

**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” –
UNESP**

Faculdade Ciências Farmacêuticas de Araraquara

**Análise da sinalização química e virulência em *Escherichia coli*
enterohemorrágica e *Citrobacter rodentium* mediado por
membros da microbiota**

Karine Melchior

Araraquara

Ano 2020

Karine Melchior

**Análise da sinalização química e virulência em *Escherichia coli*
enterohemorrágica e *Citrobacter rodentium* mediado por
membros da microbiota**

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 Biociências e Biotecnologia Aplicadas a Farmácia.

Área de conhecimento: Bacteriologia

Orientador: Prof. Dr. Cristiano Gallina Moreira

Araraquara

Ano 2020

M518a Melchior, Karine.
Análise da sinalização química e virulência em *Escherichia coli* enterohemorrágica e *Citrobacter rodentium* mediado por membros da microbiota / Karine Melchior. – Araraquara: [S.n.], 2020.
89 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 concentração Bacteriologia.

Orientador: Cristiano Gallina Moreira.

1. Microbiota. 2. Sinalização química. 3. Virulência. 4. Patogenicidade.
I. Moreira, Cristiano Gallina, orient. II. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Análise da sinalização química e virulência em *Escherichia coli* enterohemorrágica e *Citrobacter rodentium* mediado por membros da microbiota

AUTORA: KARINE MELCHIOR

ORIENTADOR: CRISTIANO GALLINA MOREIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, área: Análises Clínicas pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. CRISTIANO GALLINA MOREIRA

Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Prof^a. Dr^a. KATIA SIVIERI

Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP- Araraquara

Prof. Dr. RODRIGO TAVANELLI HERNANDES

Depto. de Microbiologia e Imunologia / IB/Botucatu - Unesp

Araraquara, 25 de junho de 2020

Dedicatória

*Ao meu noivo por estar ao meu lado em toda essa jornada e por ser o apoio que
me possibilitou chegar até aqui.*

Agradecimentos

A Thiago Fazzio Iglesias Balseiro, por ser meu equilíbrio, meu maior incentivador, meu companheiro, por acreditar em mim (e fazer com que eu sempre acreditasse em mim), por estar ao meu lado em todos os momentos e por me ajudar a transformar meus projetos e objetivos em realidade. Ter você, Sheldon e o Theo nesta jornada, tornou tudo mais leve e prazeroso. Amo vocês.

A minha mãe Antonia Cristina Galli, minhas irmãs Aline Melchior e Karoline E. G. Fonseca, aos meus sobrinhos Pedro e Emily, por todo apoio, incentivo e por ser minha base. Hoje sou o que sou e cheguei onde cheguei, porque vocês estavam comigo nessa caminhada.

Aos meus companheiros do Laboratório em Pesquisa e Patogenicidade e Sinalização Química em Bactérias – PASIQUIBAC, que desde o começo participaram da minha trajetória e de alguma maneira me ajudaram neste trabalho. Obrigada por esses anos, agradeço pelas risadas, discussões e ajudas, vocês foram essenciais para meu desenvolvimento profissional.

A Dra. Vânia Santos Braz por toda sua ajuda e mentoria para o desenvolvimento deste trabalho, com você pude melhorar minha pesquisa e alcançar melhores resultados. Obrigada por me acolher quando precisei de sua ajuda e me ensinar quando precisei dos seus ensinamentos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Cristiano Gallina Moreira pela oportunidade que me deu em seu Laboratório, por ter confiança em meu trabalho e por me ajudar a alcançar os meus objetivos. Através de sua orientação pude crescer como pesquisadora e me tornei uma profissional melhor.

A Profa. Dra. Manuela Raffatellu da Universidade da Califórnia San Diego (UCSD) por abrir as portas de seu laboratório e permitir que eu tivesse uma experiência de aprendizado incrível. A Dra. Araceli Perez Lopez por toda sua mentoria nessa jornada, com você me tornei uma pesquisadora melhor, agradeço

por toda paciência e ensinamentos. Ao Steven, por ser um excelente companheiro de laboratório, transformando minha experiência na UCSD mais divertida. Ao pessoal do Raffatellu's Lab, por terem me acolhido tão bem e por todo apoio.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por todo o apoio financeiro para o desenvolvimento desse trabalho, que por meio dos projetos n° de processo 2014/06779-2, 2018/22042-0 e 2019/14833-0, pude me dedicar integralmente a realização deste projeto e realizar um intercâmbio de muito aprendizado em minha área de pesquisa.

Ainda, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desse projeto.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.”

Isaac Newton

Resumo

Escherichia coli Enterohemorrágica (EHEC) é um patógeno gastrointestinal conhecido por sua capacidade de causar colites hemorrágicas. Possui em seu genoma a Ilha de patogenicidade *locus of enterocyte effacement* (LEE), responsável por codificar genes relacionados a importantes fatores de virulência. O sensor de histidina quinase QseC, presente na membrana de EHEC, mostrou-se importante para a regulação dessa ilha. Recentemente nosso grupo demonstrou que bactérias comensais benéficas para a microbiota como o *Bacteroides thetaiotaomicron* (Bt), podem antagonicamente aumentar a expressão de genes de virulência em bactérias patogênicas, como EHEC, pela alteração do panorama metabólico. Dessa forma este trabalho visou entender como é a regulação da virulência de EHEC na presença de bactérias comensais, com intuito de compreender a relação entre microbiota – patógeno, como o patógeno responde e modula sua resposta ao ambiente, bem como a participação do sensor QseC na sinalização envolvida nesses processos. Com os resultados obtidos foi possível evidenciar que QseC muda a regulação gênica por butirato em EHEC e houve diferenças do fenótipo de motilidade e crescimento na presença desse ácido graxo. A expressão de *hcp-2* do T6SS está aumentada em baixa glicose, porém diminuída na linhagem mutante, indicando participação de QseC na regulação desse sistema. No entanto, a introdução de *Bt* na condição de baixa glicose, levou diminuição da expressão do gene *hcp-2* de T6SS em EHEC, indicando regulação dessa bactéria comensal no T6SS deste patógeno. Membros benéficos da microbiota humana estavam aumentados na ausência de QseC em Simulador de Ecossistema Microbiano Intestinal Humano, indicando diferenças na competição de EHEC na ausência desse sensor. *Lactobacillus acidophilus*, diminuiu drasticamente o crescimento de EHEC, porém o mesmo não foi observado para *Lactobacillus reuteri*, demonstrando que a competição é espécie-dependente dos lactobacilos presentes. Ainda, o sensor QseC é necessário para uma efetiva colonização e disseminação de *Citrobacter rodentium* em camundongos C57BL/6. Assim, evidenciou-se que membros da microbiota modulam a resposta de EHEC, o sensor QseC têm participação na sinalização promovida por essas bactérias comensais e é necessário para uma efetiva colonização no hospedeiro.

Palavras-chave: Microbiota. Sinalização química. Virulência. Patogenicidade.

Abstract

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) is a gastrointestinal pathogen well known for its ability to cause hemorrhagic diarrhea. It has in its genome the Island of pathogenicity locus of enterocyte effacement (LEE), responsible for encoding genes related to important virulence factors. The QseC histidine kinase sensor, present in the EHEC membrane, regulates this island. Recently, our group demonstrated that commensal bacteria beneficial to the microbiota, such as *Bacteroides thetaiotaomicron* (Bt), can antagonically increase the expression of virulence genes in pathogenic bacteria, such as EHEC, by altering the metabolic landscape. In this way, this work aimed to understand the regulation of EHEC virulence in the presence of butyrate, as well as commensal bacteria, in order to understand the relationship between microbiota - pathogen, how the pathogen modulates its response to the environment, as well as participation of the QseC sensor in the signaling involved in these processes. The results obtained in this study, showed that QseC changes the gene regulation through butyrate in EHEC and there were differences in the motility and growth in presence of this fatty acid. The expression of *hcp-2* gene from T6SS is increased in low glucose, nevertheless decreased in the mutant strain, indicating that QseC modulates this system. However, the introduction of Bt in low glucose media, induced a decrease in the expression of the *hcp-2* gene in EHEC, which indicates a regulation of this commensal bacterium in the T6SS of this pathogen. Beneficial members of the human microbiota were increased in the absence of QseC in the Human Intestinal Microbial Ecosystem Simulator, indicating differences in EHEC competition in the absence of this sensor. *Lactobacillus acidophilus* decreased the growth of EHEC, however the same was not observed for *Lactobacillus reuteri*, indicating the inhibition observed is *Lactobacillus* strain-dependent. The QseC sensor is necessary for an effective colonization and dissemination of *Citrobacter rodentium* in C57BL/6 mice. Therefore, these results indicate that members of the microbiota modulate EHEC response, the QseC sensor has a role in signaling promoted by these commensal bacteria and is necessary for effective colonization in the host.

Keywords: Microbiota. Chemical signaling. Virulence. Pathogenicity.

Lista de Figuras

Figura 1: Representação da formação do pedestal desenvolvido por EHEC e EPEC	18
Figura 2: Representação esquemática do sistema de secreção do tipo VI	19
Figura 3. A cascata de sinalização de QseC em EHEC.	24
Figura 4: Curva de crescimento da linhagem selvagem (Wt) na presença de Cloreto de Sódio (NaCl) ou Butirato de Sódio (But) na concentração de 20 mM.	41
Figura 5. Curva de crescimento da linhagem mutante do sensor QseC na presença de Cloreto de Sódio (NaCl) ou Butirato de Sódio (But) na concentração de 20 mM.	41
Figura 6. Ensaio de adesão quantitativo em meio com baixa glicose mais NaCl ou But a 20 mM.	42
Figura 7: Ensaio de motilidade na presença de NaCl ou But das linhagens EHEC (Wt) e mutante Δ qseC	43
Figura 8: Análise do padrão de expressão dos genes de virulência na presença de cloreto de sódio (NaCl) e butirato de sódio (But)	46
Figura 9: Ensaio de sobrevivência intracelular em macrófagos J774	50
Figura 10: Curva de crescimento da linhagem selvagem na presença em alta ou baixa glicose, ou na presença de Bt em alta ou baixa glicose.	51
Figura 11: Curva de crescimento do mutante Δ qseC na presença em alta ou baixa glicose, ou na presença de Bt em alta ou baixa glicose.	52
Figura 12: Análise do padrão de expressão dos genes de virulência de EHEC (Wt) e Δ qseC em baixa e alta glicose por qRT-PCR.	53
Figura 13: Análise da expressão gênica de genes de virulência da linhagem selvagem (Wt) e Δ qseC em baixa e alta glicose na presença de <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	56
Figura 14: Análise do perfil de sobrevivência das linhagens selvagem (Wt) e Δ qseC no SHIME®	58

Figura 15: Análise da abundância do RNAr 16S para detecção dos filos γ -Proteobacteria, Bacteroidetes e Firmicutes das amostras coletadas do SHIME®...	60
Figura 16: Análise da abundância do RNAr 16S para detecção dos gêneros <i>Lactobacillus</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Bacteroides</i> e <i>Prevotella</i> das amostras coletadas do SHIME®.	60
Figura 17: Análise do padrão de expressão dos genes de virulência <i>ler</i> e <i>stx-2</i> das amostras coletadas do SHIME®	61
Figura 18: Ensaio de competição em ágar entre <i>Lactobacillus acidophilus</i> e EHEC.	66
Figura 19: Ensaio de competição em ágar entre <i>Lactobacillus reuteri</i> e EHEC. Contagem de UFCs após 16 horas de interação.....	67
Figura 20: Ensaio de co-cultura em caldo entre <i>Lactobacillus acidophilus</i> e EHEC. Ensaio de co-cultura em caldo entre <i>Lactobacillus acidophilus</i> e EHEC	68
Figura 21: Ensaio de co-cultura em caldo entre <i>Lactobacillus reuteri</i> e EHEC. Contagem da UFCs após 8 horas de interação.....	69
Figura 22: Infecção por linhagens de <i>C. rodentium</i> WT e Δ qseC em camundongos C57BL/6	73

Lista de Tabelas

Tabela 1: Lista de primers utilizados no estudo. 29

Tabela 2: Linhagens utilizadas no estudo. 30

Lista de Abreviaturas

A/E - *Attaching and Effacing*

AI-3 - Autoindutor-3

But – Butirato de sódio

Bt – *Bacteroides thetaiotaomicron*

C. rodentium - *Citrobacter rodentium*

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DO600 - Densidade Óptica a 600 nm

EAEC - *Enteraggregative Escherichia coli*

EHEC - *Enterohaemorrhagic Escherichia coli*

EPEC - *Enteropathogenic Escherichia coli*

LA – *Lactobacillus acidophilus*

LB - Meio Luria-Bertani

LEE - *Locus of Enterocyte Effacement*

LR – *Lactobacillus reuteri*

MRS - De Man, Rogosa e Sharpe

MOI - *Multiplicity of Infection*

NaCl - Cloreto de sódio

PASQUIBAC - Laboratório de Patogenicidade e Sinalização Química Bacteriana

QseC - *Quorum sensing E. coli C (sensor quinase)*

QseBC - Sistema regulador de dois componentes de *Escherichia coli*

qRT-PCR - *Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*

SHIME® - *Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem*

SHU - Síndrome Hemolítica Urêmica

STEC - *Shiga Toxin-Producing E. coli*

Stx - *Shiga toxin*

S. typhimurium - *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium

T3SS - *Type III Secretion System*

T6SS - *Type VI Secretion System*

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

Sumário

1. Introdução	17
1.1. Sensor histidina quinase QseC	20
1.2. Butirato	21
1.3. <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	23
1.4. Lactobacilos	24
1.5. Métodos de avaliação <i>in vitro</i> e modelo de infecção <i>in vivo</i> utilizando <i>Citrobacter rodentium</i>	25
2. Objetivo	27
2.1. Objetivos específicos	27
3. Materiais e Métodos	28
3.1. Linhagens e primers utilizadas no estudo	28
3.2. Curva de crescimento bacteriano na presença de butirato de sódio	30
3.3. Ensaio de motilidade	31
3.4. Cultivo de célula epitelial HeLa e macrófago	31
3.5. Ensaio de adesão bacteriana	31
3.6. Análises <i>in vitro</i> na presença de But	32
3.7. Ensaio de sobrevivência intracelular em macrófagos	33
3.8. Curva de crescimento bacteriano em alta e baixa glicose ou em co-cultura com Bt	34
3.9. Análises <i>in vitro</i> em alta e baixa glicose ou em co-cultura com Bt (<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>)	34
3.10. Estudo em Simulador de Ecossistema Microbiano Intestinal Humano - SHIME®	35
3.11. Análise de expressão gênica por qRT-PCR	37
3.12. Teste de competição em ágar entre EHEC e <i>Lactobacillus spp.</i>	38
3.13. Teste de competição em caldo entre EHEC e <i>Lactobacillus spp.</i>	38
3.15. Análise estatística	39
4. Resultados e Discussão	40

4.1.	Curva de Crescimento	40
4.2.	Ensaio de Adesão em células HeLA	42
4.3.	Motilidade em meio semissólido.....	43
4.4.	Análise da expressão gênica na presença de butirato de sódio	44
4.5.	Ensaio de sobrevivência intracelular em macrófagos.....	48
4.6.	Curva de crescimento em alta ou baixa glicose na presença ou ausência de <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	51
4.7.	Análise da expressão gênica em baixa e alta glicose.....	52
4.8.	Expressão gênica em alta e baixa glicose na presença de <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	54
4.9.	Simulador de ecossistema Microbiano Intestinal Humano - SHIME®	57
4.10.	Ensaio de competição e co-cultura com Lactobacilos em caldo e ágar ..	65
4.11.	Ensaio de infecção com <i>C. rodentium</i> , linhagem Wt e $\Delta qseC$, em camundongos C57BL/6	71
5.	Conclusão	77
6.	Referências	78

Capítulo 1

1. Introdução

EHEC é um patógeno gastrointestinal conhecido por sua capacidade de causar diarreias hemorrágicas, e em alguns casos, levar ao desenvolvimento da Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) em humanos(1). São microrganismos de grande importância clínica, associados a surtos alimentares, principalmente por carnes contaminadas mal cozidas, uma vez que EHEC pode colonizar o trato gastrointestinal de bovinos, sendo esses animais o principal reservatório para estes patógenos (1, 2). EHEC pode ser classificadas como STECs (*E. coli* produtoras de toxina “*Shiga-like*”), devido a sua capacidade de produção de toxina Shiga (1). A toxina Shiga é um importante fator de virulência expresso por estes patógenos. Esta toxina quando produzida, pode levar ao desenvolvimento de SHU, que tem consequências graves como falência renal, sendo a principal causa de morbidade e mortalidade associadas a surtos por esse patógeno (3, 4).

EHEC possui em seu genoma a ilha de patogenicidade *LEE*, onde estão contidos importantes genes de virulência. Uma vez que a ilha é ativada pelo regulador global *ler*, irão ser codificadas proteínas como EspA, EspB e EspD, para a formação do sistema de secreção do tipo III (Type-3 Secretion System – T3SS), proteínas efetoras como a adesina Intimina, e o receptor Tir (2, 5, 6). O T3SS funciona como uma agulha, injetando o receptor Tir na célula hospedeira, que se ligará à Intimina, presente na membrana celular bacteriana, promovendo a adesão íntima da bactéria na célula hospedeira (1). Quando inserida no hospedeiro, essas proteínas promovem mudanças no citoesqueleto através de complexas cascatas bioquímicas, formando a

estrutura conhecida como pedestal (1) levando a formação da lesão A/E (*attaching and effacing*), como demonstrado na figura 1.

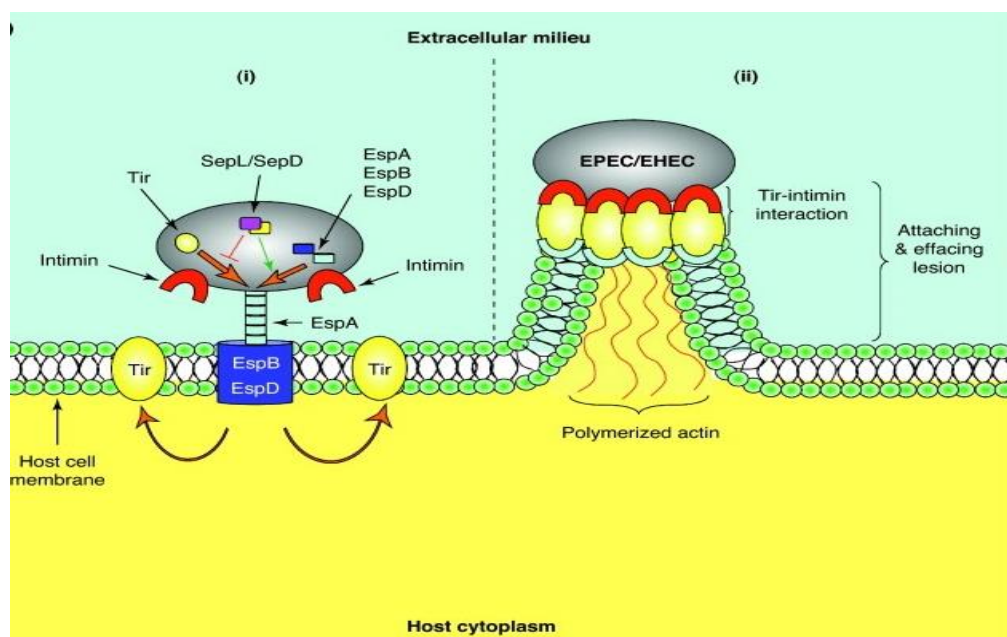


Figura 1: Representação da formação do pedestal desenvolvido por EHEC e EPEC. (I) Etapa de formação do sistema de secreção do tipo III e translocação de proteínas efectoras, (II) Remodelamento do citoesqueleto de actina para formação do pedestal (6).

Ainda, foi demonstrado que EHEC possui o sistema de secreção do Tipo VI (TSS6), sendo esse sistema amplamente distribuído em bactérias Gram-negativas, e está relacionado com a competição entre comunidades bacterianas através da introdução de toxinas bacteriolíticas em células, estando envolvido em mecanismos de patogenicidade de vários patógenos (7, 8). Esse maquinário possui proteínas acessórias e efectoras como o sistema de ancoragem TssJLM, que ancora o complexo de base TssEFGK que está conectado ao tubo proteico Hcp mediado por TssA, que funciona como uma placa para essa conexão, e o sistema TssB-TssC que funciona como uma bainha contrátil, impulsionando o dispositivo de perfuração Hcp-VgrG (9) (Figura 2). Dessa forma, Hcp, VgrG e proteínas efectoras associadas, podem ser transcolados em células-alvo bacterianas e eucarióticas, funcionando assim como uma arma especializada contra hospedeiros

eucarióticos ou competidores procarióticos, e ainda podem ser reutilizados para montar novas maquinarias T6SS em células-alvo (9). Em EHEC pouco se sabe sobre essa maquinaria, no entanto no estudo de Wan *et al.*, 2017, foi demonstrado a participação deste sistema na secreção de um efector denominado KatN, uma catalase dependente de T6SS, que contribui para o crescimento bacteriano em estresse oxidativo *in vitro*. Ainda, KatN pode ser secretada após a fagocitose por macrófagos, levando a diminuição do nível de espécies reativas de oxigênio intracelular, facilitando sua sobrevivência dentro dessas células fagocíticas (8). Nesse mesmo estudo, em experimentos *in vivo*, a deleção do T6SS levou a atenuação da virulência de EHEC, no entanto o mutante KatN não demonstrou essa mesma atuação, indicando a importância na secreção dessas proteínas efetoras por esse sistema (8). Pouco se sabe quando ocorre a ativação de T6SS, nem por quais vias este sistema é regulado em EHEC, sendo uma maquinaria na qual não é conhecida amplamente a sua contribuição para sobrevivência de EHEC no ambiente intestinal, ou seu papel na competição deste patógeno com membros da microbiota.

