



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia  
Aplicadas à Farmácia

TAMARA RENATA MACHADO RIBEIRO

**Sinalização química e virulência de *Escherichia coli* O104:H4  
(EAEC Stx+)**

Araraquara - SP

2017

**TAMARA RENATA MACHADO RIBEIRO**

**Sinalização química e virulência de *Escherichia coli* O104:H4  
(EAEC Stx+)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Cristiano Gallina Moreira.

Araraquara - SP

2017

**Ficha Catalográfica**

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

**R484s** Ribeiro, Tamara Renata Machado  
Sinalização química e virulência de *Escherichia coli* O104:H4 (EAEC Stx+) / Tamara Renata Machado Ribeiro. – Araraquara, 2017.  
90 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de Pesquisa em Microbiologia.

Orientador: Cristiano Gallina Moreira.

1. *Escherichia coli* enteroagregativa. 2. Patogenicidade. 3. Virulência. 4. Sinalização química. Moreira, Cristiano Gallina, orient. II. Título.

**CAPES: 40500005**

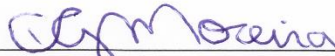
TAMARA RENATA MACHADO RIBEIRO

Sinalização química e virulência de Escherichia coli O104:H4 ( EAEC Stx<sup>+</sup>)

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Araraquara como requisito para a obtenção do título de Mestra em Biotecnologia e Biotecnologia aplicadas à Farmácia

Araraquara, 26 de maio de 2017

BANCA EXAMINADORA



---

CRISTIANO GALLINA MOREIRA



---

WALDIR PEREIRA ELIAS JUNIOR



---

CARLA RAQUEL FONTANA MENDONÇA

## DEDICATÓRIA

*À minha mãe, meu filho, esposo e sogra, por estarem sempre ao meu lado e por todo apoio e incentivo dedicados a mim durante a minha formação.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Cristiano Gallina Moreira pela orientação, incentivo e confiança para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Waldir Pereira Elias Junior pela oportunidade de colaboração.

A toda equipe do Laboratório PASIQUIBAC pela cooperação sempre que necessário.

Aos meus familiares e amigos por todo suporte e encorajamento.

À FCFar/UNESP, à FAPESP (processo nº 2014/06779-2) e à CAPES pelo apoio institucional e financeiro que viabilizaram a realização deste projeto.

*“Os que desprezam os pequenos acontecimentos nunca farão grandes descobertas.*

*Pequenos momentos mudam grandes rotas.”*

*Augusto Cury*

## RESUMO

A sinalização química é o mecanismo através do qual bactérias patogênicas interagem com o hospedeiro e sua microbiota, de modo a promover a regulação dos seus mecanismos de virulência. O estudo da sinalização química, em bactérias entéricas, do sistema de 2-componentes QseBC via autoindutor-3 (AI-3), epinefrina (Epi) e norepinefrina (NE), tem aberto perspectivas para desvendar novos mecanismos. *Escherichia coli* O104:H4 possui características fenotípicas clássicas de *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e se apresenta positiva para toxina de Shiga, encontrada em cepas de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). A presença dessa toxina pode levar o hospedeiro ao desenvolvimento de complicações mais graves, como a síndrome hemolítica urêmica (SHU). Dessa forma, essa combinação se torna altamente perigosa e patogênica a humanos, conforme observado no surto epidêmico em 2011 na Europa. O presente estudo teve como objetivo investigar a sinalização química e os mecanismos de patogenicidade em EAEC O104:H4 C227-11, já descritos em EAEC e EHEC, bem como buscar mecanismos ainda não elucidados na literatura. Comparada com cepas protótipos de *E. coli* diarreiogênicas, os resultados demonstraram que a cepa C227-11 possui um fenótipo de adesão e formação de biofilme acentuados. Em meio ácido, apresentou mais robustez na sobrevivência e maior motilidade em relação à EAEC 042. Também foi possível observar que o nível de expressão gênica para *qseC* apresentou-se semelhante ao de EHEC e exerce um importante papel na ativação da expressão de fatores de virulência, evidenciando, desse modo, a sua possibilidade de participação em mecanismos relacionados. Em ensaio *in vivo*, foi observada uma considerável variação na microbiota frente à C227-11, bem como foram reveladas diferenças significativas entre as demais EAEC, que, em sua maioria, não apresentaram grandes alterações no decorrer dos dias analisados, com predominância do Filo Bacteroidetes em relação ao Filo Firmicutes. Concluiu-se que seu perfil acentuado de adesão e sua elevada tolerância ao meio ácido provavelmente contribuíram para o estabelecimento da patogênese durante o período de surto. Tendo em vista o resultado da expressão gênica de *qseC*, cabe salientar a importância da investigação dessa e de outras vias de sinalização em EAEC O104:H4 Stx+, assim como de sua interação com a microbiota, de modo não apenas a compreender a relação patógeno-hospedeiro, como também contribuir para o desenvolvimento de terapias futuras.

**Palavras-chave:** *Escherichia coli* enteroagregativa. Patogenicidade. Virulência. Sinalização química.



## ABSTRACT

Chemical signalling is the mechanism through which pathogenic bacteria interact with the host microbiota, in order to promote regulation of virulence mechanisms. The study of chemical signalling in two-component system QseBC in enteric bacteria, by autoinducer-3 (AI-3), epinephrine (Epi) e norepinephrine (NE), has opened perspectives to discover new mechanisms. *Escherichia coli* O104:H4 has classic phenotypic characteristics of enteroaggregative *E. coli* (EAEC) and presents itself positive for Shiga toxin, which is found in enterohemorrhagic *E. coli* strains (EHEC). This toxin may lead the host to the development of more serious diseases, such as the Hemolytic Uremic Syndrome (HUS). Therefore, this combination is highly dangerous and pathogenic to humans, as observed during the epidemic outbreak in Europe in 2011. This study aimed to investigate chemical signalling and mechanisms of pathogenicity in EAEC O104:H4 C227-11, already described in EAEC and EHEC, as well as mechanisms still not elucidated in literature. Compared to prototype strains of diarrheagenic *E. coli*, the results have shown that C227-11 has accentuated phenotype of adhesion and biofilm formation. In acid medium, it presented more strength of survival and more motility than EAEC 042. In addition, gene expression level in *qseC* was found similar to EHEC and it holds an important participation in activation of virulence factors expression, highlighting, thereby, the possibility of its participation in related mechanisms. Through *in vivo* tests, it was noticed considerable variation of microbiota, compared to C227-11, just as significant differences among other EAEC that mostly did not present great alterations during analysed days, with predominance of Bacteroidetes over Firmicutes Phylum. The conclusion was that its large profile of adhesion and its elevated tolerance to acid medium probably contributed to the establishment of pathogenesis during the outbreak period. Considering the result of gene expression of *qseC*, it must be stressed the importance of researching this subject and other signalling pathways in EAEC O104:H4 Stx+, just as its interaction with microbiota, in order not only to understand the host-pathogen relationship, but also to contribute to the development of future therapies.

**Key words:** Enteroaggregative *Escherichia coli*. Pathogenicity. Virulence. Chemical signalling.

## Lista de Figuras

Figura 1 - Padrão AA de EAEC.....	19
Figura 2 - Modelo esquemático de sistemas de 2- componentes em EHEC .....	29
Figura 3 - Organização dos operons <i>ygiV/visP</i> e <i>qseBC</i> .....	31
Figura 4 - Estrutura de VisP.....	32
Figura 5 - Análise quantitativa da formação de biofilme após 24 horas de incubação.....	42
Figura 6 - Análise quantitativa da formação de biofilme após 24 horas de incubação.....	43
Figura 7 - Análise quantitativa de adesão em células epiteliais HeLa após 3 horas de incubação.....	44
Figura 8 - Análise quantitativa de adesão em células epiteliais HeLa após 6 horas de incubação.....	45
Figura 9 - Análise quantitativa de adesão em células epiteliais HeLa após 3 horas de incubação.....	46
Figura 10 - Análise quantitativa de adesão em células epiteliais HeLa após 6 horas de incubação.....	47
Figura 11 - Expressão gênica relativa do gene que codifica para o sensor histidina quinase QseC .....	48
Figura 12 - Expressão gênica relativa do gene que codifica para a toxina de Shiga .....	49
Figura 13 - Expressão gênica relativa do gene que codifica para a proteína VisP .....	50
Figura 14 - Expressão gênica relativa do gene que codifica para pilina de TIF.....	50
Figura 15 - Expressão gênica relativa do gene que codifica para a proteína MotA .....	51
Figura 16 - Medida dos halos de crescimento após 8 e 24 horas de incubação.....	52
Figura 17 - Porcentagem de sobrevivência após incubação em meio com pH 5.0.....	53
Figura 18 - Porcentagem de sobrevivência após incubação em meio com pH 2,5.....	54
Figura 19 - Abundância relativa da microbiota 1 dia após a infecção.....	55
Figura 20 - Abundância relativa da microbiota 5 dias após a infecção .....	56
Figura 21 - Abundância relativa da microbiota 10 dias após a infecção .....	57
Figura 22 - Abundância relativa da microbiota 15 dias após a infecção .....	58

## Lista de Tabelas

Tabela 1 - Cepas utilizadas durante o desenvolvimento deste estudo.....	34
Tabela 2 - Sequências dos iniciadores utilizados neste estudo .....	38
Tabela 3 - Grupos experimentais do ensaio <i>in vivo</i> com camundongos C57BL/6 .....	39
Tabela 4 - Modelos animais para o estudo da patogênese de EAEC .....	66

## Lista de Abreviaturas e Siglas

A/E - *Attaching and Effacing*

AA - Adesão Agregativa

AAF - *Aggregative Adherence Fimbriae*

AggR - Ativador transcricional de EAEC

AI-3 - Autoindutor-3

BOF - *Binding Oligosaccharide/Nucleotide Folding*

CEMIB - Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

DAEC - *Diffusely Adherent E. coli*

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DO<sub>600</sub> - Densidade Óptica a 600 nm

EAEC - *Enteraggregative Escherichia coli*

EHEC - *Enterohaemorrhagic Escherichia coli*

EIEC - *Enteroinvasive Escherichia coli*

EPEC - *Enteropathogenic Escherichia coli*

Epi - Epinefrina

Gb3 - Globotriacilceramida

GI - Gastrointestinal

Iha - Adesina de STEC Homóloga à IrgA de *Vibrio cholera*

Irp-2 - *Iron-repressible high-molecular weight2*

LB - Meio Luria-Bertani

LEE - *Locus of Enterocyte Effacement*

Lpf - *Long polar fimbriae*

LPS - Lipopolissacarídeo

MOI - *Multiplicity of Infection*

NE - Norepinefrina

pAA - Plasmídeo de Adesão Agregativa

PASQUIBAC - Laboratório de Patogenicidade e Sinalização Química Bacteriana

pEAF - *EPEC Adherence Fator Plasmid*

pESBL - *Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase Antibiotic Resistance Plasmid*

Pet - *Plasmid-encoded toxin*

Pic - *Protein involved in colonization*

qRT-PCR - *Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*  
QseB - *Quorum sensing E. coli B (regulador de resposta)*  
QseBC – Sistema regulador de dois componentes de *Escherichia coli*  
QseC - *Quorum sensing E. coli C (sensor quinase)*  
RR – Regulador de Resposta  
SepA - *Shigella extracellular protein*  
ShET-1 - *Shigella Enterotoxin 1*  
SHU - Síndrome Hemolítica Urêmica  
SigA - *Shigella IgA-like protease homologue of Shigella flexneri*  
SPATE - *Serino Protease Autotransporters of Enterobacteriaceae*  
STEC - *Shiga Toxin-Producing E. coli*  
Stx - *Shiga toxin*  
T6SS - *Type VI Secretion System*  
TTSS - *Type Three Secretion System*  
UFC - Unidades Formadoras de Colônia  
UPEC - *Uropathogenic Escherichia coli*  
VisP - *Virulence and stress-related Periplasmic protein*  
 $\Delta\Delta CT$  - *Comparative Critical Threshold*

# Sumário

**RESUMO**

**ABSTRACT**

**Lista de Figuras**

**Lista de Tabelas**

**Lista de Abreviaturas e Siglas**

**CAPÍTULO 1**

<b>1. Introdução.....</b>	<b>15</b>
1.1. <i>Escherichia coli</i> .....	15
1.2. <i>Escherichia coli</i> diarreioagênicas.....	15
1.3. <i>Escherichia coli</i> produtora de toxina de Shiga (STEC) .....	16
1.4. <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC) .....	18
1.5. <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa O104:H4.....	25
<b>2. Sistema de 2- componentes QseBC .....</b>	<b>27</b>
<b>3. VisP.....</b>	<b>30</b>
<b>4. Objetivos.....</b>	<b>33</b>
4.1. Objetivos específicos.....	33
<b>5. Material e métodos.....</b>	<b>34</b>
6.4. Ensaio de formação de biofilme em superfícies abióticas e adesão em células HeLa ....	35
6.5. Ensaio de resposta ao estresse .....	36
6.6. Extração de RNA .....	36
6.7. Análise de Expressão gênica via qRT-PCR .....	37
6.8. Ensaio <i>in vivo</i> com camundongo C57BL/6 para análise da microbiota após infecção.....	38
6.8. Ensaio de motilidade.....	39
6.9. Análise estatística.....	40

<b>7. Resultados</b> .....	<b>41</b>
7.1. Ensaio de formação de biofilme.....	41
7.2. Ensaio de adesão em células HeLa.....	43
7.3. Análise de expressão gênica via qRT-PCR.....	47
7.4. Ensaio de motilidade.....	51
7.5. Ensaio de resposta ao estresse.....	52
7.6. Análise da abundância relativa da microbiota após infecção em camundongos C57BL/6.....	54
<b>8. Discussão</b> .....	<b>59</b>
<b>9. Conclusões</b> .....	<b>69</b>
<b>Referências</b> .....	<b>70</b>

# **CAPÍTULO 1**



## 1. Introdução

### 1.1. *Escherichia coli*

*Escherichia coli* é um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, um importante membro da microbiota intestinal de mamíferos e outros animais (Nataro e Kaper, 1998; Boop *et al.*, 1999). Enquanto a maioria desses bacilos vive em perfeita harmonia com seu hospedeiro, como habitantes inofensivos do trato gastrointestinal, algumas linhagens se desviaram desse nicho ancestral ao ajustarem características de virulência específicas e se tornarem patogênicas a indivíduos saudáveis (Harrington *et al.*, 2006).

São capazes de ocasionar um amplo espectro de doenças, que podem variar entre infecções intestinais e extraintestinais como infecções do trato urinário, septicemias e meningites (Kaper *et al.*, 2004).

### 1.2. *Escherichia coli* diarreio gênicas

Os agentes etiológicos da diarreia incluem um amplo número de parasitas, vírus e bactérias. Entre os patógenos bacterianos diarreio gênicos, *Escherichia coli* é um dos mais importantes agentes de diarreia endêmica e epidêmica em todo o mundo (Nataro e Kaper, 1998).

Tanto em crianças como em adultos, as cepas associadas a infecções intestinais, conhecidas como *E. coli* diarreio gênicas, são de grande importância em saúde pública. Entre esses patógenos intestinais, existem seis categorias bem descritas: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* produtora de toxina de Shiga (STEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC). As cepas dentro de cada patotipo são caracterizadas por traços de virulência partilhados e, tipicamente, distinguem-se pelo antígeno O (lipopolissacárideo) e H (flagelar) (Nataro e Kaper, 1998; Kaper *et al.*, 2004). Essa classificação é amplamente utilizada, no entanto, as diferenças entre organismos dentro de uma mesma categoria levou à criação de subcategorias. Sendo assim, EPEC e EAEC passaram a ser classificadas como típica e atípica, e EHEC passou a constituir uma subcategoria de STEC (Kaper *et al.*, 2004).

### **1.3. *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga (STEC)**

A toxina de Shiga (Stx), inicialmente descrita como verotoxina, foi purificada primeiramente a partir de *Shigella dysenteriae* (Karmali *et al.*, 1983). STEC foi identificada pela primeira vez, nos Estados Unidos, em 1982, como agente de um surto de colite hemorrágica e de síndrome hemolítica urêmica (SHU) (Riley *et al.*, 1983). Os genes que codificam para essa toxina estão localizados em um fago, sendo que a Stx possui duas variantes, Stx1 e Stx2 (Jackson *et al.*, 1987). A segunda variante está mais relacionada a quadros graves da doença (Melton-Celsa, 2014; Boisen *et al.*, 2015).

O gado bovino, entre outros ruminantes, constitui o principal reservatório de STEC. As formas mais comuns de transmissão desse patógeno para o homem, além do consumo de água infectada, é a ingestão de alimentos, crus ou malcozidos, contaminados com as fezes desses animais (Paton e Paton, 1998; Caprioli *et al.*, 2005).

STEC possui uma subcategoria denominada EHEC e Stx é o fator chave para sua virulência (Kaper *et al.*, 2004). Essa toxina é do tipo A:B, e seu mecanismo de ação consiste basicamente na inibição da síntese proteica das células alvo a partir da ligação da subunidade B ao receptor Gb3 (globotriacilceramida), encontrado principalmente no endotélio vascular renal e nas células que compõem o epitélio intestinal. Em seguida, ocorre a endocitose da toxina, quando a subunidade A é ativada, exerce sua atividade de N-glicosidase, interage com a subunidade 60S do rRNA eucariótico, leva à remoção de um resíduo de adenina da fração 28S, resulta em uma alteração no sítio aminoacil do ribossomo e, conseqüentemente, inibe de forma irreversível o processo de alongamento da proteína, interrompendo o processo de tradução (Paton e Paton, 1998; Melton-Celsa, 2014). A Stx é produzida no cólon, viaja pela corrente sanguínea e atinge os rins, onde danifica as células endoteliais renais e obstrui a microvasculatura por meio de uma combinação de toxicidade direta e indução local da inflamação, a partir da produção de citocinas e quimiocinas (Andreoli *et al.*, 2002; Kaper *et al.*, 2004). Estes danos podem causar SHU, que se caracteriza pela tríade anemia hemolítica, trombocitopenia e potencial insuficiência renal aguda (Kaper *et al.*, 2004).

Além dos danos provocados pela toxina, EHEC causa uma lesão histopatológica A/E (*attaching and effacing*) semelhante à induzida por EPEC. Os genes envolvidos na formação dessa lesão estão localizados em uma ilha de

patogenicidade denominada LEE (*Locus of Enterocyte Effacement*), que codifica um sistema de secreção do tipo III, composto por adesina e proteínas efetoras (Mcdaniel *et al.*, 1995; Elliott *et al.*, 1998). Essa característica a diferencia das demais STEC (Robins-Browne *et al.*, 2016).

#### **1.4. *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC)**

*Escherichia coli* enteroagregativa apresenta um padrão de adesão, característico em linhagens de células epiteliais, denominado adesão agregativa (AA). Esse padrão foi estabelecido por Nataro *et al.* (1987), durante um estudo epidemiológico sobre a etiologia da diarreia em crianças no Chile, ao observar que cepas isoladas apresentavam um padrão distinto de interação com as células HEp-2. Nesse tipo de adesão, as bactérias encontram-se ligadas umas às outras, à superfície de células epiteliais e à superfície da lamínula (na ausência de células), numa configuração semelhante a tijolos empilhados que formam agregados heterogêneos (Nataro *et al.*, 1987).

**Figura 1 - Padrão AA de EAEC**

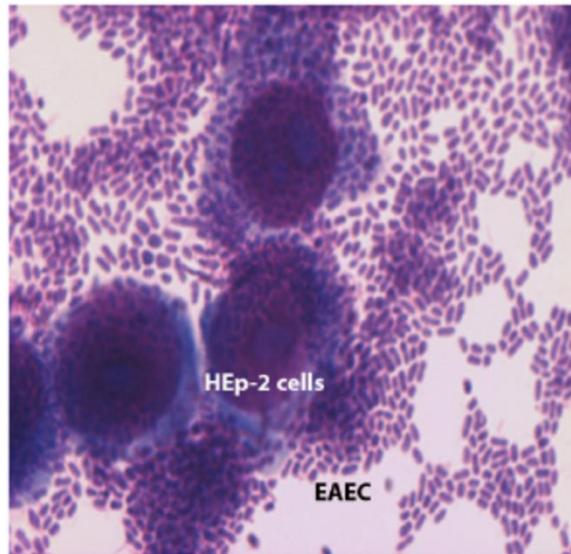


Fig.1 – Padrão de adesão agregativa de EAEC em monocamada de células HEp-2 (Navarro-Garcia *et al.*, 2010).

