



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

TAMARA RENATA MACHADO RIBEIRO

**O papel da sinalização química via sensor histidina quinase QseC na virulência
de *Escherichia coli* enteroagregativa Stx+**

Araraquara – SP

2021

TAMARA RENATA MACHADO RIBEIRO

O papel da sinalização química via sensor histidina quinase QseC na virulência de *Escherichia coli* enteroagregativa Stx+

Tese 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” para obtenção do título de Doutora em Bacteriologia.

Orientador: Prof. Dr. Cristiano Gallina Moreira

Araraquara – SP

2021

M149o Machado Ribeiro, Tamara Renata.
O papel da sinalização química via sensor histidina quinase QseC na virulência de *Escherichia coli* enteroagregativa Stx+ / Tamara Renata Machado Ribeiro. – Araraquara: [S.n.], 2021.
127 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de Bacteriologia.

Orientador: Cristiano Gallina Moreira.

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: O papel da sinalização química via sensor histidina quinase QseC na virulência de *Escherichia coli* enteroagregativa Stx+

AUTORA: TAMARA RENATA MACHADO RIBEIRO

ORIENTADOR: CRISTIANO GALLINA MOREIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, área de conhecimento: Bacteriologia pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. CRISTIANO GALLINA MOREIRA (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP

Prof. Dr. WALDIR PEREIRA ELIAS JUNIOR (Participação Virtual)
Laboratório de Bacteriologia / Instituto Butantan

Profa. Dra. JULIANA PFRIMER FALCÃO (Participação Virtual)
Análises Clínicas Toxicológicas e Bromatológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da USP

Profa. Dra. KATIA SIVIERI (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP- Araraquara

Araraquara, 30 de novembro de 2021

DEDICATÓRIA

A minha mãe Cinira, pelo suporte e encorajamento durante toda a minha trajetória acadêmica.

Ao meu filho Ari Neto, que esteve ao meu lado do ensino médio ao doutorado e nunca foi um obstáculo para eu seguir meu caminho, mas, sim, um incentivo para que eu nunca desistisse dos meus sonhos. Você é luz na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Cristiano Gallina Moreira, pela oportunidade de trabalharmos juntos e por toda a confiança depositada em mim durante o desenvolvimento desta tese.

À FCFAr/UNESP, à FAPESP (processos nº 2014/06779-2 e 2019/03049-7), à CAPES (Código de Financiamento 001) e ao DAAD (Deutscher Akademischer Austauschdienst), pelo apoio institucional e financeiro que viabilizaram a realização desta pesquisa.

Ao Dr. Waldir Pereira Elias Junior, pela oportunidade de colaboração e por todo o apoio durante toda a minha jornada acadêmica.

A Dra. Kátia Sivieri, pela oportunidade de colaboração e por todo o suporte durante os experimentos com o SEMH®.

Aos professores Dra. Juliana Pfrimer Falcão, Dr. Wilton Rogério Lustri, Dra. Roxane Maria Fontes Piazza e Dra. Taís Maria Bauab, pela oportunidade de colaboração.

A todo o Instituto de Infectologia da Universidade de Münster, pelo apoio durante o meu estágio. Em especial, ao Dr. Christian Ruter, pela oportunidade de trabalharmos juntos, pela confiança e pelos ensinamentos.

A minha amiga Theresa Meyer, por todo o acolhimento e suporte durante a minha estadia na Alemanha.

A toda equipe do Laboratório de Pesquisa em Patogenicidade e Sinalização Química Bacteriana (PASQUIBAC), pela cooperação durante toda a minha trajetória. Em especial, agradeço a minhas amigas Bruna Cardinali Lustri, por me apoiar incondicionalmente durante todos esses anos de trabalho, e a Isabela Mancini Martins, que também sempre esteve ao meu lado.

Ao meu amigo Mateus Kawata Salgaço, pela oportunidade de colaboração e por todo o suporte prestado durante o desenvolvimento do meu trabalho com o SEMH®.

A minha amiga Amanda Aparecida Seribelli, pela amizade e oportunidade de colaboração.

A minhas alunas de Iniciação Científica, Carollina Mazza Abramo Oliveira e Laís Verdi dos Santos, pela oportunidade de trabalharmos juntas.

Ao meu companheiro e pai dos meus filhos, Cesar Eduardo Valentino, por acreditar nos meus sonhos e me dar todo o suporte necessário para que eu chegasse até aqui.

Aos meus familiares e amigos, por todo encorajamento e suporte imprescindíveis sempre que necessário.

Aos meus queridos filhos de quatro patas, Lili, Rebeca e Bidu, pela companhia e amor incondicional.

“Sem sonhos, a vida não tem brilho. Sem metas, os sonhos não têm alicerces. Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais. Sonhe, trace metas, estabeleça prioridades e corra riscos para executar seus sonhos. Melhor é errar por tentar do que errar por se omitir!

Não tenha medo dos tropeços da jornada.”

Augusto Cury

RESUMO

Escherichia coli enteroagregativa (EAEC) está envolvida em casos de diarreia aguda e persistente (≥ 14 dias) em crianças e adultos de países desenvolvidos e em desenvolvimento. Possui um padrão de adesão exclusivo em cultivo de células epiteliais, denominado adesão agregativa (AA). São descritas adesinas e toxinas nos mecanismos de patogenicidade de EAEC. A formação de um espesso biofilme, mediada principalmente por fímbrias de adesão agregativa (AAF), é característica marcante desse patótipo. A EAEC O104:H4 Stx+ foi responsável por um grande surto de colite hemorrágica e síndrome hemolítica urêmica (SHU) em 2011, na Alemanha. A cepa foi considerada um híbrido EAEC/EHEC, pois havia sido lisogenizada com um fago que codifica para a toxina de Shiga, comumente encontrada em EHEC (*Escherichia coli* enterohemorrágica). Foi evidenciada uma combinação altamente patogênica a humanos, devido ao seu elevado potencial de causar SHU. As bactérias utilizam sinalização química mediada por sistemas de 2 componentes para se comunicarem com o hospedeiro e sua respectiva microbiota, de modo a regularem seus mecanismos de sobrevivência. O sistema QseBC encontra-se diretamente relacionado, em enterobactérias, com a regulação da expressão de fatores de virulência em importantes patógenos humanos. Sua sinalização ocorre via Autoindutor-3 (AI-3), produzido por bactérias, Epinefrina (Epi) e Norepinefrina (NE), hormônios adrenérgicos do hospedeiro. Trabalhos anteriores evidenciaram que o bloqueio da via de sinalização do sistema QseBC por LED209 diminui a expressão de genes de virulência em bactérias Gram-negativas. Essa molécula atua especificamente em QseC, não interfere no crescimento dos patógenos e não apresenta toxicidade para modelos animais. O objetivo deste estudo foi investigar a sinalização química na virulência de EAEC O104:H4 Stx+ e Stx- via sensor histidina quinase QseC *in vitro* e *in vivo*. Foram realizados nocautes gênicos via vetor suicida pJP5603 para caracterização fenotípica e de expressão gênica, bem como ensaios *in vivo* para avaliar a cinética da infecção na ausência e presença de LED209. A interrupção dessa via mediada por QseC resultou na redução da formação de biofilme e de adesão em células Caco-2, na alteração de expressão de importantes fatores de virulência, bem como na menor eficiência na colonização *in vivo* para a cepa C227-11 (Stx+). Por outro lado, as mesmas diferenças não foram observadas para a cepa BA3826 (Stx-). Além disso, foi evidenciado um importante papel de QseC para a cepa C227-11 (Stx+) na diminuição da captação de vesículas de membrana externa por células intestinais, assim como na modulação da microbiota intestinal humana. Desta forma, conclui-se que QseC é um excelente alvo para o desenvolvimento de terapias, assim como o uso de LED209, para a cepa C227-11 (Stx+).

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

ABSTRACT

Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) is involved in cases of acute and persistent diarrhea (≥ 14 days) in children and adults from developed and developing countries. It has a unique adhesion pattern in epithelial cell cultures, called aggregative adhesion (AA). There are several adhesins and toxins in the pathogenicity mechanisms of EAEC. The formation of a thick biofilm, mediated mainly by aggregative adhesion fimbriae (AAF), is a hallmark of this pathotype. EAEC O104:H4 Stx+ was responsible for a major outbreak of hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome (HUS) in 2011 in Germany. The strain was considered an EAEC/EHEC hybrid, as it was lysogenized with a phage that codes for a Shiga toxin, commonly found in EHEC (enterohemorrhagic *Escherichia coli*). A highly pathogenic combination to humans has been shown, due to its high potential to cause HUS. These bacteria employ chemical signaling mediated by 2-component systems to communicate with the host and its microbiota, in order to regulate their survival mechanisms. The QseBC system in enterobacteria is directly related with the regulation of the expression of virulence factors in important human pathogens. The signaling occurs via Autoinducer-3 (AI-3), produced by bacteria, Epinephrine (Epi) and Norepinephrine (NE), host adrenergic hormones. Previous studies have shown that blocking the signaling pathway of the QseBC system by LED209 results in the lower expression of virulence genes in Gram-negative bacteria. This molecule acts precisely on QseC sensor kinase, it does not interfere with the growth of pathogens and has no toxicity for animal models. The aim of the study was to investigate chemical signaling in the virulence of EAEC O104:H4 Stx + and Stx- via histidine kinase QseC sensor *in vitro* and *in vivo*. Gene knockouts were generated via pJP5603 suicide vector, and it was used to perform phenotypic and gene expression assays, as well as *in vivo* assays to assess the infection kinetics in the absence and presence of LED209. Disruption of this QseC-mediated pathway resulted in reduced biofilm formation, altered expression of important virulence factors, and reduced *in vivo* colonization efficiency for the C227-11 (Stx +) strain. On the other hand, these differences were not observed for the BA3826 (Stx-) strain. Furthermore, QseC showed to have a role in the uptake of outer membrane vesicles by intestinal cells and modulation of the human intestinal microbiota. Therefore, the QseC sensor kinase is an excellent target for the development of novel therapies, as well as the use of LED209 in the C227-11 (Stx +) outbreak strain.