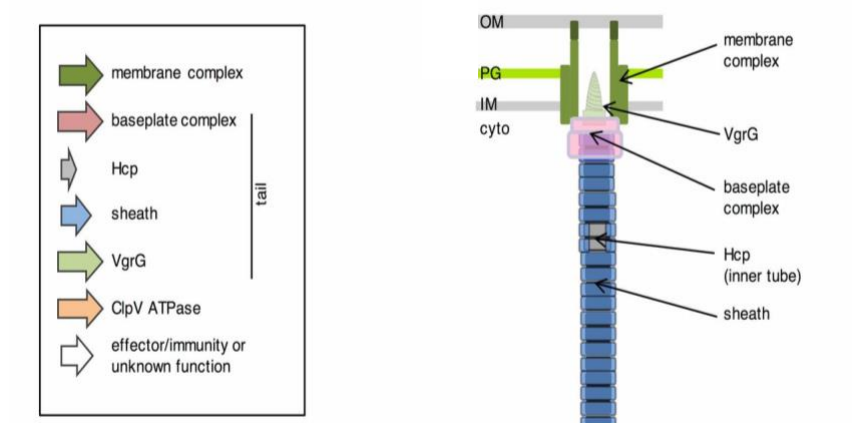


Figura 2: Representação esquemática do sistema de secreção do tipo VI. O sistema é composto de bainha, complexos de membrana e placa de base e as proteínas Hcp, além de ClpV ATPase que dá energia para a contração do sistema (10).

1.1. Sensor histidina quinase QseC

Para detectar alterações no ambiente e poder estabelecer comunicação célula-célula, bactérias produzem e difundem pequenas moléculas químicas ou sinalizadores que são reconhecidas por receptores presentes na membrana desses microrganismos (11). Através dessa comunicação é possível que bactérias detectem alterações como o aumento no número da colônia, hormônios produzidos pelo hospedeiro (12, 13) e mudanças na concentração de açúcares (14), e assim modular sua resposta dependendo da sinalização do ambiente inserido.

Esses receptores de membrana compõem um sistema de dois componentes formados por uma proteína histidina quinase, que atua como um sensor com seu respectivo regulador de resposta cognato. Um importante sensor de membrana é a proteína QseC, uma histidina quinase, que compõe um sistema de dois componentes com o regulador de resposta cognato QseB, responsável por promover modulação de genes de virulência em EHEC (13, 15, 16). O sensor QseC responde aos hormônios adrenérgicos norepinefrina e epinefrina de mamíferos, e ao autoindutor-3 produzidos por bactérias (17). Essas moléculas promovem o aumento da autofosforilação desse receptor, desencadeando cascatas de sinalizações químicas que promovem mudanças na expressão gênica em EHEC (13). Dessa forma, esse receptor tem papel importante na detecção de mudanças no ambiente para modulação de respostas desse microrganismo (15, 16). QseC regula direta e indiretamente a expressão gênica de *LEE*, na qual contém genes essenciais para a formação da lesão A/E em células epiteliais por EHEC e *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) (18-21). Estudos tem demonstrado a importância

do sensor QseC na modulação de fatores de virulências expressos por patógenos e a inibição dessa sinalização mediado por este sensor, mostrou-se ser estratégia diferenciada no desenvolvimento de possíveis antimicrobianos, uma vez que houve diminuição da virulência de patógenos, porém sem alteração do seu crescimento, não exercendo pressão seletiva para o desenvolvimento de resistência (22).

1.2. Butirato

Ácidos graxos são importantes produtos provindos da fermentação de açúcares complexos pela microbiota, que tem diversas funções benéficas tanto no hospedeiro, como na microbiota intestinal (23). Dentre esses ácidos graxos destacam-se propionato, acetato e butirato (23). Estudos anteriores mostraram aumento da expressão de genes de virulência na presença de 20 mM de butirato em EHEC, porém o mesmo não é observado para os outros dois ácidos graxos: acetato e propionato (24).

O butirato é produzido através da fermentação de açúcares complexos por espécies de bactérias da microbiota como *Blautia faecis*, *Roseburia inulinivorans*, *Ruminococcus torques*, *Clostridium lavalense*, e *Bacteroides uniformis* (25). Estudos ainda mostram que a suplementação da alimentação com butirato diminuiu a inflamação intestinal após a infecção com *C. rodentium* (26) e a proteção da invasão por *Campylobacter jejuni* (27) por exemplo. Além disso, estudos têm demonstrado que o butirato mostra ter um papel importante como anti-inflamatório intestinal, e que o desenvolvimento de certas doenças inflamatórias podem estar associadas a diminuição de grupos de bactérias que fazem sua síntese (28). Esse ácido graxo também

está associado a regeneração de enterócitos, modulação da comunidade microbiana entérica e contribui para aumentar a saúde por mecanismos que ainda não estão bem elucidados, sendo idealizado como um suplemento em alimentação de animais e humanos para fortalecimento da microbiota (26). Em seu estudo Zumbrun *et al.*, 2013, demonstrou que o aumento da produção de butirato, devido a uma dieta rica em fibras, leva a um aumento da expressão do receptor globotriaosilceramida pelo hospedeiro. A toxina de Shiga produzida por EHEC, liga-se a estes receptores, e dessa forma, animais que foram alimentados com uma dieta rica em fibras foram mais susceptíveis a toxina de Shiga, quando comparados com o grupo com uma dieta com baixa ingestão de fibras (29).

Estudos ainda demonstram que EHEC responde ao butirato através de Lrp, que junto com Pch e Ler ativam a expressão do gene *leuO*. Por sua vez *leuO* e *ler* juntos, formam um feedback positivo que contribui para a ativação prolongada dos genes associados a LEE. Esse feedback positivo só é ativado quando EHEC detecta butirato, pois tanto Lrp quanto butirato são necessários para a transcrição de *leuO* (24, 30). Ainda, proteínas como Tir, essencial para a formação da lesão A/E, estavam aumentados na presença de butirato, indicando que em EHEC, esse ácido graxo pode ter um papel oposto ao de proteção esperado (24). Ácidos graxos, bem como o butirato, têm papel importante para diminuição de doenças, e já foi demonstrado que este último atua de maneira benéfica para “*clearance*” de patógenos, ou eliminação destes intrusos pelo sistema imunológico, no entanto, ainda não está bem esclarecido se butirato contribui para a virulência de EHEC, *in vivo* (31).

1.3. *Bacteroides thetaiotaomicron*

Recentemente nosso grupo demonstrou que bactérias comensais benéficas para a microbiota como o *B. thetaiotaomicron* (Bt) podem aumentar a expressão de genes de virulência em bactérias patogênicas como EHEC (32). Estudos demonstraram que EHEC e *Citrobacter rodentium* possuem o sistema de dois componentes FusKR. Este sensor promove regulação negativa de genes de LEE na presença de fucose (32, 33). Ainda, essas bactérias possuem o fator de regulação transcricional Cra, que detecta alteração de concentrações de açúcar e também exerce regulação de LEE em resposta a essas mudanças nas concentrações de açúcares (Figura 3) (14). Dessa forma, alterações no panorama metabólico para um ambiente gliconeogênico próximo ao epitélio, que associado ao aumento da secreção de succinato e fucose no intestino mediado por Bt, é interpretado pela EHEC como um sinal nutricional para a regulação e ativação da expressão de genes de virulência (32). Portanto, EHEC usa a fucose especificamente, e outros açúcares, como um sinal disponibilizado pela microbiota, para detectar o ambiente do lúmen intestinal e para modular seu próprio metabolismo e virulência em resposta a esse ambiente (3, 33).

Ainda, experimentos *in vivo* demonstraram que o aumento induzido de Bt na microbiota, levou a um aumento da patologia, permeabilidade da mucosa e morte dos camundongos, exacerbando a infecção por *C. rodentium*, ou seja, o aumento desse membro da microbiota pode induzir uma maior virulência de EHEC e *C. rodentium* (32).

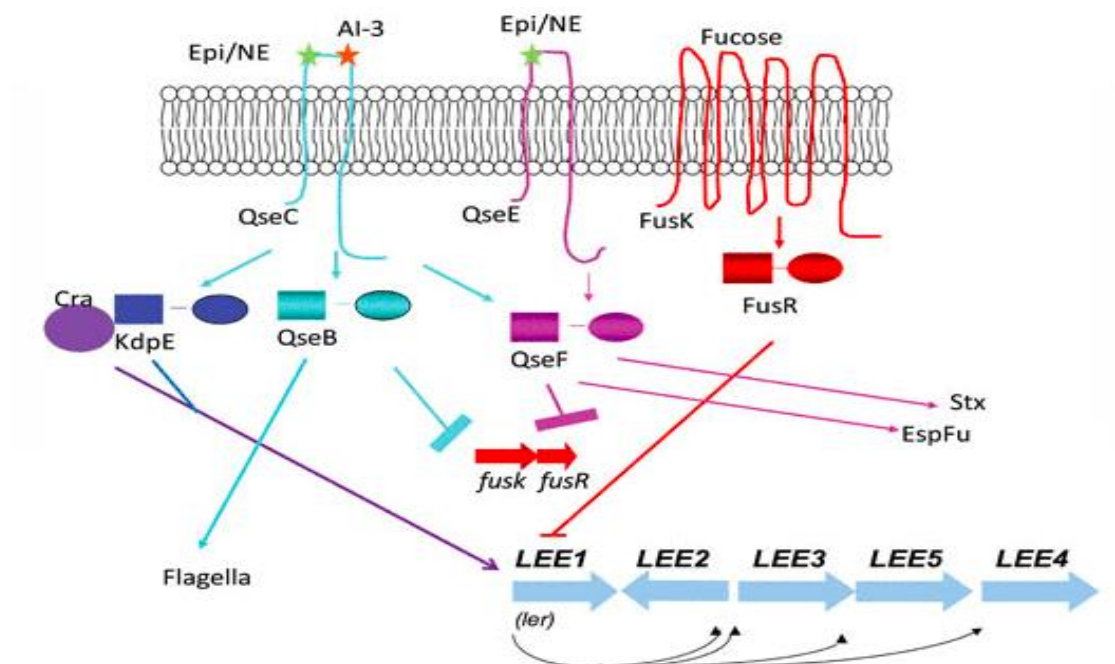


Figura 3. A cascata de sinalização de QseC em EHEC. QseC detecta AI-3, epinefrina e norepinefrina e fosforila QseB, QseF e KdpE. QseE detecta epinefrina e fosforila QseF. QseB ativa a expressão de flagelo. QseF indiretamente promove a expressão de toxina Shiga e EspFu. KdpE juntamente com Cra ativam a expressão do gene LEE. Ambos QseB e QseF reprimem a expressão de fusR. FusK detecta fucose e fosforila FusR que reprime LEE (34).

1.4. Lactobacilos

Lactobacilos são bactérias Gram-positivas que fazem parte da microbiota humana e podem ser encontradas na boca, trato gastrointestinal e trato genito-urinário feminino (35). São bactérias que apresentam um vasto papel em benefício da saúde humana, como por exemplo inibir o crescimento de patógenos devido a produção de ácido láctico e metabolitos, além disso, produzem substâncias antioxidantes (36) e imunomoduladores de células, e mediam respostas anti-inflamatórias (35, 37). Por causa dessas características são considerados uma importante classe de probióticos (35). Seu papel na proteção da saúde humana é bem conhecido e já vem sendo usado há muitos anos como probiótico em leites fermentados, como é o caso do *Lactobacillus casei* Shirota®. Recentemente foi demonstrado que lactobacilos podem ter papel protetor contra a infecção por EHEC, uma vez

que em estudos *in vivo* demonstraram que a administração prévia de *Lactobacillus casei* LW2 e *Lactobacillus reuteri*, diminuíram a colonização deste patógeno em camundongos (38, 39). Como a administração de antibióticos não é indicada para pacientes com infecção por EHEC, devido a esses fármacos induzirem a produção de toxina Shiga, codificada por variantes do gene *stx* e inserida no cromossomo de EHEC via bacteriófago (1), a utilização de bactérias probióticas que competem com EHEC vem se destacando como uma alternativa interessante, e pode ser uma estratégia promissora no combate à infecções causadas por este patógeno.

1.5. Métodos de avaliação *in vitro* e modelo de infecção *in vivo* utilizando *Citrobacter rodentium*

Entender como patógenos gastrointestinais se comportam nos diferentes compartimentos do organismo, ajudam a compreender melhor os principais mecanismos utilizados por esses microrganismos em processos de adaptação ao hospedeiro. Dessa forma, modelos de pequenos animais, como ratos e camundongos, são amplamente utilizados para investigar patogênese bacteriana ou para testar estratégias de interferência em infecções. EHEC e EPEC são patógenos que infectam murinos, mas não desenvolvem sintomas clássicos da doença, como no hospedeiro humano, dificultando o estudo dos principais mecanismos de virulências desenvolvidos por esses microrganismos *in vivo* (5, 40). Ainda, mesmo que esses animais são importantes modelos de estudo, eles não apresentam as mesmas condições que as encontradas em humanos, por esses patógenos. Para contornar esse problema, modelos colônicos dinâmicos de avaliação *in vitro* vem sendo

utilizados com o intuito de mimetizar as condições do trato gastrointestinal humano e analisar a resposta de microrganismos nesses compartimentos. Os modelos TIM (TNO gastrointestinal tract model), e SHIME® (Simulador de Ecossistema Microbiano Intestinal Humano – SEMIH) são os mais empregados em estudo para a microbiologia devido a sua combinação de dinamismo e multicompartimentalização(41). O TIM consiste em um sistema de quatro compartimentos mimetizando estômago e as três partes do intestino delgado, na qual são simuladas as condições como pH, temperatura, enzimas que fazem parte do processo digestivo e a absorção passiva de pequenas moléculas (41, 42). O SHIME® por sua vez inclui um modelo de 5 biorreatores que incluem todos os compartimentos do trato gastrointestinal, do estômago ao cólon, mimetizando as mesmas condições desses compartimentos. Nos biorreatores mimetizando cólon, o modelo é mantido sob processo fermentativo, na qual são inoculadas e estabilizadas a microbiota de doadores para os estudos da alteração da comunidade microbiana intestinal em diferentes condições(41, 43) . Esses são importantes modelos para estudar o comportamento de EHEC as condições do hospedeiro, bem como os mecanismos patogenicidade envolvidos para adaptação de EHEC a essas condições, principalmente em um patógeno que é exclusivo de humanos e com pouco modelos animais para testes *in vivo*(1). Por sua vez, para os estudos *in vivo*, *C. rodentium*, um patógeno natural de murinos, é considerado um modelo alternativo para o estudo da infecção *in vivo* de EHEC e EPEC por compartilhar 67% de seus genes com esses patógenos e alguns dos principais mecanismos de patogenicidade(40, 44). *C. rodentium*, assim como EHEC e EPEC, possuem a ilha de patogenicidade *LEE* que codificam o

sistema de secreção do tipo III e proteínas efetoras para a formação da lesão A/E (40). É utilizado como modelo alternativo de infecção animal para a compreensão das bases moleculares e os mecanismos de virulência desenvolvidos por patógenos LEE positivos, como EHEC e EPEC, *in vivo* (40, 44). Apesar dos estudos *in vitro* do sensor QseC em EHEC e EPEC, a baixa infecção desenvolvida por esses patógenos em pequenos animais é um fator limitante para a continuidade dos estudos *in vivo*. A importância em se estudar este sensor em *C. rodentium*, se dá pelo fato de auxiliar na melhor compreensão de como QseC contribui na patogenia desenvolvida *in vivo* por EHEC e EPEC, além do seu papel na interação patógeno-hospedeiro.

2. Objetivo

Investigar a direta regulação e sinalização química mediadas por bactérias comensais da microbiota intestinal, através do sensor quinase QseC, na virulência de *Escherichia coli* enterohemorrágica.

2.1. Objetivos específicos

- Investigar o papel de QseC na competição de EHEC com a microbiota intestinal.
- Investigar a participação de QseC na modulação induzida pelo butirato de sódio, na virulência de EHEC.
- Análise da sinalização mediada por *Bacteroides thetaiotaomicron* na patogenia de EHEC, bem como a participação de QseC nessa regulação.
- Análise da sinalização mediada por QseC na competição de EHEC com *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus reuteri*.

- Virulência mediada por QseC na infecção *in vivo* desenvolvida por *C. rodentium*.

3. Materiais e Métodos

As linhagens bacterianas empregadas foram cultivadas de forma aeróbica ou anaeróbica em meio Luria-Bertani (LB) para linhagens de EHEC ou meio De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) para Lactobacilos, caldo ou ágar, a temperatura de 37°C, sob agitação ou estático, conforme a necessidade do estudo. Nos ensaios em que foram usados butirato de sódio (But), foi usado cloreto de sódio (NaCl) nos grupos controles (ausência de But), para assegurar que as linhagens estivessem sob mesma pressão osmótica. Todos os testes foram realizados em triplicatas.

3.1. Linhagens e primers utilizadas no estudo

Para analisar os genes de interesse através da técnica de qRT-PCR, foram utilizados os seguintes primers.

Tabela 1: Lista de primers utilizados no estudo.

Primer	Sequência dos primers 5' - 3'	Origem
<i>tir</i>	Forward – CCATGGAGAGCAGACGTAGCT Reverse - CGGTGATCCTGGATTAAACCTT	(21)
<i>espA</i>	Forward – TCAGAATCGCAGCCTGAAAA Reverse - CGAAGGATGAGGTGGTTAAGCT	(21)
<i>ler</i>	Foward - CGACCAGGTCTGCCCTTCT Reverse - GCGCGGAACTCATCGAAA	(21)
<i>hcp-2</i>	Foward- GAACGTCAGGCAGTTTCCGT Reverse - GGCCACGCTATCTGGTGAAA	(8)
<i>rpoA</i>	Foward – GCGCTCATCTTCTTCCGAAT Reverse – CGCGGTCGTGGTTATGTG	(21)
Bacteroides (RNA 16S)	Forward – CGATGGATAGGGTTCTGAGAGGA Reverse - GCTGGCACGGAGTTAGCCGA	(45)
Prevotella (RNA 16S)	Forward – CACCAAGGCGACGATCA Reverse - GGATAACGCCYGGACCT	(45)
Delta e Gamma proteobacteria (RNA 16S)	Forward – GCTAACGCATTAAGTRYCCCG Reverse – GCCATGCRGCACCTGTCT	(46)
Eubacteria (Eub – RNA 16S)	Forward – ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT Reverse - ATTACCGCGGCTGCTGGC	(47)
Firmicutes (RNA 16S)	Forward – TGAAACTYAAAGGAATTGACG Reverse - ACCATGCACCACTGTC	(46)
Bacteroidetes (RNA 16S)	Forward – CRAACAGGATTAGATACCCT Reverse – GGTAAGGTTCTCGCGTAT	(48)
Bifidobacterium (RNA 16S)	Foward- TCGCGTC(C/T)GGTGTGAAAG Reverse - CCACATCCAGC(A/G)TCCAC'	(49)
Lactobacillus (RNA 16S)	Forward - AGCAGTAGGGAATCTTCCA Reverse - CACCGCTACACATGGAG	(49)

Para o estudo foram utilizadas as seguintes linhagens:

Tabela 2: Linhagens utilizadas no estudo.

Nº na Coleção	Descrição da linhagem	Marca resistência diferencial	Origem
52	<i>E. coli</i> TOP10 carreando plasmídeo pBADMychisA(+ <i>qseC</i>)	Ampicilina	Coleção PASIQUIBAC
160	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	-	Coleção PASIQUIBAC
202	<i>Citrobacter rodentium</i> – DBS 100 (<i>Wild-Type</i> – WT)	Ácido Nalidíxico	Coleção PASIQUIBAC
203	DBS 100 - mutante $\Delta qseC$	Ácido Nalidíxico	(50)
209	<i>E. coli</i> enterohemorrágica 0157:H7 Linhagem 8624 - (<i>Wild-Type</i> – WT)	Estreptomicina	(51)
210	8624 - mutante $\Delta qseC$	Estreptomicina	(13)
-	<i>Lactobacillus acidophilus</i> linhagem 3258	-	Laboratório Prof. André Tozela
-	<i>Lactobacillus reuteri</i> linhagem 3334	-	Laboratório Prof. André Tozela

3.2. Curva de crescimento bacteriano na presença de butirato de sódio

Curvas de crescimento foram realizadas para analisar se poderiam ocorrer diferenças de crescimento entre as linhagens Wt e $\Delta qseC$ na presença de butirato de sódio. As linhagens foram cultivadas por 16 horas sob agitação a 37°C, em seguida foram diluídas na proporção de 1:20 do inóculo em meio D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Thermo Fisher) baixa glicose (1 g/L), e adicionados 20 mM de But no grupo tratado e 20 mM de NaCl no grupo controle. Em seguida os tubos foram colocados sob agitação com rotação de 250 rpm a 37°C. Foram medidas as densidades óticas (D.O._{600nm}) das culturas nos seguintes intervalos de tempo: 30 min, 1, 2, 3, 5, 7, 9 e 21

horas. A partir das densidades óticas do crescimento bacteriano das linhagens, as curvas foram construídas.

3.3. Ensaio de motilidade

Este ensaio teve o intuito de analisar a diferença de ativação do flagelo nas linhagens Wt e $\Delta qseC$ na presença de But. Para isso foram inoculados 5 μ L da cultura cultivada por 16 horas no centro de uma placa contendo meio LB ágar semi-sólido 0,25% + 20 mM de But ou 20 mM de NaCl. Após 8 horas a 37°C, foram medidos os halos de crescimento das culturas, como previamente descrito (17).

3.4. Cultivo de célula epitelial HeLa e macrófago

Para os ensaios realizados no presente estudo foram utilizadas duas linhagens distintas de células de mamíferos, células epiteliais HeLa (Laboratório de Biologia Celular – Instituto Adolfo Lutz, São Paulo – SP) e macrófagos murinos J774 (ATCC®). Para os cultivos foram utilizados meio DMEM acrescido de 4 mM de L-glutamina, 4500 mg/L de glicose, 1 mM piruvato sódico, 10% de soro fetal bovino e Penicilina-Estreptomicina (5000 U/mL, diluída 100x), e colocadas em estufa com atmosfera de 5% CO₂, a 37°C para incubação.