EAEC é uma importante causa de doenças diarreicas em países tanto desenvolvidos quanto em desenvolvimento (Nataro e Kaper, 1998; Kaper *et al.*, 2004; Nataro *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2006). Tem sido implicada como um agente etiológico de diarreia do viajante, crianças e pacientes infectados pelo HIV, bem como, provavelmente, de vários surtos de origem alimentar, sendo cada vez mais reconhecida como um enteropatógeno emergente (Nataro e Kaper, 1998; Kaper *et al.*, 2004; Harrington *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2006; Nataro *et al.*, 2006; Izquierdo *et al.*, 2014).

Surtos de gastroenterite de origem alimentar, envolvendo EAEC, foram notavelmente relatados no Reino Unido (Smith *et al.*, 1997; Dallman *et al.*, 2014), Japão (Itoh *et al.*, 1997; Harada *et al.*, 2007) e Itália (Scavia *et al.*, 2008). Em um dos surtos ocorridos no Japão, foram acometidas 2.697 crianças em fase escolar (Itoh *et al.*, 1997).

Um número considerável de potenciais fatores de virulência para EAEC já foram descritos até o momento; contudo, não estão uniformemente distribuídos entre todos os isolados dessa categoria para que sua patogênese seja bem definida (Nataro e Kaper, 1998; Huang *et al.*, 2004; Rasko *et al.*, 2011). Apesar disso, sugere-se que a patogênese de EAEC ocorre basicamente em três estágios: no primeiro, as bactérias aderem à mucosa intestinal e à camada de muco; no segundo, elas multiplicam-se na camada de muco, estimulam sua hipersecreção e formam um característico biofilme nessa camada; no terceiro, ocorre a lesão da mucosa intestinal a partir da liberação de toxinas ou processo inflamatório. A formação do biofilme, possivelmente, está associada à capacidade de colonização da bactéria, responsável por diarreia persistente (igual ou superior a 14 dias) e má absorção de nutrientes (Nataro e Kaper, 1998; Nataro *et al.*, 1998), enquanto fatores que podem levar a problemas de crescimento e desenvolvimento (Steiner *et al.*, 1998).

É provável que a diarreia se inicie com a adesão agregativa nos tecidos do íleo e cólon por um número variado de adesinas, seguida pela secreção de uma ou mais enterotoxinas (Harrington *et al.*, 2006).

O ensaio de adesão em células epiteliais HeLa ou HEP-2, para verificação do padrão AA, é considerado o método diagnóstico de referência para detecção de EAEC (Nataro e Kaper, 1998). Como alternativa a esses ensaios, Braudry e colaboradores desenvolveram uma sonda genética inicialmente denominada CVD432, que consiste em um fragmento críptico de 1kb do plasmídeo da cepa protótipo 17-2 pertencente ao sototipo O3:H2 (Braudry *et al.*, 1990). Posteriormente, foi evidenciado que esse fragmento correspondia ao gene *aatA*, que faz parte do cluster de genes do sistema ABC de secreção. Desse modo, a sonda CVD432 passou a ser corretamente chamada de *aatA* (Nishi *et al.*, 2003). Entretanto, observa-se que

sua especificidade e sensibilidade podem variar devido à heterogeneidade genética desse patótipo (Baudry *et al.*, 1990; Debroy *et al.*, 1994; Gomes *et al.*, 1998; Boisen *et al.*, 2008).

Estudos indicam que o passo chave na patogênese de EAEC consiste na sua capacidade de aderir e colonizar o trato intestinal, facilitada pelas fímbrias de adesão agregativa (AAF) em cepas protótipos e seguida pela formação de biofilme (Hicks *et al.*, 1996; Wakimoto *et al.*, 2004; Jonsson *et al.*, 2015). Atualmente, são conhecidas ao menos cinco variantes de AAFs (AAF/I-V), codificadas em plasmídeos de alto peso molecular designados pAA. (Nataro *et al.*, 1992; Czczulin *et al.*, 1997; Elias *et al.*, 1999; Bernier *et al.*, 2002; Jonsson *et al.*, 2015).

A biogênese das AAFs apresenta uma organização similar aos genes da família AFA/DR, que são adesinas organizadas da seguinte maneira: chaperona, proteína *usher*, subunidade acessória e principal. Essas adesinas são expressas por *E. coli*, estão relacionadas a infecções intestinais e urinárias e podem se ligar a vários receptores, tais como o antígeno eritrocitário do grupo sanguíneo DR, presente na molécula *decay-accelerating factor*, ou a proteína de matriz extracelular, particularmente colágeno do tipo IV (Nowicki *et al.*, 1990; Nataro *et al.*, 1998; Servin, 2005; Farfan *et al.*, 2008).

Além disso, há a presença de adesinas não fimbriais como a proteína de membrana externa de 58 kDa, denominada *aggregative protein 58* (Ap58). Essa proteína é produzida por EAEC O111:H12, cujo gene tem localização plasmideal. A Ap58 está associada com o padrão AA e com a capacidade de hemaglutinação (Monteiro-Neto *et al.*, 2003). Outro exemplo é a presença da adesina Hra1 na EAEC 042, que é um fator acessório envolvido na formação de biofilme e na adesão agregativa (Bhargava *et al.*, 2009). Wai e colaboradores relataram a presença de uma

proteína de membrana externa de 38 Kda também envolvida no padrão AA de EAEC (Wai *et al.*, 1996).

Um ativador transcricional denominado AggR, uma proteína pertencente à família AraC, apresenta um importante papel na ativação de vários fatores de virulência, tanto no cromossomo quanto no plasmídeo bacteriano. Entre os genes controlados por AggR, estão aqueles que codificam as AAFs (Nataro *et al.*, 1994; Elias *et al.*, 1999; Dudley, E. G. *et al.*, 2006; Harrington *et al.*, 2006; Boisen *et al.*, 2014).

No mecanismo de patogenicidade da EAEC, têm sido descritas toxinas e adesinas (Nataro *et al.*, 1998). EAEC abriga um número variável de SPATE (*Serino Protease Autotransporters of Enterobacteriaceae*), que estão implicadas na evasão imune, lesão da mucosa, secreção e colonização (Dutta *et al.*, 2002; Rasko *et al.*, 2011; Boisen *et al.*, 2015). As SPATE compreendem um grande grupo de serinoproteases semelhantes à tripsina, as quais são secretadas por *Shigella spp.*, *E. coli uropatogênicas* e todos os patotipos de *E. coli* diarreiogênicas. Essas proteínas exibem características típicas de autotransportadoras e possuem uma sequência sinal, um domínio passageiro (que possui as características funcionais da proteína) e um domínio  $\beta$ -barril na porção C-terminal, necessário para a translocação da toxina através da membrana externa. As toxinas maduras dispõem, em sua região N-terminal, de um domínio catalítico típico de serinoprotease, seguido de um motivo beta-hélice, altamente conservado, presente em grande parte das proteínas autotransportadoras (Henderson *et al.*, 1999; Henderson *et al.*, 2004; Boisen *et al.*, 2009).

Os genes responsáveis por fatores de virulência estão presentes tanto no cromossomo quanto em plasmídeos, e em sua maioria, caracterizados na cepa



protótipo EAEC 042, pertencente ao sorotipo O44:H18. Essa cepa foi isolada de um caso de diarreia no Peru e causou a doença em voluntários humanos durante o desenvolvimento de um estudo (Nataro *et al.*, 1985; Nataro *et al.*, 1995; Czeczulin *et al.*, 1999).

A toxina EAST1 é um peptídeo de 38 aminoácidos, codificado no gene plasmidial *astA*, que possui homologia com a enterotoxina termo-estável (ST) de ETEC, capaz de induzir o aumento da secreção de cGMP intracelular (Savarino *et al.*, 1993). Sua função na patogênese de EAEC ainda não está clara, mas já foi encontrada em cepas de EPEC, EHEC e ETEC (Savarino *et al.*, 1996; Kaper *et al.*, 2004).

O gene *pet*, também de localização plasmidial, codifica a serinoprotease Pet, uma enterotoxina de 108 kDa capaz de causar acúmulo de fluidos e lesões necróticas e hemorrágicas em alça ligada de rato (Eslava *et al.*, 1998; Elias *et al.*, 1999). A Pet possui ainda atividade citotóxica e pode causar a disrupção do citoesqueleto das células epiteliais, por meio da clivagem da proteína dos enterócitos, a  $\alpha$ -fodrina (Villaseca *et al.*, 2000; Canizalez-Roman e Navarro-Garcia, 2003).

A proteína dispersina é codificada pelo gene *aap* (*anti-aggregation protein*) e está relacionada com a dispersão da bactéria pela mucosa intestinal e sua translocação através da membrana externa, dependente da presença do sistema de transporte do tipo ABC (complexo Aat), também codificado no pAA. Sugere-se que seu efeito esteja relacionado ao fato de que essa proteína se liga de forma não covalente ao LPS, o que neutraliza a carga negativa desse lipopolissacarídeo e permite, pois, que as AAFs, de forte carga positiva, fiquem livres para se espalharem pela superfície bacteriana e se dispersarem através da superfície das células intestinais. (Sheikh *et al.*, 2002; Nishi *et al.*, 2003; Velarde *et al.*, 2007).

O gene plasmidial *shf* foi descrito primeiramente em *Shigella flexneri* 2a, demonstrando homologia com dois genes, *shf1* e *shf2*, sendo que *shf* codifica uma proteína homóloga à IcaB de *Staphylococcus epidermidis*, relacionada à formação de biofilme (Czeczulin *et al.*, 1999). Posteriormente, foi evidenciado que *shf* está envolvido na formação de biofilme em EAEC 042 (Fujiyama *et al.*, 2008).

Pic (*Protein involved in colonization*) é uma outra SPATE que, diferentemente de Pet, está localizada no cromossomo de EAEC 042 (Henderson *et al.*, 1999). Foi descrita inicialmente em *S. flexneri* 2a (Rajakumar *et al.*, 1997) e está presente em UPEC (Parham *et al.*, 2004). É uma proteína de 116 kDa que apresenta atividade mucinolítica e de hemaglutinação, assim como confere à bactéria a capacidade de resistir à atividade bactericida do soro (Henderson *et al.*, 1999; Dutta *et al.*, 2002). Em experimentos *in vivo*, foi demonstrado que Pic pode estar envolvida nas fases iniciais da patogênese ao promover a colonização intestinal através da clivagem do muco, o que conseqüentemente favorece a adesão das bactérias aos enterócitos (Harrington *et al.*, 2009; Munera *et al.*, 2014).

A enterotoxina ShET-1 (*Shigella enterotoxin 1*) é codificada pelos genes *setAB*, localizados na fita antisenso ao gene *pic*, cuja proteína promove acúmulo de fluidos em modelo *in vivo* de alça ligada intestinal de coelho (Fasano *et al.*, 1995; Harrington *et al.*, 2006). O locus *pic/setAB* está localizado em uma ilha de patogenicidade (PAI) de 117 kb, inserida no locus do tRNA *pheU*. Nessa PAI, está contido um grupo de genes regulados por AggR, denominados *aai* (*AggR-activated island*), que codificam genes envolvidos na secreção de ao menos uma proteína, o que aparentemente faz parte do sistema de secreção do tipo VI. No entanto, a contribuição desses genes para a patogênese de EAEC ainda não é conhecida (Dudley, Edward G. *et al.*, 2006).

No cromossomo da cepa 042, foi encontrado, ademais, o gene *irp-2*, que

codifica a proteína *Iron-repressible high-molecular weight2 (Irp-2)*, envolvida na produção de um sideróforo (*yersiniabactina*) em *Yersinia enterocolitica* (Schubert *et al.*, 1998).

### **1.5. *Escherichia coli* enteroagregativa O104:H4**

A EAEC clássica não possui genes para Stx, mas codifica fímbrias de adesão agregativa (AAF) no plasmídeo de virulência pAA, responsável pela adesão do tipo “tijolos empilhados” das bactérias às células hospedeiras (VIAL *et al.*, 1988; NATARO; KAPER *et al.*, 1987; RASKO *et al.*, 2011).

Um surto de colite hemorrágica, que se iniciou na Alemanha em 2011, espalhou-se pela Europa e aumentou a necessidade de compreender os mecanismos patogênicos utilizados pelo microrganismo para colonizar e infectar células intestinais. Mais de 3800 indivíduos foram afetados, incluindo os casos primários e secundários. A SHU ocorreu em aproximadamente 22% dos casos e 54 pessoas morreram (Bielaszewska *et al.*, 2011; Frank *et al.*, 2011). O consumo de saladas contendo brotos de feno-grego, germinados a partir de sementes importadas do Egito, foi considerado a provável fonte de infecção (Buchholz *et al.*, 2011).

A cepa do surto em questão foi caracterizada como *E. coli* enteroagregativa do sorotipo O104:H4 lisogenizada por um fago que codifica para a toxina de Shiga tipo 2a. Portanto, é capaz de causar SHU e formar biofilme. Foi assim classificada por carregar genes típicos de EAEC, como *aggA* (fímbria de adesão agregativa I), *aggR* (ativador transcricional), *aap* (dispersina), *set1* (*shigella enterotoxin 1*), *pic* (*protein*

*involved in colonization*), *astA* (toxina EAST1), e o plasmídeo de virulência pAA identificado pelo gene *aatA* (Bielaszewska *et al.*, 2011; Frank *et al.*, 2011).

Surtos anteriores envolvendo EAEC produtora de Stx ocorreram isoladamente na França (Boudailliez *et al.*, 1997; Morabito *et al.*, 1998) e República da Geórgia (Ahmed *et al.*, 2012). Houve também casos esporádicos no Japão (Iyoda *et al.*, 2000), Coreia (Bae *et al.*, 2006), Alemanha (Mellmann *et al.*, 2008), Itália (Scavia, 2011) e Suécia (Guy *et al.*, 2013). Posteriormente, foram reportados casos na Irlanda (Dallman *et al.*, 2012), Bélgica (De Rauw *et al.*, 2014) e Holanda (Ferdous *et al.*, 2015).

A produção da toxina de Shiga é uma característica pertencente às *E. coli* diarreio gênicas (STEC), como é o caso da *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (Nataro e Kaper, 1998). Sendo Stx uma potente citotoxina capaz de inibir a produção de proteínas em células eucarióticas (O'Brien *et al.*, 1982), a cepa foi considerada um híbrido EAEC/EHEC, pois possui características de virulência de ambas (Rasko *et al.*, 2011). Estão presentes, ainda, Lpf (fímbria polar longa de STEC) e Iha (adesina de STEC homóloga à IrgA de *Vibrio cholera*) (Bielaszewska *et al.*, 2011), previamente identificadas tanto em EHEC como em outras cepas de *E. coli* (Tarr *et al.*, 2000; Torres *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2009).

A cepa O104:H4 do surto codifica três SPATE: Pic, SigA e SepA (Rasko *et al.*, 2011). Com base no trabalho publicado por Boisen e colaboradores, pode-se afirmar que esta seria uma rara combinação entre serinoproteases em *E. coli* enteroagregativa, considerando que a maioria codificaria apenas duas SPATE, e que a presença de três seria incomum (Boisen *et al.*, 2009). No entanto, uma recente pesquisa coordenada pelo Dr. Waldir Pereira Elias Junior evidenciou que, ao contrário do que fora demonstrado anteriormente, não é incomum EAEC abrigar número e combinações variadas de SPATE (Comunicação Pessoal).

SigA é uma proteína de 139.6 kDa originalmente encontrada na ilha de patogenicidade *she* (PAI) de *Shigella flexneri* 2a. Demonstrou causar significantes efeitos citopáticos em células HEp-2 e contribuir para acúmulo de fluidos no lúmen intestinal. Cliva a proteína  $\alpha$ -fodrina do citoesqueleto dos enterócitos, causando esfoliação e arredondamento dessas células (Al-Hasani *et al.*, 2000).

SepA é uma proteína 110 kDa de localização plasmidial, originalmente encontrada em espécies de *Shigella flexneri*. Associa-se a inflamação da mucosa e acúmulo de fluidos durante o desenvolvimento do processo infeccioso (Benjelloun-Touimi *et al.*, 1995). Posteriormente, foi também encontrada amplamente distribuída em isolados clínicos de EAEC (Boisen *et al.*, 2009).

É importante salientar a presença de um grande plasmídeo de alto peso molecular, que codifica beta-lactamases de espectro estendido (pESBL), apresenta resistência a penicilinas e cefalosporinas e é parcialmente resistente a fluorquinolonas (ácido nalidíxico), cotrimoxazol (sulfametoxazol-trimetoprim) e estreptomicina (aminoglicosídeo) (Bielaszewska *et al.*, 2011; Frank *et al.*, 2011).

## **2. Sistema de 2- componentes QseBC**

Bactérias utilizam mecanismos para se comunicar com o ambiente e regular seus meios de sobrevivência. Esses mecanismos estão associados à sinalização química da célula bacteriana, mediada via um sistema previamente caracterizado e denominado sistema de 2- componentes. Ele é composto de uma proteína histidina quinase, ligada à membrana interna bacteriana, que detecta o sinal do ambiente, e

de um regulador de reposta (RR), cuja função é promover uma resposta rápida a um estímulo detectado. Em enterobactérias, observa-se o sistema de 2- componentes QseBC e a sinalização via Epinefrina/Norepinefrina/Autoindutor-3 (Sperandio *et al.*, 2002; Sperandio *et al.*, 2003; Moreira e Sperandio, 2012).

O autoindutor-3 (AI-3) é produzido por bactérias patogênicas como *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella* e *Klebsiella*, bem como por bactérias comensais intestinais como *Enterobacter cloacae* e *E. coli* não patogênicas. (Walters *et al.*, 2006; Parker e Sperandio, 2009).

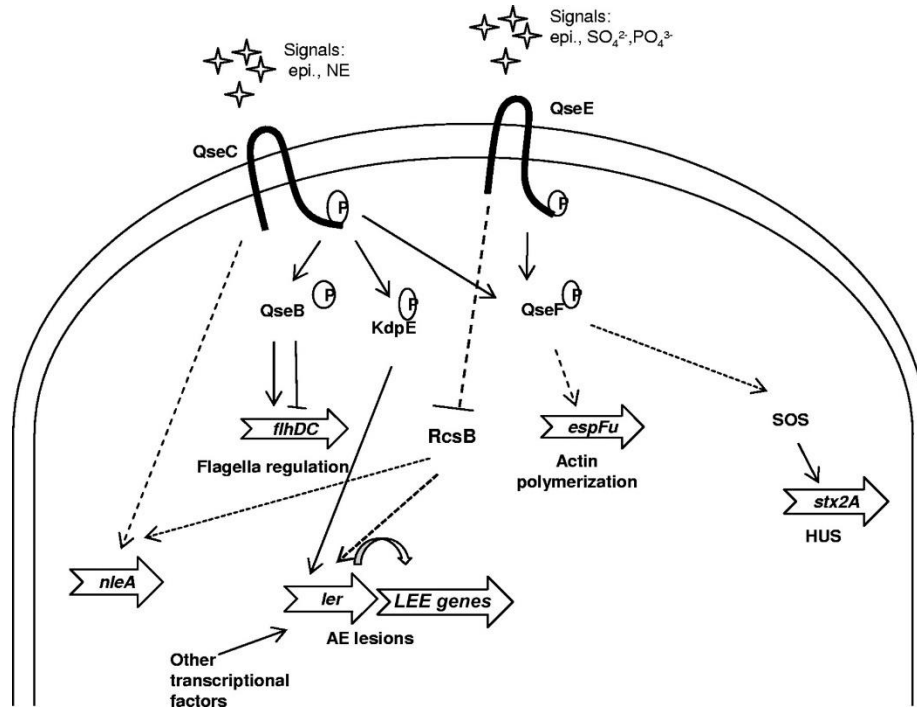
Tanto procariotos quanto eucariotos empregam sinalização célula-célula por meio de sinais químicos. Essa sinalização permeia a comunicação interespecífica e intraespecífica, além da comunicação interreinos e intrarreinos (Sperandio *et al.*, 2003).