Keywords: Enteroaggregative *Escherichia coli*. Chemical signaling. Virulence.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Padrão clássico de adesão de EAEC.....	23
Figura 2. Modelo de patogênese de EAEC O104:H4 Stx+.....	30
Figura 3. Modelo de sistemas de 2 componentes em EHEC.....	35
Figura 4. Formação de OMVs.....	37
Figura 5. Principais filos bacterianos que compõem a microbiota intestinal.....	40
Figura 6. Visão geral do protocolo experimental empregado neste estudo.....	57
Figura 7. Curva de crescimento das cepas C227-11 (Stx+).	62
Figura 8. Curva de crescimento das cepas BA3826 (Stx-).....	62
Figura 9. Análise do biofilme das cepas C227-11 (Stx+) por coloração com cristal violeta. .	63
Figura 10. Análise do biofilme das cepas BA3826 (Stx-) por coloração com cristal violeta.	64
Figura 11. Perfil de adesão das cepas C227-11 (Stx+) em células Caco-2.....	65
Figura 12. Perfil de adesão das cepas BA3826 (Stx-) em células Caco-2.	65
Figura 13. Perfil de motilidade das cepas C227-11 (Stx+).	66
Figura 14. Perfil de motilidade das cepas BA3826 (Stx-).....	67
Figura 15. Análise da expressão de genes envolvidos na formação de biofilme e colonização nas cepas C227-11 (Stx+) em fase exponencial tardia.....	69
Figura 16. Análise da expressão gênica de serinoproteases nas cepas C227-11 (Stx+) em fase exponencial tardia.....	69
Figura 17. Análise da expressão de genes envolvidos na formação de biofilme e colonização nas cepas BA3826 (Stx-) em fase exponencial tardia.	71
Figura 18. Análise da expressão gênica de serinoproteases nas cepas BA3826 (Stx-) em fase exponencial tardia.....	71
Figura 19. Análise da expressão gênica de toxina de Shiga nas cepas C227-11 (Stx+) em fase exponencial tardia.....	72

Figura 20. Análise de expressão de gene envolvido na motilidade das cepas C227-11 (Stx+) em fase exponencial tardia.	73
Figura 21. Análise de expressão de gene envolvido na motilidade das cepas BA3826 (Stx-) em fase exponencial tardia.	73
Figura 22. Análise de expressão gênica das cepas C227-11 (Stx+) de gene envolvido na tolerância ao estresse bacteriano em pH neutro.....	74
Figura 23. Análise de expressão gênica das cepas BA3826 (Stx-) de gene envolvido na tolerância ao estresse bacteriano em pH neutro.....	75
Figura 24. Análise de expressão gênica das cepas C227-11 (Stx+) de gene envolvido na tolerância ao estresse bacteriano em pH ácido.	75
Figura 25. Análise de expressão gênica das cepas BA3826 (Stx-) de gene envolvido na tolerância ao estresse bacteriano em pH ácido.	76
Figura 26. Análise de vesículas de membrana externa extraídas das cepas C227-11(Stx+)...	77
Figura 27. Cinética da captação de OMVs das cepas C227-11 (Stx+) por células Caco-2. ...	78
Figura 28. Internalização de OMVs das cepas C227-11 (Stx+) em células Caco-2.	79
Figura 29. Colocalização de OMVs das cepas C227-11 (Stx+) em células Caco-2.	80
Figura 30. Colonização das cepas C227-11 (Stx+) em camundongos C57BL/6.	82
Figura 31. Colonização da cepa BA3826 (Stx-) em camundongos C57BL/6.....	82
Figura 32. Colonização das cepas BA3826 (Stx-) em camundongos C57BL/6.	83
Figura 33. Análise de expressão gênica após o bloqueio de QseC da cepa C227-11 (Stx+) com LED209.	84
Figura 34. Análise de expressão gênica após o bloqueio de QseC da cepa BA3826 (Stx-) com LED209.	85
Figura 35. Análise de expressão gênica após o bloqueio de QseC da cepa C227-11 (Stx+) com LED209.	86

Figura 36. Análise de expressão gênica após o bloqueio de QseC da cepa BA3826 (Stx-) com LED209.	86
Figura 37. Análise de expressão gênica após o nocaute de <i>qseC</i> na cepa BA3826 (Stx-).	87
Figura 38. Abundância de filamentos após a infecção com a cepa C227-11 WT (Stx+).	88
Figura 39. Abundância de gêneros durante a infecção com a cepa C227-11 WT (Stx+).	89
Figura 40. Abundância de filamentos durante a infecção com a cepa C227-11 :: <i>qseC</i>	89
Figura 41. Abundância de gêneros durante a infecção com a cepa C227-11 :: <i>qseC</i>	90
Figura 42. Produção de AGCC durante a infecção com a cepa C227-11 WT (Stx+).	91
Figura 43. Produção de AGCC durante a infecção com a cepa C227-11 :: <i>qseC</i>	92
Figura 44. Análise da produção de toxina de Shiga durante a infecção com as cepas C227-11 (Stx+).	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Cepas bacterianas e plasmídeos utilizados neste estudo.....	43
Tabela 2. Sequências de primers utilizados durante este estudo.	46
Tabela 3. Composição do meio carboidrato e suco pancreático utilizados no SEMH®.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/E - Attaching and Effacing

AA - Adesão Agregativa

AAF - Aggregative Adherence Fimbriae

Aar – AggR-activated regulator

AGCC – Ácido Graxo de Cadeia Curta

AggR - Ativador transcricional de EAEC

AI-1 - Autoindutor-1

AI-2 - Autoindutor-2

AI-3 - Autoindutor-3

AIP - Autoinducer peptides

ANR- AraC Negative Regulators

ATP - Adenosina Trifosfato

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

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

cGMP - cyclic Guanosine Monophosphate

CH - Colite Hemorrágica

DAEC - Diffusely Adherent *E. coli*

DAF - Decay-accelerating Fator

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

DO₆₀₀ - Densidade Óptica a 600 nm

EAEC - Enteroaggregative *Escherichia coli*

EAST1 - EnteroAggregative heat-Stable Toxin 1

EHEC - Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*

EIEC - Enteroinvasive *Escherichia coli*

ELISA - Enzyme-linked Immunosorbent Assay

EPEC - Enteropathogenic *Escherichia coli*

Epi - Epinefrina

EU-RL - European Union Reference Laboratory

Gb3 - Globotriacilceramida

GPCRs - G protein-coupled Receptors

GTP - Guanosina Trifosfato

HIV - Human Immunodeficiency Virus

HK - Histidine Kinase

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

Irp-2 - Iron-repressible high-molecular weight2

LB - Meio Luria-Bertani

LEE - Locus of Enterocyte Effacement

Lpf - Long polar fimbriae

LPS - Lipopolissacarídeo

mAb - monoclonal Antibody

MOI - Multiplicity of Infection

NE - Norepinefrina

OMV - Outer Membrane Vesicle

OPD - o-Fenilenediamina

pAA - plasmídeo de Adesão Agregativa

pAb - polyclonal Antibody

PBS - Phosphate Buffered Saline

pEAF - EPEC Adherence Fator Plasmid

pESBL - Extended-Spectrum β -Lactamase Antibiotic Resistance Plasmid

Pet - Plasmid-encoded toxin

Pic - Protein involved in colonization

q-PCR - Quantitative Polymerase Chain Reaction

qRT-PCR - Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

QseB - Quorum sensing *E. coli* B (regulador de resposta)

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

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

RR - Regulador de Resposta

Sat - Secreted autotransporter toxin

SDS-PAGE - Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

SepA - *Shigella* extracellular protein

ShET-1 - *Shigella* Enterotoxin 1

SHU - Síndrome Hemolítica Urêmica

SigA - *Shigella* IgA-like protease homologue of *Shigella flexneri*

SPATE - Serino Protease Autotransporters of Enterobacteriaceae

ST - Termo-estável

STEC - Shiga Toxin-Producing *E. coli*

Stx - Shiga toxin

T6SS - Type VI Secretion System

Tdh - Treonina desidrogenase

T3SS - Type Three Secretion System

UFC - Unidades Formadoras de Colônias

UPEC - Uropathogenic *Escherichia coli*

UTI - Urinary Tract Infection

VisP - Virulence and stress-related Periplasmic Protein

VTEC - Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*

WT - Wild Type

$\Delta\Delta CT$ - Comparative Critical Threshold

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1. Introdução	19
1.1. <i>Escherichia coli</i> diarreiogênicas	19
1.2. <i>Escherichia coli</i> produtora de toxina de Shiga (STEC).....	20
1.3. <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC)	22
1.4. <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa O104:H4 Stx+	28
1.5. Sinalização química via sistema de 2-componentes QseBC	31
1.6. Vesículas de membrana externa bacteriana.....	36
1.7. Microbiota intestinal humana.....	39
2. Objetivos.....	42
2.1. Objetivos específicos	42
3. Material e métodos	43
3.1. Extração de DNA plasmidial	44
3.2. Células eletrocompetentes e transformação por eletroporação	44
3.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR)	45
3.4. Construção de mutantes isogênicos via vetor suicida pJP5603.....	47
3.5. Clonagem para complementação das cepas mutantes	48
3.6. Curva de crescimento	48
3.7. Formação de biofilme	49

3.8. Cultivo de células epiteliais Caco-2 e ensaio de adesão	49
3.9. Ensaio de motilidade (<i>swimming</i>).....	50
3.10. Isolamento de OMVs (vesículas de membrana externa).....	50
3.10.1. Quantificação de OMVs por ensaio de BCA (ácido bicinonínico)	51
3.10.2. SDS-PAGE e <i>immunoblot</i> para detecção de OMVs.....	51
3.10.3. Marcação de OMVs com DiO.....	52
3.10.4. Citometria de fluxo	52
3.10.5. Microscopia confocal de varredura a laser	53
3.11. Extração de RNA	54
3.12. Análise de expressão gênica relativa via qRT-PCR	54
3.13. Ensaio <i>in vivo</i> com camundongos C57BL/6.....	55
3.14. Ensaio no modelo colônico <i>in vitro</i> SEMH®	56
3.14.1. Colonização da microbiota	57
3.14.2. Infecção no SEMH®.....	59
3.14.3. Análise da produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC).....	59
3.14.4. ELISA de captura.....	60
3.15. Análise estatística.....	60
4. Resultados	61
4.1. Curva de crescimento.....	61
4.2. Padrão de formação de biofilme	63
4.3. Ensaio de adesão em células epiteliais polarizadas Caco-2.....	64
4.4. Ensaio de motilidade (<i>swimming</i>).....	66