3.5. Ensaio de adesão bacteriana

Por meio do ensaio de adesão, foi avaliado se But poderia influenciar no processo de adesão e se o fenótipo poderia ser diferente entre Wt e $\Delta qseC$. Assim, células HeLa foram cultivadas em garrafas até confluência de 80%, em meio de cultura D-MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino com os antibióticos penicilina-estreptomicina, e mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. Após o cultivo em garrafas, as células foram

desprendidas por tripsinização, em seguida foi adicionado D-MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos (penicilina-estreptomicina). Em uma placa de 24 poços, foram adicionados a cada poço 1 mL de meio D-MEM + células e estas foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂, por 24 horas. Após esse período, foram retirados os meios de cultura de cada poço e lavados 3 vezes com PBS (Phosphate Buffer Saline), seguidos da adição de 1 mL de meio D-MEM sem antibióticos com NaCl ou But. Em seguida 40 µL de inóculo cultivado por 16 horas das linhagens selvagem e mutante $\Delta qseC$ foram adicionadas aos poços. A interação bactéria-HeLa ocorreu durante 3 horas, seguida da troca de meio, e estas permaneceram por mais 3 horas. Finalizado o período de 6 horas, cada poço foi lavado 3 vezes com PBS e foram adicionados solução TRITON 1 X para lise da membrana celular das células HeLa. Posteriormente foram feitas diluições seriadas das amostras até a diluição de 10⁵, por fim estas foram semeadas em placas de LB contendo estreptomicina e após 16 horas a 37°C foram contadas as unidades formadoras de colônias (UFCs), conforme previamente descrito (52).

3.6. Análises *in vitro* na presença de But

Este teste teve como intuito avaliar como a presença do butirato pode modular o padrão de expressão dos genes de virulência de EHEC, e se o sensor QseC poderia ter participação nessa regulação. Dessa forma, após os cultivos bacterianos crescerem em meio D-MEM (baixa glicose) na presença de But ou NaCl até a D.O. 1,0, foi realizada a extração do RNA total através do trizol conjuntamente com o RiboPure-Bacteria RNA isolation kit (Ambion-Life). Após a extração do RNA, foi analisado a expressão dos genes de

virulência contidos na ilha LEE, *ler* e *espA*; toxina de Shiga, gene *stx-2*; e o sistema T6SS, o gene *hcp-2*.

3.7. Ensaio de sobrevivência intracelular em macrófagos

Para investigar se butirato pode modular a resposta de patógenos e células imunológicas, testes em macrófagos foram realizados na presença e ausência de But. Assim, as células bacterianas foram crescidas durante a noite em meio LB contendo 20 mM de But. Os macrófagos foram crescidos em três condições diferentes: (a) grupo controle na ausência de But, (b) na presença de 2 mM de But por 3 horas, e (c) na presença de 2 mM de But por 24 horas. No grupo controle, bactérias e macrófagos foram crescidos com 20 mM e 2 mM de NaCl, respectivamente. Dessa forma, as linhagens crescidas em NaCl ou But foram previamente opsonizadas com soro de camundongo a 37°C durante 15 min e lavadas em PBS estéril. Utilizou-se multiplicidade de infecção de 100:1, durante 30 min a 37°C em 5% CO₂, com os inóculos normalizados na mesma DO_{600nm}. As células bacterianas, após interação com macrófagos J774 sem tratamento, na presença de But por 3 horas ou por 24 horas, foram tratados com gentamicina 30 µg/ml por 1 hora para matar as bactérias extracelulares remanescentes. Após incubação extra por 3 horas a 37°C em 5% CO₂. Os macrófagos J774 foram lisados com solução de Triton-X 100 (1%). Terminado este procedimento, as bactérias foram diluídas serialmente e plaqueadas em ágar LB, para determinação das UFCs de cada linhagem testada em triplicatas (53-55).

3.8. Curva de crescimento bacteriano em alta e baixa glicose ou em co-cultura com Bt

Esse experimento foi realizado para determinar o momento em que as amostras em alta e baixa glicose, com e sem Bt, estariam na mesma faixa de crescimento para futura extração de RNA e análise de expressão gênica nessas condições. Para isso as linhagens cultivadas overnight, foram inoculadas em tubos na proporção de 30:1 de meio D-MEM alta (4,5 g/L) ou baixa glicose (1,0 g/L) e inóculo, na presença ou ausência de Bt, respectivamente. Nas co-culturas foram utilizadas as proporções de 1:1 de EHEC e Bt. Os testes foram realizados em anaerobiose e estático a 37°C. Foram medidas as densidades óticas das amostras com 1:00h, 2:00h, 4:00h, 6:00h e 8:00h. A partir das densidades óticas foram construídas as curvas de crescimento.

3.9. Análises *in vitro* em alta e baixa glicose ou em co-cultura com Bt (*Bacteroides thetaiotaomicron*)

A análise do padrão de expressão gênica por RT-PCR foi realizada para avaliar se alterações na concentração de glicose, poderiam ativar o sistema T6SS. Dessa forma foi analisado a expressão do gene *hcp-2*. Além disso, foi avaliado se a presença de Bt em alta e baixa glicose, poderia modular a expressão dos genes de virulência de EHEC e induzir ativação de T6SS, devido a mudanças na quantidade de glicose. As linhagens, selvagem e $\Delta qseC$, foram cultivadas em meio D-MEM em alta e baixa glicose, ou na presença de Bt em baixa e alta glicose por 4 horas, conforme padronizado em curva de crescimento. Em seguida foi realizada a extração do RNA total com Trizol e RiboPure-Bacteria RNA isolation kit (Ambion-Life). Foram analisadas

por RT-PCR o padrão de expressão dos genes de virulência *ler*, *espA*, *stx-2* e *hcp-2*.

3.10. Estudo em Simulador de Ecossistema Microbiano Intestinal

Humano - SHIME®

Para analisar como a presença de EHEC e mutante do sensor QseC modulam a microbiota humana, e quais as mudanças em grupos importantes da microbiota poderiam ocorrer, foi realizado ensaio em SHIME®. Para isso o ensaio foi realizado conforme descrito por Bianchi et al., 2018. O SHIME® (nome comercial registrado da Universidade de Ghent e ProDigest) é um simulador de ecossistema microbiano intestinal humano que mimetiza condições como pH, tempo de residência e temperatura através de um software (56, 57). Para o experimento foi utilizado cinco reatores duplamente revestidos, um simulando o estômago, um o duodeno e triplicata do cólon ascendente. Para o experimento, os cinco reatores foram agitados continuamente com um agitador magnético e a temperatura foi mantida a 37 °C. O sistema foi mantido anaerobicamente através da introdução diária de N₂ por 30 min. O pH do cólon (pH entre 5,6-5,8) foi ajustado automaticamente pela adição de NaOH 1M ou HCl 0,1M (56, 57).

Cada compartimento do cólon recebeu alimentação à base de carboidratos, meio que permite a adaptação de microrganismos a condições ambientais específicas do cólon em termos de faixa de pH, tempo de retenção e fontes de carbono disponíveis, em volumes específicos descrito anteriormente. As condições do estômago, bem como uso e preparação de suco pancreático (composto por Oxgall 6,0 g / L, NaHCO₃ 12,5 g/L e pancreatina 0,9 g / L) (57).

Antes de iniciar os experimentos, os reatores do cólon foram inoculados com microbiota fecal de 2 adultos saudáveis. As fezes coletadas foram diluídas em 200 mL de tampão fosfato contendo Na_2HPO_4 0,05 mol/L, NaH_2PO_4 0,05 mol/L e Na-tioglicolato 0,1% (pH 6,5), agitada por 10 min em homogeneizador (Stirrer modelo 130, Norte Científica, São Paulo, BR.) e centrifugada a $3.000\times g$ por 15 min. Os sobrenadantes foram posteriormente adicionados (40 ml) aos 3 reatores do cólon. Os doadores não tinham histórico de antibiótico por pelo menos 6 meses antes do ensaio. O protocolo experimental incluiu um período de controle de duas semanas (sem intervenção) após inoculação do sobrenadante nos três reatores do cólon, para que a comunidade microbiana se adaptasse às condições nutricionais e físico-químicas e estabilização da microbiota (56). Nesse período, 200 mL da alimentação SHIME® entraram no sistema duas vezes ao dia por duas semanas.

Uma vez realizada a estabilização, foi introduzida 10^9 por mL de células das linhagens de EHEC Wt, ou $\Delta qseC$, no reator mimetizando estômago, estas foram distribuídas para o reator do duodeno + suco pancreático, até ser introduzidas no último reator mimetizando cólon. Para os ensaios entre as linhagens, foi realizado o período de Wash-out (período necessário para nova estabilização de microbiota e eliminação da linhagem Wt), onde a microbiota recebeu 200 mL da alimentação SHIME® duas vezes ao dia por uma semana, e foi realizada análise por PCR para confirmação da eliminação da linhagem Wt dos reatores, seguida da inoculação da linhagem $\Delta qseC$.

Tanto para a linhagem Wt, quanto $\Delta qseC$, foram coletadas amostras do estômago e duodeno, e realizadas contagem das UFCs para determinar a

concentração de bactérias após diluição no conteúdo estomacal, e realizar a análise da viabilidade celular bacteriana no pH estomacal e suco pancreático após 1 hora de exposição. Amostras foram coletadas antes da infecção (dia 0 ou D0) e após 24 horas de infecção. Foi realizada a extração do RNA total para análise do padrão de expressão gênica das linhagens Wt e $\Delta qseC$, como também para determinar a abundância da microbiota intestinal. Para isso foram realizadas análises dos filos Firmicutes, Bacteroidetes e γ -Proteobacteria e dos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Prevotella* e *Bacteroides*, além dos genes de virulência *ler* e *stx-2* de EHEC Wt e $\Delta qseC$.

3.11. Análise de expressão gênica por qRT-PCR

Todas as extrações de RNA foram realizadas com Trizol e RiboPure-Bacteria RNA isolation kit (Ambion-Life), seguida pela técnica de qRT-PCR empregado conforme previamente descrito (20). O RNA total foi obtido na concentração de 50 ng/ μ L por amostra dos ensaios realizados. Para cada reação de 20 μ L foi utilizado Master Mix SYBR®, Multi-scribe® reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific) e RNase inhibitor (Thermo Fisher Scientific), além de 100 ng de RNA de amostra.

A reação de transcriptase reversa qRT-PCR foi realizada em triplicadas biológicas, duplicadas experimentais. As reações foram normalizadas com o emprego de RNA polimerase subunidade A (*rpoA*) como controle endógeno para a análise de expressão dos genes de virulência. Como controle endógeno para identificação dos membros de interesse da microbiota foi utilizado *eub338*, gene universal para Eubactérias. Foi utilizado o equipamento QuantStudio3 (Thermo Fisher Scientific) para realização das reações. Os resultados obtidos pelo ensaio de qRT-PCR foram analisados

pelo método de *Comparative critical threshold* ($\Delta\Delta CT$), conforme previamente descrito (20). Barras de erro representam o desvio padrão dos valores C_T .

3.12. Teste de competição em ágar entre EHEC e *Lactobacillus spp.*

O teste teve como objetivo avaliar a possível competição entre EHEC e *Lactobacillus acidophilus* linhagem 3258 (LA) e *Lactobacillus reuteri* 3334 (LR), bem como a participação de QseC nesse processo. As linhagens Wt e $\Delta qseC$, bem como *L. acidophilus* e *L. reuteri*, foram crescidas durante a noite em meio LB e MRS respectivamente. Em seguida, foram medidas as densidades óticas dos inóculos em comprimento de onda de 600nm e a menor D.O. apresentada pelas linhagens após crescimento de 16h, foi a escolhida para ser utilizada no teste. Após o ajuste das D.O. as culturas foram centrifugadas a 7000 rpm por 2 minutos e foram ressuspensas em 300 μ l de PBS. Realizada essa etapa, foram adicionados em novo eppendorf a proporção de 1:1 ou 1:5 das linhagens de EHEC mais LA ou LR respectivamente, e por fim foram inoculados 10 μ l da co-cultura em placa de ágar LB + MRS (50 a 50%). Após 16 horas de interação as co-culturas foram recolhidas em tubos, diluídas, plaqueadas em LB contendo estreptomicina para EHEC e somente MRS ágar para LA e LR, e posteriormente foram contadas a UFCs.

3.13. Teste de competição em caldo entre EHEC e *Lactobacillus spp.*

Para avaliar possível inibição de crescimento de EHEC em caldo, as amostras de EHEC e mutante QseC, *L. acidophilus* e *L. reuteri* foram crescidos durante a noite em meio LB e MRS respectivamente, em seguida foram medidas as densidades óticas das culturas. Foram inoculados em meio LB+MRS caldo, a proporção de 1:1 ou 1:5 de *L. acidophilus* ou *L. reuteri* e

EHEC em co-cultura. No grupo controle, as linhagens cresceram sozinhas. As linhagens foram deixadas em interação em estático na estufa a 37°C por 8 horas, em seguida as amostras foram diluídas, plaqueadas e contadas a UFCs.

3.14. Ensaios *in vivo* em camundongo C57BL/6

Os ensaios *in vivo* foram realizados como descrito anteriormente por Lopez et al., 2019. Camundongos Wt C57BL/6 do Jackson Lab, com cinco semanas de idade, foram utilizados. Os camundongos foram infectados por via oral com *C. rodentium* do tipo selvagem ou mutante $\Delta qseC$ (5×10^9 UFC/camundongo). Os camundongos foram monitorados diariamente e as amostras fecais foram coletadas nos dias 1, 4 e 7 após a infecção. As amostras fecais foram coletadas, homogeneizadas, diluídas em série e plaqueadas em placas de ágar-caldo contendo antibióticos apropriados para determinar as contagens bacterianas (UFCs). Os camundongos foram eunatasiados no dia 7 após a infecção. O baço foi coletado, homogeneizado, diluído em série e plaqueado em placas de LB ágar contendo antibiótico apropriado para determinar a contagem bacteriana (UFCs). Todos os experimentos com animais foram revisados e aprovados pelos Comitês Institucionais de Cuidado e Uso de Animais da Universidade da Califórnia, San Diego.

3.15. Análise estatística

Os dados obtidos dos ensaios realizados foram analisados e sua significância estatística foi estabelecida pela análise de variância ANOVA ou Test t, utilizando-se o teste mais adequado para cada tipo de dados.

4. Resultados e Discussão

4.1. Curva de Crescimento

O butirato é um importante produto provindo do metabolismo da microbiota intestinal e mostrou regular importantes genes de virulência de EHEC, assim para analisar se o sensor QseC poderia ter participação na regulação de butirato nos genes da ilha LEE de EHEC, ensaios genotípicos e fenotípicos foram realizados na concentração de 20 mM de butirato de sódio (But). Inicialmente, foram realizadas curvas de crescimento na presença de But para analisar se o mesmo poderia influenciar no crescimento de EHEC. Para garantir que haveria indução dos genes de virulência de LEE, o ensaio foi realizado em DMEN baixa glicose, pois estudos prévios demonstram que esta condição induz a expressão dos genes de virulência em EHEC (14).

A linhagem Wt teve o mesmo padrão de crescimento na presença de NaCl e But, porém o crescimento foi estatisticamente significante nos horários de 5, 7 e 9 horas, porém após 21 horas, o crescimento foi o mesmo entre as condições NaCl e But, indicando que este mediador, nesta concentração, não ofereceu vantagens de crescimento para EHEC, corroborando com resultados obtidos em estudos prévios (Figura 4) (24). Já para a linhagem $\Delta qseC$, houve um atraso no crescimento nos tempos de 5, 7 e 9 horas na presença de NaCl, o que não foi observado para o crescimento na presença de But (Figura 5), apresentando após 21 horas, diferenças estatisticamente significantes no crescimento.

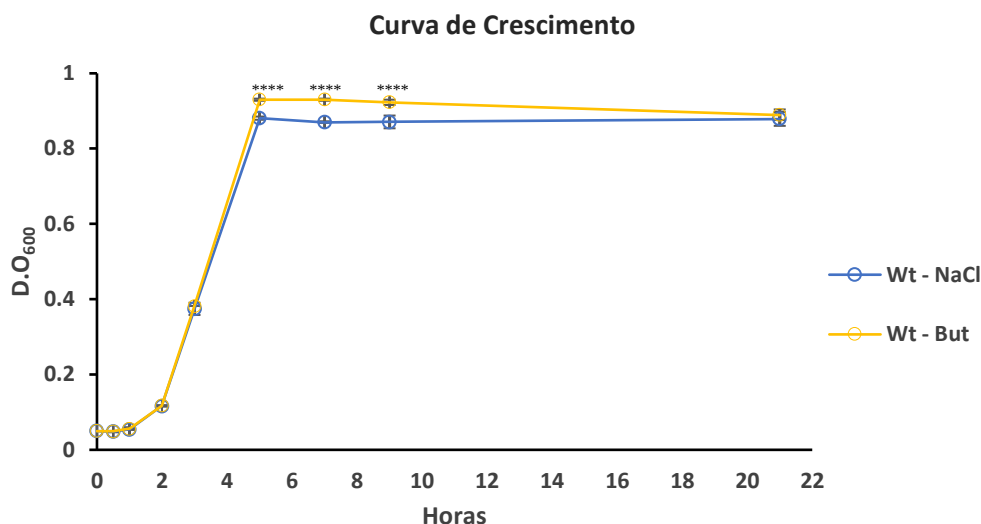


Figura 4: Curva de crescimento da linhagem selvagem (Wt) na presença de Cloreto de Sódio (NaCl) ou Butirato de Sódio (But) na concentração de 20 mM. As células foram cultivadas em meio D-MEM a 37°C por 16 horas. As culturas foram mantidas sob agitação a 37°C e a cada intervalo de tempo: 0,5 , 1, 2, 3, 5, 7, 9 e 22 horas foram retiradas alíquotas para a leitura da densidade óptica (D.O. 600 nm). Pontos sem asterisco não houve diferença estatística significativa. Significância estatística em comparação ao grupo controle em NaCl, $p < 0,0001$ (****), (Two-way Anova).

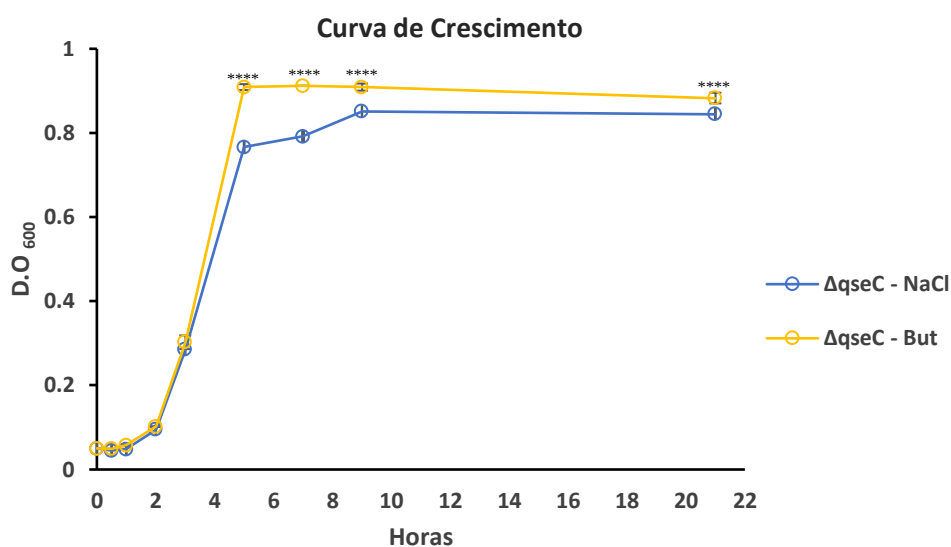


Figura 5. Curva de crescimento da linhagem mutante do sensor QseC na presença de Cloreto de Sódio (NaCl) ou Butirato de Sódio (But) na concentração de 20 mM. As células foram cultivadas em meio D-MEM a 37°C por 16 horas. As culturas foram mantidas sob agitação a 37°C e a cada intervalo de tempo: 0,5 , 1, 2, 3, 5, 7, 9 e 22 horas foram retiradas alíquotas para a leitura da densidade óptica (D.O. 600 nm). Pontos sem asterisco não houve diferença estatística significativa. Significância estatística em comparação ao grupo controle em NaCl, $p < 0,0001$ (****), (Two-way Anova).

Estes resultados sugerem que o butirato de sódio trouxe vantagens de crescimento para a linhagem $\Delta qseC$. Sabe-se que a ausência do sensor QseC afeta a virulência de EHEC sem afetar seu crescimento (22), no entanto, nesse ensaio foi possível notar que, não são em todas as condições que o

crescimento na ausência do sensor QseC será o mesmo entre a linhagem Wt e mutante.

4.2. Ensaio de Adesão em células HeLa

A adesão é uma etapa importante para EHEC se estabelecer e conseguir colonizar o ambiente intestinal. Foi demonstrado em estudo anterior que a concentração de 20 mM de butirato, induz a expressão de genes de virulência, que em EHEC, estão associados a formação do pedestal, estrutura que ajuda a colonizar o ambiente intestinal (58). Assim foi analisada se poderia haver interferência do butirato no processo de adesão, bem como a participação de QseC nesse processo.

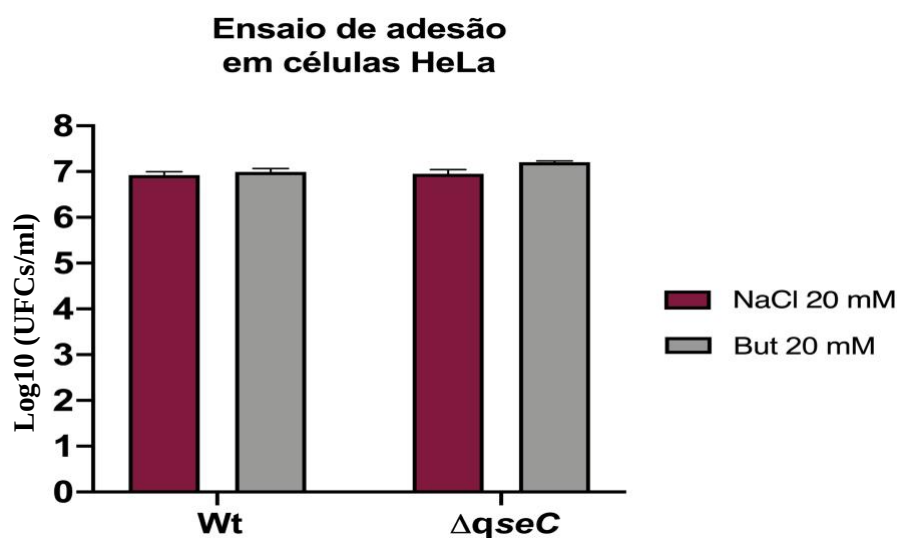


Figura 6. Ensaio de adesão quantitativo em meio com baixa glicose mais NaCl ou But a 20 mM. Análise quantitativa da adesão das linhagens estudadas em células epiteliais HeLa durante 6 horas em meio DMEM baixa glicose em NaCl ou But 20 mM. Significância estatística das linhagens Wt e $\Delta qseC$ em comparação com sua respectiva linhagem controle em NaCl. As barras sem asterisco não houve diferença estatística significativa.