QseC detecta especificamente o sinal do AI-3 e os hormônios do hospedeiro Epinefrina (Epi) e Norepinefrina (NE) (Clarke *et al.*, 2006). Previamente, QseBC e a sinalização via Epi/NE/AI-3 foram descritas em EHEC (Sperandio *et al.*, 2002) e em *S. Typhimurium*, tendo sido relatado o seu papel na patogênese (Moreira e Sperandio, 2012). Células bacterianas não expressam receptores adrenérgicos, mas muitos estudos indicam que elas respondem a Epi e NE (Sperandio *et al.*, 2003; Nakano *et al.*, 2007; Hughes e Sperandio, 2008). Observou-se, ainda, que esses hormônios atuam de forma semelhante ao AI-3 na regulação da expressão de genes de virulência em EHEC. Sendo assim, AI-3, Epi e NE são sinais agonistas, podendo ter seus efeitos bloqueados por antagonistas adrenérgicos (Sperandio *et al.*, 2003; Clarke *et al.*, 2006; Walters *et al.*, 2006). Portanto, QseC é considerado um análogo funcional bacteriano dos receptores adrenérgicos GPCRs, presentes em mamíferos (Clarke *et al.*, 2006).

Este mecanismo está presente também em diversas espécies bacterianas, bem

como em seus respectivos hospedeiros (Sperandio *et al.*, 2003). Homólogos de QseC são encontrados em pelo menos 25 importantes patógenos humanos e vegetais (Rasko, Moreira, Li, *et al.*, 2008).

**Figura 2** - Modelo esquemático de sistemas de 2- componentes em EHEC



**Fig. 2** - Modelo de sistemas de 2- componentes via Epi/NE/AI-3 (Njoroge e Sperandio, 2012).

Em EHEC, QseC transfere seu fosfato não apenas para QseB, seu regulador de resposta cognato (RR), mas também para QseF e KdpE, que são outros RRs (Hughes *et al.*, 2009). Através de QseB, QseC controla genes flagelares e de motilidade, a partir da ligação direta de QseB na região promotora de *flhDC*, regulando positivamente sua transcrição (Clarke e Sperandio, 2005; Hughes *et al.*, 2009). QseC, através de QseF, ativa a produção da toxina de Shiga (Lyte *et al.*, 1996; Lyte *et al.*, 1997; Hughes *et al.*, 2009) e, via KdpE, regula a formação da lesão A/E (Rasko, Moreira, Li, *et al.*, 2008; Hughes *et al.*, 2009; Njoroge e Sperandio, 2012). Essa lesão

se caracteriza pela adesão inicial à célula hospedeira, expressão e translocação de proteínas efetoras através do sistema de secreção do tipo III (SSTT), aderência íntima e formação da estrutura em forma de pedestal (Staley *et al.*, 1969; Moon *et al.*, 1983; Knutton *et al.*, 1989; Jerse *et al.*, 1990).

O sistema de 2- componentes QseBC foi previamente reportado por ter importante atividade na virulência não somente em EHEC (Clarke *et al.*, 2006), mas também em outros patógenos como EPEC (Sircili *et al.*, 2004), *Vibrio parahaemolyticus* (Nakano *et al.*, 2007), *S. Typhimurium* (Bearson e Bearson, 2008; Rasko, Moreira, Li, *et al.*, 2008; Merighi *et al.*, 2009; Moreira *et al.*, 2010); além de outros sorovares (Pullinger *et al.*, 2010), *Francisella tularensis* (Mokrievich *et al.*, 2010), UPEC (Hadjifrangiskou *et al.*, 2011), *Edwardsiella tarda* (Wang *et al.*, 2011), *Haemophilus influenza* (Unal *et al.*, 2012), *Aeromonas hydrophila* (Khajanchi *et al.*, 2012) e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Juárez-Rodríguez *et al.*, 2013).

### 3. VisP

Durante estudos de caracterização do sensor histidina quinase QseC na patogênese *in vivo* de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, foi descrita uma nova proteína inicialmente denominada YgiW e renomeada posteriormente para VisP (*Virulence and stress-related Periplasmic protein*). Evidenciou-se, em seguida, sua associação a mecanismos de sobrevivência, resposta ao estresse e manutenção de membrana (Moreira *et al.*, 2013).

Em *Escherichia coli*, sua única função descrita é em resposta a estresse bacteriano, o que leva em consideração a exposição a diferentes condições de pH e a agentes estressores como peróxido de hidrogênio e cloreto de cádmio (Lee *et al.*,



2010), enquanto em *S. Typhimurium* havia sido evidenciada sua participação na resposta a agentes antimicrobianos como a Polimixina B (Merighi *et al.*, 2009).

A análise transcriptômica via *oligoarray*, realizado com um mutante para *qseC* em *S. Typhimurium*, foi demonstrado que o gene *visP* estava em torno de 65 vezes aumentado em comparação à cepa selvagem. Esta análise apontou *visP* como o gene mais expresso (Moreira *et al.*, 2013), sendo esses dados coerentes com estudos anteriores realizados em EHEC e com estudo semelhante em *S. Typhimurium* (Cirillo *et al.*, 1998).

O gene *visP* está localizado em um *operon* adjacente e em direção oposta ao *operon qseBC* (Fig. 3).

**Figura 3** - Organização dos *operons ygiV/visP* e *qseBC*

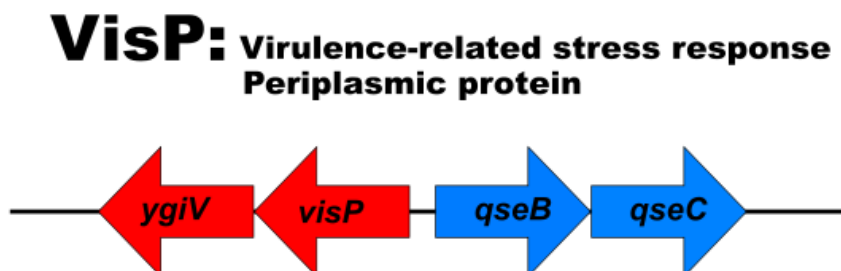


Fig. 3 – Localização do *operon* onde se encontra *visP*, adjacente e em direção oposta ao *operon qseBC* (Moreira *et al.*, 2013).

Previamente, VisP já havia sido classificada como uma proteína da família BOF (Oligonucleotide/oligosacáride Binding Fold), que se liga a oligossacarídeos (Ginalski *et al.*, 2004). Durante a realização de ensaio *in silico* com VisP, observou-se que a proteína se liga aos açúcares N-acetilglicosamina (NAG) e, em especial, N-acetilmurâmico (NAM), oligossacarídeos abundantes na camada de peptídeoglicano.

Evidenciou-se o papel que VisP pode desempenhar na homeostase da membrana, bem como na resposta ao estresse (Moreira *et al.*, 2013).

As análises cristalográficas da estrutura de VisP de *E. coli*, quando comparada à estrutura modelada dessa proteína em *S. Typhimurium*, sugerem que VisP é preservada entre essas espécies e possui seis resíduos de aminoácidos da bolsa de ligação de BOF, conservados entre os dois organismos e envolvidos na modulação da função dessas proteínas (Moreira *et al.*, 2013).

**Figura 4** - Estrutura de VisP

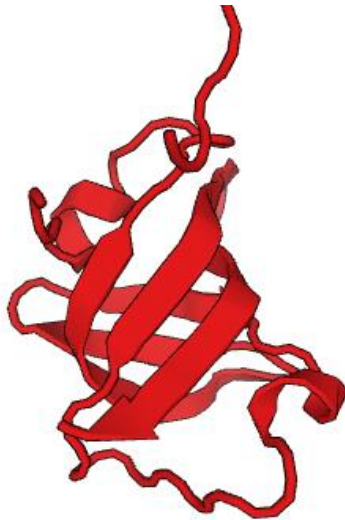


Fig. 4 - Estrutura da proteína periplasmática VisP de *E. coli*, Protein Data Bank: 1NNX.

Em ensaios *in vitro* com *S. Typhimurium*, com mutante de *visP*, foi evidenciado diminuição na replicação intracelular em macrófagos. Em ensaio *in vivo* com camundongos, *S. Typhimurium* mutantes de *visP* não foram virulentas para infecção sistêmica. Em EHEC nos testes realizados até o momento, VisP não apresentou um papel direto na virulência ou na patogenicidade, e sua função ainda não foi amplamente estudada em demais cepas de *E. coli* (Moreira *et al.*, 2013).

## **4. Objetivos**

O objetivo geral deste estudo foi investigar a importância da sinalização química na virulência de EAEC O104:H4 C227-11 (Stx+).

### **4.1. Objetivos específicos**

- I. Estudar os processos de virulência bacteriana, tais como a adesão em células epiteliais, a formação de biofilme e a motilidade nesta cepa de surto epidêmico e em comparação a outras cepas de perfis de patogenicidade semelhante.
- II. Investigar o papel do sensor quinase QseC e da sinalização química, bem como a importância da proteína periplasmática VisP na patogênese de EAEC O104:H4 C227-11 (Stx+).

## 5. Material e métodos

As cepas bacterianas foram cultivadas a 37° C, sob condições aeróbicas, meio LB (*Luria-Bertani*) e pH 7,0, sendo este último variável conforme a necessidade do estudo (Sambrook *et al.*, 1989). Todas as cepas foram estocadas em ultrafreezer a -80° C.

**Tabela 1** - Cepas utilizadas durante o desenvolvimento deste estudo

Nº de coleção	Patotipo/Sorotipo/Cepa	Marcadores de virulência	Referência
05	EHEC O157:H7 86-24	LEE e Stx2+	Griffin <i>et al.</i> , 1988
10	EPEC O127:H6 E2348/69	LEE e pEAF	Levine <i>et al.</i> , 1978
20	<i>E. coli</i> K12 DH5 $\alpha$	-	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
45	EAEC O104:H4 C227-11	pAA, AggR, AAF/I, Stx2+, Pic e SigA	Rasko <i>et al.</i> , 2011
188	EAEC O44:H18 042	pAA, AggR, AAF/II, Pet e Pic	Nataro <i>et al.</i> , 1985
190	EAEC O3:H2 17-2	pAA, AggR e AAF/I	Vial <i>et al.</i> , 1990
201	EAEC O104:H4 BA3826	pAA, AggR, AAF/III e Pic	Bueris <i>et al.</i> , 2007

A cepa EAEC BA3826, isolada em Salvador, BA, durante um estudo caso-controle para identificação de fatores de risco para diarreia entre crianças menores de 10 anos, foi gentilmente cedida pelo Dr. Waldir Pereira Elias Junior, Diretor do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan.

#### **6.4. Ensaio de formação de biofilme em superfícies abióticas e adesão em células HeLa**

A capacidade de EAEC formar biofilme em superfície abiótica foi investigada tal como foi previamente descrita (Sheikh *et al.*, 2001) e foi utilizado DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) como meio de cultura. As bactérias foram previamente cultivadas por 16-18h em meio LB sob agitação (250 rpm a 37° C). Em placas de poliestireno de 96 poços, o inóculo foi feito na proporção 1:100, na ausência e presença de 1% de D-manose, ou seu análogo,  $\alpha$ -metil D-manosídeo (não metabolizado por bactérias após longos períodos de incubação), para caracterizar a sensibilidade à manose de TIF (fímbria do tipo 1). As bactérias foram incubadas estaticamente a 37° por 24 horas. Foi utilizado PBS 1x estéril para lavagem dos poços. As células foram incubadas com 0,1% de Tween em PBS, por 10 minutos, e, então, foram feitas diluições seriadas e plaqueadas, em meio seletivo, para contagem de UFC (Moreira *et al.*, 2006).

Os ensaios de adesão em células HeLa foram realizados conforme previamente descrito (Cravioto *et al.*, 1979). Foram feitos em placas de 24 poços, em DMEM enriquecido com soro fetal bovino, na presença e ausência de 1% de D-manose ou  $\alpha$ -metil D-manosídeo, para caracterizar a sensibilidade à manose de TIF. As cepas bacterianas foram previamente cultivadas (como descrito no ensaio anterior) e a infecção foi realizada com um MOI (*Multiplicity of infection*) de 100:1, incubadas a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> por 3 ou 6 horas. Em seguida, o meio foi retirado, os poços foram lavados com PBS 1x (3 vezes) e as células foram incubadas com 1% de Triton X-100 em PBS, por 10 minutos, e, então, foram feitas diluições seriadas e

plaqueadas em meio seletivo para contagem UFC. Tanto os ensaios de formação de biofilme quanto os de adesão foram realizados em triplicata para cada cepa. Para esses ensaios, foram utilizadas as cepas C227-11, BA3826, 042, 17-2 e EPEC E2348/69.

### **6.5. Ensaio de resposta ao estresse**

Os ensaios de resistência ao estresse realizaram-se a partir de um pré-inóculo (16-18h). Um novo cultivo foi feito sob agitação (250 rpm a 37°C) até atingir a densidade óptica de 1.0 (600nm). Para o ensaio de resistência ao pH ácido, a cultura foi diluída 40 vezes em PBS (pH 7.2 para determinar o número inicial de células) ou LB (pH 2.5 e 5.0), sendo que ambos foram incubados estaticamente por 60 minutos a 37°C. A porcentagem de sobrevivência foi calculada a partir do número de UFC depois de cada exposição ao estresse, dividido pelo número inicial de UFC por mL. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada cepa (Moreira *et al.*, 2013).

### **6.6. Extração de RNA**

As extrações de RNA foram feitas a partir de cultivo bacteriano em LB a 37°C, sob agitação, até que fosse atingida a densidade óptica de 1,0 (DO<sub>600</sub>). Também foram realizadas diretamente de fezes coletadas durante o ensaio *in vivo* com camundongos infectados. Foi empregado o TRIzol® (Ambion) para romper a célula, inativar a enzima

RNAse e dissolver os componentes celulares. Foi adicionado clorofórmio para separação de fases, dado que o RNA está contido na fase aquosa, enquanto a fase intermediária contém o DNA e a fase orgânica possui as proteínas e demais componentes celulares. Adicionou-se à fase aquosa etanol 100% para solubilizar o RNA e, através de uma coluna de separação, o RNA foi eluído. Em seguida, foi utilizado o *RiboPure Bacteria RNA Isolation Kit* da Ambion-Life, de acordo com as instruções do fabricante.

### **6.7. Análise de Expressão gênica via qRT-PCR**

Os ensaios foram feitos em duplicatas biológicas e duplicatas técnicas. O volume final de cada reação foi de 20  $\mu$ L, contendo *Master Mix SYBR®*, *Multi-scribe® Reverse Transcriptase*, *RNAse inhibitor (Thermo Fisher Scientific)* e 100ng de RNA. Todos os dados foram normalizados com um controle endógeno (*rpoA* para genes de virulência e *rRNA 16S* do Dominio Bacteria para o total de bactérias presentes nas fezes). Foi utilizado o *QuantStudio3 (Thermo Fisher Scientific)* para realização das reações de qRT-PCR, e os resultados obtidos foram analisados pelo método de *Comparative critical threshold ( $\Delta\Delta$ CT)*, conforme previamente descrito (Walters e Sperandio, 2006).

**Tabela 2** - Sequências dos iniciadores utilizados neste estudo

<b>Alvo</b>	<b>Forward (5'-3')</b>	<b>Reverse (5'-3')</b>	<b>Referência</b>
<i>qseC</i>	cgctgaaagtgcaaaccgaa	ccgcgatagagtgagcagtt	Este estudo
<i>visP</i>	atgcgtcaacgatattgccg	cgaccgtagaaagcgcaaaa	Este estudo
<i>fimH</i>	cggggtgatggattctcgtt	tctgggatctccaccatgt	Este estudo
<i>motA</i>	ttaccgccgcgacgata	ccaacagtctggcgatggt	Moreira <i>et al.</i> , 2010
<i>rpoA</i>	gcgctcatcttctccgaat	cgcggtcgtggttatgtg	Moreira <i>et al.</i> , 2010
<i>stx2</i>	acccaccgggagcagtt	ggtcaaaacgcgcctgata	Rasko, Moreira, Li De, <i>et al.</i> , 2008
Filo Bacteria Eub338F/Eub518R	actcctacgggagcagcagtt	attaccgcggtgctggc	Fierer <i>et al.</i> , 2005
Filo Firmicutes 928F-Firm/1040FirmR	tgaaactyaaaggaattgacg	accatgcaccacctgtc	Bacchetti De Gregoris <i>et al.</i> , 2011
Filo Bacteroidetes 798cfbF/cfb967R	craacaggattagataccct	ggtaagggtcctcgcgtat	Bacchetti De Gregoris <i>et al.</i> , 2011

### 6.8. Ensaio *in vivo* com camundongo C57BL/6 para análise da microbiota após infecção

Os animais foram adquiridos no CEMIB/UNICAMP e mantidos no Biotério do Departamento de Ciências Biológicas da FCFar/UNESP. A utilização de animais neste trabalho foi previamente aprovada pelo CEUA/FCF/CAR: 23/2016. Para este ensaio, foram utilizados 23 camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6J UNIB, com peso entre 10 e 12 gramas e idade entre 3 e 5 semanas. Os camundongos foram tratados com 20 mg/mL de ampicilina por gavagem, 24 horas antes da infecção, para depleção da microbiota. O ensaio foi dividido em quatro grupos experimentais, um com *E. coli* K12 DH5 $\alpha$  (não patogênica), como controle negativo, e os outros três com *E. coli* enteroagregativa C227-11, BA3826 e 042, respectivamente.



**Tabela 3** - Grupos experimentais do ensaio *in vivo* com camundongos

C57BL/6

<b>Grupo 1</b>	<b>Grupo 2</b>	<b>Grupo 3</b>	<b>Grupo 4</b>
DH5 $\alpha$ (N=5)	C227-11 (N=6)	BA3826 (N=6)	042 (N=6)

Para a infecção, as cepas foram cultivadas por 16-18 horas e, então, centrifugadas e ressuspendidas em PBS. Os animais foram infectados com  $1 \times 10^{10}$  de bactérias por gavagem. Antes da administração do antibiótico e da infecção, os animais permaneceram em jejum por 4 horas. Imediatamente após os procedimentos, a ração e a água foram reintroduzidas. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com prévio estudo (Zangari *et al.*, 2013), salvo modificações aqui apontadas. As fezes foram coletadas nos dias 0, 1, 5, 10 e 15 após a infecção para extração do RNA, como descrito em material e métodos. As reações de qRT-PCR foram realizadas utilizando *primers* para amplificar a região *rRNA 16S* para bactérias da microbiota pertencentes aos Filos Bacteroidetes e Firmicutes (Tabela 2). A expressão gênica de cada *taxon* foi normalizada com um controle endógeno (*rRNA 16S* do Dominio Bacteria) e, então, comparada com o nível de expressão presente nas cepas, coletadas no dia 0, correspondentes a cada grupo experimental.

### 6.8. Ensaio de motilidade

Os ensaios de motilidade via flagelo (*swimming*) foram realizados em placas contendo LB ágar semi-sólido (0,3%) a partir de um pré-inóculo (16-18h). As cepas foram individualmente inoculadas (5uL) no centro das placas e incubadas a 37°C por 8 e 24 horas. Após esse período de incubação, o diâmetro do halo crescimento foi mensurado para análises posteriores (Sperandio *et al.*, 2003; Moreira *et al.*, 2010).

