (em salários mínimos)
1 = <1/4 2 = 1/4 a 1/2 3 = 1/2 a 1 4 = 1 a 2
5 = 2 a 3 6 = 3 a 5 7 = >5 9 = desconhecido

Responsável: _____

Data: _____

_____/_____/_____

ANEXO G



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
 UNIDADE DE PESQUISAS CLÍNICAS & INSTITUTO DE BIOMÉDICA
 Projeto: UFC e UVA / CNPq - Genética
 COMEPE: 238/05

1º Formulário de Coleta de Fezes e Dados Antropométricos - Período Chuvoso

Quarto Formulário

Pedigree

*Rec N°	Dt. Nasc. (dd/mm/aa)	Sexo**	Data de coleta dos Dados Antropométricos (dd/mm/aa)	Dados Antropométricos					História de Diarreia*** nos últimos 14 dias			Coleta de Fezes			Choveu no dia da coleta 1=Sim 2=Não	Observações	
				Peso (Kg)	Altura 1 (cm)	Altura 2 (cm)	Altura 3 (cm)	Circunferência do braço (cm)	Prega Cutânea (mm)	Diarreia 1=Sim 2=Não	Se Sim, nº de Dias de Diarreia	Número de Evacuações líquidas em 24 horas	Data em que foi deixado o copo para a coleta	Data em que a Amostra foi coletada			Agente de Saúde que coletou a amostra
00101																	
00102																	
00103																	
00104																	
00105																	
00106																	
00107																	
00108																	
00109																	
00110																	
00111																	
00112																	
00113																	
00114																	
00115																	
00116																	
00117																	
00118																	
00119																	
00120																	
00121																	
00122																	
00123																	
00124																	
00125																	

*REC N° - é o número de registro que o residente recebeu no Formulário Confidencial do Pedigree; **Sexo: F=Feminino, M=Masculino; *** Diarreia: no mínimo 3 evacuações líquidas em 24 horas

Responsável: _____

ANEXO H – Distribuição dos genes codificadores de fatores de virulência *aggR*, *pet*, *pic*, *aap* e *astA* entre as amostras positivas para EAEC provenientes de crianças do grupo dos casos.

Nº. seq.	Nº. ident.	Gene <i>aaiC</i>	Gene <i>aatA</i>	Gene <i>aggR</i>	Gene <i>pet</i>	Gene <i>pic</i>	Gene <i>aap</i>	Gene <i>astA</i>
1	41	+	-	+	-	+	+	+
2	46	+	-	-	-	+	-	-
3	48	+	-	-	-	+	-	+
4	64	+	-	-	-	+	-	+
5	73	+	+	+	-	+	+	+
6	80	+	+	+	-	+	-	+
7	81	+	-	-	-	+	-	+
8	92	+	+	+	+	+	+	+
9	93	+	-	-	-	+	+	+
10	94	+	+	+	+	+	+	+
11	111	+	-	-	-	+	-	+
12	115	+	-	-	+	+	-	+
13	116	+	+	+	+	+	+	+
14	124	+	+	+	+	+	-	+
15	134	+	-	-	+	+	+	+
16	150	+	+	+	+	+	+	+
17	156	-	+	-	-	+	+	+
18	159	+	-	-	-	+	-	+
19	163	+	-	-	-	+	-	+
20	165	+	+	+	+	+	+	+

Continuação do **Anexo H**

Nº. seq.	Nº. ident.	Gene <i>aaiC</i>	Gene <i>aatA</i>	Gene <i>aggR</i>	Gene <i>pet</i>	Gene <i>pic</i>	Gene <i>aap</i>	Gene <i>astA</i>
21	166	+	+	+	+	-	+	+
22	202	+	+	+	+	+	+	+
23	218	+	+	+	+	+	+	+
24	223	+	-	-	+	+	-	+
25	226	+	+	+	-	+	+	+
26	228	+	+	+	+	+	+	+
27	233	+	-	-	+	+	-	+
28	255	+	+	+	-	+	+	+
29	279	+	-	-	-	+	+	+
30	300	+	+	+	-	+	+	+
31	317	+	-	-	-	+	-	+
32	319	+	-	-	-	+	-	+
33	325	+	-	-	-	+	-	+
34	337	+	-	-	-	+	-	+

ANEXO I – Distribuição dos genes codificadores de fatores de virulência *aggR*, *pet*, *pic*, *aap* e *astA* entre as amostras positivas para EAEC provenientes de crianças do grupo dos controles.