Como mostrado na Figura 6, as linhagens Wt e $\Delta qseC$ não apresentaram alteração no perfil de adesão na presença ou ausência de But. É importante considerar que o ensaio não analisa a presença de pedestal, na qual os genes da ilha LEE são responsáveis por essa estrutura, mas somente

adesão, onde estruturas como fímbrias e outras adesinas participam (59). Assim, nota-se que não houve diferenças no processo de adesão que possam ser induzidas pelo butirato, ou com participação do sensor QseC, nessa condição.

4.3. Motilidade em meio semissólido

O ensaio de motilidade teve o intuito de demonstrar a ativação do flagelo induzida por butirato e se haveria participação de QseC, nesse processo. Dessa forma, foi realizado o ensaio na presença de 20 mM de But. No grupo controle contendo NaCl, a linhagem $\Delta qseC$ apresentou diminuição no halo de motilidade em comparação a linhagem Wt, que apresentou halo de tamanho médio de 27 mm, enquanto a $\Delta qseC$ apresentou halo em torno de 16 mm.

A presença de But, induziu aumento no tamanho do halo nas duas linhagens, com média de 33 e 27 mm para Wt e $\Delta qseC$, respectivamente. Houve aumento da motilidade na presença de But para ambas as linhagens.

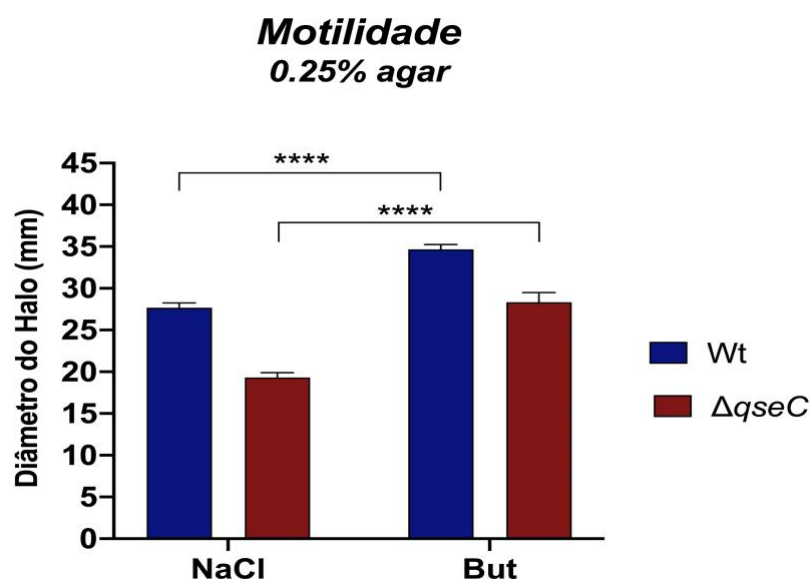


Figura 7: Ensaio de motilidade na presença de NaCl ou But das linhagens EHEC (Wt) e mutante $\Delta qseC$. Medidas do diâmetro do halo de crescimento em milímetros das linhagens em meio LB semi-sólido (0.25% ágar) após 8 horas. Significância estatística das linhagens Wt e $\Delta qseC$ em comparação com sua respectiva linhagem controle em NaCl, $p < 0,0001$ (**), Two-way Anova).

Sabe-se que em EHEC, o sensor QseC está envolvido na sinalização para ativação flagelar por meio do regulador FlhDC e há diminuição da motilidade em linhagens mutante desse sensor(13). Ainda, butirato pode fazer a ativação do flagelo em EHEC por meio de Lrp (proteína regulatória responsiva a leucina) que ativa os genes de *flhDC*(60). Nesse ensaio foi demonstrado que, mesmo a linhagem $\Delta qseC$ apresentando diminuição da ativação do flagelo e redução da motilidade, a presença de butirato ajudou a contornar essa redução na ativação. Isso pode ter ocorrido porque a ativação flagelar promovida por QseC, é por meio do regulador QseB(13), enquanto que a ativação por butirato é por meio de Lrp. Assim, na ausência de QseC, Lrp pode ter induzido a ativação flagelar na presença de butirato, levando ao aumento da motilidade observado na linhagem $\Delta qseC$, no entanto, essa ativação flagelar por meio do butirato não foi suficiente para que a linhagem $\Delta qseC$ chegasse ao nível de motilidade da linhagem Wt, nessa mesma condição. Ainda, esses resultados evidenciam como o mesmo grupo de genes, nesse caso para formação do flagelo, podem ser regulados por diferentes condições ambientais, permitindo uma resposta de EHEC a diferentes estímulos.

4.4. Análise da expressão gênica na presença de butirato de sódio

Para analisar se o padrão de expressão gênica de importantes genes de virulência de EHEC na presença de butirato e como a ausência do sensor QseC poderia afetar esse padrão de expressão, foi realizado o qRT-PCR do RNA extraído destas linhagens cultivadas na presença de 20 mM de But dos genes *ler* e *espA* para ilha LEE, *stx-2* para Shiga toxina, e *hcp-2* para o T6SS nas linhagens Wt e $\Delta qseC$.

Como pode ser observado na Figura 8A o padrão de expressão de *ler*, regulador global da ilha LEE, na presença de But, apresentou indução significativa da expressão desse gene, tanto na linhagem Wt quanto $\Delta qseC$. Além disso, a linhagem $\Delta qseC$ apresentou também um aumento da expressão de *ler* na presença NaCl em comparação a linhagem Wt, nessa mesma condição (Figura 8A).

Por outro lado, para o gene *espA*, contido em LEE, houve redução nos níveis de expressão em NaCl na linhagem $\Delta qseC$, quando comparada a linhagem Wt (Figura 8B). Já na presença de But, houve redução dos níveis de expressão do gene *espA* na linhagem Wt em relação na presença de NaCl, porém em $\Delta qseC$ houve aumento da expressão de *espA* nessa linhagem, quando comparado ao perfil de expressão desse gene em NaCl (Figura 8B).

Enquanto que, o padrão de expressão do gene *hcp-2* não demonstrou alteração na presença de NaCl tanto na linhagem Wt como $\Delta qseC$, por outro lado houve redução da expressão deste gene por But somente na linhagem $\Delta qseC$ (Figura 8C). Por fim, o gene *stx-2* não mostrou nenhuma alteração no padrão de expressão por NaCl em ambas as linhagens, porém houve aumento da expressão desse gene na presença de But somente na linhagem Wt (Figura 8D).

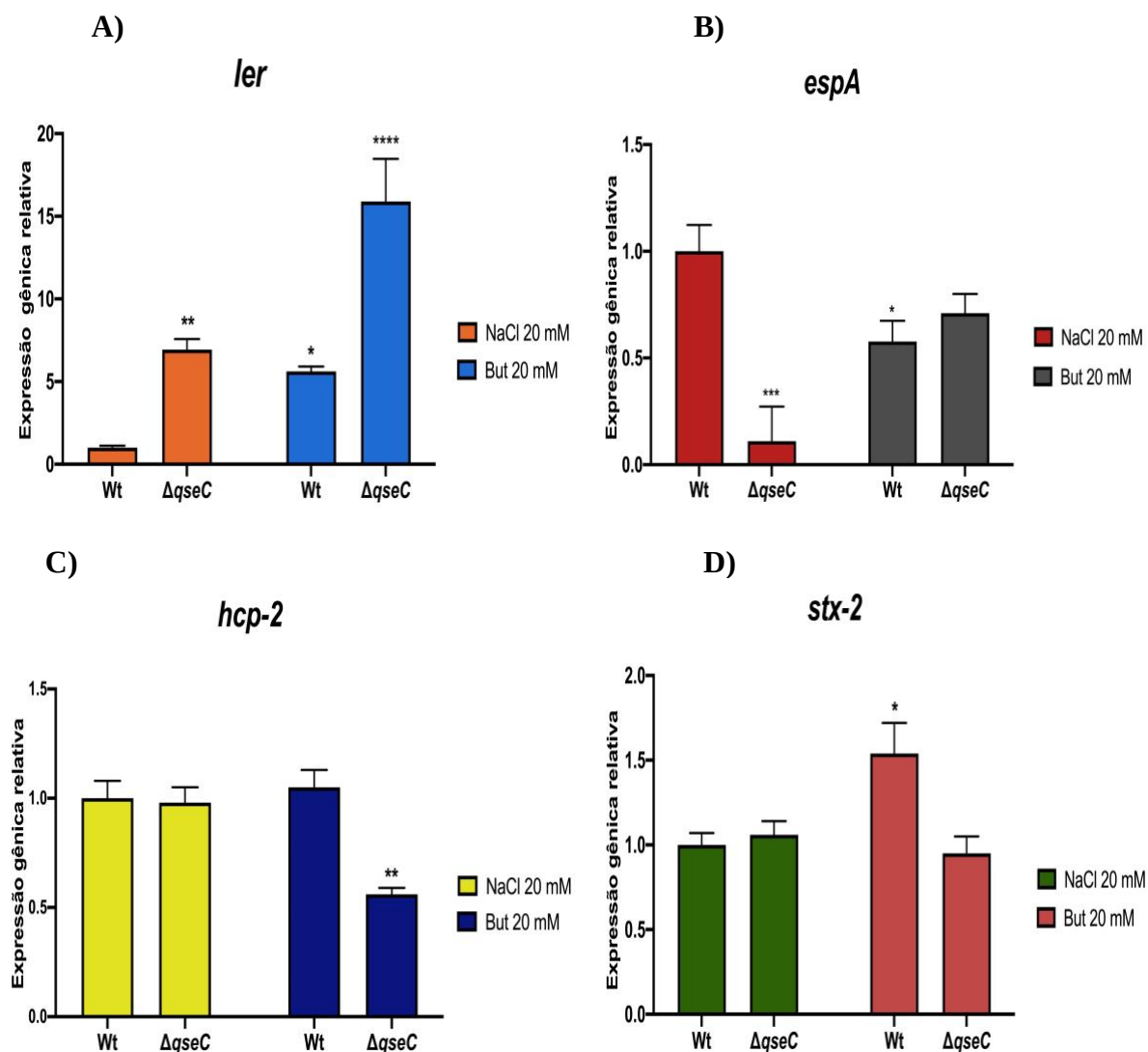


Figura 8: Análise do padrão de expressão dos genes de virulência na presença de cloreto de sódio (NaCl) e butirato de sódio (But). As células das linhagens selvagem EHEC (Wt) e $\Delta qseC$ foram cultivadas em meio DMEM baixa glicose, a 37°C na presença de 20 mM de NaCl ou But até D.O de 1, então o RNA total foi extraído tratado com DNase. Em seguida, foi realizado o ensaio de RT-PCR com os seguintes genes: **(A)** *ler*, **(B)** *espA*, **(C)** *hcp-2* e **(D)** *stx-2*. Significância estatística em comparação com a linhagem selvagem na presença de NaCl, as barras sem asterisco não houve diferença estatística significativa, $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****) (Two-way Anova).

Já havia sido demonstrado em EHEC o efeito do butirato no padrão de expressão da ilha LEE, na qual butirato leva a um loop positivo entre *leuO* e *ler*, induzindo assim a expressão dos genes de LEE1, e essa ativação ocorre através da detecção de butirato dependente de Lrp, que ativa a expressão de *phcA* e aumenta ainda mais a expressão de *ler* (24, 30). Ainda Nakanishi *et al.*, 2009 demonstrou que em 20 mM de butirato aumenta a expressão dos genes *tir* e *espB*.

Os resultados descritos acima mostraram aumento da expressão do regulador global da ilha LEE, *ler* na presença de butirato, e a indução da expressão foi ainda maior na linhagem $\Delta qseC$, indicando que a ausência do sensor QseC e a presença do butirato induz fortemente o regulador Ler da ilha LEE. Por outro lado, não houve alteração da expressão do gene *espA*, que pertence ao regulon Ler, indicando que o aumento da expressão do regulador não implica na indução do seu regulon. Ainda, na linhagem $\Delta qseC$ em NaCl houve expressão aumentada de *ler*, no entanto o gene *espA* estava significativamente diminuído, nessa mesma condição.

Nota-se que na ausência de QseC e na presença de But ocorre uma superexpressão de *ler*, no entanto, essa expressão não foi propagada para a ativação dos operons montante a LEE1, como LEE4 onde está contido *espA* (Figura 8 A e B). Sabe-se que bactérias possuem mecanismos distintos que regulam o processo de ativação de genes (61), sendo assim, processos regulatórios não conhecidos, podem estar inibindo a expressão dos outros genes de LEE em EHEC na presença de But, mesmo quando a expressão do ativador global da ilha está aumentado. Outra hipótese é que este regulador esteja controlando outro conjunto de genes para resposta a presença de butirato.

Ainda, não está bem descrito na literatura como ocorre a ativação do sistema T6SS em EHEC, no entanto, é interessante notar que a presença do butirato levou a uma diminuição da expressão de *hcp-2* na linhagem $\Delta qseC$ (Figura 6C), inferindo que este sensor pode ter alguma participação na regulação de T6SS, por meio de butirato.

Por fim, o But aumentou a expressão do gene *stx-2*, responsável por codificar a toxina Shiga somente na linhagem Wt, indicando que o sensor QseC não participa desta resposta.

4.5. Ensaio de sobrevivência intracelular em macrófagos

Na análise de expressão gênica na presença de butirato de sódio, ocorreu uma diminuição de *hcp-2* na linhagem $\Delta qseC$. Esse gene faz parte da estrutura do T6SS e foi demonstrado que em EHEC, o T6SS auxilia na sobrevivência dentro de macrófagos, por ser através deste sistema que a catalase KatN é secretada, como tentativa de neutralizar o ambiente inóspito dentro do vacúolo, após a fagocitose da EHEC, dentro de macrófagos (8). Assim para analisar se o mutante de QseC teria dificuldade de sobreviver dentro de macrófagos, devido a uma possível diminuição da expressão do sistema T6SS, foi realizado ensaio de sobrevivência em macrófagos J774. No primeiro ensaio foi realizado o crescimento das linhagens Wt e $\Delta qseC$ na presença ou ausência de But, em macrófagos que não receberam nenhum tipo de tratamento prévio com esse ácido graxo. Assim, se na ausência de QseC e na presença de But, o sistema T6SS estivesse diminuído, como demonstrado na expressão gênica, era esperado que essa linhagem tivesse uma menor sobrevivência dentro de macrófagos.

Para a linhagem Wt, houve diminuição significativa da sobrevivência intracelular, quando esta cresceu na presença do butirato em relação ao sua taxa de sobrevivência na presença de NaCl (Figura 9A). A linhagem $\Delta qseC$, em contrapartida, não apresentou diferença estatística entre as duas condições NaCl e But (Figura 9A).

O estudo de Schulthess *et al.*, 2019 demonstrou que butirato a 2 mM, aumentou a eliminação de patógenos por macrófagos, não por aumentar a fagocitose, mas por melhorar a capacidade microbicida dessas células (62). Assim para potencializar a capacidade microbicida dos macrófagos e analisar se poderiam induzir diferença nas respostas das linhagens, os macrófagos receberam But durante o ensaio (3h) ou cresceram na presença de But (24h) e da mesma forma as linhagens bacterianas cresceram durante a noite na presença ou ausência de But. Em nenhuma das condições houve diferença na sobrevivência das linhagens Wt e $\Delta qseC$ (Figura 9 B e C). Esses resultados indicam que, mesmo a linhagem $\Delta qseC$ tenha apresentado diminuição da expressão do gene T6SS, essa diminuição não foi suficiente para prejudicar sua capacidade de sobrevivência dentro de macrófagos, mesmo estes sendo previamente ativados com But. Assim, nota-se que a linhagem $\Delta qseC$, apresentou o mesmo perfil de sobrevivência da linhagem Wt, em macrófagos previamente ativados (Figura 9 B e C).

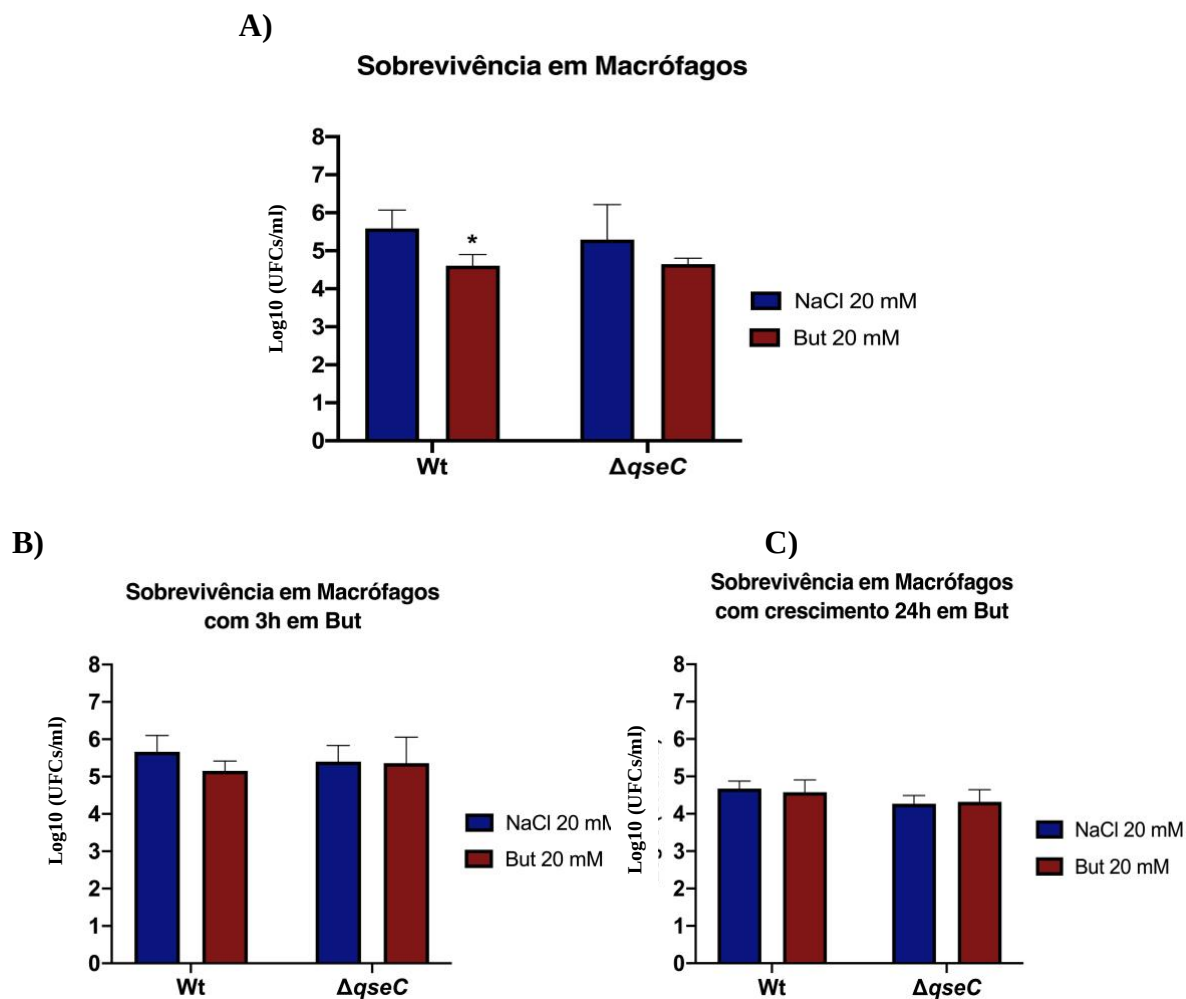


Figura 9: Ensaio de sobrevivência intracelular em macrófagos J774. As bactérias das linhagens selvagem IEHEC (Wt) e $\Delta qseC$ foram cultivadas durante a noite na presença de 20 mM de NaCl ou But em meio LB, a 37°C overnight. **(A)** Bactérias overnight em de NaCl ou But em macrófagos sem tratamento **(B)** Bactérias overnight em de NaCl ou But em macrófagos previamente tratados com 2 mM de NaCl ou But por 3 horas ou **(C)** por 24 horas. Significância estatística das linhagens Wt e $\Delta qseC$ em comparação com sua respectiva linhagem controle em NaCl. Barras sem asterisco não houve diferença estatística significativa, $p < 0,05$ (*) (Two-way Anova).

É importante lembrar que sistemas complexos de bactérias podem ser regulados de maneira multifatorial, assim por mais que a linhagem $\Delta qseC$ tenha demonstrado em D-MEM contendo But diminuição da expressão de *hcp-2*, esse sistema, dentro de macrófagos, pode ser controlado e ativado por diferentes fatores. Dessa forma, a diminuição da expressão de *hcp-2* observada na linhagem $\Delta qseC$, não foi suficiente para ter alterações que prejudicassem sua sobrevivência dentro de macrófagos, ou ainda, o ambiente

dentro dessas células, pode ativar esse sistema por outras vias que contornem esse problema de ausência de QseC, para a indução de T6SS.

4.6. Curva de crescimento em alta ou baixa glicose na presença ou ausência de *Bacteroides thetaiotaomicron*

Como butirato mostrou capacidade de regular o gene *hcp-2* em EHEC na ausência de QseC, e sabe-se que a baixa glicose induz a expressão de genes de virulência em EHEC, foi analisada se esta mesma modulação induzida por glicose poderia ocorrer no gene *hcp-2* e se QseC poderia estar envolvido nessa regulação. Para garantir que a extração de RNA seria feita na mesma fase de crescimento das linhagens em alta e baixa glicose, com ou sem Bt, foram realizadas curvas de crescimento, nessas condições. Assim, foi definido que seria feita a extração de RNA após 4 horas de interação, pois em todas as condições testadas, nesse tempo, as linhagens estariam em fases parecidas da curva de crescimento.