### **6.9. Análise estatística**

Os dados obtidos foram analisados com o *GraphPad Prism 7*, a significância estatística entre os grupos bacterianos foi determinada por meio do teste *t- Student* e ANOVA (*Oneway analysis of variance*). Valores de *P* inferiores ou iguais a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

## 7. Resultados

### 7.1. Ensaio de formação de biofilme

Os ensaios de formação de biofilme foram realizados com as cepas C227-11 e BA3826 e com as cepas protótipos 042, 17-2 e EPEC E2348/69. Foram feitos em placas de 96 poços, na presença e ausência de D-manose ou  $\alpha$ -metil D-manosídeo, e incubadas a 37°C por 24 horas, conforme previamente descrito. A cepa C227-11 não apresentou diferença em seu fenótipo de adesão na presença de D-manose e não pôde, assim, evidenciar a participação de TIF na formação de biofilme nesse experimento. Foi observado o mesmo resultado para a 17-2, como já relatado na literatura. A sensibilidade das cepas 042 e EPEC E2348/69 à D-manose, demonstrada aqui, também já fora evidenciada anteriormente (Moreira *et al.*, 2003; Moreira *et al.*, 2006). Quando comparada com as outras cepas, a C227-11 não apresentou diferença em seu fenótipo de adesão em comparação com a 042, no entanto, apresentou diferenças estaticamente significativas em relação às cepas 17-2 e EPEC E2348/69, em uma ordem de magnitude de 0,5 e 1,2 respectivamente (Figura 5). Foi utilizado um análogo como alternativa ao uso de D-manose, o  $\alpha$ -metil D-manosídeo, com as cepas C227-11 e BA3826. Na presença do  $\alpha$ -metil D-manosídeo, tanto a C227-11 quanto a BA3826 apresentaram redução na formação de biofilme, em uma ordem de magnitude de 0,7 e 0,4 respectivamente. Quando comparadas, as duas cepas não apresentaram diferenças significativas entre si (Figura 6).

**Figura 5** - Análise quantitativa da formação de biofilme após 24 horas de incubação

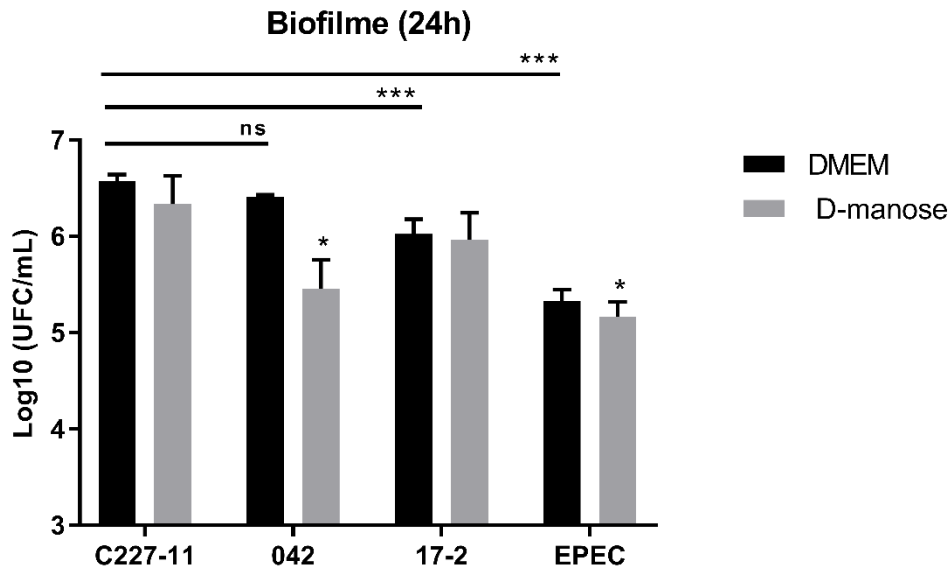


Fig. 5 – Ensaio de formação de biofilme em superfície abiótica com EAEC C227-11, EAEC 042, EPEC E2348/69 e EAEC 17-2, incubadas na ausência e presença de D-manose. Significância estatística em comparação com as cepas na ausência e presença de D-manose, com EAEC C227-11 em comparação com EAEC 042, EPEC E2348/69 e EAEC 17-2,  $p < 0,0001$  (\*\*\*),  $p < 0,05$  (\*), ns- não significativo.

**Figura 6** - Análise quantitativa da formação de biofilme após 24 horas de incubação

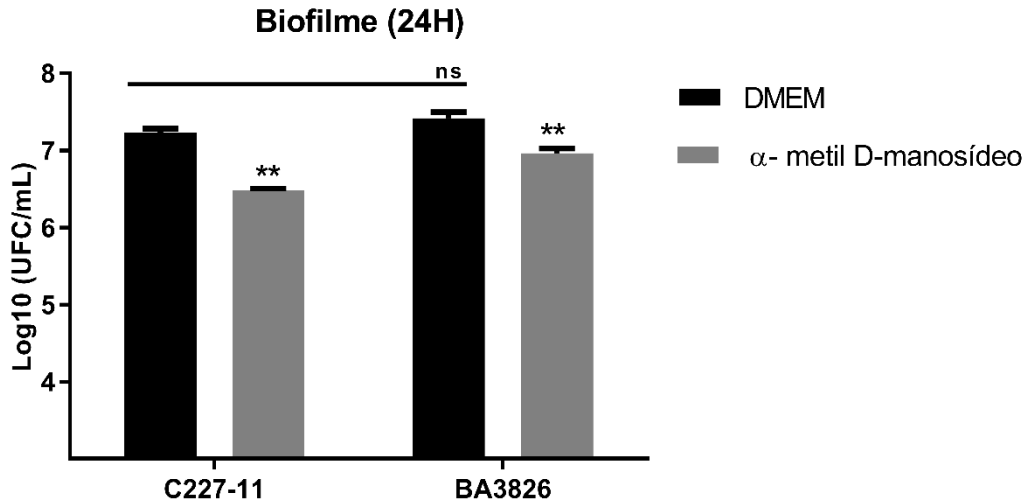


Fig. 6 - Ensaio de formação de biofilme em superfície abiótica com EAEC C227-11 e EAEC BA3826, incubadas na ausência e presença de  $\alpha$ -metil D-manosídeo. Significância estatística em comparação com as cepas na ausência e presença de  $\alpha$ -metil D-manosídeo, com EAEC C227-11 em comparação com EAEC BA3826,  $p < 0,001$  (\*\*), ns- não significativo.

## 7.2. Ensaios de adesão em células HeLa

Os ensaios de adesão em células HeLa foram realizados com as cepas C227-11 e BA3826 e com as cepas protótipos 042, 17-2 e EPEC E2348/69. Foram feitos em placas de 24 poços, na presença e ausência de D-manose ou  $\alpha$ - metil D-manosídeo, incubadas a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub>, por 3 e 6 horas, conforme previamente descrito. A cepa C227-11 não apresentou diferença em seu fenótipo de adesão na presença de D-manose. As outras cepas, novamente, apresentaram o mesmo fenótipo (Figuras 7 e 8) demonstrado no experimento anterior (Figura 5). Quando comparada com as demais, a C227-11 apresentou um fenótipo de adesão

mais acentuado em relação à 042, 17-2 e EPEC E2348/69, em uma ordem de magnitude de 0,5, 0,7 e 0,3, respectivamente, para o ensaio de 3 horas (Figura 7). No ensaio de 6 horas, o fenótipo de adesão da C227-11 manteve-se mais acentuado, em uma ordem de magnitude de 0,5, 0,9 e 0,4, em comparação com as outras cepas, como demonstrado acima (Figura 8).

**Figura 7** - Análise quantitativa de adesão em células epiteliais HeLa após 3 horas de incubação

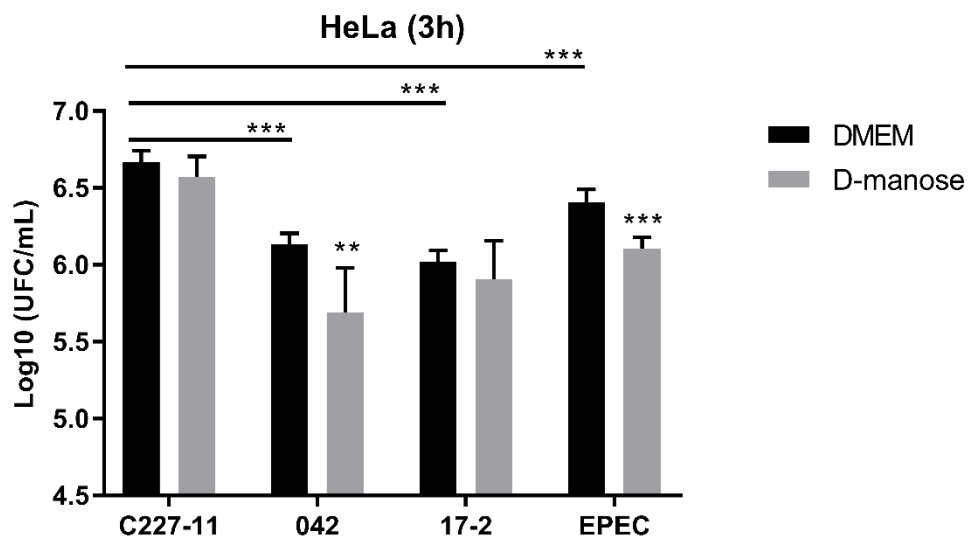


Fig. 7 – Ensaio de adesão em células HeLa com EAEC C227-11, EAEC 042, EAEC 17-2 e EPEC E2348/69, incubadas na ausência e presença de D-manose durante 3 horas em estufa de CO<sub>2</sub>. Significância estatística em comparação com as cepas na ausência e presença de D-manose, com EAEC C227-11 em comparação com EAEC 042, EAEC 17-2 e EPEC E2348/69,  $p < 0,0001$  (\*\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*).

**Figura 8** - Análise quantitativa de adesão em células epiteliais HeLa após 6 horas de incubação

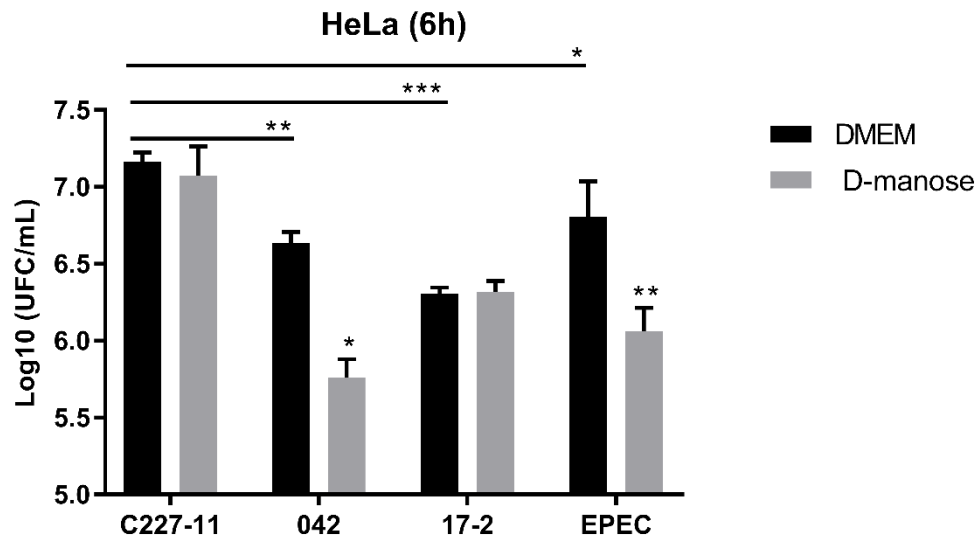


Fig. 8 – Ensaio de adesão em células HeLa com EAEC C227-11, EAEC 042, EAEC 17-2 e EPEC E2348/69, incubadas na ausência e presença de D-manose durante 6 horas em estufa de CO<sub>2</sub>. Significância estatística em comparação com as cepas na ausência e presença de D-manose, com EAEC C227-11 em comparação com EAEC 042, EAEC 17-2 e EPEC E2348/69,  $p < 0,0001$  (\*\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*),  $p < 0,05$  (\*).

Os ensaios realizados com  $\alpha$ -metil D-manosídeo não revelaram diferenças no fenótipo de adesão tanto para o período de 3 horas quanto para o período de 6 horas de incubação. Quando comparadas, as cepas C227-11 e BA3826 não apresentaram diferenças significativas entre si (Figuras 9 e 10).

**Figura 9** - Análise quantitativa de adesão em células epiteliais HeLa após 3 horas de incubação

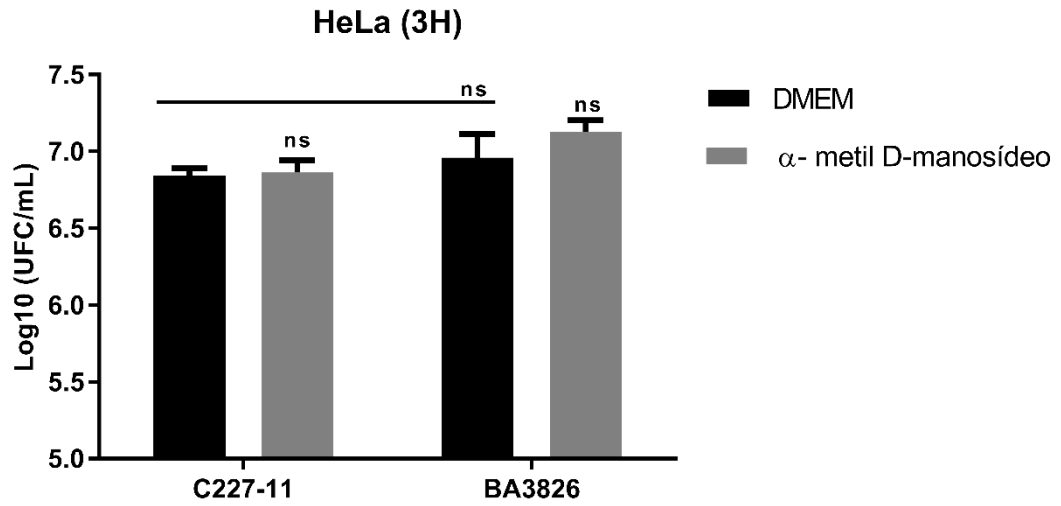


Fig. 9 - Ensaio de adesão em células HeLa com EAEC C227-11 e EAEC BA3826, incubadas na ausência e presença de α-metil D-manosídeo, durante 3 horas em estufa de CO<sub>2</sub>. Significância estatística em comparação com as cepas na ausência e presença de α-metil D-manosídeo, ns- não significativo.



**Figura 10** - Análise quantitativa de adesão em células epiteliais HeLa após 6 horas de incubação

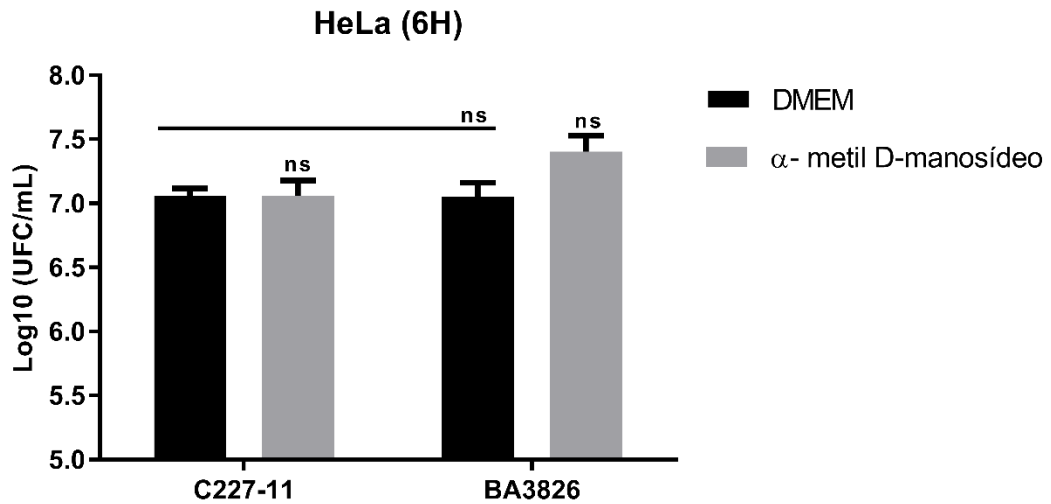


Fig. 10 - Ensaio de adesão em células HeLa com EAEC C227-11 e EAEC BA3826, incubadas na ausência e presença de  $\alpha$ -metil D-manosídeo durante 6 horas em estufa de  $\text{CO}_2$ . Significância estatística em comparação com as cepas na ausência e presença de  $\alpha$ -metil D-manosídeo, ns- não significativo.

### 7.3. Análise de expressão gênica via qRT-PCR

A técnica de qRT-PCR foi empregada com o intuito de analisar a expressão de genes relacionados à sinalização química e à virulência, a partir de RNA extraído das cepas C227-11, EHEC 86-24, 042 e 17-2.

A análise de expressão do gene *qseC*, que codifica para o sensor histidina quinase, demonstra que a cepa C227-11 apresenta o mesmo nível de expressão desse gene em comparação com EHEC. Já as cepas 17-2 e 042 apresentam a expressão 2,4 e 7,3 vezes menor, respectivamente (Figura 11).

**Figura 11** - Expressão gênica relativa do gene que codifica para o sensor histidina quinase QseC

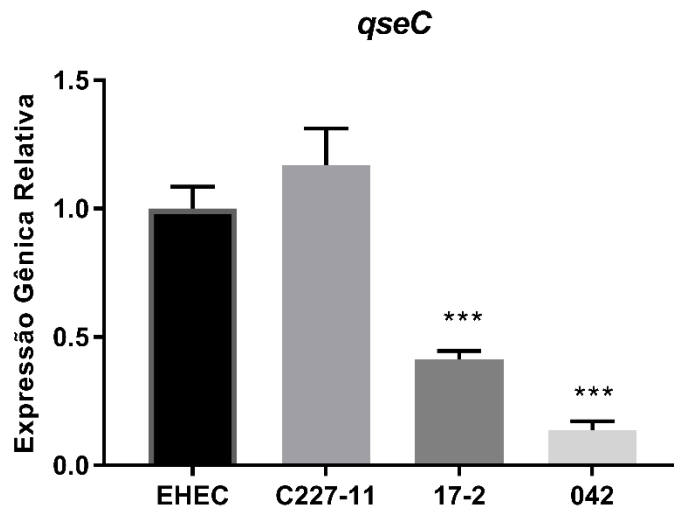


Fig. 11 - Análise de expressão gênica relativa via qRT-PCR do gene *qseC*, realizada com as cepas EHEC 86-24, EAEC C227-11, EAEC 042, e EAEC 17-2. Análise estatística em comparação com a cepa EHEC 86-24,  $p < 0,0001$  (\*\*\*).

Interessantemente, a expressão do gene *stx*, que codifica para a toxina de Shiga, foi 32 vezes menos expressa em relação à EHEC 86-24 (Figura 12).

**Figura 12** - Expressão gênica relativa do gene que codifica para a toxina de Shiga

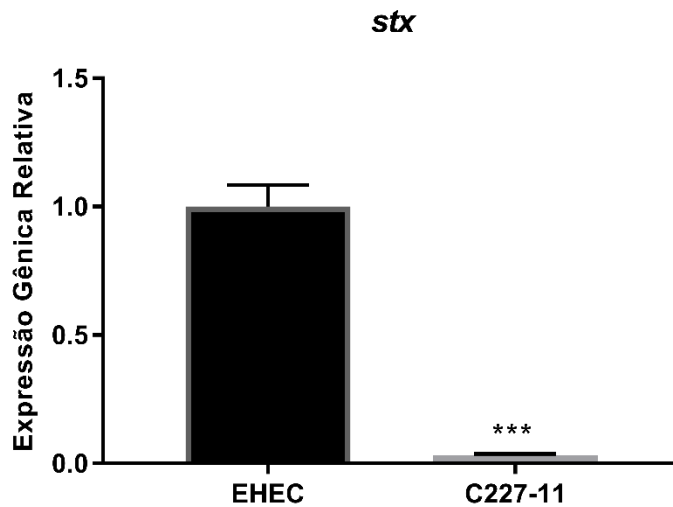


Fig. 12 - Análise de expressão gênica relativa via qRT-PCR do gene *stx*, realizada com as cepas EHEC 86-24 e EAEC C227-11. Análise estatística em comparação com a cepa EHEC 86-24,  $p < 0,0001$  (\*\*\*)).

O gene *visP*, que codifica para a proteína periplasmática VisP, foi 82,4 vezes mais expresso na cepa C227-11 em relação à EHEC 86-24, enquanto que as cepas 17-2 e 042 apresentaram um nível de expressão de 2,2 e 56,6 respectivamente (Figura 13).

O gene *fimH* codifica para a pilina da fímbria tipo 1 e sua expressão na cepa C227-11 foi 2 vezes maior em relação a cepa protótipo 042 (Figura 14).