Nº. seq.	Nº. ident.	Gene <i>aaiC</i>	Gene <i>aatA</i>	Gene <i>aggR</i>	Gene <i>pet</i>	Gene <i>pic</i>	Gene <i>aap</i>	Gene <i>astA</i>
1	14	+	-	-	-	+	-	+
2	26	+	-	-	-	+	+	+
3	29	+	-	+	-	+	+	+
4	32	+	-	-	-	+	+	+
5	35	+	-	-	-	+	+	+
6	75	+	-	-	-	+	-	+
7	87	+	+	+	-	+	-	+
8	89	+	+	+	-	+	+	+
9	96	+	-	-	+	+	-	+
10	99	+	+	+	+	+	+	+
11	107	+	-	-	-	+	-	+
12	117	+	+	+	-	+	+	+
13	125	+	+	+	-	+	-	+
14	135	+	+	-	-	+	+	+
15	158	+	+	-	-	+	+	+
16	176	+	+	+	-	+	+	+
17	193	+	-	-	-	+	-	+
18	201	+	+	+	-	+	+	+
19	205	+	+	+	+	+	+	+
20	212	+	-	-	+	+	-	+

Continuação do **Anexo I**

Nº. seq.	Nº. ident.	Gene <i>aaiC</i>	Gene <i>aatA</i>	Gene <i>aggR</i>	Gene <i>pet</i>	Gene <i>pic</i>	Gene <i>aap</i>	Gene <i>astA</i>
21	234	+	+	+	-	+	+	+
22	245	+	-	-	-	+	-	+
23	251	+	-	-	+	+	+	+
24	256	+	-	-	-	+	-	+
25	259	+	+	+	-	+	+	+
26	264	+	+	+	+	+	-	+
27	278	-	+	-	-	+	+	-
28	282	-	+	+	+	+	-	-
29	298	-	+	+	-	+	+	-
30	311	+	-	-	-	-	-	+
31	320	+	+	+	-	+	+	+
32	322	+	+	+	-	+	+	+
33	323	+	-	-	-	+	-	+
34	340	+	+	+	-	+	+	+

ANEXO J – RESUMOS EM CONGRESSOS

1. **Lima, I. F. N.**; Quetz, J. da S.; Havt, A.; Mota, R. M. S.; Nataro, J. P.; Guerrant, R. L.; Lima, A. A. M. Prevalence of enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) and its virulence-related genes in stool samples from Northeastern Brazil using molecular diagnostic method. 1°. Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica, Gramado, Rio Grande do Sul, 2008. Disponível em CD-Rom. Apresentação em pôster.
2. Quetz, J. da S.; **Lima, I. F. N.**; Havt, A.; Mota, R. M. S.; Guerrant, R. L.; Lima, A. A. M. *Campylobacter jejuni* identification by PCR and ELISA, and its correlation with nutritional parameters in children from Northeast of Brazil. In: 1°. Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica, Gramado, Rio Grande do Sul, 2008. Disponível em CD-Rom. Apresentação em pôster.
3. Havt, A.; Quetz, J. da S.; **Lima, I. F. N.**; Mota, R. M. S.; Guerrant, R. L.; Lima, A. A. M. Evaluation of retinol supplementation on nutritional status, intestinal barrier function and cytokines concentrations in stool samples of children in the Northeast of Brazil. In: XVIII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Farmacología, III Congreso Iberoamericano de Farmacología, XXX Reunión Anual de La Sociedad de Farmacología de Chile, XXIII Reunión Anual de La Sociedad Chilena de Ciencias Fisiológicas, Coquimbo, Chile, 2008. p. 111. Apresentação em pôster.
4. **Lima, I. F. N.**; Quetz, J. da S.; Havt, A.; Guerrant, R. L.; Lima, A. A. M. Detection of fecal pro- and anti-inflammatory cytokines in children with diarrheal diseases from Northeast of Brazil. In: XVIII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Farmacología, III Congreso Iberoamericano de Farmacología, XXX Reunión Anual de La Sociedad de Farmacología de Chile, XXIII Reunión Anual de La Sociedad Chilena de Ciencias Fisiológicas, Coquimbo, Chile, 2008. p. 115. Apresentação em pôster.
5. Havt, A.; **Lima, I. F. N.**, Quetz, Carvalho, E. B., Berkley, L.; Sheikh, J.; Nataro, J. P.; Guerrant, R. L.; Lima, A. A. Multiplex PCR assay for *Escherichia coli* diagnosis using DNA extracted from stool samples. In: 20th International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Fortaleza, Ceará, 2008. p. 98. Apresentação em pôster.
6. Lima, A. A. M.; **Lima, I. F. N.**; Carvalho, E. B.; Lima, N. L.; Oriá, R. B.; Guerrant, R. L. Evaluation of glutamine, arginine and zinc serum concentrations with intestinal barrier function, inflammation and growth: a cross-sectional study in children from Northeast of Brazil. In: World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (WCPGHAN), Foz do Iguaçu, Paraná, 2008. p. 25. Apresentação em pôster.
7. Havt, A.; **Lima, I. F. N.**; Quetz, J. S.; Nataro, J. P.; Guerrant, R. L.; Lima, A. A. M. Evaluation of primers to detect the virulence genes *aggR*, *aap* and *aaiC* from enteroaggregative *E. coli* using real time PCR. In: World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (WCPGHAN), Foz do Iguaçu, Paraná, 2008. p. 26. Apresentação em pôster.