4.5. Análise de expressão gênica <i>in vitro</i>	67
4.6. Análise de associação de OMVs em linhagem de célula intestinal Caco-2.....	77
4.7. Ensaio de colonização bacteriana <i>in vivo</i> com camundongos C57BL/6.....	81
4.8. Modulação da microbiota intestinal humana no SEMH® e análise da produção de AGCC	87
5. Discussão	93
6. Conclusões	105
7. Referências bibliográficas.....	105

1. Introdução

1.1. *Escherichia coli* diarreiogênicas

A diarreia infecciosa é um problema global de saúde pública (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012), sendo em 2016 a oitava causa de morte entre pessoas de todas as idades (>1,6 milhão) e a quinta entre crianças menores de 5 anos (446.000) (GBD 2016 DIARRHOEAL DISEASE COLLABORATORS, 2018). Embora esta doença seja de distribuição mundial, os países com baixa renda e infraestrutura sanitária precária, são os mais afetados, apresentando altos índices de morbidade e mortalidade (MILLS, 2014; GBD DIARRHOEAL DISEASES COLLABORATORS, 2017). Nos países em desenvolvimento, *Escherichia coli* encontra-se entre os agentes infecciosos bacterianos mais frequentemente isolados em casos de diarreia e está envolvida em grande parte dos óbitos relacionados a essa doença (LANATA *et al.*, 2013).

A *Escherichia coli* é um membro da família Enterobacteriaceae, caracterizada como uma bacilo Gram-negativo e o anaeróbio facultativo mais abundante na microbiota intestinal humana (BOOP *et al.*, 1999; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Embora estejam amplamente presentes em indivíduos saudáveis e tenham estabelecido uma relação simbiótica bem sucedida, algumas linhagens passaram a apresentar características de virulência específicas e se desviaram do seu nicho ancestral (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006). Cepas patogênicas de *E. coli* se adaptaram a novos nichos e podem causar uma grande variedade de doenças infecciosas intestinais e extraintestinais como infecções do trato urinário (UTI), septicemias e meningites (CLEMENTS *et al.*, 2012). De modo geral, essas cepas compartilham fatores de virulência e podem ser agrupadas de acordo com seu antígeno O (lipopolissacárideo) e H (flagelar) e, em alguns casos, o antígeno K (cápsula) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

As cepas associadas exclusivamente a infecções intestinais são conhecidas como *E. coli* diarreio gênicas e são agrupadas tradicionalmente em seis grandes categorias, ou patótipos, bem caracterizados: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* produtora de toxina de Shiga (STEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC) (NATARO; KAPER, 1998; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Embora essa classificação para *E. coli* diarreio gênicas seja mundialmente utilizada, características genéticas distintas entre organismos do mesmo patótipo, levou à necessidade da divisão de alguns deles em subcategorias, como é o caso de EAEC e EPEC, classificadas em típicas e atípicas, além de EHEC, que passou a ser classificada como STEC (*Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga) (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006; ROBINS-BROWNE *et al.*, 2016).

1.2. *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga (STEC)

As cepas de *E. coli* produtoras de toxina de Shiga são classificadas como STEC ou *E. coli* verotoxigênica (VTEC), por apresentarem citotoxicidade em células Vero (KONOWALCHUK; SPEIRS; STAVRIC, 1977; CLEMENTS *et al.*, 2012). A toxina de Shiga foi descrita pela primeira vez em 1898 por Kioshi Shiga, em *Shigella dysenteriae* type 1. Em seguida, sua potente função citotóxica em coelhos foi reportada por dois grupos distintos de pesquisa (SHIGA, 1898; KAPER; O'BRIEN, 2014). Porém, somente em torno de 80 anos depois, essa toxina (Stx1), foi identificada em *E. coli*, relacionada a casos esporádicos e a um grande surto de colite hemorrágica (CH) e síndrome hemolítica urêmica (SHU), caracterizada por anemia hemolítica, trombocitopenia e falência renal (KARMALI *et al.*, 1983; O'BRIEN *et al.*, 1983). Posteriormente, foi evidenciado que os genes que codificam essas toxinas encontram-se em bacteriófagos lambda e foram classificadas em dois importantes grupos sorologicamente distintos, designados Stx1 e Stx2, apresentando ainda, variações dentro deles

que são indicadas por letras minúsculas (JACKSON *et al.*, 1987; SCHEUTZ *et al.*, 2012). No entanto, a variante Stx2 está mais relacionada com o desenvolvimento de casos graves, como a SHU (FRIEDRICH *et al.*, 2002; LUNA-GIERKE *et al.*, 2014; BOISEN *et al.*, 2015).

A toxina de Shiga é uma das mais potentes citotoxinas conhecidas e é caracterizada como uma toxina do tipo A:B, cujo mecanismo de ação consiste na inibição da síntese proteica das células alvo. Inicialmente, ocorre a ligação da subunidade B preferencialmente ao receptor Gb3 (globotriacilceramida), amplamente encontrado no endotélio vascular renal e nas células epiteliais do intestino. Através de endocitose, a Stx atinge o citoplasma, onde ocorre a ativação da subunidade A, que possui atividade de N-glicosidase e, ao interagir com a subunidade 60S do rRNA eucariótico, leva à remoção de um resíduo de adenina da fração 28S. Sendo assim, todo esse processo resulta em uma alteração no sítio aminoacil do ribossomo, interrompendo o processo de alongamento proteico e, conseqüentemente, de tradução (MELTON-CELSA, 2014). A Stx, ao ser produzida no cólon, pode causar danos locais como a CH, ou ainda, atravessar a corrente sanguínea e alcançar os rins, causando a SHU. Esses danos são causados através da toxicidade direta e da indução local da inflamação, resultando na produção de citocinas e quimiocinas (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Em alguns casos, a Stx pode atingir ainda, o endotélio vascular do sistema nervoso central, resultando em danos neurológicos (TRACHTMAN *et al.*, 2012).

A EHEC, uma subcategoria de STEC, além de produzir Stx, possui outros fatores de virulência, que em conjunto com essa potente citotoxina a tornam extremamente virulenta a humanos (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Esta categoria é conhecida por produzir uma lesão histopatológica denominada A/E (*attaching and effacing*), cujos genes envolvidos estão localizados na ilha de patogenicidade LEE (*Locus of Enterocyte Effacement*), também presente em EPEC. Essa lesão é caracterizada por uma adesão íntima da bactéria às células do epitélio intestinal, mediada pela adesina intimina, resultando no rearranjo dos filamentos de actina através de proteínas efetoras secretadas pelo Sistema de Secreção do Tipo III (T3SS)

(MCDANIEL *et al.*, 1995; ELLIOTT *et al.*, 1998). Sendo assim, a presença dessa ilha de patogenicidade diferencia a EHEC das demais cepas de STEC, além de conferir um perfil mais virulento a essa subcategoria (ROBINS-BROWNE *et al.*, 2016).

Rebanhos bovinos são reservatórios naturais de STEC, no entanto, outras espécies de ruminantes como ovelhas e cabras, também podem albergar esses patógenos em seu sistema digestivo e espalhá-los no ambiente através de suas fezes. Sendo assim, o consumo de água, alimentos crus ou malcozidos, contaminados com as fezes desses animais, é a forma mais comum de transmissão desse patógeno para o homem (PATON; PATON, 1998; TORRES, 2016).

1.3. *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC)

Durante um estudo epidemiológico desenvolvido por Nataro (1987) sobre a etiologia de diarreia aguda em crianças no Chile, algumas cepas isoladas de *E. coli* apresentaram um padrão de adesão distinto em cultivo de células epiteliais HEp-2, designado adesão agregativa (AA). Sendo assim, foi estabelecido o termo *E. coli* enteroaderente para estes isolados (NATARO *et al.*, 1987). Posteriormente, esse patótipo foi reclassificado como *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (BAUDRY *et al.*, 1990).

Figura 1. Padrão clássico de adesão de EAEC.

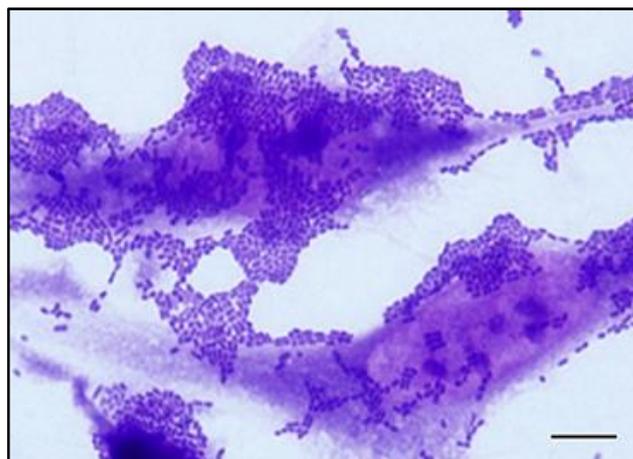


Fig. 1. Padrão clássico de adesão agregativa (AA) de EAEC, semelhante a tijolos empilhados, em cultivo de células epiteliais HeLa. A barra de escala representa 10 μm (DIAS *et al.*, 2020).

O padrão de adesão AA (Fig. 1) é caracterizado por bactérias ligadas umas às outras, assim como à superfície de células epiteliais do intestino e à superfície de lamínulas na ausência de células, formando agregados heterogêneos semelhantes a tijolos empilhados (NATARO *et al.*, 1987). Além disso, essa característica permite sua diferenciação dos demais patótipos de *E. coli* diarreio gênicas (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

A EAEC é um importante agente etiológico de diarreia aguda e persistente, em crianças e adultos de países desenvolvidos e em desenvolvimento e, ainda, tem sido associada a casos esporádicos da doença e a surtos de origem alimentar (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006; HUANG *et al.*, 2006; JENSEN *et al.*, 2014). Além disso, a EAEC tem sido descrita em casos de diarreia do viajante (ADACHI *et al.*, 2001; JIANG *et al.*, 2002; HUANG *et al.*, 2007; PASCHKE *et al.*, 2011; LÄÄVERI *et al.*, 2014), como patógeno oportunista em portadores do vírus do HIV (PAVIA *et al.*, 1992; MAYER; WANKE, 1995; DURRER *et al.*, 2000; GASSAMA-SOW *et al.*, 2004; SAMIE *et al.*, 2007) e em casos de diarreia persistente em crianças malnutridas de países subdesenvolvidos (LIMA *et al.*, 1992; STEINER *et al.*, 1998; OPINTAN *et al.*, 2010). Desta forma, a EAEC é considerada um patógeno emergente de

distribuição global (HUANG *et al.*, 2006; ESTRADA-GARCIA; NAVARRO-GARCIA, 2012; ESTRADA-GARCIA *et al.*, 2014; JENKINS, 2018).