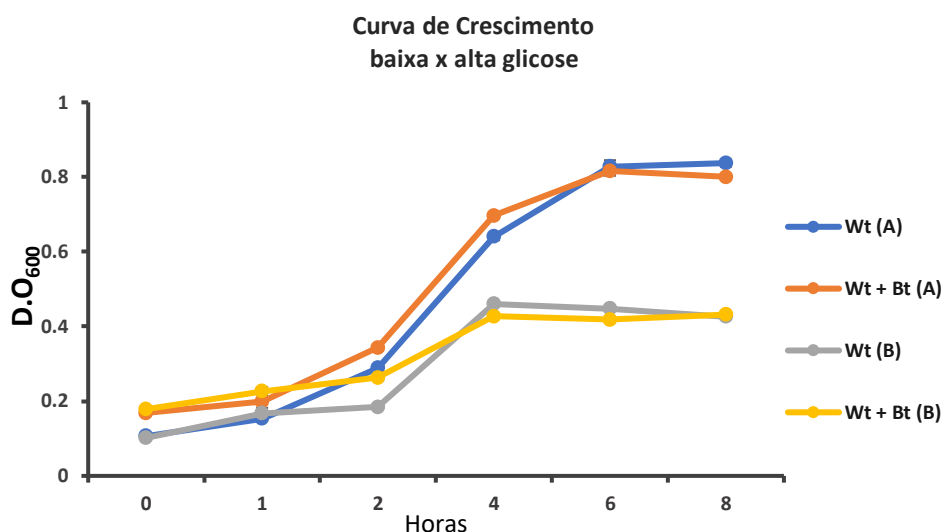


Figura 10: Curva de crescimento da linhagem selvagem na presença em alta ou baixa glicose, ou na presença de Bt em alta ou baixa glicose. A linhagem selvagem (Wt) foram cultivadas anaerobicamente em meio D-MEM baixa glicose (B) ou alta glicose (A) na presença ou ausência de *Bacteroides thetaiotaomicron* (Bt) a 37°C por 8 horas. As culturas foram mantidas sob agitação a 37°C e a cada intervalo de tempo: 1, 2, 3, 4, 6 e 8 horas foram retiradas alíquotas para a leitura da densidade óptica (D.O. 600 nm).

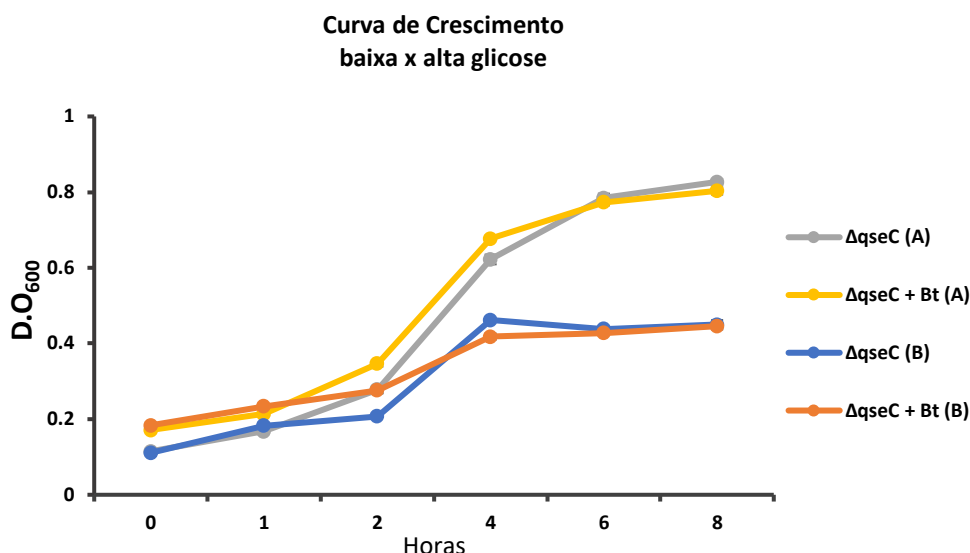


Figura 11: Curva de crescimento do mutante $\Delta qseC$ na presença em alta ou baixa glicose, ou na presença de Bt em alta ou baixa glicose. As bactérias foram cultivadas anaerobicamente em meio D-MEM baixa glicose (B) ou alta glicose (A) na presença ou ausência de *Bacteroides thetaiotaomicron* (Bt) a 37°C por 8 horas. As culturas foram mantidas sob agitação a 37°C e a cada intervalo de tempo: 1, 2, 3, 4, 6 e 8 horas foram retiradas alíquotas para a leitura da densidade óptica (D.O. 600 nm).

4.7. Análise da expressão gênica em baixa e alta glicose

Devido a indução, já conhecida, na expressão de genes de virulência que a baixa concentração de glicose leva em EHEC, foi analisada se esta mesma modulação poderia ocorrer no gene *hcp-2* e se o sensor QseC também poderia influenciar nessa regulação. Também foram investigados os genes *ler* e *espA* de LEE e *stx-2* de Shiga, para analisar se os dados obtidos para esses genes, nessa condição, corroborariam com o demonstrado na literatura.

Como podemos observar na Figura 12A o gene *ler* teve aumento significativo de sua expressão em baixa glicose em relação à alta glicose, cerca de 20x na linhagem Wt e 10x na linhagem $\Delta qseC$. De forma mais moderada o mesmo perfil de indução foi constatado para o gene *espA*, com aumento da sua expressão em torno de 3,5 x na linhagem Wt e 2,5 x na linhagem $\Delta qseC$ em meio baixa glicose em relação à alta glicose (Figura 12 B). O mesmo perfil se

repetiu para o gene *hcp-2*, houve aumento da expressão em baixa glicose para ambas linhagens Wt e $\Delta qseC$, 6x e 4x respectivamente, demonstrando maior expressão na Wt do que na $\Delta qseC$ em baixa glicose (Figura 12 C). Esse resultado indica que glicose interfere na regulação do gene *hcp-2* e que QseC tem participação na regulação da expressão desse gene, nessa condição. Por fim, foi analisado o perfil de expressão do gene *stx-2* que também mostrou indução da expressão em baixa glicose, sendo 35x mais expresso na linhagem Wt e 25x na linhagem $\Delta qseC$ em relação à alta glicose (Figura 12D).

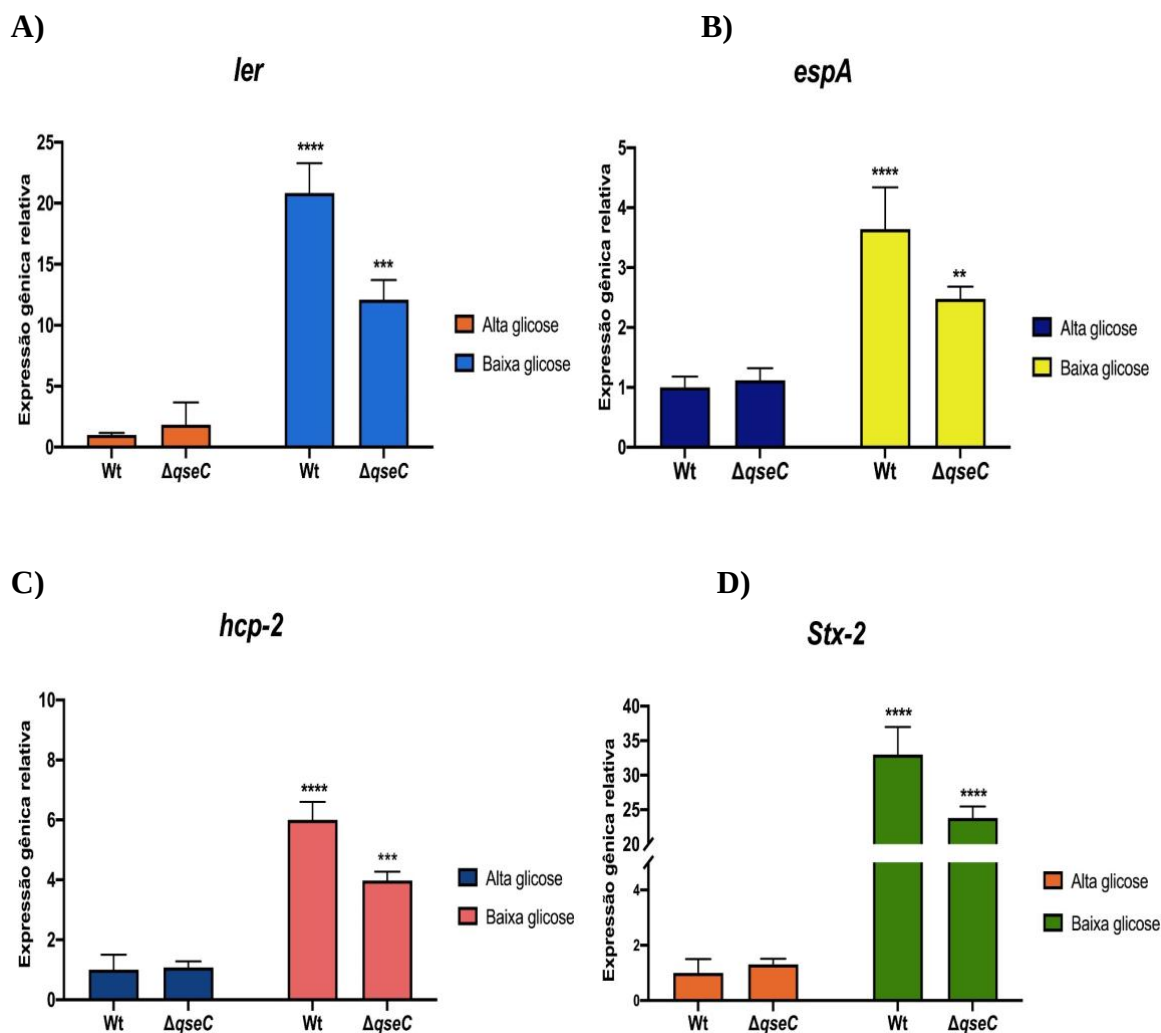


Figura 12: Análise do padrão de expressão dos genes de virulência de EHEC (Wt) e $\Delta qseC$ em baixa e alta glicose por qRT-PCR. As bactérias das linhagens selvagem EHEC (Wt) e $\Delta qseC$ foram cultivadas em meio DMEM baixa glicose ou alta glicose a 37°C por 4 horas, então o RNA total foi extraído tratado com DNase. Em seguida, foi realizado o ensaio de qRT-PCR com os seguintes genes: (A) *ler*, (B) *espA*, (C) *hcp-2* e (D) *stx-2*. Significância estatística em comparação com a linhagem selvagem em meio D-MEM alta glicose. Barras sem asterisco não houve diferença estatística significativa, $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****) (Two-way Anova).

Já foi descrito na literatura que a diminuição de glicose leva a indução da expressão de genes de virulência em EHEC (14, 32), e os resultados apresentados corroboram com esses dados. No entanto, é inédito a demonstração da regulação de glicose em genes do sistema T6SS com participação de QseC em EHEC. Ainda, é importante destacar que a diminuição de glicose levou ao aumento do gene *hcp-2* do sistema T6SS nesse patógeno, inferindo que EHEC pode aumentar a ativação desse gene em um ambiente que mimetiza as condições próximas ao epitélio, onde poderia estar havendo ativação desse sistema para uma possível indução de citotoxicidade na célula hospedeira, ou ainda que a diminuição de glicose, faz com que EHEC ative esse gene para inibir o crescimento de possíveis competidores dessa fonte de carbono, em um ambiente onde este está escasso. Por fim, nota-se como o gene *stx-2* teve uma superexpressão em baixa glicose, indicando que o ambiente gliconeogênico induz a ativação da toxina Shiga em EHEC.

4.8. Expressão gênica em alta e baixa glicose na presença de

Bacteroides thetaiotaomicron

Devido a indução na expressão de gene *hcp-2* do importante sistema de competição em bactérias T6SS por glicose, foi levantada a hipótese se a presença de Bt (*B. thetaiotaomicron*), uma bactéria comensal conhecida por modular genes de virulência em EHEC (32), poderia levar a uma maior indução desse sistema em um ambiente com diferentes concentração de glicose. Também já foi demonstrado na literatura, que a baixa concentração de glicose na presença de Bt, leva a indução da expressão de genes de

virulência da liha LEE, por isso os genes *ler* e *espA* também foram analisados, bem como *stx-2* para Shiga.

As linhagens Wt e $\Delta qseC$ apresentaram aumento da expressão de *ler*, em torno de 2,5x e 3,5x respectivamente em baixa glicose (Figura 13A). É interessante notar que, nessa condição, a linhagem $\Delta qseC$ apresentou maior indução da expressão de *ler* em relação à Wt, no entanto a indução de *ler* em baixa glicose na presença de Bt, foi menor do que a apresentada em baixa glicose sem Bt, para as duas linhagens (Figura 12 A).

A expressão do gene *espA* apresentou aumento em baixa glicose na presença de Bt para a linhagem Wt em relação à alta glicose na presença de Bt (Figura 13B). Contudo, na linhagem $\Delta qseC$, *espA* mostrou diminuição significativa da expressão somente em alta glicose na presença de Bt quando comparada com a linhagem Wt (Figura 13 B).

Já para o gene *hcp-2*, não houve diferença no padrão de expressão na linhagem Wt em baixa glicose na presença de Bt em relação à alta glicose na presença de Bt (Figura 13 C). Por outro lado, na linhagem $\Delta qseC$ esse gene mostrou 1,5x aumento da sua expressão (Figura 13 C). É interessante notar que na presença de Bt, houve diminuição da expressão de *hcp-2* em meio baixa glicose, diferente da expressão observada quando essa bactéria comensal não estava presente (Figura 12 C).

Tanto em baixa, quanto em alta glicose na presença de Bt, não houve mudança na expressão do gene *stx-2* (Figura 13 D). Resultado diferente do obtido para o gene *stx-2*, quando Bt não estava presente (Figura 12D).

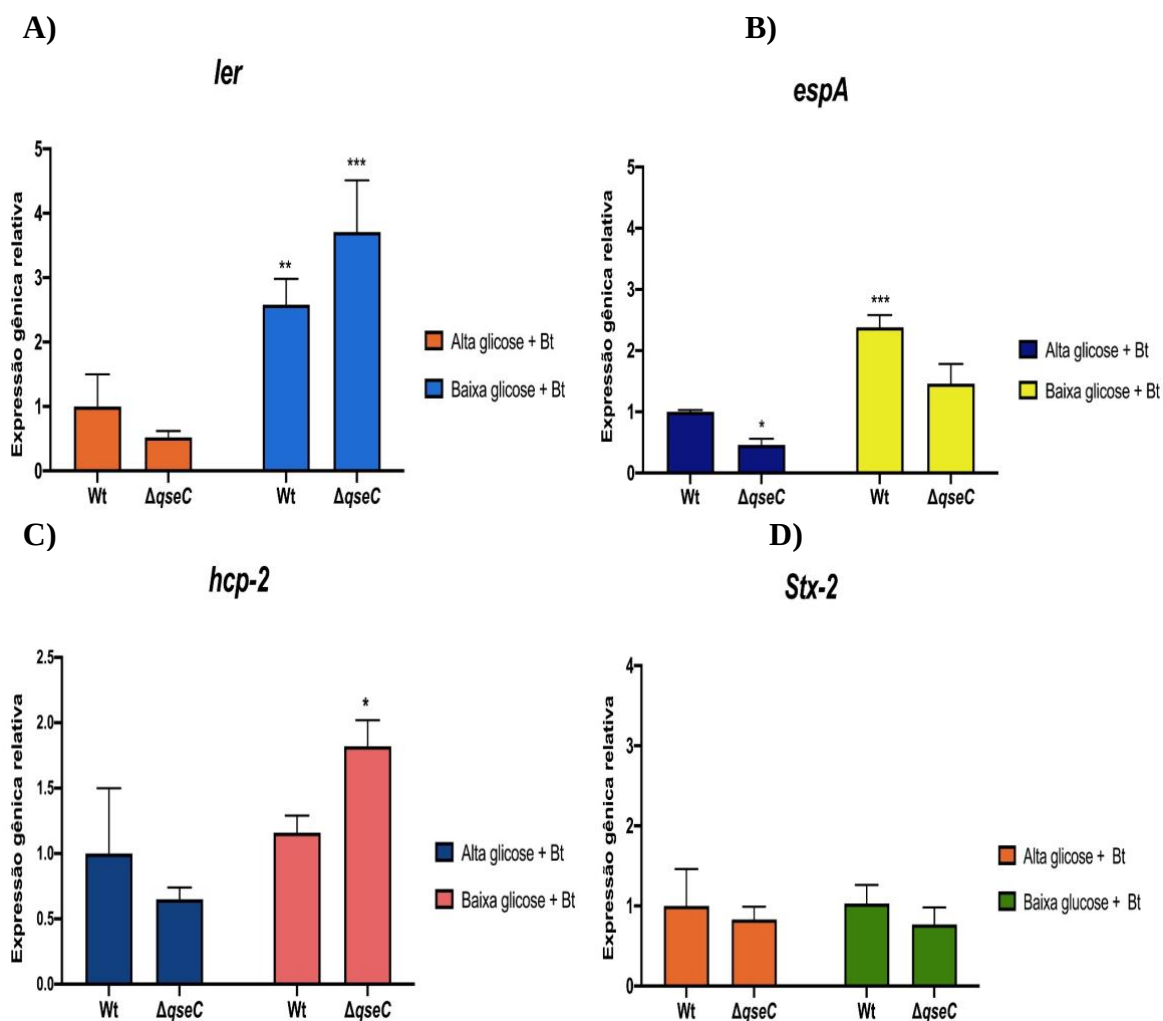


Figura 13: Análise da expressão gênica de genes de virulência da linhagem selvagem (Wt) e $\Delta qseC$ em baixa e alta glicose na presença de *Bacteroides thetaiotaomicron*. As bactérias das linhagens selvagem Wt e $\Delta qseC$ foram cultivadas em meio DMEM baixa glicose ou alta glicose anaerobicamente na presença *Bacteroides thetaiotaomicron* (Bt) 37°C por 4 horas, então o RNA total foi extraído tratado com DNase. Em seguida, foi realizado o ensaio de qRT-PCR com os seguintes genes: **(A) *ler***, **(B) *espA***, **(C) *hcp-2*** e **(D) *stx-2***. Significância estatística em comparação com a linhagem Wt em meio D-MEM alta glicose + Bt. Barras sem asterisco não houve diferença estatística significativa, $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****) (Two-way Anova).

Quando EHEC foi cultivada somente em alta ou baixa glicose, foi possível notar que a diminuição de glicose induziu a expressão de genes de virulência, uma das hipóteses é que a condição de gliconeogênese, mimetiza a condição encontrada próximo ao epitélio do hospedeiro (14, 32). Dessa forma, EHEC ativa seus genes de LEE como resposta a aproximação do epitélio, para a formação da lesão A/E, que auxilia no processo de adesão dessa bactéria no intestino (14). Ainda sabe-se que o T6SS de bactérias pode ser usado como uma maquinaria tanto para a competição entre membros da

microbiota, quando para a indução de danos em células eucarióticas (9). Observar que EHEC aumentou a expressão do gene *hcp-2* somente em baixa glicose e diminuiu a expressão desse gene em baixa glicose na presença de Bt, pode inferir que EHEC não ativa o sistema contra Bt devido a alguma sinalização que pode ser produzida por essa bactéria comensal. Outra hipótese é de que Bt pode estar produzindo metabólitos que possam ser usados por EHEC, e por isso, para este patógeno, não houve mimetização de um ambiente em gliconeogênese para a ativação desse sistema contra o hospedeiro ou contra a própria Bt, inferindo o mesmo para a ativação da toxina Shiga. Ainda, os resultados obtidos aqui, na qual na presença de Bt não houve aumento da expressão de T6SS, vão de encontro com estudos que demonstraram que Bt e EHEC, quando em co-cultura, não tiveram seu crescimento prejudicados, inferindo que estas bactérias não são competidores diretas(32). Assim, mais estudos ajudarão a entender amplamente a participação dessas sinalizações em um importante sistema de competição entre bactérias como o T6SS em EHEC.

4.9. Simulador de ecossistema Microbiano Intestinal Humano -

SHIME®

Os resultados obtidos *in vitro* para EHEC, demonstraram que a linhagem $\Delta qseC$ apresenta diminuição da expressão de *hcp-2* de T6SS em butirato ou na baixa glicose, e como este sistema está envolvido em competição de bactérias, esta linhagem poderia ter sua eficiência em competir com a microbiota prejudicada. Para analisar a competição direta das linhagens Wt e $\Delta qseC$ com a microbiota, foi realizado estudo em um simulador de microbiota

intestinal humano, com o intuito de avaliar alteração da microbiota humana induzida por EHEC na linhagem Wt e em uma linhagem com alteração de um importante sensor de comunicação bacteriana em EHEC. Essa comparação entre a alteração da microbiota humana na linhagem $\Delta qseC$, não foi descrito na literatura, sendo um trabalho interessante e inédito.

A princípio, foi realizada o controle da viabilidade bacteriana, para analisar se as linhagens Wt e $\Delta qseC$ estariam sendo inoculadas no reator na mesma proporção, e se estas poderiam sobreviver de maneiras parecidas nos diferentes compartimentos que simulam as condições dos órgãos humanos, como estômago e duodeno. Assim, pode-se notar que foi inoculada, em testes e dias diferentes, quantidades semelhantes de Wt e $\Delta qseC$ (Figura 14). Após 1 hora no estômago, tanto linhagem Wt quanto $\Delta qseC$, demonstraram alta resistência a pH estomacal (pH 2,5). Após 1 hora no duodeno, a linhagem Wt começa a se recuperar e multiplicar, enquanto a linhagem $\Delta qseC$ apresenta diminuição das UFCs.

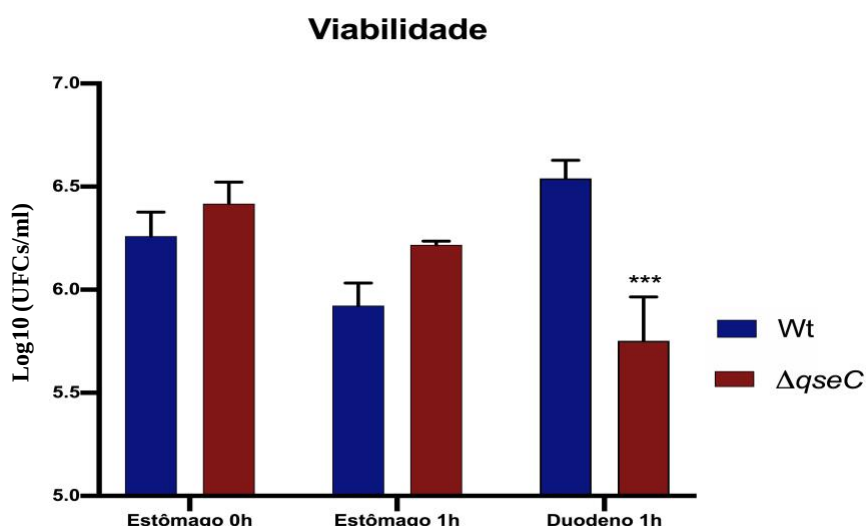


Figura 14: Análise do perfil de sobrevivência das linhagens selvagem (Wt) e $\Delta qseC$ no SHIME®. Um inóculo inicial de 10^9 células por ml das linhagens foi introduzida no SHIME®. Em seguida, a sobrevivência das linhagens foi determinada através da contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) a partir das amostras coletadas imediatamente do estômago (tempo 0h) e após 1 hora do estômago e duodeno. Significância estatística em comparação com a linhagem Wt, barras sem asterisco não houve diferença estatística significativa $p < 0,001$ (***) (Two-way Anova).