**Figura 13** - Expressão gênica relativa do gene que codifica para a proteína

VisP

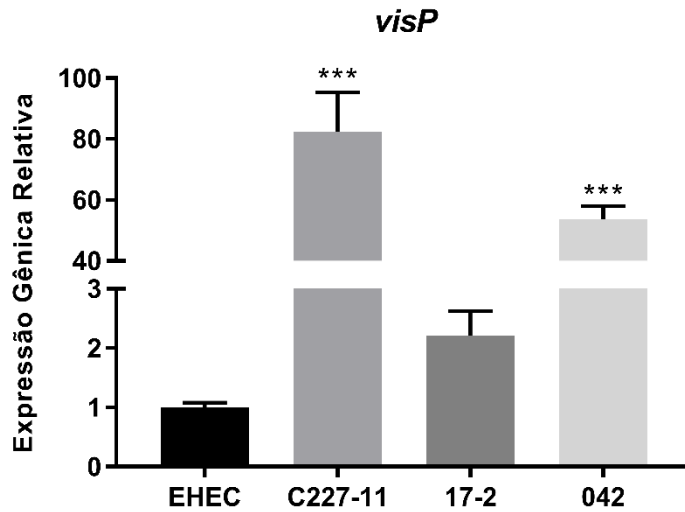


Fig. 13 - Análise de expressão gênica via qRT-PCR do gene *visP*, realizada com as cepas EHEC 86-24, EAEC C227-11, EAEC 042, e EAEC 17-2. Análise estatística em comparação com a cepa EHEC 86-24,  $p < 0,0001$  (\*\*\*).

**Figura 14** - Expressão gênica relativa do gene que codifica para pilina de TIF

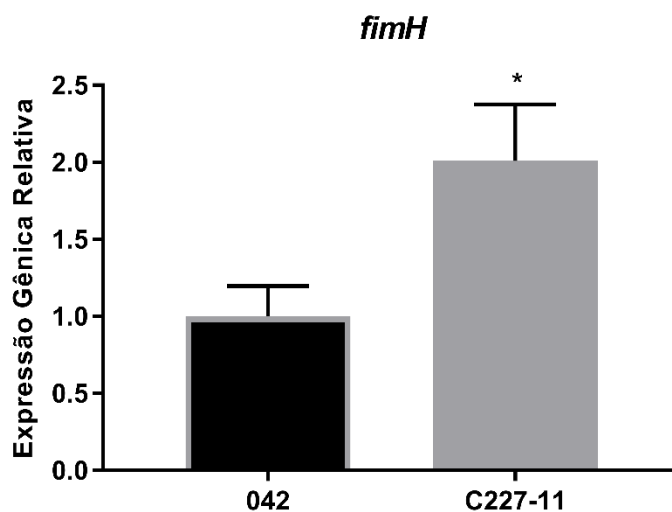


Fig. 14 - Análise de expressão gênica via qRT-PCR do gene *fimH*, realizada com as cepas EAEC C227-11 e EAEC 042. Análise estatística em comparação com a cepa EAEC 042,  $p < 0,05$  (\*).

A análise da expressão do gene *motA*, que está envolvido na movimentação do flagelo, revelou que a expressão desse gene é 161,8 e 71,5 vezes menor nas cepas C227-11 e 042, respectivamente, em relação à EHEC 86-24 (Figura 15).

**Figura 15** - Expressão gênica relativa do gene que codifica para a proteína MotA

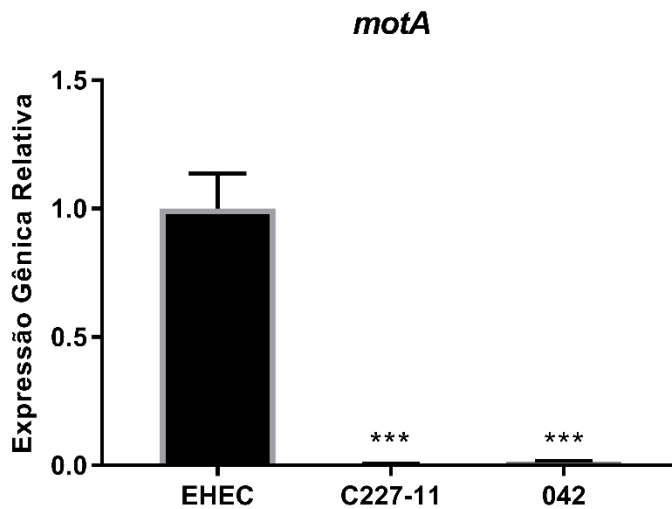


Fig. 15 – Análise de expressão gênica via qRT-PCR do gene *motA*, realizada com as cepas EHEC 86-24, EAEC C227-11 e EAEC 042. Análise estatística em comparação com a cepa EHEC 86-24,  $p < 0,0001$  (\*\*\*)

#### 7.4. Ensaio de motilidade

Os ensaios de motilidade foram realizados com as cepas EHEC 86-24, C227-11, 042 e BA3826, em LB ágar 0,3%. Elas foram incubadas a 37°C por 8 e 24 horas. No ensaio de 8 horas, as cepas apresentaram um fenótipo de motilidade reduzido em comparação à EHEC 86-24, de 53,8% para C227-11, 76,4% para 042 e de 21,7% para BA3826. Após o período de 24 horas de incubação, o fenótipo manteve-se

reduzido em 30,3%, 82,3% e 13,5%, respectivamente, evidenciando uma diferença mais acentuada para a 042 (Figura 16).

**Figura 16** - Medida dos halos de crescimento após 8 e 24 horas de incubação

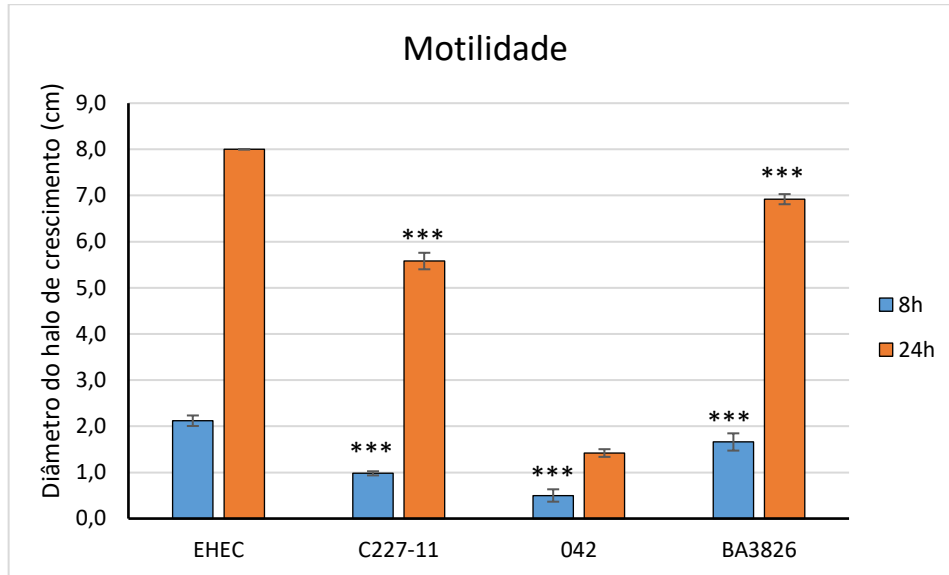


Fig. 16 - Medida dos halos de crescimento após 8 e 24 horas de incubação a 37 °C, em LB ágar 0,3%, com as cepas EHEC 86-24, EAEC C227-11, EAEC 042 e EAEC BA3826. Análise estatística em comparação com a cepa EHEC 86-24,  $p < 0,0001$  (\*\*\*)

### 7.5. Ensaio de resposta ao estresse

Para avaliar a resposta ao estresse, as cepas EHEC 86-24, C227-11 e 042 foram incubadas em meio com pH 7.2, 5.0 e 2.5 por uma hora. Foram feitas diluições seriadas, plaqueadas em meio seletivo para contagem de UFC e cálculo de porcentagem de sobrevivência. Em pH 5.0, observou-se que a EHEC apresentou uma maior porcentagem de sobrevivência (8,7%) e a 042 apresentou uma porcentagem menor (5,8%), em comparação com a C227-11 (Figura 17). As três cepas

apresentaram uma alta porcentagem de sobrevivência nessas condições. Em pH 2.5, a EHEC demonstrou novamente maior percentual de sobrevivência (9,4%) e a 042, uma significativa diminuição em seu percentual (49,1%) com relação à C227-11 (Figura 18).

**Figura 17** - Porcentagem de sobrevivência após incubação em meio com pH

5.0

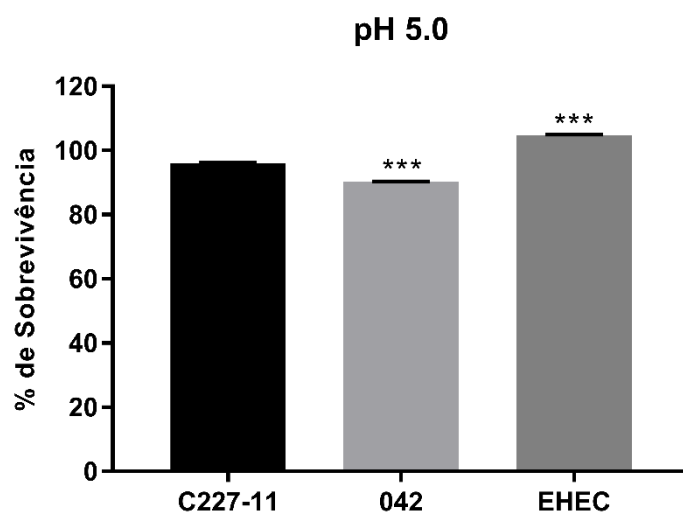


Fig. 17 – Ensaio de resposta ao estresse, em meio com pH 5.0, com as cepas EHEC 86-24, EAEC C227-11 e EAEC 042. Análise estatística em comparação com a cepa EHEC 86-24,  $p < 0,0001$  (\*\*\*)

**Figura 18** - Porcentagem de sobrevivência após incubação em meio com pH 2,5

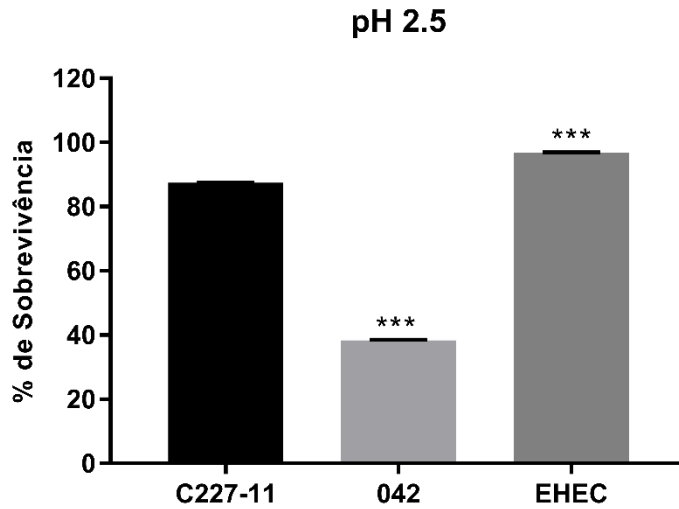


Fig. 18 – Ensaio de resposta ao estresse, em meio com pH 2.5, com as cepas EHEC 86-24, EAEC C227-11 e EAEC 042. Análise estatística em comparação com a cepa EHEC 86-24,  $p < 0,0001$  (\*\*\*)

### 7.6. Análise da abundância relativa da microbiota após infecção em camundongos C57BL/6

A abundância relativa da microbiota para avaliar a predominância dos Filos Bacteroidetes e Firmicutes, em cada grupo experimental, foi analisada por ensaios de qRT-PCR a partir de RNA isolado das fezes de camundongos previamente tratados com ampicilina e infectados com *E. coli* DH5 $\alpha$  e com as cepas de EAEC C227-11, BA3826 e 042, nas coletas realizadas em longos períodos, ou, especificamente, nos dias 0, 1, 5, 10 e 15 após a infecção.



No dia 1 após a infecção, houve uma predominância alta de bactérias do Filo Bacteroidetes para todos os grupos que atingiram um percentual de 99% (Figura 19).

**Figura 19** - Abundância relativa da microbiota 1 dia após a infecção

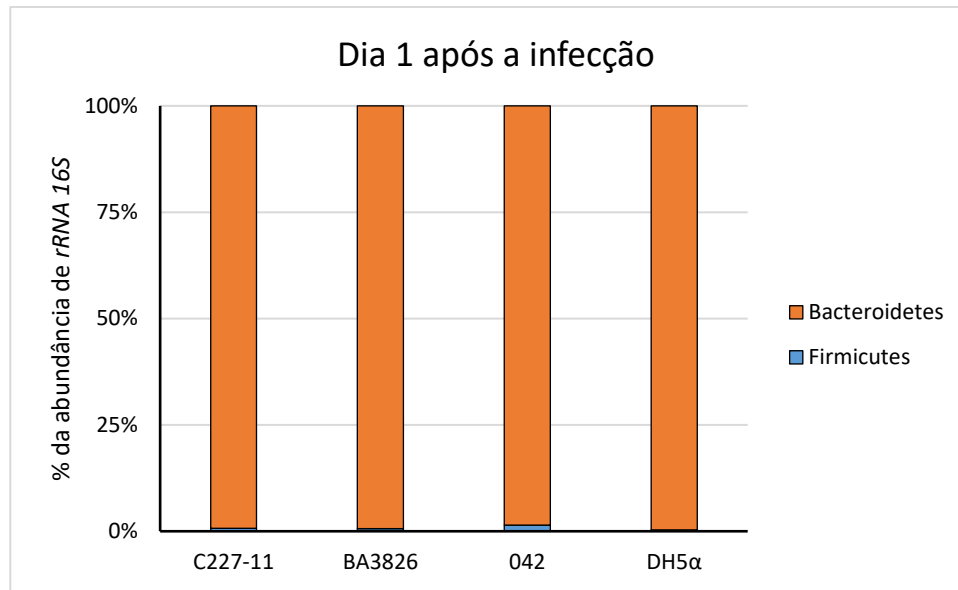


Fig. 19 – Análise da abundância relativa dos Filos Bacteroidetes e Firmicutes via qRT-PCR, realizada a partir de RNA isolado de fezes de camundongos infectados com *E. coli* DH5α, EAEC C227-11, EAEC BA3826 e EAEC 042. Coletas no dia 1 após a infecção. Nível de expressão gênica comparado ao nível apresentado pelas cepas no dia 0.

Novas análises foram realizadas 5 dias após a infecção e passaram a ser evidentes as mudanças ocasionadas após esse período, principalmente para o grupo infectado com a C227-11, sendo que Bacteroidetes corresponderam a 41% e Firmicutes, a 59% - houve um notável aumento para este último. O grupo infectado com a BA3826 não apresentou diferenças significativas em relação ao dia 1, e um camundongo morreu no 7º dia após a infecção (dados não apresentados). Para o grupo infectado com a 042, manteve-se a predominância de Bacteroidetes, com um

ligeiro aumento de Firmicutes, e duas mortes, no 4<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> dias após a infecção (dados não apresentados). Um padrão semelhante de expressão ocorreu com o grupo infectado com a *E. coli* DH5 $\alpha$  (Figura 20).

**Figura 20** - Abundância relativa da microbiota 5 dias após a infecção

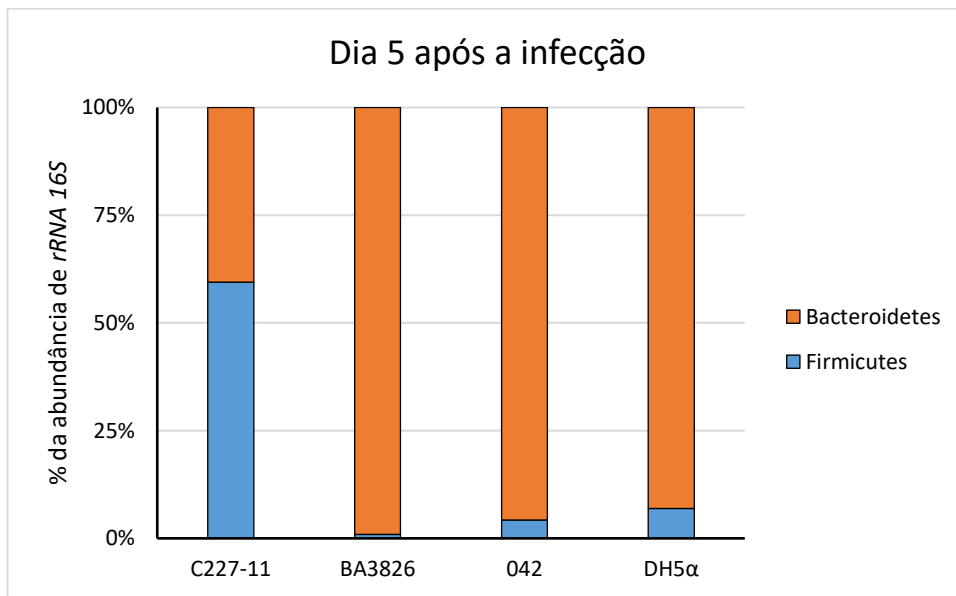


Fig. 20 – Análise da abundância relativa dos Filos Firmicutes e Bacteroidetes via qRT-PCR, realizada a partir de RNA isolado de fezes de camundongos infectados com *E. coli* DH5 $\alpha$ , EAEC C227-11, EAEC BA3826 e EAEC 042. Coletas no dia 5 após a infecção. Nível de expressão gênica comparado ao nível apresentado pelas cepas no dia 0.

As análises no dia 10 após a infecção, quando comparadas àquelas do dia 5, revelaram grande redução de Firmicutes no grupo infectado com a C227-11, representando apenas 11%, e, novamente, Bacteroidetes voltou a predominar. Já o grupo infectado com a BA3826 manteve-se sem consideráveis alterações em relação aos dias anteriores. Os grupos infectados com a 042, a BA3826 e *E. coli* DH5 $\alpha$

apresentaram uma pequena redução para Firmicutes em relação ao dia 5, de 2%, 1% e 7% respectivamente, mantendo a predominância de Bacteroidetes (Figura 21).

**Figura 21 -** Abundância relativa da microbiota 10 dias após a infecção

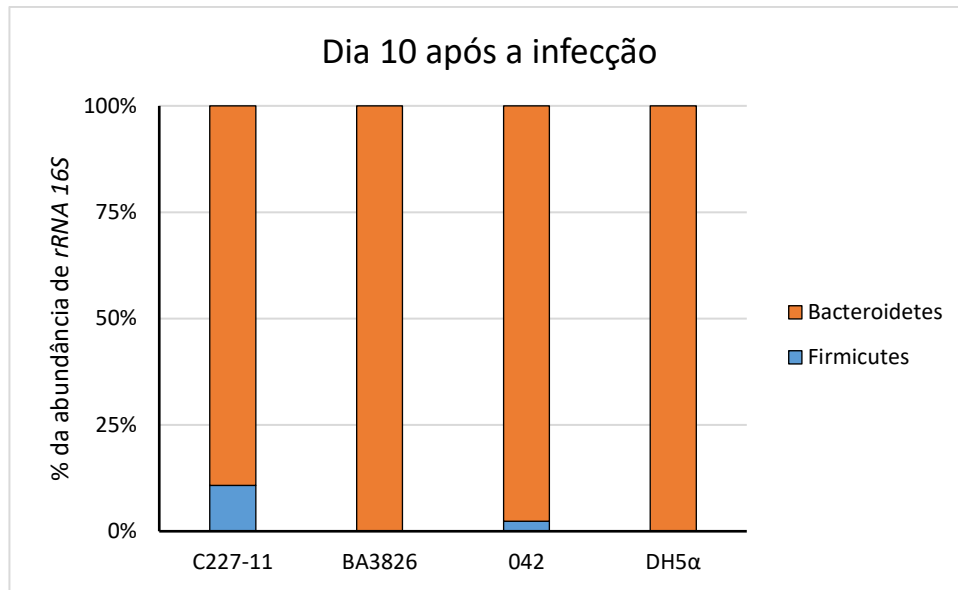


Fig. 21 – Análise da abundância relativa dos Filos Firmicutes e via qRT-PCR, realizada a partir de RNA isolado de fezes de camundongos infectados com *E. coli* DH5α, EAEC C227-11, EAEC BA3826 e EAEC 042. Coletas no dia 10 após a infecção. Nível de expressão gênica comparado ao nível apresentado pelas cepas no dia 0.