O conhecimento acerca dos estágios da patogenicidade de EAEC tem sido obtidos através de estudos *in vitro*, modelos animais, pacientes infectados durante surtos e casos esporádicos, além de estudos com voluntários humanos (ESTRADA-GARCIA; NAVARRO-GARCIA, 2012; PHILIPSON; BASSAGANYA-RIERA; HONTECILLAS, 2013). No entanto, sua patogênese não é bem definida, uma vez que os potenciais fatores de virulências não se encontram distribuídos de forma homogênea entre os isolados dessa categoria (NATARO; STEINER; GUERRANT, 1998; HUANG *et al.*, 2006; ESTRADA-GARCIA; NAVARRO-GARCIA, 2012; JENKINS, 2018). Ainda assim, a patogênese de EAEC pode ser descrita basicamente em três estágios: (I) ocorre a adesão abundante da bactéria à mucosa intestinal e à camada de muco; (II) multiplicação, estímulo da hipersecreção de muco e a formação de um espesso biofilme; (III) lesão da mucosa intestinal a partir da indução da resposta inflamatória e liberação de toxinas. Por fim, pode-se observar quadros de diarreia aguda ou persistente (≥ 14 dias), aquosa e presença de muco (NATARO; KAPER, 1998; NATARO; STEINER; GUERRANT, 1998).

O método clássico e ainda utilizado para detecção de EAEC é o ensaio de adesão em células epiteliais HEp-2 ou HeLa (NATARO; KAPER, 1998). No entanto, esse ensaio demanda conhecimento em cultura de células, treinamento específico e necessita de laboratório especializado para sua realização. Como alternativa, foi desenvolvida uma sonda genética de um fragmento do plasmídeo pAA denominada CVD432. Posteriormente, evidenciou-se que esse fragmento correspondia ao gene *aatA*, que faz parte de um cluster de cinco genes (*aatPABCD*) codificadores do Sistema ABC de Secreção, então, a sonda foi renomeada com o nome do gene correspondente (BAUDRY *et al.*, 1990; NISHI *et al.*, 2003). No entanto, sua sensibilidade e especificidade podem variar de acordo com o grupo isolado, por conta da grande heterogeneidade genética dessa categoria (BAUDRY *et al.*, 1990; DEBROY *et al.*, 1994;

GOMES *et al.*, 1998; BOISEN *et al.*, 2008). Recentemente, foi desenvolvido pelo Laboratório de Referência da União Europeia (EU-RL) o método de detecção de EAEC em amostras de alimentos e fezes via q-PCR, a partir da amplificação do gene plasmidial *aggR*, um ativador transcricional, e o gene cromossomal *aaiC*, que faz parte do cluster de genes *aai* que codificam o Sistema de Secreção do Tipo VI (PANEL ON BIOLOGICAL HAZARDS, 2015).

A cepa protótipo 042 de EAEC (O44:H18) foi isolada de um indivíduo com diarreia no Peru e, a maioria dos fatores de virulência cromossomais e plasmidiais, foram inicialmente caracterizados nessa cepa. Além disso, durante o desenvolvimento de um estudo, a EAEC 042 foi capaz de causar diarreia em voluntários humanos (NATARO *et al.*, 1985; NATARO *et al.*, 1995; CZEZULIN *et al.*, 1999).

A formação de um espesso biofilme mediado principalmente por fímbrias de aderência agregativa (AAF), assim como por outras fímbrias e adesinas não-fimbriais, é um notável fenótipo de EAEC. Além disso, essa característica é considerada crucial para o estabelecimento da patogênese e pode estar associada aos casos de infecção persistente, como já reportado na literatura (HICKS; CANDY; PHILLIPS, 1996; NATARO; STEINER; GUERRANT, 1998; SHEIKH *et al.*, 2001; WAKIMOTO *et al.*, 2004; PEREIRA *et al.*, 2007; TOKUDA *et al.*, 2010).

As AAFs são relacionadas às adesinas da família DR, que são estruturalmente constituídas por uma chaperona, proteína *usher*, subunidade acessória e principal. Essas adesinas interagem com a molécula *decay-accelerating factor* (DAF) associada ao epitélio intestinal e urinário, ou ainda, podem se associar a componentes de matriz extracelular das células epiteliais intestinais, como colágeno do tipo IV, laminina, citoqueratina 8 e fibronectina (NOWICKI *et al.*, 1990; NATARO; STEINER; GUERRANT, 1998; SERVIN, 2005; FARFAN; INMAN; NATARO, 2008; CROXEN; FINLAY, 2010; IZQUIERDO *et al.*, 2014). Até o momento, foram descritas cinco variantes de AAF (I-V) e, todas elas, estão codificadas em um plasmídeo de alto peso molecular denominado pAA e sob a regulação do ativador

transcricional AggR (NATARO *et al.*, 1992; CZECHULIN *et al.*, 1997; ELIAS *et al.*, 1999; BERNIER.; GOUNON; LE BOUGUÉNEC, 2002; JONSSON *et al.*, 2015). Recentemente, em um estudo realizado na Dinamarca com isolados clínicos de EAEC, seis deles apresentaram duas variantes de AAF (III e V) no mesmo plasmídeo pAA (Jønsson *et al.*, 2017). Além disso, foram descritas adesinas não fimbriais de membrana externa como a *aggregative protein 58* (Ap58), na EAEC O111:H12 e Hra1 na EAEC 042, ambas envolvidas no padrão AA (MONTEIRO-NETO *et al.*, 2003; BHARGAVA *et al.*, 2009).

O ativador transcricional AggR, um regulador positivo pertencente à família AraC de reguladores, está envolvido na ativação da expressão de genes de virulência tanto no cromossomo quanto no plasmídeo de EAEC, incluindo os genes das AAFs (NATARO *et al.*, 1994; SHEIKH *et al.*, 2002; NISHI *et al.*, 2003; DUDLEY *et al.*, 2006; MORIN *et al.*, 2013).

Imediatamente a montante do gene que codifica o AggR, encontra-se o gene *aap* (*anti-aggregation protein*) que codifica a proteína dispersina, envolvida na dispersão da bactéria na superfície da mucosa intestinal. Esta proteína, assim como o Sistema de Secreção do Tipo ABC (complexo Aat), responsável por sua translocação através da membrana externa bacteriana, estão localizados no plasmídeo pAA e sob a regulação do AggR. A dispersina é uma proteína carregada positivamente que, ao se ligar de forma não covalente ao LPS (lipopolissacarídeo), neutraliza sua carga negativa, permitindo assim que as AAFs, que são carregadas positivamente, possam se dispersar pela superfície dos enterócitos e se ligar a outras regiões do intestino (SHEIKH *et al.*, 2002; NISHI *et al.*, 2003; VELARDE *et al.*, 2007; HUANG *et al.*, 2008). No entanto, essa proteína também pode ser encontrada em DAEC e *E. coli* não-patogênica (MONTEIRO *et al.*, 2009).

As cepas de EAEC, assim como os outros patótipos de *E. coli* diarreio gênicas, UPECs e *Shigella* sp., codificam um importante grupo de toxinas conhecidas como SPATE (*Serino Protease Autotransporters of Enterobacteriaceae*), que apresentam funções na evasão do sistema imune, danos à mucosa e colonização (DUTTA *et al.*, 2002; HENDERSON *et al.*,

2004). As serinoproteases são enzimas que possuem um sítio catalítico na região N-terminal composto por Ser/His/Asp, com atividade semelhante à tripsina. De modo geral, essas proteínas são compostas por um peptídeo sinal, que é reconhecido pelo Sistema Sec de Secreção e permite sua passagem através da membrana interna bacteriana, um domínio passageiro (que possui as características funcionais da proteína) e um domínio β -barril na porção C-terminal, que forma um poro necessário para a translocação da toxina através da membrana externa (HENDERSON *et al.*, 1999; HENDERSON *et al.*, 2004; BOISEN *et al.*, 2009). Em EAEC, como exemplos de SPATEs frequentemente encontradas podemos citar: Pet (*Plasmid-encoded toxin*), com efeito citotóxico e enterotóxico (ESLAVA *et al.*, 1998; ELIAS *et al.*, 1999; VILLASECA *et al.*, 2000; CANIZALEZ-ROMAN; NAVARRO-GARCIA, 2003); Pic (*Protein involved in colonization*), com atividade de mucinase, hemaglutinação, imunomodulação e colonização (RAJAKUMAR; SASAKAWA; ADLER, 1997; HENDERSON *et al.*, 1999; HARRINGTON *et al.*, 2009; MUNERA *et al.*, 2014); Sat (*Secreted autotransporter toxin*), com atividade citotóxica, enterotóxica, indução de autofagia e comprometimento das junções de células epiteliais intestinais (GUYER *et al.*, 2000; GUYER *et al.*, 2002; MARONCLE *et al.*, 2006; LIEVIN-LE MOAL *et al.*, 2011; VIEIRA *et al.*, 2020). Além disso, os isolados de EAEC podem apresentar um número e combinação variados de serinoproteases (ANDRADE *et al.*, 2017).