Para os reatores mimetizando o colón, foram realizadas análises de filós e gêneros de membros específicos da microbiota após 24 horas de interação patógeno-microbiota. Em 24 horas de interação com linhagem Wt, houve maior proporção do filo γ -Proteobacteria, em torno de 60% da composição analisada, sendo o filo onde estão contidas espécies como *Escherichia coli*. Ainda houve proporção de 30 e 10% dos filós Firmicutes e Bacteroidetes, sendo estes os filós proeminentes da microbiota humana.

Na linhagem $\Delta qseC$, diferentemente do demonstrado na linhagem Wt, houve aumento significativo do filo Firmicutes, em torno de 80% da composição analisada, seguidos de Bacteroidetes e γ -Proteobacteria, que juntos somaram apenas 20% dessa composição (Figura 15).

Após a análise de filós, foi analisado a nível de gênero, quais membros poderiam estar aumentados ou diminuídos. Para isso foram escolhidos membros conhecidos por sua atuação benéfica no intestino como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, e membros que estão aumentados em situações de doenças inflamatórias como *Prevotella* e *Bacteroides* (63, 64). Como ilustra a Figura 16, a linhagem Wt, após interação de 24 horas com a microbiota, levou a uma proporção de *Prevotella* e *Bacteroides* de 60% da composição analisada. Já os membros benéficos *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, estavam na em torno de 40% da composição.

Já para a linhagem $\Delta qseC$, interessantemente, houve aumento na proporção de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, em torno de 80% na microbiota analisada, já *Prevotella* e *Bacteroides* ficaram apenas com proporção de 20%.

Ao analisar genes de virulência, como para a toxina Shiga, houve diminuição significativa de *stx-2* na linhagem $\Delta qseC$ comparado com a

linhagem Wt (Figura 17B). Já *ler* teve a mesma expressão nas linhagens Wt e $\Delta qseC$ (Figura 17A).

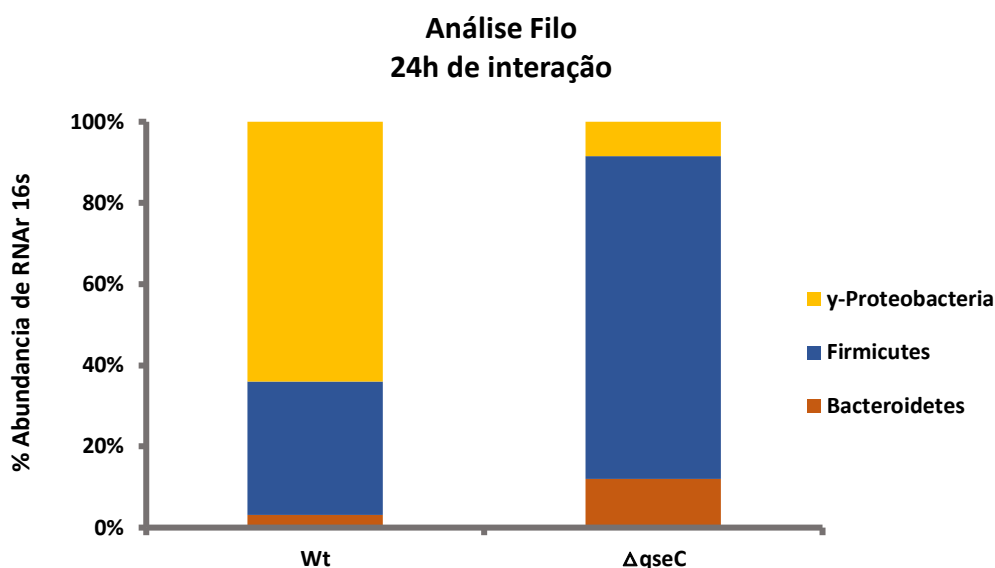


Figura 15: Análise da abundância do RNAr 16S para detecção dos filos γ -Proteobacteria, Bacteroidetes e Firmicutes das amostras coletadas do SHIME®. Após 24 horas foram coletadas amostras do SHIME®, em seguida o RNA total foi extraído para realizar o ensaio de RT-PCR e como gene endógeno foi utilizado *eub338*, gene universal para Eubactérias.

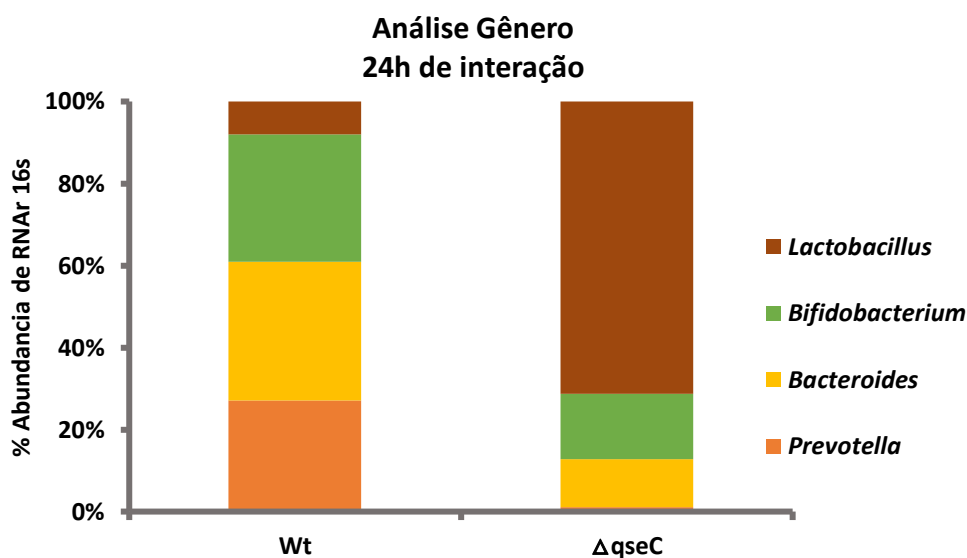


Figura 16: Análise da abundância do RNAr 16S para detecção dos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides* e *Prevotella* das amostras coletadas do SHIME®. Após 24 horas foram coletadas amostras do SHIME®, em seguida o RNA total foi extraído para realizar o ensaio de RT-PCR e como gene endógeno foi utilizado *eub338*, gene universal para Eubactérias.

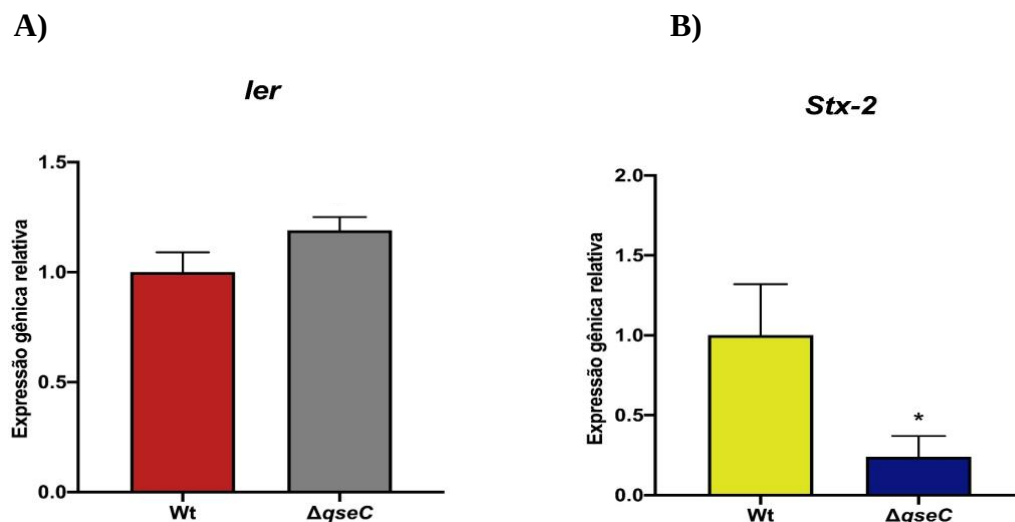


Figura 17: Análise do padrão de expressão dos genes de virulência *ler* e *stx-2* das amostras coletadas do SHIME®. Significância estatística em comparação com a linhagem selvagem (Wt), barras sem asterisco não houve diferença estatística significativa, $p < 0,05$ (*).

Estudos anteriores com EHEC em ensaios de resistência a diferentes pHs, revelaram que este patógeno apresenta alta tolerância a pHs baixos (65), o que corrobora com o resultado obtido, na qual mesmo após uma hora de exposição ao pH de 2.5, as células bacterianas se mantiveram viáveis e apresentaram pouca redução comparada com o inóculo inicial (estômago 0h). Ainda, essa alta resistência a baixos pHs contribui para a baixa dose infectante demonstrada por EHEC, em torno de 50 a 100 UFCs (1).

Após uma hora de exposição ao reator duodeno, houveram diferenças na recuperação de UFCs entre as linhagens Wt e $\Delta qseC$, dessa forma, mesmo que a linhagem $\Delta qseC$ não tenha apresentado diminuição significativa de UFCs comparada ao inóculo inicial (estômago 0h), indicando que essa linhagem continua apresentando resistência ao pH e as condições do duodeno, esse linhagem não apresentou replicação de células bacterianas da mesma forma observada para a linhagem Wt. Sabe-se que EHEC é resistente a ácidos biliares (41, 66), e estudos em modelo de hospedeiro bovino

demonstraram que a cepa O157:H7 foi capaz de crescer em torno de 15% em bile (41, 66). No estudo de Etienne-Mesmin et al., 2011, em simulador TIM houve crescimento de EHEC nas porções distais do processo digestivo, com aumento da viabilidade celular de EHEC após 1h no duodeno, e quando em condições favoráveis, como neutralização de pH e dissolução de sais biliares, no íleo, houve aumento significativo do crescimento bacteriano (66). Dessa forma, o sensor QseC pode ser importante para ativar sinalizações envolvidas no processo de resistência em condições de estresses, como sais biliares e enzimas pancreáticas, e promoção da replicação após condições de estresse, na qual pode ter induzido diferenças na recuperação de células bacterianas cultiváveis e na replicação celular observadas entre as linhagens $\Delta qseC$ e Wt, no SHIME®.

Ao analisar alterações na microbiota intestinal no SHIME®, houve uma grande diferença entre a composição dos filos entre as linhagens Wt e $\Delta qseC$, com aumento expressivo de Firmicutes no mutante, enquanto na linhagem Wt houve prevaletimento de γ -proteobacteria. A microbiota intestinal é composta de uma complexa comunidade microbiana estimada em 10^{14} de microrganismos que oferece uma variedade de benefícios para o hospedeiro como, aumentar a integridade e o remodelamento do epitélio intestinal, regulação da imunidade, produção de vitaminas e moléculas energéticas, resistência contra patógenos e auxílio na manutenção da homeostase gastrointestinal (67). A microbiota por habitar vários nichos e disputar por fontes energéticas diretamente com patógenos, promove o processo denominado “resistência a colonização”, ajudando na proteção a infecções (68). Ainda, ela é essencial para a saúde do hospedeiro e alterações dessa

comunidade microbiana, denominada disbiose, vem sendo associada a suscetibilidade a infecções e a diversas doenças inflamatórias (67);(68). Estudos mostram, por exemplo, que indivíduos com doença de Crohn e colite ulcerativa apresentam um aumento relativo de Bacteroidetes e diminuição na abundância de Firmicutes (25); e patógenos que causam gastroenterite podem desempenhar um papel na iniciação e/ou exacerbação de doenças inflamatórias intestinais (69), por isso disbioses induzidas por processos infecciosos, poder ter impactos profundos na saúde do hospedeiro. Assim, é possível notar que somente a introdução de EHEC no SHIME® foi suficiente para alterar a microbiota e que o sensor QseC tem direta participação desse processo.

Ao analisar os gêneros, é interessante notar que na linhagem $\Delta qseC$ houve prevalência de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, enquanto na selvagem *Bacteroides* e *Prevotella* foram mais prevalentes. Ainda, nota-se que dos gêneros analisados, *Lactobacillus* foi o que teve a mudança mais expressiva. Na linhagem Wt, *Lactobacillus* representou apenas 10% do RNA analisado, enquanto que em $\Delta qseC$, esse gênero foi em torno de 75%, corroborando com o aumento do filo Firmicutes observado, uma vez que *Lactobacillus* pertence a esse filo. Esses resultados expressivos de *Lactobacillus* sugerem que, ou EHEC compete diretamente com bactérias desse grupo, ou EHEC pode competir com membros da microbiota que beneficiem *Lactobacillus*, e por isso na presença de EHEC, não houve aumento da expressão desse gênero. Já na ausência do sensor QseC, este patógeno não competiu da mesma forma com os membros da microbiota, beneficiando assim as bactérias do gênero *Lactobacillus*.

Já foi descrito que o sensor QseC auxilia EHEC na percepção das alterações no ambiente (16), dessa forma, a ausência deste sensor na linhagem mutante, pode ter impactado na regulação de sistemas ainda não bem elucidados, como os envolvidos em competição de EHEC com outras bactérias, induzindo as diferenças observadas na microbiota. Esse resultado vai de encontro com os resultados da análise de expressão em baixa glicose e na presença de But, que indicaram diminuição da expressão do gene *hcp-2* de T6SS na linhagem $\Delta qseC$. Dessa forma, as mudanças na microbiota observadas na linhagem mutante, poderiam ser devido a alterações na ativação de sistemas envolvidos na direta competição com a microbiota reguladas por QseC, por meio da diminuição da percepção de alterações ambientais por este sensor, impactando diretamente na maneira como esse patógeno altera a microbiota intestinal. Fica claro, com esses resultados que QseC tem participação na competição de EHEC com a microbiota e a sua ausência tem relação direta de como este patógeno altera a microbiota intestinal. Ainda, um importante fator de virulência, o gene que codifica para a toxina Shiga (*stx-2*), estava diminuído na linhagem $\Delta qseC$, corroborando com as análises de expressão gênicas obtidas.

Estudos abordam que a ausência de QseC leva a uma diminuição da virulência de EHEC *in vitro*, e em outros patógenos como *S. Typhimurium* *in vivo*, e inibir esse sensor pode ser uma estratégia interessante para a utilização em tratamentos, bem como prevenção de infecções (70). Dessa forma, testar a linhagem mutante diretamente na microbiota intestinal humana, demonstra que utilizar o sensor QseC como alvo terapêutico, pode ser interessante não só por diminuir a expressão de genes de virulência em

EHEC, mas também por mudar a maneira como esse patógeno altera a microbiota intestinal, podendo induzir o aumento de membros que possam ajudar na resistência a colonização do hospedeiro, desfavorecendo o processo infeccioso promovido por este patógeno. Este ensaio aumenta a compreensão da direta competição de EHEC com a microbiota humana, como a presença de EHEC leva mudanças na sua composição, bem como a participação de QseC nessa competição. Assim, com resultados obtidos, é possível evidenciar que apenas a alteração de um sensor foi suficiente para levar a uma expressiva alteração da comunidade microbiana entre as linhagens, no entanto, mais estudos são necessários para entender qual o impacto dessa alteração da microbiota promovida pela ausência de QseC no processo infeccioso, desencadeado por EHEC, em vivo.

4.10. Ensaios de competição e co-cultura com Lactobacilos em caldo e ágar

Devido ao aumento de *Lactobacillus* demonstrados no SHIME® para a linhagem $\Delta qseC$, e as análises de expressão gênica demonstrarem que o gene *hcp-2* está diminuído na presença de But e baixa glicose comparado a linhagem Wt, foi hipotetizado se EHEC poderia ter uma competição direta com Lactobacilos, e se QseC poderia estar envolvido nesse processo. Dessa forma foi realizado o ensaio de competição em ágar, na qual as bactérias são colocadas em contato direto uma com as outras, uma vez que estudos anteriores demonstram que a proximidade entre bactérias é essencial para uma efetiva participação de T6SS(9). Para o experimento foram usadas duas espécies diferentes de Lactobacilos, *L. acidophilus* 3258 (LA) e *L. reuteri* 3334 (LR), com intuito de analisar se competição de EHEC mudaria entre essas

linhagens. Ainda, é importante enfatizar que este ensaio apenas analisou duas espécies de *Lactobacilos*, diferente do SHIME® que haviam um “pool” de espécies do gênero *Lactobacillus*.

Como mostrado na Figura 18, no grupo controle, ou seja, as linhagens crescendo sozinhas, tanto Wt e $\Delta qseC$ apresentaram mesmo perfil de crescimento. Já LA, no grupo controle, apresentou crescimento de 1,5x ordem de magnitude comparada as linhagens as linhagens Wt e $\Delta qseC$. Em co-cultura Wt e $\Delta qseC$ na proporção de 1:1 com LA, tiveram uma redução 4 ordens de magnitude, quando comparadas a seu grupo controle. Já na proporção de 1:5 de LA, a linhagem Wt e $\Delta qseC$ apresentaram redução em torno de 5 e 5,5 ordens de magnitude, comparadas a seus respectivos grupos controle. Ainda a linhagem $\Delta qseC$ apresentou alta variabilidade de crescimento na presença de LA, o mesmo não foi observado para a linhagem Wt. Para LA, em ambas as condições, 1:1 ou 1:5, em co-cultura, houve diminuição em torno de 1 ordem de magnitude de LA, quando comparados ao seu grupo seu controle.

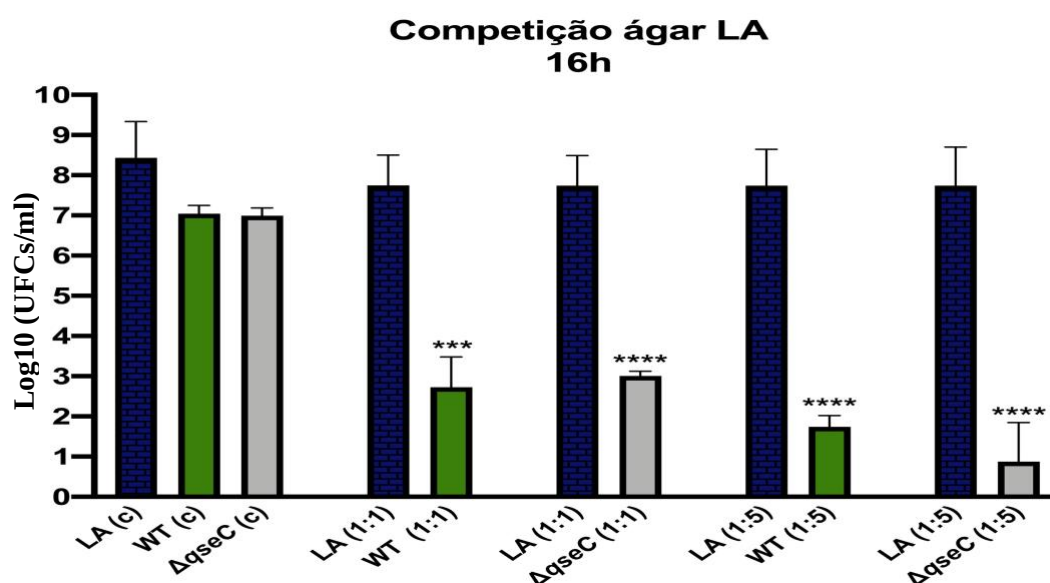


Figura 18: Ensaio de competição em ágar entre *Lactobacillus acidophilus* e EHEC. Crescimento em monocultura das linhagens Wt (C) $\Delta qseC$ (C) e LA (C) no grupo controle. As linhagens Wt + LA e $\Delta qseC$ + LA cresceram em co-

cultura na proporção de 1:1 ou 1:5 de EHEC e LA respectivamente. Significância estatística das linhagens em comparação com sua respectiva linhagem controle, barras sem asterisco não houve diferença estatística significativa, $p < 0.001$ (***) , $p < 0.0001$ (****) (One-Way Anova).

Por outro lado, na competição entre *L. reuteri* (LR) e EHEC (Figura 19), esse perfil de crescimento foi diferente do demonstrado para *L. acidophilus*. No grupo controle, tanto LR quando as linhagens Wt e $\Delta qseC$ de EHEC, apresentaram o mesmo perfil de crescimento. Em co-cultura, na proporção de 1:1, tanto a linhagem Wt, quanto $\Delta qseC$, apresentaram mesmo perfil de redução, com diminuição de 2 ordens de magnitude, em comparação a seus grupos controles. A linhagem LR, na proporção de 1:1 teve mesmo crescimento que no grupo controle, porém como aumento de 0,8 ordens de magnitude na proporção de 1:5. As linhagens Wt e $\Delta qseC$, apresentaram diminuição de 1,5 ordens de magnitude quando crescidas na proporção de 1:1 ou 1:5 de LR, indicando que LR interfere no crescimento EHEC, porém a alteração da proporção de LR (1:1 ou 1:5) não interfere no perfil de crescimento de EHEC.