8. Lima, A. A. M.; **Lima, I. F. N.**; Quetz, J. S.; Bindá, A. H.; Carvalho, E. B.; Lima, N. L.; Oriá, R. B.; Guerrant, R. L. Evaluation of glutamine, arginine and zinc serum concentrations with intestinal barrier function, inflammation and growth in children from Northeast of Brazil. In: DMID International Research in Infectious Diseases Annual Meeting, Bethesda, Maryland, 2008. p. 12. Apresentação oral.
9. Havt, A.; **Lima, I. F. N.**; Quetz, J. S.; Nataro, J. P.; Guerrant, R. L.; Lima, A. A. M. Evaluation of primers to detect the virulence genes *aggR*, *aap* and *aaiC* from enteroaggregative *E. coli* using real time PCR. In: DMID International Research in Infectious Diseases Annual Meeting, Bethesda, Maryland, 2008. p. 39. Apresentação em pôster.
10. Aguiar, C. V.; **Lima, I. F. N.**; Vieira, C. M. G.; Lima, A. A. M.; Pinkerton, R. ; Oriá, R. B.; Guerrant, R. ApoE deficiency causes behavioral and intestinal barrier impact in malnourished ApoE knock-out mice. In: XXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), Águas de Lindóia, São Paulo, 2006. p. 63. Apresentação em pôster.
11. Siqueira, F. J. W. S.; Maciel, J. G.; Aguiar, C. V.; Brito, J. R. M.; **Lima, I. F. N.**; Lima, A. A. M.; Braga Neto, M. B.; Brito, G. A. C.; Oriá, R. B. Efeito da glutamina e alanil-glutamina nas alterações da barreira morfofuncional intestinal em camundongos tratados com antiretrovirais. In: XXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), Águas de Lindóia, São Paulo, 2006. p. 63. Apresentação em pôster.
12. **Lima, I. F. N.**; Maciel, J. G.; Aguiar, C. V.; Siqueira, F. J. W. S.; Braga Neto, M. B.; Maciel, A. A. F. L.; Brito, G. A. C.; Oriá, R. B.; Lima, A. A. M. Modulação da alanil-glutamina nas alterações induzidas por nelfinavir na migração de células intestinais in vitro enabarreira morfofuncional intestinal in vivo em camundongos. In: XXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), Águas de Lindóia, São Paulo, 2006. p. 114. Apresentação em pôster.
13. Maciel, A. A. F. L.; Braga Neto, M. B.; Castro, I. C.; Maciel, J. G.; **Lima, I. F. N.**; Lucena, H. B. M.; Carvalho, E. B.; Brito, G. A. C.; Oriá, R. B.; Lima, A. A. M. Modulação do retinol na apoptose e necrose induzida pela toxina A do *Clostridium difficile* em células intestinais epiteliais. In: XXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), Águas de Lindóia, São Paulo, 2006. p. 114. Apresentação em pôster.
14. Maciel, A. A. F. L.; Braga Neto, M. B.; Castro, I. C.; Oliveira, B. B.; **Lima, I. F. N.**; Lucena, H. B. M.; Carvalho, E. B.; Oriá, R. B.; Lima, A. A. M. Retinol estimula a migração e protege a inibição da proliferação induzida pela toxina A do *Clostridium difficile* em células epiteliais intestinais de ratos. In: XXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), Águas de Lindóia, São Paulo, 2006. p. 114. Apresentação em pôster.

ANEXO K – ARTIGOS CIENTÍFICOS EM PREPARAÇÃO

1. Diagnostic of enteropathogens by direct DNA extraction and PCR from human stool samples.
2. New multiplex PCR method for the detection of enteroaggregative, enteropathogenic and enterotoxigenic *Escherichia coli* from stool samples.
3. Direct detection of enteroaggregative *Escherichia coli* in human feces by Real-Time PCR.
4. Prevalence and distribution of virulence genes among strains of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from children in Northeastern Brazil.
5. A case-control study of enteroaggregative *Escherichia coli* infection in Brazilian children.

ANEXO L – PROJETOS DE PESQUISA APROVADOS

- 1. Título do Projeto:** Predisposição genética e seu impacto na deficiência mental e intervenção com micronutrientes em crianças com diarreia e desnutrição no Nordeste do Brasil.
Fonte Financiadora: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
Período: 2006-2008
Função: Pesquisadora
- 2. Título do Projeto:** *Escherichia coli* enteroagregativa, *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em Fortaleza, Ceará, Brasil: genes de virulência e polimorfismo genético de mediadores pró-inflamatórios.
Fonte Financiadora: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
Período: 2007-2009
Função: Pesquisadora
- 3. Título do Projeto:** Evaluation of a diagnostic enteric card for management of diarrhea in a clinical site in Fortaleza, Brazil.
Fonte Financiadora: National Institutes of Health (NIH)
Período: 2007-2008
Função: Pesquisadora
- 4. Título do Projeto:** Estudo da etiologia de diarreia infantil no Semi-Árido Brasileiro.
Fonte Financiadora: Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP)
Período: 2009-2012
Função: Pesquisadora
- 5. Título do Projeto:** Etiology, risk factors and interactions of enteric infections and malnutrition and the consequences for child health and development.
Fonte Financiadora: Foundation for the National Institutes of Health (FNIH)
Período: 2009-2014
Função: Pesquisadora