Além das SPATEs, outras toxinas também podem ser produzidas por cepas de EAEC. A EAST1, codificada pelo gene *astA* no plasmídeo pAA, é uma enterotoxina termo-estável (ST) homóloga à de ETEC e está relacionada ao aumento dos níveis de cGMP intracelular (SAVARINO *et al.*, 1993; SAVARINO *et al.*, 1996). A enterotoxina do tipo A:B, ShET-1 (*Shigella enterotoxin 1*), está relacionada ao acúmulo de fluídos no intestino e é codificada pelos genes *setAB* localizados na fita antisense ao gene *pic* (FASANO *et al.*, 1995). Os genes que codificam estas toxinas estão inseridos em uma ilha de patogenicidade de 117 kb presente no locus do tRNA *pheU*. Além disso, nessa mesma ilha estão contidos os genes *aai* (*AggR-activated island*), assim denominados por serem regulados pelo AggR e que, aparentemente,

compõe o Sistema de Secreção do Tipo VI (T6SS). O papel desses genes nos mecanismos de patogenicidade de EAEC ainda precisam ser esclarecidos (DUDLEY *et al.*, 2006).

Foi identificada na cepa protótipo 042, e em outros isolados de EAEC, a hemolisina E (HlyE) formadora de poros, relacionada à atividade lítica e citotóxica. No entanto, essa hemolisina também pode ser encontrada em *E. coli* não-patogênica e seu papel em EAEC permanece indefinido (CHAUDHURI *et al.*, 2010; ESTRADA-GARCIA; NAVARRO-GARCIA, 2012). Na mesma cepa, está presente o gene *irp-2*, que codifica a proteína Irp-2 (*Iron-repressible high-molecular weight 2*), relacionada à produção de um sideróforo em *Yersinia enterocolitica* (SCHUBERT *et al.*, 1998).

De modo geral, a diarreia causada por EAEC é autolimitante, mas no caso da doença persistente se faz necessário o uso de antibióticos. No entanto, tem sido evidenciado um alto número de cepas de EAEC multidroga resistentes (MDR), bem como produtoras de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL), além do aumento da resistência à quinolonas e à outras categorias de antimicrobianos. Sendo assim, as alternativas terapêuticas tornam-se cada vez mais reduzidas (VILA *et al.*, 2001; OUNDO *et al.*, 2008; AMAYA *et al.*, 2011; ASLANI *et al.*, 2011; GUIRAL *et al.*, 2011; KONG; HONG; LI, 2015; IMUTA *et al.*, 2016).

1.4. *Escherichia coli* enteroagregativa O104:H4 Stx+

Em 2011, ocorreu um grande surto de CH e SHU, que se iniciou na Alemanha e se espalhou por outros países da Europa. Inicialmente, acreditou-se que o provável agente etiológico fosse a EHEC, por historicamente estar envolvida em surtos de larga escala com essas características. No entanto, foi constatado que se tratava de uma EAEC do sorotipo O104:H4 lisogenizada com um fago que codifica a toxina de Shiga 2a, tipicamente encontrado em STEC como a EHEC, sendo assim, a cepa foi considerada um híbrido entre as duas categorias. Durante o período de surto, 3816 pessoas adoeceram e, entre elas, 54 morreram e

22% desenvolveram a SHU (BIELASZEWSKA *et al.*, 2011; FRANK *et al.*, 2011). A provável fonte de contaminação foi atribuída ao consumo de saladas contendo brotos de feno-grego, germinados a partir de sementes importadas do Egito (BUCHHOLZ *et al.*, 2011). No mesmo período, foi reportado um surto na França com 15 casos de CH, sendo que 8 deles desenvolveram SHU. A cepa de EAEC O104:H4 isolada durante esse período é geneticamente relacionada a cepa do surto Alemão, além de compartilhar o provável veículo de contaminação, uma vez que também na França, foram utilizadas as mesmas sementes compradas do Egito (GAULT *et al.*, 2011).

A EAEC O104:H4 Stx+ possui características clássicas dessa categoria, tais como os genes *aggA* (fímbria de adesão agregativa I), *aggR* (ativador transcricional), *aap* (dispersina), *set1* (*shigella enterotoxin 1*), *pic* (*protein involved in colonization*), *astA* (toxina EAST1), *aap* (dispersina), *aai* (T6SS), *aat* (Sistema de Secreção ABC) e o plasmídeo de virulência pAA identificado pelo gene *aata* (BIELASZEWSKA *et al.*, 2011; FRANK *et al.*, 2011). Além disso, estão presente Lpf 1 e 2 (fímbria polar longa de STEC) e Iha (adesina de STEC homóloga à IrgA de *Vibrio cholera*) (BIELASZEWSKA *et al.*, 2011), previamente identificadas tanto em EHEC como em outras cepas de *E. coli* (TARR *et al.*, 2000; TORRES *et al.*, 2002; TORRES *et al.*, 2009).

Essa cepa alberga também as três SPATEs Pic, SigA e SepA. Inicialmente, baseado em um trabalho publicado por Boisen *et al.* (2009), acreditou-se que essa seria uma rara combinação dessas toxinas em uma única cepa (BOISEN *et al.*, 2009). No entanto, um trabalho recente publicado por ANDRADE *et al.* (2017), evidenciou que os diferentes isolados de EAEC apresentam um número e combinação diversificados de SPATEs (ANDRADE *et al.*, 2017). SigA é uma proteína de 139.6 kDa e está localizada no cromossomo da EAEC O104:H4 Stx+. Essa SPATE foi identificada pela primeira vez na ilha de patogenicidade *she* de *Shigella flexneri* 2a e está relacionada a efeitos citopáticos em células epiteliais HEp-2 e enterócitos, além de acúmulo de fluidos no lúmen intestinal (AL-HASANI *et al.*, 2000). De localização

plasmidial e com 110 kDa, SepA, uma das serinoproteases encontradas nessa cepa de surto, também foi identificada inicialmente em *S. flexneri* e, posteriormente, em cepas de EAEC. Ela está associada ao desenvolvimento de processos inflamatórios e acúmulo de fluidos intestinais (BENJELLOUN-TOUIMI; SANSONETTI; PARSOT, 1995; BOISEN *et al.*, 2009).

Figura 2. Modelo de patogênese de EAEC O104:H4 Stx+.

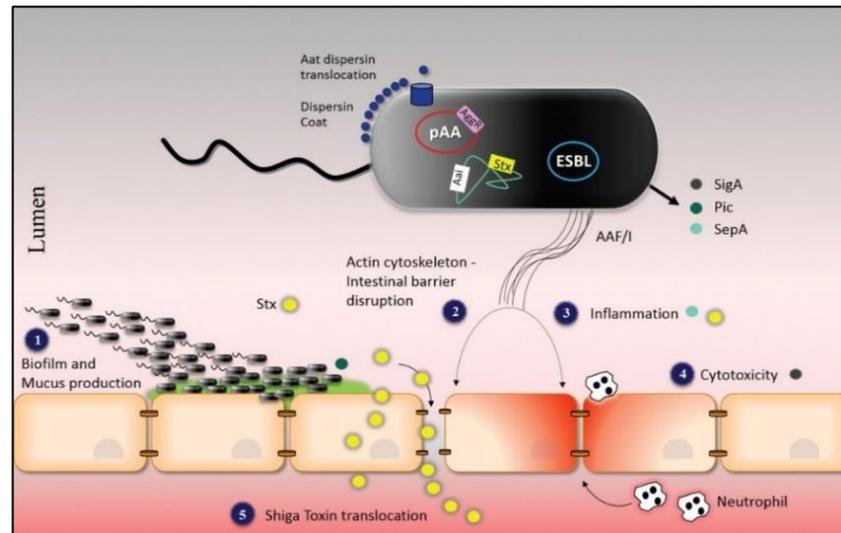


Fig. 2. Formação de um espesso biofilme e produção de muco, aumento da permeabilidade intestinal mediado pela AAF-I, indução de processo inflamatório, citotoxicidade e translocação da toxina de Shiga para a corrente sanguínea (BOISEN *et al.*, 2015).

Outra notável característica desta cepa é a presença de um plasmídeo que codifica uma ESBL, o gene *bla*CTX-M-15, resultando em resistência a penicilinas e cefalosporinas. E ainda, apresenta resistência ácido nalidíxico (quinolona), sulfametoxazol-trimetoprim (sulfonamida), tetraciclina e estreptomicina (aminoglicosídeo) (BIELASZEWSKA *et al.*, 2011; FRANK *et al.*, 2011).

Desta forma, foi evidenciada uma cepa capaz de formar um espesso biofilme e produzir toxinas, assim como a potente toxina de Shiga (Fig. 2), tornando-se uma combinação extremamente bem sucedida e virulenta a humanos (BOISEN *et al.*, 2015).

1.5. Sinalização química via sistema de 2-componentes QseBC

Em bactérias, a sinalização química é também conhecida como *quorum sensing* e se assemelha a sinalização via hormônios em mamíferos (FUQUA; WINANS; GREENBERG, 1994; FUQUA; WINANS; GREENBERG, 1996; HUGHES; SPERANDIO, 2008). Os microrganismos empregam a comunicação célula a célula de modo a detectar, processar e traduzir informações do ambiente, levando à regulação da expressão de fatores que permitam uma rápida adaptação às mudanças ambientais, garantindo assim, sua sobrevivência (PARKER; SPERANDIO, 2009). Este fenômeno foi identificado pela primeira vez na regulação da bioluminescência de *Aliivibrio fischeri* em simbiose com diversos animais marinhos e, desde então, tem sido demonstrado o seu papel nos mecanismos de regulação gênica de forma multifatorial em diversas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (NEALSON; PLATT; HASTINGS, 1970; WATERS; BASSLER, 2005).

Esse tipo de comunicação é caracterizado pela secreção e detecção de pequenas moléculas sinalizadoras, semelhantes a hormônios e conhecidas como autoindutores (AI). A quantidade dessas moléculas está diretamente relacionada ao número de células dessa população no ambiente. Sendo assim, é possível identificar quando uma certa densidade populacional, ou *quorum*, foi estabelecido, levando os microrganismos a agirem em escala populacional, com respostas rápidas e unificadas, favorecendo a sua sobrevivência (FUQUA; WINANS; GREENBERG, 1994; MILLER; BASSLER, 2001; BASSLER, 2002). Dentre os mecanismos regulados por este sistema, encontram-se a formação de biofilme, esporulação, bioluminescência, atividades metabólicas, biossíntese de moléculas antibióticas, motilidade, competência, diferenciação celular, interação com o hospedeiro, regulação da expressão de fatores de virulência, entre outros (SCHAUDER; BASSLER, 2001; BASSLER; LOSICK, 2006).