Embora no dia 15 tenha ocorrido um aumento de Firmicutes para os grupos infectados com a C227-11, a BA3826 e *E. coli* DH5α, em comparação com o dia anterior, Bacteroidetes continua sendo o Filo predominante, correspondendo à 77%, 95% e 84% do total respectivamente. Supreendentemente, para o grupo infectado com a 042, Firmicutes apresentou um percentual de 83%, superando todos os outros dias (Figura 22).

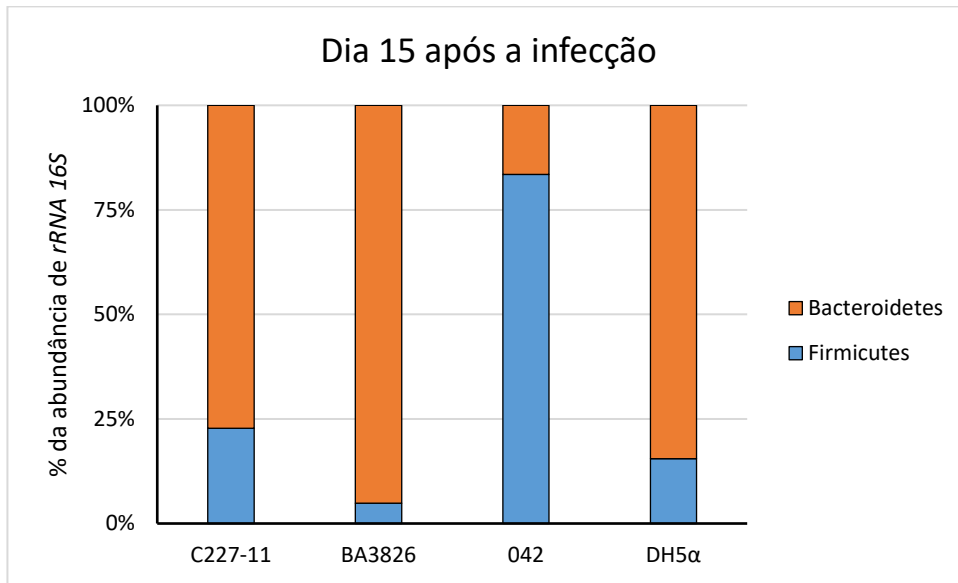
**Figura 22** - Abundância relativa da microbiota 15 dias após a infecção

Fig. 22 – Análise da abundância relativa dos Filos Firmicutes e Bacteroidetes via qRT-PCR, realizada a partir de RNA isolado de fezes de camundongos infectados com *E. coli* DH5α, EAEC C227-11, EAEC BA3826 e EAEC 042. Coletas no dia 15 após a infecção. Nível de expressão gênica comparado ao nível apresentado pelas cepas no dia 0.

## 8. Discussão

Isolados de EAEC formam um grupo altamente heterogêneo de bactérias, e cada isolado específico carrega um subconjunto exclusivo de genes de virulência associados, sendo assim, nenhum fator de virulência único está consistentemente associado a sua patogênese (Nataro e Kaper, 1998; Czeczulin *et al.*, 1999; Okeke *et al.*, 2000; Boisen *et al.*, 2012; Estrada-Garcia e Navarro-Garcia, 2012).

A cepa do estudo EAEC O104:H4 C227-11 representa uma rara combinação de características de EAEC clássica e expressão de Stx2a. Apenas casos esporádicos de doença associada a EAEC produtoras de Stx foram previamente descritos, no entanto, um caso evidente dessa combinação causou um grande surto (Rasko *et al.*, 2011; Zangari *et al.*, 2013). A adição de *stx2* para o repertório de genes de virulência levou a um agente patogênico que tem a capacidade de causar doença em grande escala, com um resultado potencialmente mortal devido à possibilidade de desenvolvimento de SHU (Zangari *et al.*, 2013).

A adesão ao epitélio é um passo essencial durante o processo de colonização bacteriana no intestino e, em EAEC, é facilitado por adesinas e AAFs, seguido da formação de um espesso biofilme, sendo este um importante mecanismo de patogenicidade desse patótipo (Hicks *et al.*, 1996; Czeczulin *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 2004). Os resultados do ensaio de formação de biofilme, no período de 24 horas e em superfície abiótica, evidenciaram um padrão para a C227-11 semelhante não só ao apresentado pela 042, mas também ao da cepa BA3826, igualmente uma O104:H4 (Bueris *et al.*, 2007). Quando comparada com as outras cepas, a 17-2 e a EPEC E2348/69 apresentou notavelmente um padrão mais acentuado para a formação de

biofilme. Contudo, em cultivo celular (3 e 6 horas), apresentou acentuado padrão de adesão em relação a todas as outras cepas, sendo que o mesmo padrão se dá em relação à BA3826. Em um estudo com células T84, foi demonstrado que AAF/I, localizada no plasmídeo pAA e presente na cepa C227-11, foi suficiente para aumentar a permeabilidade da monocamada de células epiteliais, contribuindo assim para o aumento da translocação de Stx através do epitélio. Porém, o mesmo não foi observado na presença da EHEC 86-24 (Boisen *et al.*, 2014). Esses dados são consistentes com o trabalho de Zhang e colaboradores (2013), que evidenciaram que a provável perda do plasmídeo pAA, durante o curso da doença no período do surto, teria diminuído a capacidade da EAEC O104:H4 Stx+ causar SHU, uma vez que sua presença aumentava a probabilidade do desenvolvimento da síndrome (Zhang *et al.*, 2013). A análise de expressão gênica para o gene *stx* demonstrou um nível de expressão significativamente menor para a C227-11, em relação ao da EHEC 86-24, nas condições aqui testadas. No entanto, é provável que a EAEC seja mais eficiente em transportar a toxina do epitélio intestinal até a corrente sanguínea, devido a sua capacidade de formação de biofilme mediada por AAFs, fator esse que por si só complica sua patogênese.

A fímbria do tipo I (TIF) é a adesina mais comum encontrada em *Enterobacteriaceae* e, geralmente, é observada em isolados de *E. coli* comensais e patogênicas. Essa fímbria interage com resíduos de manose presentes em receptores de células eucarióticas (Ofek e Doyle, 1994; Hernandez *et al.*, 2008). TIF foi relatada como responsável pela adesão inicial em *E. coli* K12 (Pratt e Kolter, 1998) e como um importante fator de virulência em *E. coli* uropatogênica (Johnson, 1991). Na EAEC 042, um mutante, incapaz de produzir a fímbria, apresentou uma significativa redução na formação de biofilme e no padrão AA (Moreira *et al.*, 2003). Foi possível

demonstrar, aqui, a participação de TIF na formação de biofilme com a C227-11, corroborando a análise de expressão gênica para *fimH*, que revelou nível semelhante à 042 e levantou a hipótese de sua participação no processo para esta cepa. Embora o mesmo fenótipo não tenha sido demonstrado nos ensaios de adesão com células epiteliais, não se pode excluir seu papel na adesão inicial sem investigações complementares.

As bactérias devem reconhecer o ambiente hospedeiro para expressar tanto genes essenciais para a colonização como aqueles que estão envolvidos na patogênese (Sperandio *et al.*, 2003). Sendo assim, a capacidade de detectar sinais do ambiente pode permitir ao patógeno a modulação da expressão de genes de virulência em resposta ao estado fisiológico do hospedeiro, permitindo uma rápida adaptação às mudanças ambientais (Hughes e Sperandio, 2008). Portanto, não é surpreendente que as bactérias possam responder a hormônios do hospedeiro e que algumas espécies patogênicas possam promover doença a partir desses sinais. EHEC é um exemplo de patógeno que detecta esses hormônios para regular a expressão de seus fatores de virulência. Ao atingir o cólon humano, através do sensor histidina quinase QseC, EHEC detecta o autoindutor-3 (AI-3), produzido pela flora microbiana gastrointestinal, a epinefrina e a norepinefrina, produzidas pelo hospedeiro. Esta transdução de sinal ativa a transcrição de genes de virulência de uma forma coordenada e conduz à formação de lesões histopatológicas A/E em células intestinais, a partir da expressão de genes da ilha de patogenicidade LEE, da regulação flagelar e da produção de toxina de Shiga (Sperandio *et al.*, 2003; Clarke e Sperandio, 2005; Njoroge e Sperandio, 2012). A cepa C227-11 demonstrou um nível de expressão gênica semelhante ao da EHEC 86-24, o que abre perspectivas para a investigação da via de sinalização dessa cepa e de sua participação na patogênese,

conforme brevemente descrito em estudo anterior pelo nosso grupo (Curtis *et al.*, 2014).

A sinalização química desempenha um importante papel na relação entre o patógeno e seu respectivo hospedeiro. A comunicação química dentro dos reinos tem sido estudada por muitas décadas, no entanto, a interceptação dessas linguagens entre diferentes reinos tem sido apreciada apenas mais recentemente. À medida que este campo se expande, mais e mais exemplos serão descritos e muitas perguntas respondidas (Kendall e Sperandio, 2016; Moreira *et al.*, 2016).

A capacidade de sobreviver em condições ácidas é essencial para a colonização bem-sucedida do hospedeiro mamífero por bactérias entéricas, sendo o pH do estômago (<3) um dos primeiros desafios a serem superados (Gorden e Small, 1993; Arnold e Kaspar, 1995). Portanto, esse perfil resistente pode resultar em uma dose infecciosa baixa de patógenos transmitidos para seres humanos através de alimentos contaminados (Griffin e Tauxe, 1991; Gorden e Small, 1993; Baumler e Sperandio, 2016).

Nos ensaios de resistência ao estresse em meio ácido (pH 2.5), foi possível observar que a C227-11 possui um perfil de resistência semelhante à EHEC 86-24, sendo notavelmente mais robusta em relação à 042. Esses dados corroboram seu perfil virulento evidenciado durante o surto, levando em consideração o elevado número de casos.

Estudos recentes de tolerância ao ácido em *E. coli* sugerem que a aquisição de uma ilha genômica denominada *AFI* (*Acid Fitness Island*) foi um passo crucial na evolução de bactérias entéricas. Um total de 12 genes relacionados ao estresse metabólico compreendem *AFI* e, dentre eles, está o sistema *GAD* (*Glutamate-based Acid Resistance*) (Hommais *et al.*, 2004; Mates *et al.*, 2007). Esse sistema é



responsável por manter o pH citoplasmático bacteriano neutro, por descarboxilação de glutamato e exportação de ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), e também atua para repelir a entrada de prótons através da inversão do potencial de membrana (Richard e Foster, 2004). Contudo, os mecanismos utilizados por *Escherichia coli* para se adaptar e sobreviver em ambientes com pH extremamente baixo são variáveis, complexos e integrados, haja vista sua complexa fisiologia de resistência ao ácido (Mates *et al.*, 2007).

A proteína periplasmática VisP está diretamente relacionada à virulência e resistência ao estresse em *S. Typhimurium* (Moreira *et al.*, 2013). Além disso, é importante durante a montagem das cadeias do antígeno-O e está envolvida na motilidade desse patógeno (Da Silva, 2016). Um estudo, realizado com *E. coli* BW25113, exposta ao poluente cis-dicloroetileno, identificou seis proteínas relacionadas à resposta ao estresse não caracterizadas previamente. Dentre elas, VisP e seu papel em resposta a agentes estressores (Lee *et al.*, 2010). Evidenciamos, aqui, um elevado nível de expressão para o gene que codifica para essa proteína em C227-11, comparado com EHEC 86-24, contudo, sua participação na patogênese dessa cepa ainda não foi estabelecida.

A motilidade é considerada um fator de virulência em bactérias patogênicas, envolvida na colonização do hospedeiro porque medeia o contato inicial com a superfície de adesão (Van Houdt e Michiels, 2005). De modo geral, as bactérias se movimentam ao longo de superfícies em busca de nutrientes e de novos nichos de colonização, para a formação de biofilme e como fuga de compostos tóxicos (Park *et al.*, 2015). Demonstraram-se significativamente prejudicadas, nos estágios iniciais da formação de biofilme, *E. coli* K12 mutantes para o gene *fliC*, que codifica para a flagelina (principal componente do filamento flagelar), e os genes *motAB*, que

codificam para as proteínas que formam os complexos estatores condutores de íons (necessários para a rotação do flagelo). Sendo assim, é provável que a motilidade possa desempenhar um papel crítico nesse processo ao favorecer o contato inicial entre a célula e a superfície e, desse modo, contribuir para a sua propagação (Pratt e Kolter, 1998). A expressão gênica para *motA* foi significativamente baixa para as cepas C227-11 e 042, em comparação com a EHEC 86-24, e corroborou o fenótipo evidenciado no ensaio de motilidade. Entretanto, a EAEC 042 imóvel (mutante para o gene *fliC*) foi capaz de produzir um indistinguível biofilme em relação ao tipo selvagem (Sheikh *et al.*, 2001). No ensaio de 24 horas, a C227-11 demonstrou um perfil de motilidade 74,6% maior em relação à 042 e apenas 24% menor quando comparada à BA3826. Se essa característica confere vantagem direta durante o processo de colonização de EAEC, isso ainda não foi completamente elucidado.

O trato gastrointestinal (GI) dos mamíferos alberga uma complexa comunidade de microrganismos, coletivamente conhecidos como microbiota, que é composta por mais de 100 trilhões de bactérias. A microbiota desempenha um importante papel na saúde humana, pois auxilia na captação de nutrientes, produção de vitaminas e no desenvolvimento dos sistemas digestivo e imunológico (Hooper e Gordon, 2001; Round e Mazmanian, 2009).

A microbiota é influenciada por mudanças no ambiente hospedeiro, pelo consumo de antibióticos e pela dieta. A sua composição é única em níveis de gênero e espécie para cada indivíduo, no entanto, em níveis taxonômicos mais altos, como filo, é mais conservada, sendo predominantemente constituída por Bacteroidetes e Firmicutes, seguido de Proteobacteria e Actinobacteria (Eckburg *et al.*, 2005; The Human Microbiome Project Consortium, 2012; Yurist-Doutsch *et al.*, 2014; Baumler e Sperandio, 2016). Essas bactérias podem, ainda, conferir resistência à colonização

por bactérias patogênicas no sistema GI, e um desequilíbrio nessa população pode levar a uma maior susceptibilidade a infecções (Yurist-Doutsch *et al.*, 2014).

Em estudo anterior com camundongos LCM (Low-Complexity Microbiota), foi relatada uma maior suscetibilidade à infecção por *S. Typhimurium* (Stecher *et al.*, 2010; Ng *et al.*, 2013). Alterações na microbiota ocasionadas após o uso de antibióticos possibilitam a expansão de *Clostridium difficile* no cólon, mediada pela perda de resistência à colonização que leva à colite (Leffler e Lamont, 2015). Os patógenos entéricos, como *C. difficile* e *Salmonella*, exploram metabólitos produzidos por *B. thetaiotaomicron*, como fucose e ácido siálico, e competem de forma vantajosa por esses nutrientes quando a microbiota se encontra em desequilíbrio, permitindo, assim, o estabelecimento da infecção (Ng *et al.*, 2013).

Trabalhos anteriores, resumidamente demonstrados na Tabela 4, utilizaram modelos animais para o estudo do desenvolvimento da patogênese em EAEC Stx- e Stx+. Em alguns casos, é necessária a administração de antibióticos para a depleção da microbiota, no entanto, os modelos apresentam respostas variadas quanto a colonização, morbidade e mortalidade. Neste presente estudo, foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6, previamente tratados com ampicilina, conforme descrito por Zangari *et al.* (2013), por apresentarem respostas satisfatórias quanto aos quesitos citados acima.

**Tabela 4 - Modelos animais para o estudo da patogênese de EAEC**

<b>Linhagem*</b>	<b>Cepa</b>	<b>Antibiótico</b>	<b>Referência</b>
Leitão (gnotobiótico)	17-2/221	-	Tzipori <i>et al.</i> , 1992
Balb/C	042	Estreptomicina	Harrington <i>et al.</i> , 2009
CD-1	042	Estreptomicina	Morin <i>et al.</i> , 2010
C3H/HeJ	042	Estreptomicina	
C57BL/6 (neonato)	042/JM221	-	Roche <i>et al.</i> , 2010
CD-1	O104:H4(Stx+)	Estreptomicina	Torres <i>et al.</i> , 2012
Swiss Webster ( <i>germ-free</i> )	O104:H4(Stx+)	-	Al Safadi <i>et al.</i> , 2012
Coelho <i>Dutch Belted</i>	O104:H4(Stx+)	-	Zangari <i>et al.</i> , 2013
Balb/C	O104:H4(Stx+)	Ampicilina	
C57BL/6	O104:H4(Stx+)	Ampicilina	
Coelho <i>New Zealand White</i> (neonato)	O104:H4(Stx+)	-	Munera <i>et al.</i> , 2014

\* Quando o animal não está indicado, a linhagem aplica-se a camundongos.

Foi possível evidenciar, no modelo experimental proposto aqui, a predominância de Bacteroidetes para a maioria dos dias e grupos avaliados. O grupo de camundongos infectados com a cepa C227-11 apresentou uma notável modificação no dia 5 após a infecção, marcada pelo aumento de Firmicutes, sendo que foi reestabelecido o nível de Bacteroidetes nos dias posteriores. Essas alterações possivelmente ocorreram devido à capacidade dos patógenos de superar as barreiras impostas pela microbiota, o que acarretou em um exacerbado desequilíbrio na população residente. Como representantes desse filo na microbiota do sistema GI, pode-se citar os gêneros *Alistipes*, *Prevotella* e *Bacteroides*. Este último coloniza mais densamente o intestino, sendo composto por mais de 15 espécies (The Human Microbiome Project Consortium, 2012; Coyne *et al.*, 2016). Os membros desse grupo, como *B. thetaiotaomicron* e *B. vulgatus*, produzem enzimas que degradam

polissacarídeos presentes no muco e o tornam disponível para a microbiota, que compete de forma mais eficiente por esse nutriente quando comparada a patógenos invasores como EHEC, *Shigella* e *Salmonella* (Mckenney e Kendall, 2016).

Estudos têm evidenciado que um significativo número de Bacteroidetes codificam um T6SS (*Type VI Secretion System*), e seus genes estão expressos durante infecção *in vivo*. Esse sistema está relacionado com a secreção de fosfolipases, nucleases e proteínas formadoras de poros, que podem ser injetadas diretamente no periplasma de uma bactéria alvo (Coyne *et al.*, 2016). Sendo assim, é provável que a predominância do Filo Bacteroidetes esteja relacionada a essas características que, direta ou indiretamente, podem conferir resistência à colonização. Além disso, foi evidenciado que, ao detectar fucose, também um produto final do metabolismo de *B. thetaiotaomicron*, EHEC modula a expressão de fatores de virulência através de um sistema de 2-componentes denominado FusKR, que lhe permite reconhecer os ambientes glicolíticos e gliconeogênicos (Curtis *et al.*, 2014; Kendall e Sperandio, 2016).

Os demais grupos, todavia, não demonstraram grandes alterações no decorrer dos dias, com exceção do dia 15 para o grupo infectado com a cepa 042, que apresentou um percentual de Firmicutes extremamente elevado, semelhantemente ao que ocorreu no dia 5 com o grupo infectado com a C227-11. Esse resultado suscita a possibilidade de uma colonização persistente, semelhante a casos de diarreia que podem perdurar por um período igual ou superior a 14 dias em humanos (Nataro e Kaper, 1998). Entre os gêneros de Firmicutes relacionados com a microbiota do trato GI, temos *Lactobacillus*, *Bacillus* e *Clostridium* (Pamer, 2016). Foi reportado anteriormente, em estudo *in vitro*, a inibição do crescimento de *C. difficile* mediada por *Bacillus coagulans*, entretanto, o mesmo não foi evidenciado para outros

enteropatógenos como *E. coli* e *S. Typhimurium* (Honda *et al.*, 2011). Membros do gênero *Lactobacillus* protegem as células epiteliais colônicas durante o processo inflamatório, por meio da secreção de duas proteínas que ativam AKT, uma proteína quinase que desempenha importante papel na proliferação celular e na proteção contra apoptose (Yan *et al.*, 2007). Foi demonstrado, em estudo clínico, que terapia com vancomicina associada à suplementação com *Lactobacillus plantarum* pode diminuir a taxa de recorrência de *C. difficile*, em comparação ao tratamento apenas com antibiótico (Wullt *et al.*, 2003).