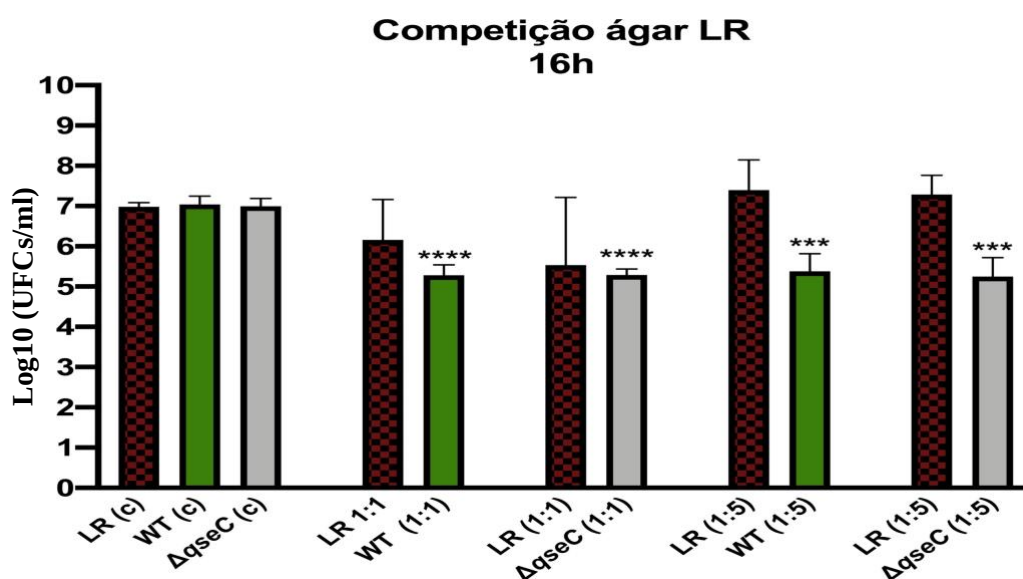


Figura 19: Ensaio de competição em ágar entre *Lactobacillus reuteri* e EHEC. Contagem de UFCs após 16 horas de interação. Crescimento em monocultura das linhagens Wt (C) $\Delta qseC$ (C) e LR (C) no grupo controle. As linhagens Wt + LR e $\Delta qseC$ + LR cresceram em co-cultura na proporção de 1:1 ou 1:5 de EHEC e LR respectivamente. Significância estatística das linhagens em comparação com sua respectiva linhagem controle, barras sem asterisco não houve diferença estatística significativa, $p < 0.001$ (***) , $p < 0.0001$ (****) (One-Way Anova).

Para analisar se a inibição de crescimento de EHEC demonstrados em ágar seria devido contato direto deste patógeno com LA e LR, ou por moléculas produzidas pelos Lactobacilos, foi realizado o ensaio de co-cultura em caldo, onde não há contato direto célula-célula, pelo período de 8 horas entre as linhagens de EHEC, LA e LR na proporção de 1:1 e 1:5.

Na figura 20 podemos observar que na proporção de 1:1, houve diminuição em torno de 1,5 ordem de magnitude no crescimento das linhagens Wt e $\Delta qseC$ na presença de LA, quando comparadas a seu grupo controle. No entanto, essa diminuição de EHEC não foi tão drástica quanto ao observada em ágar para estas linhagens, onde as bactérias têm que disputar o mesmo nicho. Já LA não teve seu crescimento alterado pela presença das linhagens de EHEC, nessa condição, demonstrando que em ágar onde há contato direto entre as bactérias, a presença de EHEC diminuiu em torno de 1x ordem de magnitude o crescimento de LA nas proporções de 1:1 e 1:5, porém o mesmo não ocorre em caldo.

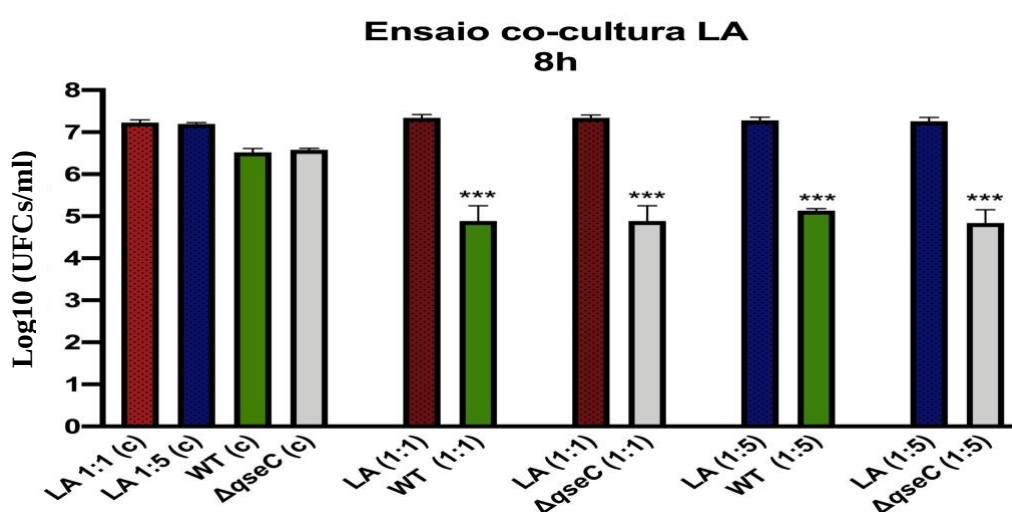


Figura 20: Ensaio de co-cultura em caldo entre *Lactobacillus acidophilus* e EHEC. Ensaio de co-cultura em caldo entre *Lactobacillus acidophilus* e EHEC. Contagem da UFCs após 8 horas de interação. As linhagens Wt (C) $\Delta qseC$ (C) e LA (C) cresceram sozinhas em caldo. As linhagens Wt+LA e $\Delta qseC$ + LA crescimento em co-cultura. Significância estatística das linhagens em comparação com sua respectiva linhagem controle, barras sem asterisco não houve diferença estatística significativa, $p < 0.001$ (***), (One-Way Anova).

Em co-cultura com LR (Figura 21), na proporção de 1:1 e 1:5, as linhagens Wt e $\Delta qseC$, apresentaram mesmo perfil de crescimento. No entanto tiveram redução do crescimento em torno de 1,7 ordens de magnitude comparadas a seus grupos controles. A linhagem LR, na proporção de 1:1 e 1:5, teve o mesmo crescimento em comparação a seus respectivos grupos controle.

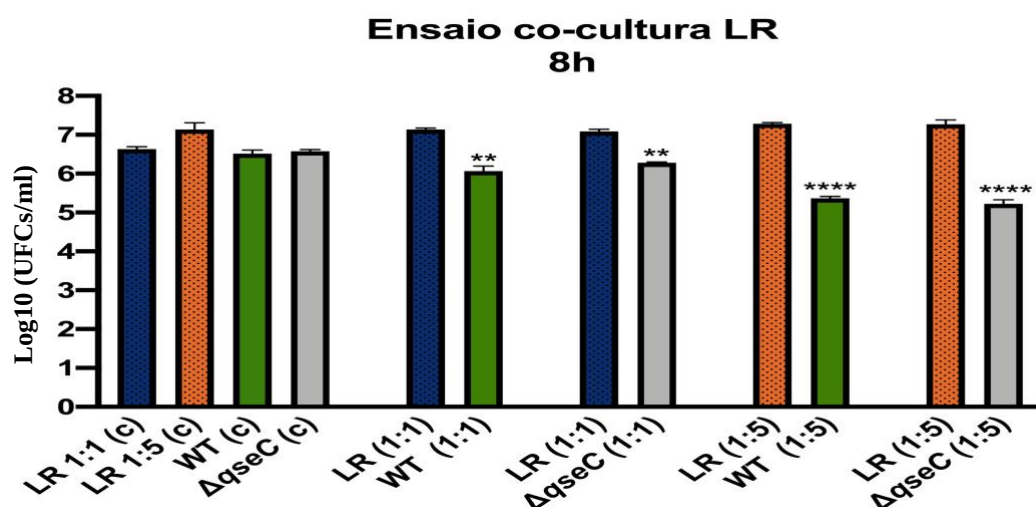


Figura 21: Ensaio de co-cultura em caldo entre *Lactobacillus reuteri* e EHEC. Contagem da UFCs após 8 horas de interação. As linhagens Wt (C) $\Delta qseC$ (C) e LA (C) cresceram sozinhas em caldo. As linhagens Wt+LA e $\Delta qseC$ + LA cresceram em co-cultura. Significância estatística das linhagens em comparação com sua respectiva linhagem controle, barras sem asterisco não houve diferença estatística significativa, $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) (One-Way Anova).

Estudos têm demonstrado que bactérias do gênero *Lactobacillus* possuem influencia na patogenicidade de EHEC, como no estudo de Chang *et al.*, 2019, na qual o *Lactobacillus casei* LC2W inibiu a colonização de EHEC em camundongos (38). Já a administração de *L. reuteri* antes e durante a infecção com EHEC em animais denominados “*germ-free*” (que não possuem microbiota intestinal), resultou na melhora dos sintomas da doença e proteção desses animais na infecção com este patógeno (39). LR interferiu no crescimento de EHEC, no entanto essa redução não foi drástica quanto a promovida por LA nas linhagens de EHEC Wt e $\Delta qseC$. Ainda, não houve

grandes diferenças no perfil de crescimento entre as linhagens Wt e $\Delta qseC$, demonstrando que nessa condição, o sensor QseC pode não estar fortemente envolvido, uma vez que o perfil de redução foi parecido entre as linhagens. Por outro lado, EHEC não afetou de modo drástico o crescimento de *L. acidophilus* e *L. reuteri*. Ainda, é interessante destacar que o perfil de crescimento de EHEC foi diferente entre as espécies de Lactobacilos utilizadas.

Estudos anteriores mostram que *L. acidophilus*, através da produção de moléculas bioativas, teve a capacidade de diminuir a virulência de EHEC (71), e que a alta produção de ácido linoleico por *L. casei* limitou o crescimento, sobrevivência e virulência não só de EHEC, como também de *Salmonella* Typhimurium (72). Esses resultados corroboram com o demonstrado aqui, onde houve diminuição do crescimento de EHEC pela presença de *L. acidophilus*, no entanto a diminuição do crescimento de EHEC em caldo, não foi tão drástica como a demonstrado em ágar. Esses resultados, indicam que as mudanças na microbiota observada no SHIME® entre as linhagens Wt e $\Delta qseC$, podem não ser por uma competição direta de EHEC com membros do gênero *Lactobacillus*, mas sim por uma competição indireta com outros membros da microbiota, que influenciam o crescimento de bactérias do gênero *Lactobacillus*. Ainda, esses resultados abrem perspectivas de que *L. acidophilus*, uma bactéria probiótica, pode ser um interessante candidato como alternativa de tratamento em infecções desencadeadas por EHEC, uma vez que antibióticos não são indicados no tratamento por infecções por este patógeno (1) e houve forte inibição do crescimento de EHEC quando esta teve que disputar o mesmo nicho com *L. acidophilus*, podendo colaborar no

processo de resistência a colonização por este patógeno. Dessa forma mais estudos serão interessantes para avaliar o potencial e possíveis benéficos do uso de *L. acidophilus* na infecção desenvolvida por EHEC.

4.11. Ensaio de infecção com *C. rodentium*, linhagem Wt e $\Delta qseC$, em camundongos C57BL/6

Um dos problemas ao se estudar EHEC é que essa bactéria ao colonizar animais como camundongos e ratos, não desenvolve as características principais da doença, por conta disso utiliza-se a *C. rodentium* como modelo intestinal *in vivo*. Estudos anteriores demonstraram que o sensor QseC tem participação na virulência exercida por *C. rodentium* em camundongos C3H/HeJ, que são altamente susceptíveis a infecção por este patógeno (50). Ainda, estudos indicam que há diminuição da virulência de EHEC na ausência de QseC (16). Assim, devido aos resultados *in vitro* deste estudo, que indicam uma diminuição da expressão de genes de virulência na linhagem $\Delta qseC$ e diferentes modulações da microbiota promovidas pelas linhagens Wt e $\Delta qseC$ de EHEC, foram realizados ensaios *in vivo*, para avaliar a participação de QseC na virulência de patógenos LEE positivos em infecções. Dessa forma, foram realizados estudos *in vivo* com as linhagens Wt e $\Delta qseC$ de *C. rodentium* em espécie de camundongo diferente de estudos prévios (50), o C57BL/6 Wt, na qual apresenta maior resistência a infecção por *C. rodentium* (73).

Como mostrado na Figura 22A, foram observados níveis semelhantes de colonização da linhagem Wt e $\Delta qseC$ em camundongos C57BL/6 no D1 pós-infecção. No entanto, os níveis de colonização do mutante $\Delta qseC$ foram reduzidos no D2 e D4 pós-infecção, e a diferença na colonização entre Wt e

o mutante $\Delta qseC$ tornou-se estatisticamente significativa no D7 pós-infecção. Além da colonização bacteriana, foram medidas o comprimento do cólon; uma diminuição no comprimento do cólon indica indução de inflamação em resposta à infecção por *C. rodentium*. Não foi observada diferença significativa entre o comprimento do cólon de camundongos infectados com linhagens Wt ou $\Delta qseC$. No entanto, como mostrado na Figura 22B, o comprimento do cólon foi mais variável em camundongos infectados com a linhagem de *C. rodentium* Wt do que naqueles infectados com o mutante $\Delta qseC$. Quando analisado a capacidade da linhagem $\Delta qseC$ de disseminar sistemicamente, foi observado que esse mutante não foi capaz de se disseminar, pois não houve recuperação de bactérias no baço de camundongos infectados com o mutante $\Delta qseC$ (Figura 22C). Além disso, quando medido o peso do baço, observou-se que o peso desse órgão em camundongos infectados com Wt *C. rodentium* era significativamente maior do que baço de camundongos infectados com o mutante $\Delta qseC$ (Figura 22D). Finalmente, não foi observada diferenças no peso corporal entre camundongos infectados com Wt e o mutante $\Delta qseC$ (Figura 21E).

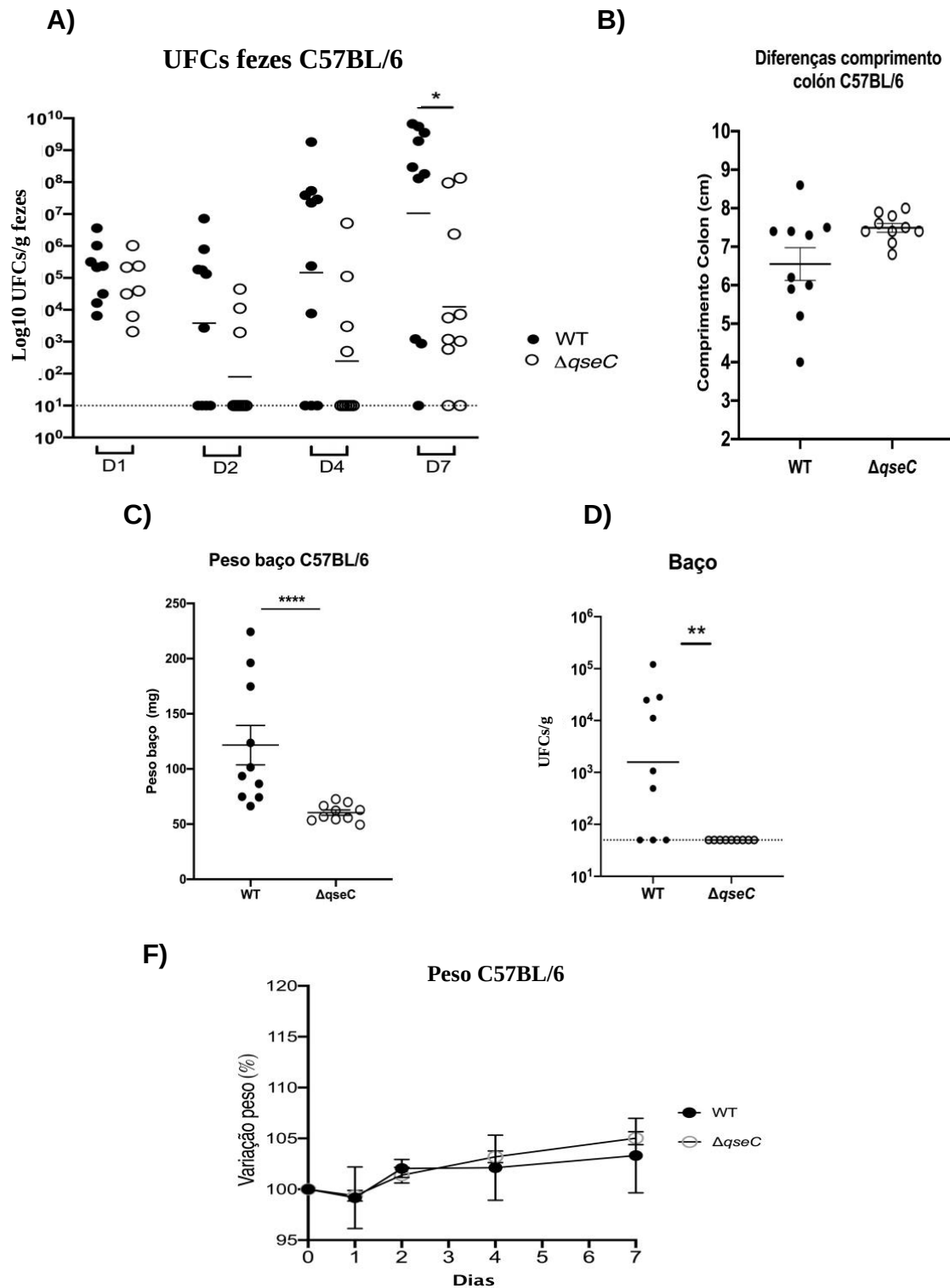


Figura 22: Infecção por linhagens de *C. rodentium* WT e $\Delta qseC$ em camundongos C57BL/6. **(A)** Diferenças na colonização entre linhagens WT e $\Delta qseC$, unidades formadoras de colônias (UFC) de linhagens de *C. rodentium* em amostras fecais nos dias 1, 2, 4 e 7 dias (D1, D2, D4 e D7) pós infecção em ratos WT. **(B)** O cólon de camundongos infectados com WT ou $\Delta qseC$ foi medido D7 pós-infecção **(C)** UFCs de *C. rodentium* no baço de camundongos infectados com WT ou $\Delta qseC$ 7 dias pós-infecção (D7). **(D)** Baço de camundongos infectados com WT ou $\Delta qseC$ foi coletado e pesado em D7. **(E)** Diferenças de peso corporal entre linhagens WT ou $\Delta qseC$ infectadas camundongos WT em D1, D2, D4 e D7 pós-infecção. Barras representam a média geométrica $\pm$ SE. Diferença significativa (teste t) é indicada por $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,0001$ (****). Resultados sem asterisco não foram encontradas diferenças significativas.

Estudos anteriores *in vivo* demonstraram que camundongos infectados em dose letal com a linhagem $\Delta qseC$ sobreviveram à infecção, diferentemente do observado na linhagem Wt, em que todos os camundongos foram a óbito (50). Através dos resultados obtidos neste estudo em camundongos C57BL/6, QseC mostrou ter direta participação na virulência de *C. rodentium*, na qual a linhagem $\Delta qseC$ apresentou menor colonização e não disseminou para o baço, evidenciando como esse sensor é importante para uma efetiva colonização de *C. rodentium* em vivo e para o desenvolvimento do processo infeccioso. Estudos ainda demonstraram, que camundongos infectados com dose letal de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, *Francisella tularensis* (70) e *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (74), tiveram aumento da sobrevivência, ou diminuição da colonização por esses patógenos, quando receberam a molécula LED209, que tem como alvo o bloqueio do sensor QseC (22), ou quando mutantes para este sensor. Ainda, houve diminuição da formação de pedestais em EHEC que recebeu tratamento com LED209 (70). Dessa forma, os resultados obtidos no presente estudo corroboram com dados da literatura obtidos *in vivo*, e evidenciam a importância de QseC na modulação da resposta de patógenos.

Durante a infecção de C57BL/6 é possível notar que no dia 1 pós-infecção a linhagem Wt coloniza da mesma forma que a $\Delta qseC$, no entanto, conforme o decorrer da infecção, a linhagem Wt consegue se estabelecer e aumentar as UFCs, enquanto o mutante de QseC não apresenta a mesma eficiência de colonização. Estudos com *C. rodentium* e *S. Typhimurium* demonstraram que esses patógenos induzem a inflamação intestinal, para que através do processo inflamatório, haja diminuição de possíveis

competidores da microbiota, pois bactérias comensais não possuem a mesma maquinaria que esses patógenos profissionais para driblar o sistema imunológico(75-78), e a indução da inflamação pode levar a disbioses (79). Ainda, para *C. rodentium*, estudos demonstram que a indução da inflamação promovida por este patógeno, diminuiu a diversidade da microbiota intestinal de camundongos (77). Por fim, corroborando com esses resultados, o trabalho de Lopez et al. 2019, demonstrou que em camundongos nocaute para CRTAM, molécula envolvida na retenção de linfócitos T na mucosa intestinal, houve diminuição da resposta inflamatória, seguida de modulação da microbiota intestinal que tornaram o camundongo nocaute para CRTAM mais resistente a infecção por *S. Typhimurium* (75). Assim, somando-se os resultados *in vitro* para EHEC nesse estudo, na qual houveram diminuições da expressão *in vitro* de genes de LEE e *hcp-2* de T6SS na linhagem $\Delta qseC$, a ausência de QseC alterou a microbiota de forma distinta da linhagem Wt no SHIME®, e a linhagem $\Delta qseC$ em *C. rodentium* não coloniza de forma eficiente camundongos BL57/6, levam a inferir que a ausência de QseC, em patógenos LEE positivos como EHEC e *C. rodentium*, pode ser importante para uma efetiva competição desses patógenos com a microbiota intestinal.

Isso fica claro ao analisar que no D1 pós-infecção, houve a mesma colonização entre as linhagens $\Delta qseC$ e Wt, e com o decorrer do processo infeccioso começam haver diferenças na colonização. Essa diferença pode ser devida a diminuição da indução da inflamação e/ou competição com a microbiota na linhagem $\Delta qseC$, ou ainda a ausência desse sensor modulou a microbiota de forma a tornar os camundongos mais resistentes a infecção. Ainda o colón de camundongos infectados com a linhagem Wt tiveram

tamanhos variados, baços inflamados e disseminação de bactérias para este órgão, enquanto o mesmo não foi observado em $\Delta qseC$, indicando diminuição da resposta inflamatória, na infecção por esta linhagem. Assim, pode ser hipotetizado que a sinalização química através de QseC, além de modular a expressão de genes de virulência de patógenos, pode ser importante também na competição dessas bactérias com a microbiota, para o estabelecimento e efetividade da infecção, o que poderia explicar a tão pronunciada diminuição da virulência observada para *C. rodentium*, neste estudo, mas também como já demonstrado para outros patógenos, como *S. Typhimurium*, *F. tularensis*(70) e EAEC(74) em vivo em cepas mutantes ou com bloqueio do sensor QseC. Dessa forma, a ausência de QseC afeta a colonização, ou pela diminuição de genes de virulência em EHEC e *C. rodentium* (50) , que poderiam diminuir indução da inflamação, tendo impacto não só no hospedeiro como na microbiota, ou pela direta competição com a microbiota, podendo induzir mudanças na microbiota benéficas para o hospedeiro, como demonstrado no SHIME®, ou ainda por ocorrer ambas as situações, levando a diferenças na colonização e disseminação observadas *in vivo* na linhagem $\Delta qseC$ em *C. rodentium*.