O sistema de sinalização via autoindutores ocorre basicamente a partir da ligação de uma molécula sinalizadora a um receptor presente na superfície ou no interior da célula bacteriana, que ativa um regulador de resposta (RR) citoplasmático, iniciando assim, ações coordenadas a nível de expressão gênica (BASSLER; LOSICK, 2006). Os sistemas de *quorum sensing* são agrupados basicamente em quatro categorias: peptídeos autoindutores (AIP), AI-1/LuxIR, AI-2/LuxS e AI-3/Epinefrina/Norepinefrina. No entanto, existem outros sistemas como por exemplo, a sinalização via PQS (*Pseudomonas quinolone signal*), caracterizada como 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona em *Pseudomonas aeruginosa* (PESCI *et al.*, 1999; MILLER; BASSLER, 2001; HUGHES; SPERANDIO, 2008).

Os sistemas de peptídeos autoindutores (AIP) são mediados por oligopeptídeos modificados, produzidos e secretados por bactérias Gram-positivas, permitindo a comunicação intra e interespecífica. Essas moléculas se ligam a receptores histidina quinase transmembrana, resultando na fosforilação e ativação de um RR citoplasmático (BASSLER, 2002). Em *Staphylococcus aureus*, o AIP é sintetizado pelo gene *agrD*, que atinge a membrana direcionado por uma sequência N-terminal, onde ocorre a clivagem da porção C-terminal pela endopeptidase AgrB. Ocorre ainda, a remoção da porção N-terminal e o peptídeo modificado se liga a uma molécula de cisteína. Ao ser exportado para o exterior celular, o AIP modificado é detectado pelo receptor AgrC que fosforila seu RR AgrA, resultando na ativação da expressão gênica de *S. aureus* (NOVICK *et al.*, 1995; MILLER; BASSLER, 2001; WATERS; BASSLER, 2005).

No entanto, essa comunicação via sinalização química pode ocorrer a partir de moléculas produzidas pelo hospedeiro, o que caracteriza uma comunicação intrarreinos (RUMBAUGH, 2007; HUGHES; SPERANDIO, 2008). Esse tipo de comunicação pode ser observado no sistema AI-3/Epinefrina/Norepinefrina, mediado pelo sistema de dois componentes QseBC, descrito inicialmente em EHEC (SPERANDIO; TORRES; KAPER, 2002; SPERANDIO *et al.*, 2003). O sistema QseBC é composto pelo sensor histidina quinase

QseC, localizado na membrana bacteriana e um RR cognato, localizado no citoplasma e denominado QseB. Este Sistema responde a sinais ambientais como aos hormônios de estresse do hospedeiro mamífero presentes no intestino, epinefrina (Epi) e norepinefrina (NE). A epinefrina é sintetizada no sistema nervoso central e medula adrenal, atingindo o intestino através da corrente sanguínea, já a norepinefrina é sintetizada pelos neurônios adrenérgicos do sistema nervoso entérico (FURNESS, 2000; PURVES *et al.*, 2001; SPERANDIO *et al.*, 2003). Além disso, responde também ao autoindutor 3 (AI-3), uma molécula sinalizadora produzida por bactérias (SPERANDIO *et al.*, 2003; PARKER; SPERANDIO, 2009).

Os hormônios Epi e NE desempenham um papel importante na manutenção da homeostase intestinal, como na regulação do peristaltismo, fluxo sanguíneo, secreção de cloreto e de potássio. Esses dois hormônios se ligam aos receptores acoplados à proteína G (GPCRs) encontrados na membrana das células de mamíferos, resultando em uma cascata regulatória com ativação de alvos intracelulares (GILMAN, 1987; HORGER; SCHULTHEISS; DIENER, 1998; ELDRUP; RICHTER, 2000; FREDDOLINO, 2004). As bactérias não apresentam receptores homólogos a este, sendo assim, conseguem detectar hormônios do hospedeiro através de sensores histidina quinase (HK), que são amplamente distribuídos entre bactérias e trabalham em conjunto com RR, formando um sistema de dois componentes. Ao detectar um sinal ambiental específico, a proteína HK autofosforila um resíduo conservado de histidina, em seguida, transfere esse fosfato para um resíduo de aspartato presente no seu regulador de resposta cognato, que na maioria das vezes desempenha a função de ativador transcricional (STOCK; ROBINSON; GOUDREAU, 2000; CLARKE *et al.*, 2006; READING *et al.*, 2009).

Inicialmente, acreditou-se que o AI-3 poderia ser um composto aromático aminado, similar às catecolaminas, uma vez que sua sinalização em EHEC é agonista à NE e Epi e, assim como para esses hormônios, pode ter sua atividade via QseC bloqueada por antagonistas adrenérgicos (SPERANDIO *et al.*, 2003; CLARKE *et al.*, 2006). A produção do AI-3 foi evidenciada ainda, em *E. coli* comensal, EPEC, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella* sp.,

Salmonella sp., e *Enterobacter cloacae* (WALTERS; SIRCILI; SPERANDIO, 2006). No entanto, somente duas décadas depois de sua descoberta, esse autoindutor pôde ser caracterizado em EHEC como uma molécula de pirazinona derivada de treonina desidrogenase (Tdh). Análogos de AI-3 foram também caracterizados em bactérias Gram-negativas como *V. cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Klebsiella pneumoniae* resistente à carbapenemase, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella* Typhimurium, assim como em bactérias Gram-positivas como *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina (VRE), *Enterococcus gallinarum*, *Staphylococcus aureus* resistente à meticiclina (MRSA) e o não patogênico *Bacillus subtilis*. Portanto, esses dados podem evidenciar que diversas bactérias são capazes de sintetizar análogos do AI-3, sugerindo que esses padrões podem facilitar os efeitos de sinalização diferencial entre as espécies (KIM *et al.*, 2020).

O sistema QseBC é codificado no *operon qseBC*, sendo a transcrição deste regulada por QseB. QseC é uma proteína de 50 kDa, que possui dois domínios transmembrana, um domínio HK conservado, um domínio EAL e um domínio ATPase, que permite sua atividade de fosfatase (CLARKE; SPERANDIO, 2005a; CLARKE *et al.*, 2006). Homólogos de QseC estão presentes em ao menos 25 patógenos Gram-negativos, além de já ter sido evidenciada a sua participação nos mecanismos de patogenicidade de muitas dessas bactérias (RASKO *et al.*, 2008; KENDALL; SPERANDIO, 2016).

Em EHEC, onde esse sistema é amplamente descrito (Fig. 3), foi demonstrado que QseC detecta os sinais AI-3/Epi/NE, se autofosforila e transfere um fosfato para o seu regulador de resposta QseB, que se liga diretamente na região promotora de FlhD, regulador mestre do *operon* flagelar, resultando na ativação da transcrição de genes envolvidos na motilidade (CLARKE; SPERANDIO, 2005b). No entanto, pode ocorrer uma regulação cruzada, onde QseC ativa o RR KdpE, que se liga na região promotora de Ler, regulador mestre das ilha de patogenicidade LEE, regulando assim a transcrição desses genes (NJOROGE; SPERANDIO, 2012). Além disso, QseC tem um papel na ativação da expressão da toxina de Shiga e do efector

EspFU, envolvido na polimerização de actina, através da ativação de QseF, o RR do sensor HK QseE. Esse sensor também detecta Epi e NE, além de SO₄ e PO₄ (READING *et al.*, 2007; HUGHES *et al.*, 2009).

Figura 3. Modelo de sistemas de 2 componentes em EHEC.

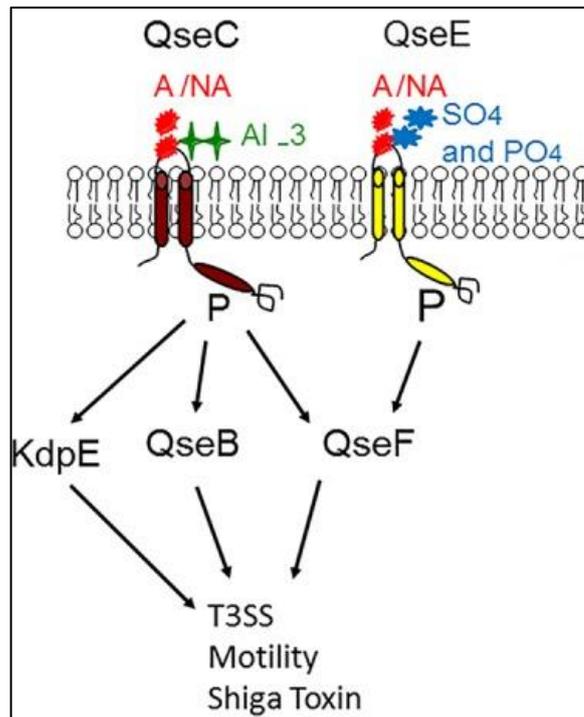


Fig. 3. Sistemas de dois componentes QseBC e QseEF na regulação da transcrição de genes envolvidos na montagem do Sistema de Secreção do Tipo III, motilidade e produção da toxina de Shiga. As siglas A/NA representam Epi/NE (KENDALL; SPERANDIO, 2016). Adaptado.

Um estudo com uma biblioteca de 150.000 moléculas, realizado pelo nosso grupo, identificou que uma delas possui atividade inibidora de QseC, denominada posteriormente LED209 [*N*-fenil-4-(3-feniltioureia)benzenosulfonamida]. Em ensaios *in vitro* e *in vivo*, demonstrou-se que o bloqueio de QseC por LED209 inibiu a expressão de importantes fatores de virulência em EHEC, *S. Typhimurium* e *Francisella tularensis* (RASKO *et al.*, 2008), além de resultar em percentual maior de sobrevivência dos animais infectados com esses patógenos Gram-negativos (CURTIS *et al.*, 2014). Sendo também, brevemente reportada sua atividade para a inibição da formação de biofilme em isolados clínicos multidroga-resistentes (MDR) de

Pseudomonas aeruginosa, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* uropatogênica e EAEC (CURTIS *et al.*, 2014). Essa abordagem pode ser considerada promissora no controle da disseminação de microrganismos patogênicos MDR, uma vez que LED209 não interfere no crescimento bacteriano e, conseqüentemente, não exerce forte pressão seletiva para linhagens resistentes. Ademais, atua somente na via de transdução de sinal bacteriano, não demonstra atividade em receptores de células eucarióticas e não proporciona toxicidade em modelos animais. Portanto, abre perspectivas para uma possível utilização na clínica futuramente (RASKO *et al.*, 2008; CURTIS *et al.*, 2014).