Em conjunto, esses dados revelam diferenças significativas na abundância relativa da microbiota na presença da EAEC O104:H4 C227-11 (Stx+) em relação às demais EAEC. É possível, ainda, realizar análises mais específicas utilizando iniciadores para grupos taxonômicos, como gênero e espécie, o que refinará ainda mais os resultados, possibilitando melhor entender as modificações causadas por estes patógenos na microbiota destes animais e, assim, estabelecer paralelos com a mudanças em indivíduos que sofrerem destas infecções via alimentos contaminados em futuros casos.

## 9. Conclusões

Partindo desses resultados iniciais, foi possível concluir que a cepa C227-11 de *E. coli* O104:H4 possui um fenótipo de adesão, em cultivo de células epiteliais HeLa, semelhante ao da cepa BA3826 de *E. coli* O104:H4 e mais acentuado em relação às demais *E. coli* diarreiogênicas testadas no presente estudo. O ensaio de formação de biofilme, com o emprego de  $\alpha$ -metil D-manosídeo, evidenciou a participação de TIF nesse processo, bem como a análise de expressão gênica de *fimH*, porém isso ainda requer maiores investigações. Apresentou, ainda, em meio com pH ácido, um percentual de sobrevivência significativamente maior em relação à EAEC 042, bem como notavelmente maior motilidade.

O nível de expressão de *qseC* apresentou-se semelhante em relação à EHEC 86-24, levando em consideração as perspectivas para a investigação dessa via de sinalização para a expressão de fatores de virulência nessa cepa de surto.

Cabe salientar o significativo nível de expressão acentuado de *visP*, sendo que sua função em *E. coli* ainda não foi completamente estabelecida na literatura científica, bem como a relação de VisP quanto à resistência ao estresse bacteriano, motilidade e virulência para a cepa de surto epidêmico C227-11.

A análise da abundância da microbiota após infecção evidenciou significativas alterações frente à cepa C227-11 ao decorrer do período experimental. No entanto, há a necessidade de maiores análises e aperfeiçoamento deste tipo de investigação, viabilizando, portanto, resultados mais abrangentes para obter maiores conclusões sobre os detalhes das modificações observadas na microbiota.

## Referências

AHMED, S. A. et al. Genomic comparison of *Escherichia coli* O104:H4 isolates from 2009 and 2011 reveals plasmid, and prophage heterogeneity, including shiga toxin encoding phage stx2. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e48228, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0048228> >.

AL SAFADI, R. et al. Correlation between in vivo biofilm formation and virulence gene expression in *Escherichia coli* O104:H4. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e41628, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0041628> >.

AL-HASANI, K. et al. The sigA gene which is borne on the she pathogenicity island of *Shigella flexneri* 2a encodes an exported cytopathic protease involved in intestinal fluid accumulation. **Infect Immun**, v. 68, n. 5, p. 2457-63, May 2000. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://iai.asm.org/content/68/5/2457.long> >.

ANDREOLI, S. P. et al. Hemolytic uremic syndrome: epidemiology, pathophysiology, and therapy. **Pediatr Nephrol**, v. 17, n. 4, p. 293-8, Apr 2002. ISSN 0931-041X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11956886> >.

ARNOLD, K. W.; KASPAR, C. W. Starvation- and stationary-phase-induced acid tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. **Appl Environ Microbiol**, v. 61, n. 5, p. 2037-9, May 1995. ISSN 0099-2240 (Print)1098-5336 (Electronic). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC167472/> >.

BACCHETTI DE GREGORIS, T. et al. Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa. **J Microbiol Methods**, v. 86, n. 3, p. 351-356, 2011. ISSN 0167-7012. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701211002247> >.

BAE, W. K. et al. A Case of Hemolytic Uremic Syndrome Caused by *Escherichia coli* O104:H4. **Yonsei Med J**, v. 47, n. 3, p. 437-9, Jun 30 2006. ISSN 0513-5796 (Print)1976-2437 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3349/ymj.2006.47.3.437> >.

BAUDRY, B. et al. A sensitive and specific DNA probe to identify enteroaggregative *Escherichia coli*, a recently discovered diarrheal pathogen. **J Infect Dis**, v. 161, n. 6, p. 1249-51, Jun 1990. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2189007> >.

BAUMLER, A. J.; SPERANDIO, V. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. **Nature**, v. 535, n. 7610, p. 85-93, Jul 07 2016. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nature18849> >.



BEARSON, B. L.; BEARSON, S. M. The role of the QseC quorum-sensing sensor kinase in colonization and norepinephrine-enhanced motility of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Microb Pathog**, v. 44, n. 4, p. 271-8, Apr 2008. ISSN 0882-4010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17997077> >.

BENJELLOUN-TOUIMI, Z.; SANSONETTI, P. J.; PARSOT, C. SepA, the major extracellular protein of *Shigella flexneri*: autonomous secretion and involvement in tissue invasion. **Mol Microbiol**, v. 17, n. 1, p. 123-35, Jul 1995. ISSN 0950-3820950-382. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7476198> >.

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. 4302-11, Aug 2002. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12117939> >.

BHARGAVA, S. et al. Heat-resistant agglutinin 1 is an accessory enteroaggregative *Escherichia coli* colonization factor. **J Bacteriol**, v. 191, n. 15, p. 4934-42, Aug 2009. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/jb.01831-08> >.

BIELASZEWSKA, M. et al. Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. **Lancet Infect Dis**, v. 11, n. 9, p. 671-6, Sep 2011. ISSN 1474-4457. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21703928> >.

BOISEN, N. et al. The presence of the pAA plasmid in the German O104:H4 Shiga toxin type 2a (Stx2a)-producing enteroaggregative *Escherichia coli* strain promotes the translocation of Stx2a across an epithelial cell monolayer. **J Infect Dis**, v. 210, n. 12, p. 1909-19, Dec 2014. ISSN 1537-6613. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25038258> >.

\_\_\_\_\_. Shiga toxin 2a and Enteroaggregative *Escherichia coli*--a deadly combination. **Gut Microbes**, v. 6, n. 4, p. 272-8, Jul 4 2015. ISSN 1949-0976. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/19490976.2015.1054591> >.

\_\_\_\_\_. Short report: high prevalence of serine protease autotransporter cytotoxins among strains of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 80, n. 2, p. 294-301, Feb 2009. ISSN 1476-1645. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19190229> >.

\_\_\_\_\_. Genomic characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* from children in Mali. **J Infect Dis**, v. 205, n. 3, p. 431-44, Feb 2012. ISSN 1537-6613. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22184729> >.

\_\_\_\_\_. New adhesin of enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF family. **Infect Immun**, v. 76, n. 7, p. 3281-92, Jul 2008. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/iai.01646-07> >.

BOOP, C. A. et al. *Echerichia, Shigella and Salmonella*. MURRAY, P. R.; BARONE, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R. H. In: (Ed.). **Manual of clinical microbiology**. 7. Washington, D. C.:ASM Press, 1999. cap. 28, p.459-465.

BOUDAILLIEZ, B. et al. Possible person-to-person transmission of *Escherichia coli* O111--associated hemolytic uremic syndrome. **Pediatr Nephrol**, v. 11, n. 1, p. 36-9, Feb 1997. ISSN 0931-041X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9035170> >.

BUCHHOLZ, U. et al. German outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 associated with sprouts. **N Engl J Med**, v. 365, n. 19, p. 1763-70, Nov 10 2011. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1106482> >.

BUERIS, V. et al. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 7, p. 839-44, Nov 2007. ISSN 0074-02760074-0276. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762007005000116> >.

CANIZALEZ-ROMAN, A.; NAVARRO-GARCIA, F. Fodrin CaM-binding domain cleavage by Pet from enteroaggregative *Escherichia coli* leads to actin cytoskeletal disruption. **Mol Microbiol**, v. 48, n. 4, p. 947-58, May 2003. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2958.2003.03492.x/epdf> >.

CAPRIOLI, A. et al. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. **Vet Res**, v. 36, n. 3, p. 289-311, May-Jun 2005. ISSN 0928-4249. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1051/vetres:2005002> >.

CIRILLO, D. M. et al. Macrophage-dependent induction of the Salmonella pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival. **Mol Microbiol**, v. 30, n. 1, p. 175-88, Oct 1998. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9786194> >.

CLARKE, M. B. et al. The QseC sensor kinase: a bacterial adrenergic receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 27, p. 10420-5, Jul 2006. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16803956> >.

CLARKE, M. B.; SPERANDIO, V. Transcriptional regulation of flhDC by QseBC and sigma (FliA) in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. **Mol Microbiol**, v. 57, n. 6, p. 1734-49, Sep 2005. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04792.x> >.

COYNE, M. J.; ROELOFS, K. G.; COMSTOCK, L. E. Type VI secretion systems of human gut Bacteroidales segregate into three genetic architectures, two of which are contained on mobile genetic elements. **BMC Genomics**, v. 17, 2016. ISSN 1471-2164 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-016-2377-z> >.

CRAVIOTO, A. et al. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. **Curr Microbiol**, v. 3, n. 2, p. 95-99, 1979. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007%2FBF02602439> >.

CURTIS, M. M. et al. QseC inhibitors as an antivirulence approach for Gram-negative pathogens. **MBio**, v. 5, n. 6, p. e02165, 2014. ISSN 2150-7511. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25389178> >.

CZECZULIN, J. R. et al. Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 65, n. 10, p. 4135-45, Oct 1997. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9317019> >.

\_\_\_\_\_. Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 67, n. 6, p. 2692-9, Jun 1999. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10338471> >.

DA SILVA, P. **Participação de VisP e LpxO na definição das formas de antígeno-O e na patogênese de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium**. 2016. Repositório Institucional da Unesp, FCFar/UNESP, Araraquara.

DALLMAN, T. et al. Characterization of a Verocytotoxin-Producing Enteroaggregative *Escherichia coli* Serogroup O111:H21 Strain Associated with a Household Outbreak in Northern Ireland. **J Clin Microbiol**, v. 50, n. 12, p. 4116-9, 2012. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.02047-12> >.

DALLMAN, T. J. et al. An investigation of the diversity of strains of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from cases associated with a large multi-pathogen foodborne outbreak in the UK. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e98103, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0098103> >.

DE RAUW, K. et al. Enteroaggregative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* of serotype O104:H4 in Belgium and Luxembourg. **New Microbes New Infect**, v. 2, n. 5, p. 138-143, 2014. ISSN 2052-2975. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/nmi2.58> >.

DEBROY, C. et al. 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. 393-8, Dec 1994. ISSN 0022-2615. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1099/00222615-41-6-393> >.

DUDLEY, E. G. et al. Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a pheU pathogenicity island in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 61, n. 5, p. 1267-1282, 2006. ISSN 1365-2958. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2958.2006.05281.x/full> >.

\_\_\_\_\_. Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a pheU pathogenicity island in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Mol Microbiol**, v. 61, n. 5, p. 1267-82, Sep 2006. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05281.x> >.

DUTTA, P. R. et al. Functional comparison of serine protease autotransporters of enterobacteriaceae. **Infect Immun**, v. 70, n. 12, p. 7105-13, Dec 2002. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12438392> >.

ECKBURG, P. B. et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. **Science**, v. 308, n. 5728, p. 1635-8, Jun 10 2005. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1126/science.1110591> >.

ELIAS, W. P., JR. et al. Organization of biogenesis genes for aggregative adherence fimbria II defines a virulence gene cluster in enteroaggregative *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, v. 181, n. 6, p. 1779-85, Mar 1999. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10074069> >.

ELLIOTT, S. J. et al. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. **Mol Microbiol**, v. 28, n. 1, p. 1-4, Apr 1998. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9593291> >.

ESLAVA, C. et al. Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 66, n. 7, p. 3155-63, Jul 1998. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9632580> >.

ESTRADA-GARCIA, T.; NAVARRO-GARCIA, F. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathotype: a genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 66, n. 3, p. 281-98, Dec 2012. ISSN 0928-8244. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.01008.x> >.

FARFAN, M. J.; INMAN, K. G.; NATARO, J. P. The Major Pilin Subunit of the AAF/II Fimbriae from Enteroaggregative *Escherichia coli* Mediates Binding to Extracellular Matrix Proteins. **Infect Immun**, v. 76, n. 10, p. 4378-84, 2008. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/iai.00439-08> >.

FASANO, A. et al. 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. 2853-61, Jun 1995. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1172/jci117991> >.

FERDOUS, M. et al. Comprehensive Characterization of *Escherichia coli* O104:H4 Isolated from Patients in the Netherlands. **Front Microbiol**, v. 6, 2015. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.01348> >.

FIERER, N. et al. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. **Appl Environ Microbiol**, v. 71, n. 7, p. 4117-20, Jul 2005. ISSN 0099-2240. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/aem.71.7.4117-4120.2005> >.

FRANK, C. et al. Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. **N Engl J Med**, v. 365, n. 19, p. 1771-80, Nov 10 2011. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1106483> >.

FUJIYAMA, R. et al. The shf gene of a *Shigella flexneri* homologue on the virulent plasmid pAA2 of enteroaggregative *Escherichia coli* 042 is required for firm biofilm formation. **Curr Microbiol**, v. 56, n. 5, p. 474-80, May 2008. ISSN 0343-8651. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-008-9115-y> >.

GINALSKI, K. et al. BOF: a novel family of bacterial OB-fold proteins. **FEBS Lett**, v. 567, n. 2-3, p. 297-301, Jun 04 2004. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2004.04.086> >.

GOMES, T. A. T. et al. 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. 3609-13, Dec 1998. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://jcm.asm.org/content/36/12/3609.full> >.

GORDEN, J.; SMALL, P. L. Acid resistance in enteric bacteria. **Infect Immun**, v. 61, n. 1, p. 364-7, Jan 1993. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8418063> >.

GRIFFIN, P. M. et al. Illnesses associated with *Escherichia coli* O157:H7 infections. A broad clinical spectrum. **Ann Intern Med**, v. 109, n. 9, p. 705-12, Nov 01 1988. ISSN 0003-4819. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3056169> >.

GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. **Epidemiol Rev**, v. 13, p. 60-98, 1991. ISSN 0193-936X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1765120> >.

GUY, L. et al. Adaptive mutations and replacements of virulence traits in the *Escherichia coli* O104:H4 outbreak population. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e63027, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0063027> >.

HADJIFRANGISKOU, M. et al. A central metabolic circuit controlled by QseC in pathogenic *Escherichia coli*. **Mol Microbiol**, v. 80, n. 6, p. 1516-29, Jun 2011. ISSN 1365-2958. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21542868> >.

HARADA, T. et al. A food poisoning diarrhea outbreak caused by enteroaggregative *Escherichia coli* serogroup O126:H27 in Shizuoka, Japan. **Jpn J Infect Dis**, v. 60, n. 2-3, p. 154-5, May 2007. ISSN 1344-6304. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17515660> >.

HARRINGTON, S. M.; DUDLEY, E. G.; NATARO, J. P. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **FEMS Microbiol Lett**, v. 254, n. 1, p. 12-8, Jan 2006. ISSN 0378-1097. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16451173> >.

HARRINGTON, S. M. et al. The Pic protease of enteroaggregative *Escherichia coli* promotes intestinal colonization and growth in the presence of mucin. **Infect Immun**, v. 77, n. 6, p. 2465-73, Jun 2009. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/iai.01494-08> >.

HENDERSON, I. R. et al. Characterization of Pic, a Secreted Protease of *Shigella flexneri* and Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 67, n. 11, p. 5587-96, 1999. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10531204> >.

\_\_\_\_\_. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 68, n. 4, p. 692-744, Dec 2004. ISSN 1092-2172. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/mmlr.68.4.692-744.2004> >.

HERNANDES, R. T. et al. The localized adherence pattern of an atypical enteropathogenic *Escherichia coli* is mediated by intimin omicron and unexpectedly promotes HeLa cell invasion. **Cell Microbiol**, v. 10, n. 2, p. 415-25, Feb 2008. ISSN 1462-5822. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17910741> >.

HICKS, S.; CANDY, D. C.; PHILLIPS, A. D. Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa in vitro. **Infect Immun**, v. 64, n. 11, p. 4751-60, Nov 1996. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8890236> >.

HOMMAIS, F. et al. GadE (YhiE): a novel activator involved in the response to acid environment in *Escherichia coli*. **Microbiology**, v. 150, n. Pt 1, p. 61-72, Jan 2004. ISSN 1350-0872. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.26659-0> >.

HONDA, H. et al. Use of a continuous culture fermentation system to investigate the effect of GanedenBC30 (*Bacillus coagulans* GBI-30, 6086) supplementation on pathogen survival in the human gut microbiota. **Anaerobe**, v. 17, n. 1, p. 36-42, Feb 2011. ISSN 1075-9964. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.12.006> >.

HOOPER, L. V.; GORDON, J. I. Commensal host-bacterial relationships in the gut. **Science**, v. 292, n. 5519, p. 1115-8, May 11 2001. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11352068> >.

HUANG, D. B. et al. A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli*. **J Med Microbiol**, v. 55, n. Pt 10, p. 1303-11, Oct 2006. ISSN 0022-2615. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17005776> >.

\_\_\_\_\_. Enteroaggregative *Escherichia coli*: an emerging enteric pathogen. **Am J Gastroenterol**, v. 99, n. 2, p. 383-9, Feb 2004. ISSN 0002-9270. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15046233> >.

HUGHES, D. T. et al. The QseC adrenergic signaling cascade in Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC). **PLoS Pathog**, v. 5, n. 8, p. e1000553, Aug 2009. ISSN 1553-7366. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000553> >.

HUGHES, D. T.; SPERANDIO, V. Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts. **Nat Rev Microbiol**, v. 6, n. 2, p. 111-120, 2008-02-01 2008. ISSN 1740-1526. Disponível em: < <http://www.nature.com/nrmicro/journal/v6/n2/full/nrmicro1836.html> >.

ITOH, Y. et al. 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. 2546-50, Oct 1997. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9316905> >.

IYODA, S. et al. Inducible stx2 phages are lysogenized in the enteroaggregative and other phenotypic *Escherichia coli* O86:HNM isolated from patients. **FEMS Microbiol Lett**, v. 191, n. 1, p. 7-10, Oct 1 2000. ISSN 0378-1097. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11004392> >.

IZQUIERDO, M. et al. Identification of cell surface-exposed proteins involved in the fimbria-mediated adherence of enteroaggregative *Escherichia coli* to intestinal cells.

**Infect Immun**, v. 82, n. 4, p. 1719-24, Apr 2014. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24516112> >.

JACKSON, M. P. et al. Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli* 933. **FEMS Microbiol Lett**, v. 44, n. 1, p. 109-114, 1987. ISSN 1574-6968. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1987.tb02252.x> >.

JERSE, A. E. et al. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 87, n. 20, p. 7839-43, Oct 1990. ISSN 0027-8424 (Print)1091-6490 (Electronic). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2172966> >.

JOHNSON, J. R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. **Clin Microbiol Rev**, v. 4, n. 1, p. 80-128, Jan 1991. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1672263> >.

JONSSON, R. et al. Novel aggregative adherence fimbria variant of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 83, n. 4, p. 1396-405, Apr 2015. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/iai.02820-14> >.

JUÁREZ-RODRÍGUEZ, M. D.; TORRES-ESCOBAR, A.; DEMUTH, D. R. ygiW and qseBC are co-expressed in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and regulate biofilm growth. **Microbiology**, v. 159, n. Pt 6, p. 989-1001, Jun 2013. ISSN 1465-2080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23519160> >.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat Rev Microbiol**, v. 2, n. 2, p. 123-40, Feb 2004. ISSN 1740-1526. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro818> >.

KARMALI, M. A. et al. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. **Lancet**, v. 1, n. 8325, p. 619-20, Mar 1983. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6131302> >.

