

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta **Dissertação** será disponibilizado somente a partir de 25/06/2024.

**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>	77
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.....	77
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 ..	77
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.

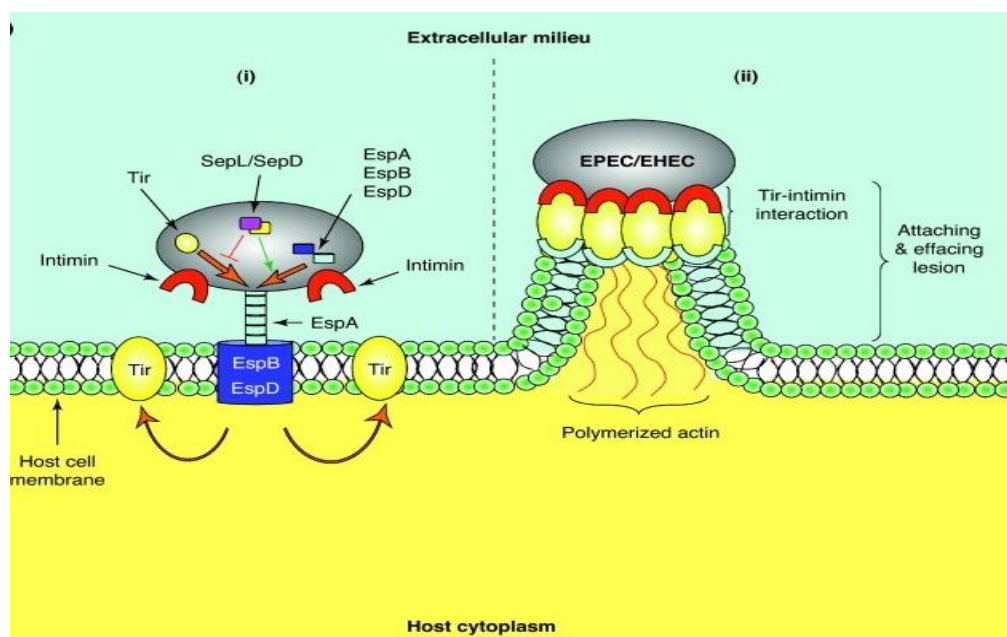


Figura 1: Representação da formação do pedestal desenvolvido por EHEC e EPEC. (I) Etapa de formação do sistema de secreção do tipo III e translocação de proteínas efectoras, (II) Remodelamento do citoesqueleto de actina para formação do pedestal (6).

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.

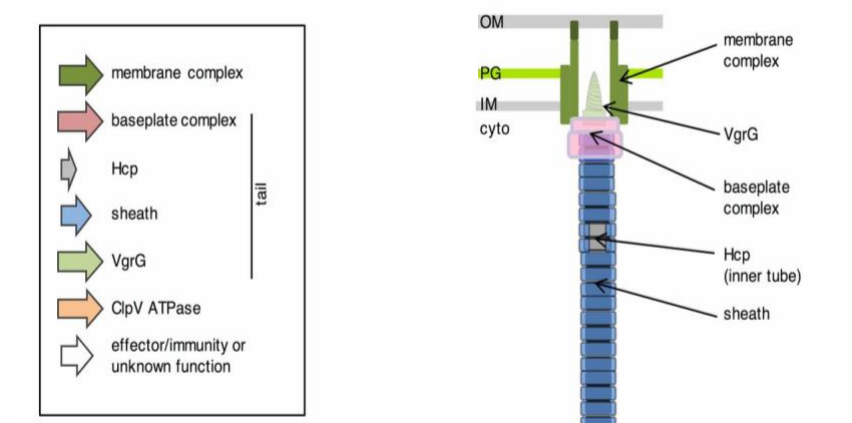


Figura 2: Representação esquemática do sistema de secreção do tipo VI. O sistema é composto de bainha, complexos de membrana e placa de base e as proteínas Hcp, além de ClpV ATPase que dá energia para a contração do sistema (10).

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).

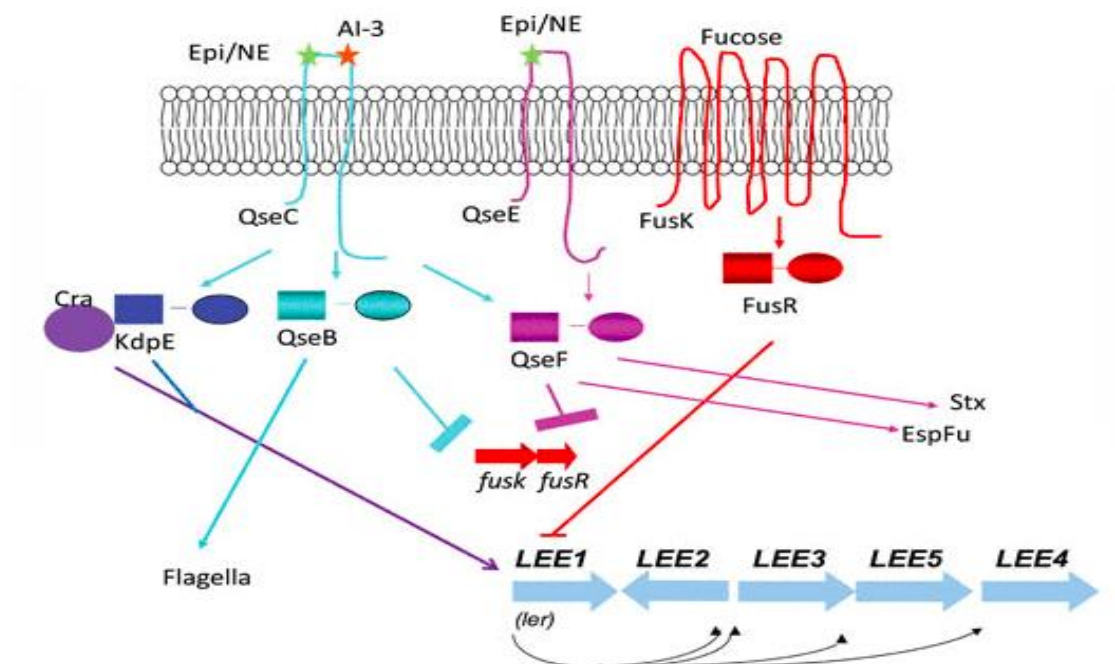


Figura 3. A cascata de sinalização de QseC em EHEC. QseC detecta AI-3, epinefrina e norepinefrina e fosforila QseB, QseF e KdpE. QseE detecta epinefrina e fosforila QseF. QseB ativa a expressão de flagelo. QseF indiretamente promove a expressão de toxina Shiga e EspFu. KdpE juntamente com Cra ativam 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.

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 1476-4687/1476-4687. Disponível em: < <https://www.nature.com/articles/nature18849> >.
4. KARMALI, 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/embor.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: < <https://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> >.