Ainda, visto que *C. rodentium* e EHEC tem regulações de LEE semelhantes (40), e extrapolando para *C. rodentium* os resultados obtidos aqui *in vitro* em EHEC, a ausência deste sensor pode ter mudado a regulação gênica promovida por sinalizações do ambiente intestinal, como por açúcares e ácidos graxos, detectadas através de QseC, alterando a resposta de *C. rodentium* ao ambiente, podendo contribuir também para as diferenças na infecção observadas na linhagem $\Delta qseC$ em *C. rodentium*. Assim, esses

resultados demonstram como o sensor QseC é um interessante alvo em patógenos LEE positivos como EHEC e *C. rodentium*, por ter uma importante participação na regulação da virulência desses patógenos. Por fim, estudos da microbiota ainda serão realizados e ajudarão a melhor compreender como a infecção com as linhagens Wt ou $\Delta qseC$ de *C. rodentium* modulam e afetam a diversidade da microbiota intestinal de camundongos C57BL/6.

5. Conclusão

Butirato de sódio e glicose regulam genes de LEE e modulam o gene de competição *hcp-2* em EHEC, ainda a ausência do sensor QseC leva a diminuição da indução desse gene. O gene *hcp-2* de T6SS, diminuiu na presença de Bt, evidenciando que EHEC pode não ativar esse sistema contra Bt, mesmo em condições em que fontes de carbono estão escassas, sendo um indicativo que Bt pode não ser um competidor direto de EHEC, ou tem capacidade de inibir esse sistema nesse patógeno.

Há diferenças na modulação da microbiota através do sensor QseC em EHEC, uma vez que no SHIME® houve aumento do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* na ausência de QseC, demonstrando esse sensor pode ter possível participação na competição de EHEC.

L. acidophilus diminuiu significativamente o crescimento de EHEC quando esses cresceram em direta competição, no ágar. O mesmo não foi observado quando essas mesmas bactérias cresceram em co-cultura em caldo. Ainda, não houve direta participação do sensor QseC nessa competição, uma vez que as linhagens selvagem e mutante cresceram na mesma proporção. Já em co-cultura com *L. reuteri*, EHEC não teve inibição do crescimento tão drástica como teve para *L. acidophilus*, indicando que a

inibição do crescimento observado em EHEC, é espécie-depende do *Lactobacilos* presente.

QseC tem direta participação da virulência de *C. rodentium* e é importante para a evolução do quadro infeccioso, uma vez que linhagem mutante apresentou menor colonização em camundongos e não disseminou para o baço, diferente do demonstrado para a linhagem Wt, evidenciando como esse sensor é importante para uma efetiva colonização de *C. rodentium* em vivo.

Diante disso, é possível inferir que o sensor QseC não impacta somente na ativação de fatores de virulência de LEE em EHEC, mas pode participar da direta competição deste patógeno com a microbiota, contribuindo para sua efetiva colonização em hospedeiros e para uma ampla resposta a diferentes sinalizações do ambiente intestinal, se mostrando um potencial alvo para intervenções terapêuticas. Ainda, bactérias probióticas podem ser interessantes alternativas terapêuticas para serem utilizadas em tratamento contra EHEC, uma vez que o *L. acidophilus* mostrou uma grande redução do crescimento desse patógeno. Assim, mais estudos são necessários e ajudarão a entender, como a microbiota contribui para a resistência ou susceptibilidade a colonização por EHEC, bem como benefícios do bloqueio do sensor QseC e do uso probióticos no tratamento em infecções causadas por este patógeno.

6. Referências

1. 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 (Print)1740-1526. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro818> >.

2. NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin Microbiol Rev**, v. 11, n. 1, p. 142-201, Jan 1998. ISSN 0893-8512 (Print)0893-8512. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

3. BÄUMLER, A. J.; SPERANDIO, V. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. **Nature**, v. 535, n. 7610, p. 85, 2016-07-06 2016. ISSN 1476-46871476-4687. Disponível em: < <https://www.nature.com/articles/nature18849> >.

4. KARMAI, M. A. et al. *Escherichia coli* cytotoxin, haemolytic-uraemic syndrome, and haemorrhagic colitis. In: (Ed.). **Lancet**. England, v.2, 1983. p.1299-1300. ISBN 0140-6736 (Print)0140-6736 (Linking).

5. DENG, W. et al. Locus of Enterocyte Effacement from *Citrobacter rodentium*: Sequence Analysis and Evidence for Horizontal Transfer among Attaching and Effacing Pathogens. In: (Ed.). **Infect Immun**, v.69, 2001. p.6323-35. ISBN 0019-9567 (Print)1098-5522 (Electronic).

6. BHATT, S.; ROMEO, T.; KALMAN, D. Honing the message: posttranscriptional and posttranslational control in attaching and effacing pathogens. **Trends Microbiol**, v. 19, n. 5, p. 217-24, May 2011. ISSN 0966-842X (Print)1878-4380 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2011.01.004> >.

7. CASCALES, E. The type VI secretion toolkit. **EMBO Rep**, v. 9, n. 8, p. 735-41, Aug 2008. ISSN 1469-221x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/embo.2008.131> >.

8. WAN, B. et al. Type VI secretion system contributes to Enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence by secreting catalase against host reactive oxygen species (ROS). **PLoS Pathog**, v. 13, n. 3, p. e1006246, Mar 2017. ISSN 1553-7366. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1006246> >.

9. LIEN, Y. W.; LAI, E. M. Type VI Secretion Effectors: Methodologies and Biology. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 7, 2017. ISSN 2235-2988 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2017.00254> >.

10. SANA, T. G. et al. *Salmonella* Typhimurium utilizes a T6SS-mediated antibacterial weapon to establish in the host gut. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 34, p. E5044-E5051, Aug 2016. Disponível em: < <https://www.pnas.org/content/early/2016/08/05/1608858113> >.

11. FUQUA, C.; WINANS, S. C.; GREENBERG, E. P. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. **Annu Rev Microbiol**, v. 50, p. 727-51, 1996. ISSN 0066-4227 (Print)0066-4227. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.50.1.727> >.

12. SPERANDIO, V. et al. Quorum sensing is a global regulatory mechanism in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **J Bacteriol**, v. 183, n. 17, p. 5187-97, Sep 2001. ISSN 0021-9193 (Print)0021-9193. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

13. 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 the regulation of flagella and motility by quorum sensing in *E. coli*. **Mol Microbiol**, v. 43, n. 3, p. 809-21, Feb 2002. ISSN 0950-382X (Print)0950-382x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

14. NJOROGE, J. W. et al. Virulence meets metabolism: Cra and KdpE gene regulation in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **MBio**, v. 3, n. 5, p. e00280-12, Oct 16 2012. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.00280-12> >.

15. YAMAMOTO, K. et al. Functional Characterization in Vitro of All Two-component Signal Transduction Systems from *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 1448-1456, 2005-01-14 2005. Disponível em: < <http://www.jbc.org/content/280/2/1448.short> >.

16. 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> >.

17. 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 22 2003. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1537100100> >.

18. SIRCILI, M. P. et al. Modulation of Enteropathogenic *Escherichia coli* Virulence by Quorum Sensing. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 4, p. 2329-2337, Apr 2004. Disponível em: < <http://iai.asm.org/content/72/4/2329.short> >.

19. READING, N. C. et al. A novel two-component signaling system that activates transcription of an enterohemorrhagic *Escherichia coli* effector involved in remodeling of host actin. **J Bacteriol**, v. 189, n. 6, p. 2468-76, Mar 2007. ISSN 0021-9193 (Print)0021-9193. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/jb.01848-06> >.

20. 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://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16988219> >.

21. 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 0019-9567. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/iai.05921-11> >.

22. 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> >.

23. WONG, J. M. et al. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. **J Clin Gastroenterol**, v. 40, n. 3, p. 235-43, Mar 2006. ISSN 0192-0790 (Print)0192-0790. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1097/00004836-200603000-00015> >.

24. NAKANISHI, N. et al. Regulation of virulence by butyrate sensing in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. **Microbiology**, v. 155, n. Pt 2, p. 521-30, Feb 2009. ISSN 1350-0872 (Print)1350-0872. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.023499-0> >.

25. RAPOZO, D. C. M.; BERNARDAZZI, C.; DE SOUZA, H. S. P. Diet and microbiota in inflammatory bowel disease: The gut in disharmony. **World J Gastroenterol**, v. 23, n. 12, p. 2124-40, Mar 28 2017. ISSN 1007-9327 (Print)2219-2840 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v23.i12.2124> >.

26. JIMINEZ, J. A. et al. Butyrate Supplementation at High Concentrations Alters Enteric Bacterial Communities and Reduces Intestinal Inflammation in Mice Infected with *Citrobacter rodentium*. **mSphere**, v. 2, n. 4, Jul-Aug 2017. ISSN 2379-5042 (Print)2379-5042. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/mSphere.00243-17> >.

27. VAN DEUN, K. et al. Butyrate protects Caco-2 cells from *Campylobacter jejuni* invasion and translocation. **Br J Nutr**, v. 100, n. 3, p. 480-4, Sep 2008. ISSN 0007-1145. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1017/s0007114508921693> >.

28. SERRANO-VILLAR, S. et al. The effects of prebiotics on microbial dysbiosis, butyrate production and immunity in HIV-infected subjects. **Mucosal Immunology**, v. 10, n. 5, p. 1279, 2016-12-21 2016. ISSN 1935-34561935-3456. Disponível em: < <https://www.nature.com/articles/mi2016122> >.

29. ZUMBRUN, S. D. et al. Dietary choice affects Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O157:H7 colonization and disease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 23, p. E2126-33, Jun 4 2013. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1222014110> >.

30. TAKAO, M.; YEN, H.; TOBE, T. LeuO enhances butyrate-induced virulence expression through a positive regulatory loop in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. **Mol Microbiol**, v. 93, n. 6, p. 1302-13, Sep 2014. ISSN 0950-382x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/mmi.12737> >.

31. MARTÍN, R. et al. Functional Characterization of Novel *Faecalibacterium prausnitzii* Strains Isolated from Healthy Volunteers: A Step Forward in the Use of *F. prausnitzii* as a Next-Generation Probiotic. **Front Microbiol**, v. 8, 2017. ISSN 1664-302X (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.01226> >.

32. CURTIS, M. M. et al. The gut commensal *Bacteroides thetaiotaomicron* exacerbates enteric infection through modification of the metabolic landscape. **Cell Host Microbe**, v. 16, n. 6, p. 759-69, Dec 10 2014. ISSN 1931-3128 (Print)1934-6069 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2014.11.005> >.

33. PACHECO, A. R. et al. Fucose sensing regulates bacterial intestinal colonization. **Nature**, v. 492, n. 7427, p. 113-7, Dec 6 2012. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nature11623> >.

34. PIFER, R.; SPERANDIO, V. The Interplay between the Microbiota and Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Microbiol Spectr**, v. 2, n. 5, Oct 2014. ISSN 2165-0497. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/microbiolspec.EHEC-0015-2013> >.

35. ROSSI, F.; AMADORO, C.; COLAVITA, G. Members of the *Lactobacillus* Genus Complex (LGC) as Opportunistic Pathogens: A Review. In: (Ed.). **Microorganisms**, v.7, 2019. ISBN 2076-2607 (Electronic).

36. WANG, Y. et al. Antioxidant Properties of Probiotic Bacteria. In: (Ed.). **Nutrients**, v.9, 2017. ISBN 2072-6643 (Electronic).

37. LIU, Y. W. et al. Oral administration of *Lactobacillus plantarum* K68 ameliorates DSS-induced ulcerative colitis in BALB/c mice via the anti-inflammatory and immunomodulatory activities. **Int Immunopharmacol**, v. 11, n. 12, p. 2159-66, Dec 2011. ISSN 1567-5769. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2011.09.013> >.

38. WANG, G. et al. *Lactobacillus casei* LC2W can inhibit the colonization of *Escherichia coli* O157:H7 in vivo and reduce the severity of colitis. **Food**

- Funct**, v. 10, n. 9, p. 5843-5852, Sep 1 2019. ISSN 2042-6496. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/c9fo01390c> >.
39. EATON, K. A. et al. Probiotic *Lactobacillus reuteri* ameliorates disease due to enterohemorrhagic *Escherichia coli* in germfree mice. **Infect Immun**, v. 79, n. 1, p. 185-91, Jan 2011. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/iai.00880-10> >.
 40. COLLINS, J. W. et al. *Citrobacter rodentium*: infection, inflammation and the microbiota. **Nat Rev Microbiol**, v. 12, n. 9, p. 612-23, Sep 2014. ISSN 1740-1526. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3315> >.
 41. JUBELIN, G. et al. Modulation of Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* Survival and Virulence in the Human Gastrointestinal Tract. In: (Ed.). **Microorganisms**, v.6, 2018. ISBN 2076-2607 (Electronic).
 42. MINEKUS, M. "The TNO gastro-intestinal model (TIM)." **The Impact of Food Bioactives on Health**. Springer, Cham, p.37-46, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29787065> >.
 43. VAN DE WIELE, T. et al. "The simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME®)." **The Impact of Food Bioactives on Health**. Springer, Cham, p. 305-317, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29787058> >.
 44. PETTY, N. K. et al. The *Citrobacter rodentium* genome sequence reveals convergent evolution with human pathogenic *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, v. 192, n. 2, p. 525-38, Jan 2010. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/jb.01144-09> >.
 45. ROAGER, H. M. et al. Microbial Enterotypes, Inferred by the *Prevotella*-to-*Bacteroides* Ratio, Remained Stable during a 6-Month Randomized Controlled Diet Intervention with the New Nordic Diet. In: (Ed.). **Appl Environ Microbiol**, v.80, 2014. p.1142-9. ISBN 0099-2240 (Print)1098-5336 (Electronic).

46. 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. 351-6, Sep 2011. ISSN 0167-7012. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2011.06.010> >.
47. FIERER, N. et al. Assessment of Soil Microbial Community Structure by Use of Taxon-Specific Quantitative PCR Assays. 2005-07-01 2005. Disponível em: < <https://aem.asm.org/content/71/7/4117> >.
48. GUO, X. et al. Development of a real-time PCR method for *Firmicutes* and *Bacteroidetes* in faeces and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs. **Lett Appl Microbiol**, v. 47, n. 5, p. 367-73, Nov 2008. ISSN 0266-8254. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02408.x> >.
49. RINTTILA, T. et al. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. **J Appl Microbiol**, v. 97, n. 6, p. 1166-77, 2004. ISSN 1364-5072 (Print)1364-5072. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02409.x> >.
50. MOREIRA, C. G. et al. Bacterial Adrenergic Sensors Regulate Virulence of Enteric Pathogens in the Gut. **MBio**, v. 7, n. 3, Jun 7 2016. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.00826-16> >.
51. 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 1 1988. ISSN 0003-4819 (Print)0003-4819. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
52. CRAVIOTO, A. et al. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. **Current Microbiology**, v. 3, n. 2, p. 95-99, Mar 1979. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02602439> >.
53. FIERER, J. et al. Expression of the *Salmonella* virulence plasmid gene spvB in cultured macrophages and nonphagocytic cells. **Infect Immun**, v. 61, n. 12,

- p. 5231-6, Dec 1993. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8225598> >.
54. FINLAY, B. B.; RUSCHKOWSKI, S.; DEDHAR, S. Cytoskeletal rearrangements accompanying *Salmonella* entry into epithelial cells. **J Cell Sci**, v. 99 (Pt 2), p. 283-96, Jun 1991. ISSN 0021-9533. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1909337> >.
 55. PFEIFER, C. G. et al. *Salmonella* Typhimurium virulence genes are induced upon bacterial invasion into phagocytic and nonphagocytic cells. **Infect Immun**, v. 67, n. 11, p. 5690-8, Nov 1999. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10531217> >.
 56. MOLLY, K. et al. Validation of the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME) Reactor Using Microorganism-associated Activities. **Microbial ecology in health and disease**, v. 7, n. 4, p. 191-200, 11 Jul 1994. Disponível em: < <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/08910609409141354> >.
 57. BIANCHI, F. et al. Modulation of Gut Microbiota From Obese Individuals by in Vitro Fermentation of Citrus Pectin in Combination With *Bifidobacterium longum* BB-46. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 102, n. 20, 2018 Oct 2018. ISSN 1432-0614. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30121748> >.
 58. 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 (Print)0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
 59. TORRES, A. G.; ZHOU, X.; KAPER, J. B. Adherence of Diarrheagenic *Escherichia coli* Strains to Epithelial Cells. In: (Ed.). **Infect Immun**, v.73, 2005. p.18-29. ISBN 0019-9567 (Print)1098-5522 (Electronic).
 60. TOBE, T.; NAKANISHI, N.; SUGIMOTO, N. Activation of Motility by Sensing Short-Chain Fatty Acids via Two Steps in a Flagellar Gene Regulatory

- Cascade in Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: (Ed.). **Infect Immun**, v.79, 2011. p.1016-24. ISBN 0019-9567 (Print)1098-5522 (Electronic).
61. SAUDER, A. B.; KENDALL, M. M. After the Fact(or): Posttranscriptional Gene Regulation in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **J Bacteriol**, v. 200, n. 19, Oct 1 2018. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/jb.00228-18> >.
 62. SCHULTHESS, J. et al. The Short Chain Fatty Acid Butyrate Imprints an Antimicrobial Program in Macrophages. **Immunity**, v. 50, n. 2, p. 432-445.e7, Feb 19 2019. ISSN 1074-7613. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2018.12.018> >.
 63. LUCKE, K. et al. Prevalence of *Bacteroides* and *Prevotella* spp. in ulcerative colitis. **J Med Microbiol**, v. 55, n. Pt 5, p. 617-24, May 2006. ISSN 0022-2615 (Print)0022-2615. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.46198-0> >.
 64. KAAKOUSH, N. O. et al. Microbial Dysbiosis in Pediatric Patients with Crohn's Disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 10, p. 3258-3266, Oct 2012. Disponível em: < <https://jcm.asm.org/content/50/10/3258> >.
 65. BENJAMIN, M.; DATTA, A.R. Acid Tolerance of Enterohemorrhagic *Escherichia Coli*. **Applied and environmental microbiology**, v. 61, n. 4, Apr 1995. ISSN 0099-2240. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7747983> >.
 66. ETIENNE-MESMIN, L. et al. Effect of a New Probiotic *Saccharomyces Cerevisiae* Strain on Survival of *Escherichia Coli* O157:H7 in a Dynamic Gastrointestinal Model. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 3, Feb 2011. ISSN 1098-5336. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21131521> >.
 67. THURSBY, E.; JUGE, N. Introduction to the human gut microbiota. In: (Ed.). **Biochem J**, v.474, 2017. p.1823-36. ISBN 0264-6021 (Print)1470-8728 (Electronic).

68. PEREZ-LOPEZ, A. et al. Mucosal Immunity to Pathogenic Intestinal Bacteria. **Nature reviews. Immunology**, v. 16, n. 3, Mar 2016. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26898110> >.

69. GARCIA RODRIGUEZ, L. A.; RUIGOMEZ, A.; PANES, J. Acute gastroenteritis is followed by an increased risk of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 130, n. 6, p. 1588-94, May 2006. ISSN 0016-5085 (Print)0016-5085. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2006.02.004> >.

70. CURTIS, M. M. et al. QseC Inhibitors as an Antivirulence Approach for Gram-Negative Pathogens. **Mbio**, v. 5, n. 6, Dec 2014. Disponível em: < <https://mbio.asm.org/content/5/6/e02165-14> >.

71. MEDELLIN-PENA, M. J.; GRIFFITHS, M. W. Effect of molecules secreted by *Lactobacillus acidophilus* strain La-5 on *Escherichia coli* O157:H7 colonization. **Appl Environ Microbiol**, v. 75, n. 4, p. 1165-72, Feb 2009. ISSN 0099-2240. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/aem.01651-08> >.

72. PENG, M. et al. Linoleic Acids Overproducing *Lactobacillus casei* Limits Growth, Survival, and Virulence of *Salmonella* Typhimurium and Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. **Front Microbiol**, v. 9, p. 2663, 2018. ISSN 1664-302X (Print)1664-302x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.02663> >.

73. BOULADOUX, N.; HARRISON, O. J.; BELKAID, Y. The mouse model of infection with *Citrobacter rodentium*. **Curr Protoc Immunol**, v. 119, p. 19 15 1-19 15 25, Nov 01 2017. ISSN 1934-3671 (Print)1934-368X (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/cpim.34> >.

74. RIBEIRO, T. R. M. et al. QseC Signaling in the Outbreak O104:H4 *Escherichia coli* Strain Combines Multiple Factors during Infection. **Journal of Bacteriology**, v. 201, n. 17, p. e00203-19, Sep 2019. Disponível em: < <https://jb.asm.org/content/201/17/e00203-19/article-info> >.

75. PEREZ-LOPEZ, A. et al. CRTAM Shapes the Gut Microbiota and Enhances the Severity of Infection. **The Journal of Immunology**, v. 203, n. 2, p. 532-

- 543, Jul 2019. Disponível em: <
<https://www.jimmunol.org/content/early/2019/05/28/jimmunol.1800890> >.
76. BARMAN, M. et al. Enteric Salmonellosis Disrupts the Microbial Ecology of the Murine Gastrointestinal Tract. **Infection and immunity**, v. 76, n. 3, Mar 2008. ISSN 1098-5522. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18160481> >.
77. LUPP, C. et al. Host-mediated Inflammation Disrupts the Intestinal Microbiota and Promotes the Overgrowth of Enterobacteriaceae. **Cell host & microbe**, v. 2, n. 2, 2007. ISSN 1934-6069. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18005726> >.
78. KAMADA, N. et al. Regulated Virulence Controls the Ability of a Pathogen to Compete With the Gut Microbiota. **Science (New York, N.Y.)**, v. 336, n. 6086, 2012. ISSN 1095-9203. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22582016> >.
79. ZENG, M.Y.; INOHARA, N.; NUNEZ, G. Mechanisms of Inflammation-Driven Bacterial Dysbiosis in the Gut. **Mucosal immunology**, v. 10, n. 1, Jan 2017. ISSN 1935-3456. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27554295> >.