KENDALL, M. M.; SPERANDIO, V. What a Dinner Party! Mechanisms and Functions of Interkingdom Signaling in Host-Pathogen Associations. **MBio**, v. 7, n. 2, p. e01748-15, Mar 2016. Disponível em: < <http://mbio.asm.org/content/7/2/e01748-15.full> >.

KHAJANCHI, B. K. et al. The two-component QseBC signalling system regulates in vitro and in vivo virulence of *Aeromonas hydrophila*. **Microbiology**, v. 158, n. Pt 1, p. 259-71, Jan 2012. ISSN 1465-2080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21998161> >.



KNUTTON, S. et al. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 57, n. 4, p. 1290-8, Apr 1989. ISSN 0019-9567 (Print)1098-5522 (Electronic). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2647635> >.

LEE, J. et al. Identification of stress-related proteins in *Escherichia coli* using the pollutant cis-dichloroethylene. **J Appl Microbiol**, v. 108, n. 6, p. 2088-102, Jun 2010. ISSN 1365-2672. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19919618> >.

LEFFLER, D. A.; LAMONT, J. T. *Clostridium difficile* infection. **N Engl J Med**, v. 372, n. 16, p. 1539-48, Apr 16 2015. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra1403772> >.

LEVINE, M. M. et al. *Escherichia coli* strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. **Lancet**, v. 1, n. 8074, p. 1119-22, May 27 1978. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/77415> >.

LYTE, M.; ARULANANDAM, B. P.; FRANK, C. D. Production of Shiga-like toxins by *Escherichia coli* O157:H7 can be influenced by the neuroendocrine hormone norepinephrine. **J Lab Clin Med**, v. 128, n. 4, p. 392-8, Oct 1996. ISSN 0022-2143. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8833888> >.

LYTE, M. et al. Norepinephrine-induced expression of the K99 pilus adhesin of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 232, n. 3, p. 682-6, Mar 27 1997. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.1997.6356> >.

MATES, A. K.; SAYED, A. K.; FOSTER, J. W. Products of the *Escherichia coli* Acid Fitness Island Attenuate Metabolite Stress at Extremely Low pH and Mediate a Cell Density-Dependent Acid Resistance. **J Bacteriol**, v. 189, n. 7, p. 2759-68, Apr 2007. Disponível em: < <http://jb.asm.org/content/189/7/2759.abstract> >.

MCDANIEL, T. K. et al. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 5, p. 1664-8, Feb 28 1995. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7878036> >.

MCKENNEY, E. S.; KENDALL, M. M. Microbiota and pathogen 'pas de deux': setting up and breaking down barriers to intestinal infection. **Pathog Dis**, v. 74, n. 5, Jul 2016. ISSN 2049-632x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/femspd/ftw051> >.

MELLMANN, A. et al. Analysis of collection of hemolytic uremic syndrome-associated enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Emerg Infect Dis**, v. 14, n. 8, p. 1287-90, Aug 2008. ISSN 1080-6040. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3201/eid1408.071082> >.

MELTON-CELSA, A. R. Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function. **Microbiol Spectr**, v. 2, n. 4, p. Ehec-0024-2013, Aug 2014. ISSN 2165-0497. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/microbiolspec.EHEC-0024-2013> >.

MERIGHI, M. et al. Genome-wide analysis of the PreA/PreB (QseB/QseC) regulon of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **BMC Microbiol**, v. 9, p. 42, 2009. ISSN 1471-2180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19236707> >.

MOKRIEVICH, A. N. et al. Biological properties and structure of the lipopolysaccharide of a vaccine strain of *Francisella tularensis* generated by inactivation of a quorum sensing system gene qseC. **Biochemistry (Mosc)**, v. 75, n. 4, p. 443-51, Apr 2010. ISSN 1608-3040. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20618133> >.

MONTEIRO-NETO, V. et al. 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. 533-47, Aug 2003. ISSN 1462-5814. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12864813> >.

MOON, H. W. et al. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. **Infect Immun**, v. 41, n. 3, p. 1340-51, Sep 1983. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6350186> >.

MORABITO, S. et al. Enteroaggregative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111:H2 associated with an outbreak of hemolytic-uremic syndrome. **J Clin Microbiol**, v. 36, n. 3, p. 840-2, Mar 1998. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9508328> / >.

MOREIRA, C. G. et al. Role of type I fimbriae in the aggregative adhesion pattern of enteroaggregative *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 226, n. 1, p. 79-85, Sep 2003. ISSN 0378-1097. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13129611> >.

\_\_\_\_\_. Virulence and stress-related periplasmic protein (VisP) in bacterial/host associations. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 4, p. 1470-5, Jan 2013. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23302685> >.

\_\_\_\_\_. Bundle-forming pili and EspA are involved in biofilm formation by enteropathogenic *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, v. 188, n. 11, p. 3952-61, Jun 2006. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/jb.00177-06> >.

\_\_\_\_\_. Bacterial Adrenergic Sensors Regulate Virulence of Enteric Pathogens in the Gut. **MBio**, v. 7, n. 3, Jun 07 2016. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.00826-16> >.

MOREIRA, C. G.; SPERANDIO, V. Interplay between the QseC and QseE bacterial adrenergic sensor kinases in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathogenesis. **Infect Immun**, v. 80, n. 12, p. 4344-53, Dec 2012. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23027532> >.

MOREIRA, C. G.; WEINSHENKER, D.; SPERANDIO, V. QseC mediates *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence in vitro and in vivo. **Infect Immun**, v. 78, n. 3, p. 914-26, Mar 2010. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20028809> >.

MORIN, N. et al. Autoactivation of the AggR regulator of enteroaggregative *Escherichia coli* in vitro and in vivo. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 58, n. 3, p. 344-55, Apr 2010. ISSN 0928-8244. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00645.x> >.

MUNERA, D. et al. Autotransporters but not pAA are critical for rabbit colonization by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4. **Nat Commun**, v. 5, p. 3080, 2014. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms4080> >.

NAKANO, M. et al. Modulation of pathogenicity with norepinephrine related to the type III secretion system of *Vibrio parahaemolyticus*. **J Infect Dis**, v. 195, n. 9, p. 1353-60, May 1 2007. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1086/513275> >.

NATARO, J. P. et al. Detection of an adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli* with a DNA probe. **J Infect Dis**, v. 152, n. 3, p. 560-5, Sep 1985. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2863319> >.

\_\_\_\_\_. Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated in volunteers. **J Infect Dis**, v. 171, n. 2, p. 465-8, Feb 1995. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7844392> >.

\_\_\_\_\_. 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. 2297-304, Jun 1992. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1350273> >.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin Microbiol Rev**, v. 11, n. 1, p. 142-201, Jan 1998. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9457432> >.

NATARO, J. P. et al. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **Pediatr Infect Dis J**, v. 6, n. 9, p. 829-31, Sep 1987. ISSN 0891-3668. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3313248> >.

\_\_\_\_\_. Diarrheagenic *Escherichia coli* infection in Baltimore, Maryland, and New Haven, Connecticut. **Clin Infect Dis**, v. 43, n. 4, p. 402-7, Aug 2006. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16838226> >.

NATARO, J. P.; STEINER, T.; GUERRANT, R. L. Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Emerg Infect Dis**, v. 4, n. 2, p. 251-61, Apr-Jun 1998. ISSN 1080-6040. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3201/eid0402.980212> >.

NATARO, J. P. et al. AggR, a transcriptional activator of aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, v. 176, n. 15, p. 4691-9, Aug 1994. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7913930> >.

NAVARRO-GARCIA, F. et al. **Enteroaggregative *Escherichia coli*. Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America.** TORRES, A. G.: Bentham Science Publishers Ltd: 48-64 p. 2010.

NG, K. M. et al. Microbiota-liberated host sugars facilitate post-antibiotic expansion of enteric pathogens. **Nature**, v. 502, n. 7469, p. 96-99, 2013. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nature12503> >.

NISHI, J. et al. 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. 45680-9, Nov 14 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M306413200> >.

NJOROGE, J.; SPERANDIO, V. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence regulation by two bacterial adrenergic kinases, QseC and QseE. **Infect Immun**, v. 80, n. 2, p. 688-703, Feb 2012. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22144490> >.

NOWICKI, B. et al. The Dr hemagglutinin, afimbrial adhesins AFA-I and AFA-III, and F1845 fimbriae of uropathogenic and diarrhea-associated *Escherichia coli* belong to a family of hemagglutinins with Dr receptor recognition. **Infect Immun**, v. 58, n. 1, p. 279-81, Jan 1990. ISSN 0019-9567 (Print)1098-5522 (Electronic). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1967170> >.

O'BRIEN, A. D. et al. Production of Shigella dysenteriae type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. **J Infect Dis**, v. 146, n. 6, p. 763-9, Dec 1982. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6754826> >.

OFEK, I.; DOYLE, R. J. Bacterial Adhesion to Cells and Tissues. In: OFEK, I. e DOYLE, R. J. (Ed.). **Bacterial Adhesion to Cells and Tissues**. 2. New York: Chapman and Hall, v.735, 1994. cap. Regulation and expression of bacterial adhesins, p.239-320.

OKEKE, I. N. et al. Characterization of *Escherichia coli* strains from cases of childhood diarrhea in provincial southwestern Nigeria. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 1, p. 7-12, Jan 2000. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10618054> >.

PAMER, E. G. Resurrecting the intestinal microbiota to combat antibiotic-resistant pathogens. **Science**, v. 352, n. 6285, p. 535-8, Apr 29 2016. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1126/science.aad9382> >.

PARHAM, N. J. et al. PicU, a second serine protease autotransporter of uropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 230, n. 1, p. 73-83, Jan 15 2004. ISSN 0378-1097. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14734168> >.

PARK, S. Y.; PONTES, M. H.; GROISMAN, E. A. Flagella-independent surface motility in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 112, n. 6, p. 1850-5, Dec 2015. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1422938112> >.

PARKER, C. T.; SPERANDIO, V. Cell-to-cell signalling during pathogenesis. **Cell Microbiol**, v. 11, n. 3, p. 363-9, Mar 2009. ISSN 1462-5814. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01272.x> >.

PATON, J. C.; PATON, A. W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Clin Microbiol Rev**, v. 11, n. 3, p. 450-79, Jul 1998. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9665978> >.

PRATT, L. A.; KOLTER, R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. **Mol Microbiol**, v. 30, n. 2, p. 285-93, Oct 1998. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9791174> >.

PULLINGER, G. D. et al. Role of two-component sensory systems of *Salmonella enterica* serovar Dublin in the pathogenesis of systemic salmonellosis in cattle. **Microbiology**, v. 156, n. Pt 10, p. 3108-22, Oct 2010. ISSN 1465-2080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20656781> >.

RAJAKUMAR, K.; SASAKAWA, C.; ADLER, B. Use of a novel approach, termed island probing, identifies the *Shigella flexneri* she pathogenicity island which encodes a homolog of the immunoglobulin A protease-like family of proteins. **Infect Immun**, v. 65, n. 11, p. 4606-14, Nov 1997. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9353040> >.

RASKO, D. A. et al. Targeting QseC signaling and virulence for antibiotic development. **Science**, v. 321, n. 5892, p. 1078-80, Aug 22 2008. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1126/science.1160354> >.

\_\_\_\_\_. Targeting QseC signaling and virulence for antibiotic development. **Science**, v. 321, n. 5892, p. 1078-80, Aug 2008. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18719281> >.

\_\_\_\_\_. Origins of the *E. coli* strain causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany. **N Engl J Med**, v. 365, n. 8, p. 709-17, Aug 25 2011. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1106920> >.

RICHARD, H.; FOSTER, J. W. *Escherichia coli* glutamate- and arginine-dependent acid resistance systems increase internal pH and reverse transmembrane potential. **J Bacteriol**, v. 186, n. 18, p. 6032-41, Sep 2004. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/jb.186.18.6032-6041.2004> >.

RILEY, L. W. et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **N Engl J Med**, v. 308, n. 12, p. 681-5, Mar 1983. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6338386> >.

ROBINS-BROWNE, R. M. et al. Are *Escherichia coli* Pathotypes Still Relevant in the Era of Whole-Genome Sequencing? **Front Cell Infect Microbiol**, v. 6, 2016. ISSN 2235-2988. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2016.00141> >.

ROCHE, J. K. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) impairs growth while malnutrition worsens EAEC infection: a novel murine model of the infection malnutrition cycle. **J Infect Dis**, v. 202, n. 4, p. 506-14, Aug 15 2010. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1086/654894> >.

ROUND, J. L.; MAZMANIAN, S. K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 5, p. 313-23, May 2009. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nri2515> >.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SAVARINO, S. J. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 7, p. 3093-7, Apr 1 1993. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8385356> >.

\_\_\_\_\_. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *E. coli*. **J Infect Dis**, v. 173, n. 4, p. 1019-22, Apr 1996. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8603943> >.

SCAVIA, G., MORABITO, S., TOZZOLI, R., MICHELACCI, V., MARZIANO, M. L., MINELLI, F., CAPRIOLI, A. Similarity of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 Strains from Italy and Germany. **Emerg Infect Dis**, v. 17, n. 10, p. 1957-1958, 2011. Disponível em: < <https://dx.doi.org/10.3201/eid1710.111072> >.

SCAVIA, G. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with a foodborne outbreak of gastroenteritis. **J Med Microbiol**, v. 57, n. Pt 9, p. 1141-6, Sep 2008. ISSN 0022-2615. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.2008/001362-0> >.

SCHUBERT, S. et al. Prevalence of the "high-pathogenicity island" of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. **Infect Immun**, v. 66, n. 2, p. 480-5, Feb 1998. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9453599> >.

SERVIN, A. L. Pathogenesis of Afa/Dr Diffusely Adhering *Escherichia coli*. 2005-04-01 2005. Disponível em: < <http://cmr.asm.org/content/18/2/264.full> >.

SHEIKH, J. et al. A novel dispersin protein in enteroaggregative *Escherichia coli*. **J Clin Invest**, v. 110, n. 9, p. 1329-37, Nov 2002. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1172/jci16172> >.

\_\_\_\_\_. Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. **Mol Microbiol**, v. 41, n. 5, p. 983-97, Sep 2001. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11555281> >.

SIRCILI, M. P. et al. Modulation of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence by quorum sensing. **Infect Immun**, v. 72, n. 4, p. 2329-37, Apr 2004. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15039358> >.

SMITH, H. R.; CHEASTY, T.; ROWE, B. Enteroaggregative *Escherichia coli* and outbreaks of gastroenteritis in UK. **Lancet**, v. 350, n. 9080, p. 814-5, Sep 13 1997. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9298029> >.

SPERANDIO, V. et al. Bacteria-host communication: the language of hormones. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 15, p. 8951-6, Jul 2003. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12847292> >.

SPERANDIO, V.; TORRES, A. G.; KAPER, J. B. Quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QseBC): a novel two-component regulatory system involved in theregulation of flagella and motility by quorum sensing in *E. coli*. **Mol Microbiol**, v. 43, n. 3, p. 809-21, Feb 2002. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11929534> >.

STALEY, T. E.; JONES, E. W.; CORLEY, L. D. Attachment and penetration of *Escherichia coli* into intestinal epithelium of the ileum in newborn pigs. **Am J Pathol**, v. 56, n. 3, p. 371-92, Sep 1969. ISSN 0002-9440 (Print)1525-2191 (Electronic). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4898367> >.

STECHER, B. et al. Like Will to Like: Abundances of Closely Related Species Can Predict Susceptibility to Intestinal Colonization by Pathogenic and Commensal Bacteria. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 1, 2010. ISSN 1553-7366. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000711> >.

STEINER, T. S. et al. 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, Jan 1998. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9419174> >.

TARR, P. I. et al. Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. **Infect Immun**, v. 68, n. 3, p. 1400-7, Mar 2000. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10678953> >.

The Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. **Nature**, v. 486, n. 7402, p. 207-14, Jun 13 2012. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nature11234> >.

TORRES, A. G. et al. Genes related to long polar fimbriae of pathogenic *Escherichia coli* strains as reliable markers to identify virulent isolates. **J Clin Microbiol**, v. 47, n. 8, p. 2442-51, Aug 2009. ISSN 1098-660X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19494071> >.

\_\_\_\_\_. In vivo bioluminescence imaging of *Escherichia coli* O104:H4 and role of aerobactin during colonization of a mouse model of infection. **BMC Microbiol**, v. 12, n. 1, p. 112, 2012. ISSN 1471-2180. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-12-112> >.



\_\_\_\_\_. Identification and characterization of IpfABCC'DE, a fimbrial operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Infect Immun**, v. 70, n. 10, p. 5416-27, Oct 2002. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12228266> >.

TZIPORI, S. et al. Studies with enteroaggregative *Escherichia coli* in the gnotobiotic piglet gastroenteritis model. **Infect Immun**, v. 60, n. 12, p. 5302-6, Dec 1992. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1452364> >.

UNAL, C. M. et al. QseC controls biofilm formation of non-typeable *Haemophilus influenzae* in addition to an AI-2-dependent mechanism. **Int J Med Microbiol**, v. 302, n. 6, p. 261-9, Nov 2012. ISSN 1618-0607. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22954413> >.

VAN HOUTD, R.; MICHIELS, C. W. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. **Res Microbiol**, v. 156, n. 5-6, p. 626-33, Jun-Jul 2005. ISSN 0923-2508. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2005.02.005> >.

VELARDE, J. J. et al. Solution structure of the novel dispersin protein of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Mol Microbiol**, v. 66, n. 5, p. 1123-35, Dec 2007. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05985.x> >.

VIAL, P. A. et al. 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. 882-5, May 1990. ISSN 0095-1137 (Print)1098-660X (Electronic). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC267829/> >.

VILLASECA, J. M. et al. Pet toxin from enteroaggregative *Escherichia coli* produces cellular damage associated with fodrin disruption. **Infect Immun**, v. 68, n. 10, p. 5920-7, Oct 2000. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10992503> >.

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, Jan 01 1996. ISSN 0378-1097. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8598272> >.

WAKIMOTO, N. et al. Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for enteroaggregative *Escherichia coli*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 71, n. 5, p. 687-90, Nov 2004. ISSN 0002-9637. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15569806> >.

WALTERS, M.; SIRCILI, M. P.; SPERANDIO, V. AI-3 synthesis is not dependent on luxS in *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, v. 188, n. 16, p. 5668-81, Aug 2006. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/jb.00648-06> >.

WALTERS, M.; SPERANDIO, V. Autoinducer 3 and epinephrine signaling in the kinetics of locus of enterocyte effacement gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 74, n. 10, p. 5445-55, Oct 2006. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/iai.00099-06> >.

WANG, X. et al. QseBC controls flagellar motility, fimbrial hemagglutination and intracellular virulence in fish pathogen *Edwardsiella tarda*. **Fish Shellfish Immunol**, v. 30, n. 3, p. 944-53, Mar 2011. ISSN 1095-9947. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21288493> >.

WULLT, M.; HAGSLATT, M. L.; ODENHOLT, I. *Lactobacillus plantarum* 299v for the treatment of recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhoea: a double-blind, placebo-controlled trial. **Scand J Infect Dis**, v. 35, n. 6-7, p. 365-7, 2003. ISSN 0036-5548. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/00365540310010985> >.

YAN, F. et al. Soluble proteins produced by probiotic bacteria regulate intestinal epithelial cell survival and growth. **Gastroenterology**, v. 132, n. 2, p. 562-75, Feb 2007. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2006.11.022> >.

YURIST-DOUTSCH, S. et al. Gastrointestinal Microbiota “Mediated Control of Enteric Pathogens. **Annu. Rev. Genet.**, v. 48, p. 361-82, Sep 10 2014a. Disponível em: < <http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev-genet-120213092421#article-denial> >.

\_\_\_\_\_. Gastrointestinal Microbiota “Mediated Control of Enteric Pathogens. **Annu. Rev. Genet.**, v. 48, p. 361-82, Sep 10 2014b. Disponível em: < <http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev-genet-120213-092421#article-denial> >.

ZANGARI, T. et al. Virulence of the Shiga toxin type 2-expressing *Escherichia coli* O104:H4 German outbreak isolate in two animal models. **Infect Immun**, v. 81, n. 5, p. 1562-74, May 2013. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23439303> >.

ZHANG, W. et al. Lability of the pAA Virulence Plasmid in *Escherichia coli* O104:H4: Implications for Virulence in Humans. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e66717, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0066717> >.