1.6. Vesículas de membrana externa bacteriana

As bactérias Gram-negativas empregam diferentes mecanismos para secretar seus fatores de virulência e atingir seu alvo, podendo ocorrer através dos sistemas de secreção e vesículas de membrana externa (OMVs, do inglês *Outer Membrane Vesicles*) (GERLACH; HENSEL, 2007; AMANO; TAKEUCHI; FURUTA, 2010). As OMVs são geralmente estruturas esféricas que apresentam um tamanho variável entre 20 e 250 nm, originadas durante o crescimento bacteriano, a partir de bolhas formadas em sua membrana externa (SCHWECHHEIMER; KUEHN, 2015). As células de bactérias Gram-negativas possuem um envelope que consiste em duas membranas, a membrana externa e a membrana citoplasmática, além de um espaço periplasmático entre as duas membranas. A membrana externa bacteriana atua como uma barreira celular e é composta basicamente por LPS (lipopolissacarídeos), fosfolípídeos, lipoproteínas, porinas e receptores. A membrana citoplasmática é composta por uma bicamada fosfolipídica, com uma importante função de barreira eletroquímica. O periplasma possui uma camada de peptidoglicano, proteínas e enzimas e é um ambiente oxidativo, não contendo fontes de energia como ATP e GTP, sendo o peptídeoglicano responsável por conferir forma à célula e proteção durante mudanças na pressão osmóticas e

contra o estresse mecânico (AMANO; TAKEUCHI; FURUTA, 2010; SCHWECHHEIMER; KUEHN, 2015). O lúmen das OMVs pode ser composto por conteúdo periplasmático e citoplasmático, além de moléculas de DNA e RNA (AMANO; TAKEUCHI; FURUTA *et al.*, 2010; KUNSMANN *et al.*, 2015; SJÖSTRÖM *et al.*, 2015; KOEPPEN *et al.*, 2016).

Figura 4. Formação de OMVs.

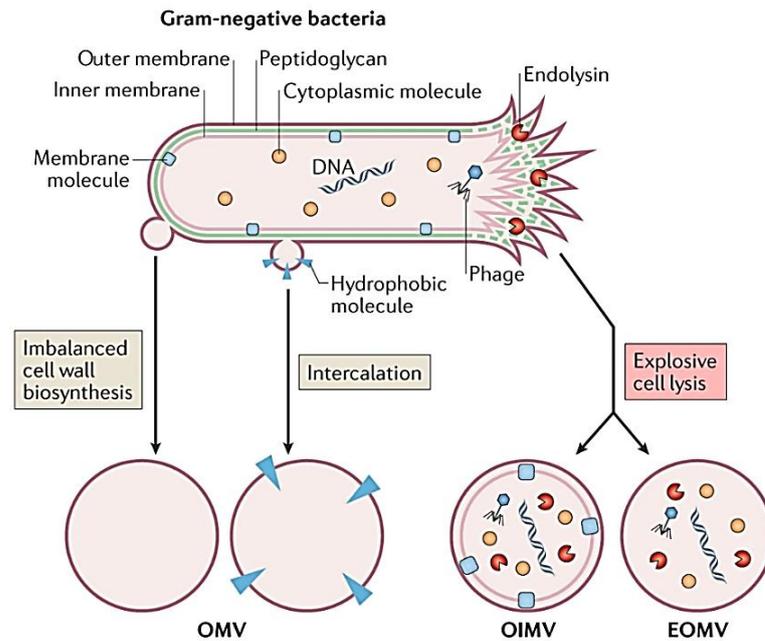


Fig. 4. Modelo esquemático da produção de OMVs (*Outer Membrane Vesicles*) através da formação de bolhas na membrana externa bacteriana, após um distúrbio no envelope celular. Formação de OIMVs (*Outer-Inner Membrane Vesicles*) e EOMVs (*Explosive Outer Membrane Vesicles*) através da lise celular por moléculas de endolisina liberadas por fagos (TOYOFUKU; NOMURA; EBERL, 2019). Adaptado.

A produção dessas vesículas foi evidenciada em diversas bactérias patogênicas como *Pseudomonas aeruginosa*, EHEC, EAEC, assim como em cepas não patogênicas de *E. coli* comensal e probiótica (KUEHN; KESTY, 2005; AMANO; TAKEUCHI; FURUTA, 2010; KUNSMANN *et al.*, 2015; CAÑAS *et al.*, 2018). Notavelmente, as OMVs transportam diversos fatores de virulência como proteases, adesinas, hemolisinas e toxinas, que são protegidos por sua associação com as vesículas, que matam sua integridade frente aos efeitos

ambientais adversos, como a resposta do sistema imune do hospedeiro. Sendo assim, o transporte realizado pelas OMVs contribui para o estabelecimento da colonização bacteriana e para o desenvolvimento da patogênese (MASHBURN-WARREN; WHITELEY, 2006; AVILA-CALDERON *et al.*, 2015). Foi reportado anteriormente que as OMVs podem utilizar três mecanismos distintos para liberar o seu conteúdo nas células alvo, sendo estes: I) lise proximal, difusão e internalização; II) fusão; III) endocitose, sendo este último particularmente relacionado às bactérias patogênicas (KULP; KUEHN, 2010).

Além disso, as OMVs possuem característica imunomoduladoras por transportarem PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos), como LPS, peptidoglicano, flagelina e porinas de membrana externa. Deste modo, após o reconhecimento desses PAMPs pelos TLRs (*Toll-like receptors*), ocorre uma cascata de sinalização de resposta imune do hospedeiro, a partir da produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (ELLIS; KUEHN, 2010; KAPARAKIS-LIASKOS; FERRERO, 2015). No entanto, além de sua importância na patogênese, as OMVs também desempenham um importante papel nos mecanismos de sobrevivência bacteriana, como defesa e resistência, comunicação e aquisição de nutrientes (KULP; KUEHN, 2010; TOYOFUKU; NOMURA; EBERL, 2019).

Embora a biogênese das OMVs esteja sendo descrita por mais de 50 anos, seu processo exato de síntese e a seleção de seu conteúdo interno, ainda não foram completamente elucidados (KABACK, 1974; TOYOFUKU; NOMURA; EBERL, 2019). É proposto que as vesículas formadas a partir de bolhas que se originam na membrana externa de células viáveis, ocorram basicamente a partir de distúrbios no envelope celular, causados por qualquer desequilíbrio na síntese de peptídeoglicano, ou ainda, através da intercalação de moléculas hidrofóbicas na membrana externa, como certos antibióticos (Fig. 4). Existem também, evidências de que vesículas possam ser produzidas após a lise celular por liberação de endolisinas derivadas de fagos, que degradam o peptídeoglicano, levando a ruptura da célula e ao rearranjo da membrana, resultando na formação dessas estruturas (TOYOFUKU; NOMURA; EBERL,

2019). Sabe-se que, além de influência genética, diferentes condições ambientais como temperatura, disponibilidade de nutrientes, fase de crescimento, disponibilidade de ferro e oxigênio, estresse oxidativo, bem como os efeitos de antibióticos que atuam na membrana bacteriana e compostos genotóxicos, estimulam o processo de formação de vesículas (KUEHN; KESTY, 2005; KULP; KUEHN, 2010; MACDONALD; KUEHN, 2013; ORENCH-RIVERA; KUEHN, 2016).

Dessa forma, essa via se torna um alvo interessante de estudo para compreender os mecanismos de patogenicidade em cepas de EAEC.

1.7. Microbiota intestinal humana

O trato digestivo humano hospeda centenas de espécies de microrganismos que são coletivamente conhecidos como microbiota. A microbiota intestinal é um ecossistema complexo e dinâmico que inclui bactérias, arqueias, vírus, fungos e protozoários (CLAESSON *et al.*, 2012). Especificamente no cólon, existe a maior e mais diversa população microbiana no intestino humano, estimando-se que existam aproximadamente 10^{12} células bacterianas por grama de conteúdo luminal (FRICK; AUTENRIETH, 2013). Esta comunidade é composta predominantemente por bactérias (Fig. 5) dos filos Firmicutes e Bacteroidetes, seguido por Proteobacteria e Actinobacteria (HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM, 2012). A composição da microbiota intestinal pode influenciar as funções dos sistemas cardiovascular, nervoso e endócrino (NEUMAN *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2015; SHARON *et al.*, 2016). Além disso, a microbiota oferece muitos benefícios para a saúde humana, como no desenvolvimento do sistema digestivo e imunológico, produção de vitaminas, metabolização e disponibilização de nutrientes, além de proteção contra patógenos invasores (SEKIROV; FINLAY, 2009; MCKENNEY; KENDALL, 2016). Assim, o desequilíbrio nessa população microbiana, conhecida como disbiose, pode resultar em maior suscetibilidade ao

desenvolvimento de doenças infecciosas e crônicas (BUFFIE; PAMER, 2013; BYNDLOSS; PERNITZSCH; BAUMLER *et al.*, 2018).

Figura 5. Principais filos bacterianos que compõem a microbiota intestinal.

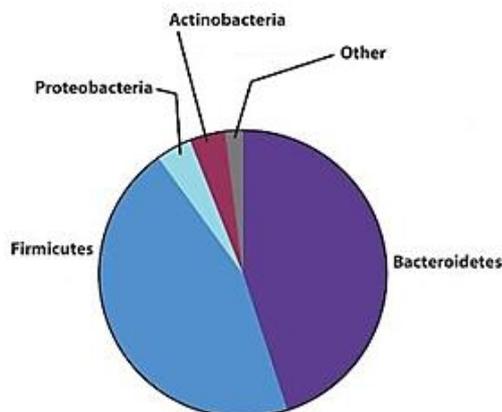


Fig. 5. Bacteroidetes e Firmicutes representam os filos mais abundantes, seguido pelos filos Proteobacteria e Actinobacteria (MCKENNEY; KENDALL, 2016). Adaptado.

Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) são os principais metabólitos da fermentação de polissacarídeos por bactérias anaeróbias no cólon, e acetato, propionato e butirato representam cerca de 90% a 95% de sua composição (BERGMAN, 1990; MACFARLANE; MACFARLANE, 2003). Os AGCC desempenham um papel importante na manutenção da saúde intestinal, como proteção, fonte de energia e homeostase fisiológica (TAN *et al.*, 2014). O acetato é o principal AGCC produzido no cólon e o mais abundante na corrente sanguínea (LOUIS *et al.*, 2007; KOH *et al.*, 2016). Sua principal atividade no cólon é a diminuição do pH, efeitos anti-inflamatórios, aumento do fluxo sanguíneo e melhor captação de oxigênio, além de ser utilizado como substrato para a produção de butirato por outras bactérias da microbiota, durante o processo de *cross-feeding* (HAVENAAR, 2011; RÍOS-COVIÁN *et al.*, 2016). O propionato está relacionado com a diminuição do pH do cólon, contribui na prevenção da proliferação de células cancerígenas e na indução da apoptose dessas células na região colorretal, além de possuir efeitos anti-inflamatórios (AL-LAHHAM *et al.*, 2010; RÍOS-

COVIÁN *et al.*, 2016). O butirato, por sua vez, é a fonte preferencial de energia dos colonócitos, diminui o pH, estimula a proliferação de células epiteliais saudáveis, está envolvido na proteção contra câncer de cólon e colite, melhora a função da barreira intestinal ao estimular a formação de mucina, peptídeos antimicrobianos e proteínas que compõe as junções das células epiteliais, apresenta propriedades anti-inflamatórias, estimula a absorção de água e sódio e reduz o desgaste oxidativo no cólon (HAMER *et al.*, 2008; CHANG *et al.*, 2014; BAXTER *et al.*, 2019). A diminuição do pH no cólon pelos AGCC possui diversos efeitos fisiológicos, como diminuição da solubilidade dos sais biliares, aumento da absorção de minerais, diminuição da absorção de amônia, além de inibir o crescimento de patógenos (RIVIÈRE *et al.*, 2016).

Existem muitas limitações no uso de modelos animais para investigar a infecção por EAEC, devido à falta de reprodutibilidade da patogênese *in vivo*, bem como limites éticos para a realização de ensaios clínicos (PHILIPSON; BASSAGANYA-RIERA; HONTECILLAS, 2013). Como alternativa, temos o SEMH® (Simulador do Ecossistema Microbiano Humano), que pode ser utilizado como um modelo colônico de infecção *in vitro* (MOLLY; WOESTYNE; VERSTRAETE, 1993; MOLLY *et al.*, 1994), uma ferramenta que contribui para a investigação das modificações da microbiota intestinal durante um processo infeccioso. Embora o SEMH® não possua condições idênticas aquelas encontradas no hospedeiro, como células intestinais e camada de muco, este sistema simula condições fisiológicas, como pH, temperatura, tempo de trânsito intestinal e composição da microbiota, tornando-se uma excelente maneira de correlacionar a complexa interação entre a microbiota intestinal humana e patógenos (POSSEMIERS *et al.*, 2004).

Trabalhos recentes na literatura têm evidenciado a importância de se compreender a intrínseca relação patógeno-hospedeiro mediada pela sinalização química, que permeia a comunicação inter-reinos e intrarreinos (KENDALL; SPERANDIO, 2016). Identificar os mecanismos envolvidos na cascata de patogenicidade é de suma importância para que se possa compreender a função de sistemas ainda não elucidados em cepas de grande relevância clínica.

Dessa forma, desvendar o papel de QseC em EAEC Stx+, esclarecerá mecanismos ainda não estabelecidos na literatura científica para esta categoria de *Escherichia coli* diarreiogênica, assim como a sua direta relação com o hospedeiro e interação com a microbiota durante o desenvolvimento de seus processos infecciosos.

2. Objetivos

O objetivo geral deste estudo foi investigar a sinalização química via sensor histidina quinase QseC na virulência de EAEC O104:H4 C227-11(Stx+) *in vitro* e *in vivo*, em comparação com a cepa de EAEC O104:H4 BA3826 (Stx-).

2.1. Objetivos específicos

- Análise da sinalização química via QseC *in vitro* e *in vivo* e sua relação com a patogênese em ambas as cepas de EAEC Stx+ e Stx-.
- Investigação da influência de QseC na associação de OMVs da cepa de EAEC Stx+ com células intestinais.
- Avaliação do desenvolvimento da patogênese pelas cepas de EAEC Stx+ e Stx- em modelo de infecção *in vivo*, bloqueando QseC com a administração de LED209.
- Avaliação do papel de QseC na modulação da microbiota intestinal humana no modelo colônico *in vitro* SEMH® (Simulador do Ecosistema Microbiano Humano), durante a infecção com a cepa de EAEC C227-11 (Stx+).

3. Material e métodos

As cepas bacterianas foram cultivadas a 37° C, sob condições aeróbicas e meio LB (Luria-Bertani) (SAMBROOK; FRITSCH.; MANIATIS, 1989). As bactérias foram estocadas em ultrafreezer a -80°C com 25% de glicerol. Todas as cepas bacterianas e plasmídeos utilizados no desenvolvimento deste estudo estão listados na Tabela 1. As técnicas de biologia molecular foram realizadas como previamente descrito (AUSUBEL *et al.*, 1996).

Tabela 1. Cepas bacterianas e plasmídeos utilizados neste estudo.

Cepas e plasmídeos	Características relevantes	Referência
Cepas		
C227-11 WT	Cepa selvagem de EAEC O104:H4 pAA, AggR, AAF/I, Stx2a+, Pic, SigA, SepA (Isolada durante o surto na Alemanha em 2011)	RASKO <i>et al.</i> , 2011
C227-11 :: <i>qseC</i>	EAEC O104:H4 mutante para <i>qseC</i>	ESTE ESTUDO
C227-11 <i>qseC</i> +	EAEC O104:H4 :: <i>qseC</i> complementada com pBAD33-Gm	ESTE ESTUDO
BA3826 WT	Cepa selvagem de EAEC O104:H4 pAA, AggR, °AAF/III, Pic, EAST1 (isolada durante um estudo caso-controle no Brasil)	BUERIS <i>et al.</i> , 2007
BA3826 :: <i>qseC</i>	EAEC O104:H4 mutante para <i>qseC</i>	ESTE ESTUDO
BA3826 <i>qseC</i> +	EAEC O104:H4 :: <i>qseC</i> complementada com pBAD33-Gm	ESTE ESTUDO
DH5α	<i>E. coli supE44 ΔlacU169 (φ80 lacZ ΔM15) hsdR17</i>	STRATAGENE
DH5α λpir	DH5α lisogenizada com λpir, Nal ^r	ELLIOTT; KAPER, 1997
S17-1 λpir	Pro, res-, mod+, RP4-2, Tc::UM-Km::Tn7, Sm ^r	SIMON; PRIEFER; PÜHLER, 1983
Plasmídeos		
pJP5603	3.1-kb R6K- vetor suicida, Km ^r	PENFOLD; PEMBERTON, 1992
pBAD33	Vetor de expressão com baixo número de cópias, Gm ^r	JIMENEZ <i>et al.</i> , 2009

3.1. Extração de DNA plasmidial

Os plasmídeos utilizados neste estudo, pJP5603 e pBAD33-Gm, foram extraídos a partir de 5 mL de um cultivo prévio (16-18h) das respectivas bactérias hospedeiras, sob agitação a 37°C, utilizando o *Quick Plasmid Miniprep Kit* (Invitrogen) e de acordo com as instruções do fabricante. O DNA plasmidial purificado foi quantificado no NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher).

3.2. Células eletrocompetentes e transformação por eletroporação

Para realizar a transformação das bactérias por eletroporação com os plasmídeos de interesse para o estudo, foram preparadas células eletrocompetentes. Um cultivo prévio (16-18h) foi diluído em 200 mL de LB (1:200) e incubado sob agitação a 37° até atingir D.O. 0,5-0,6. (600_{nm}). Em seguida, o cultivo foi mantido por 30 minutos no gelo e centrifugado a 2500 rpm por 6 minutos a 4°C. Após a centrifugação e descarte do sobrenadante, as bactérias foram lavadas com água ultrapura gelada e novamente centrifugadas. O processo foi realizado por duas vezes. No passo seguinte, o *pellet* bacteriano foi lavado com 20 mL de glicerol 10% gelado e centrifugado. Por fim, as células foram ressuspensas em 800 µL da mesma solução de glicerol 10% gelado e mantidas em ultrafreezer a -80°C. Para a transformação, os plasmídeos (100 ng) foram adicionados a 50µL de células eletrocompetentes, que foram transferidas para cubetas apropriadas de 0,2cm (BIO-RAD), previamente resfriadas. Foi utilizado o eletroporador GenePulser (BIO-RAD) a 2,5 kV, 25 µF a 200 Ω. Em seguida, as células bacterianas foram ressuspensas em LB e passaram por um período de recuperação de duas horas sob agitação a 37°C. Após esse período, as bactérias foram plaqueadas em LB/ágar contendo um antibiótico específico para a marca de resistência dos plasmídeos utilizados e,

assim, selecionar as colônias positivas para a transformação após o período de incubação estática a 37°C (16-18h).

3.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Todas as amplificações por PCR utilizadas para as clonagens (mutagênese e complementação) e checagens foram realizadas no T100™ Thermal Cycler (Bio Rad), com temperatura de anelamento de 55°C e extensão a 72°C. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose a 1% e as imagens foram capturadas no ChemiDoc MP Imaging System® (Bio-Rad). As condições para cada 50 uL de reação foram: 35,3 uL de água livre de nucleases, 5 uL de tampão (1x), 1uL de primer forward (0,2 µM), 1uL de primer reverse (0,2 uM), 1,5 µL MgCl₂ (1,5 mM), 1uL de DNTP mix (0,2 mM cada), 5uL of DNA molde, 0,2 uL de enzima Invitrogen™ Platinum™ Taq DNA Polymerase (1UI). Os primers utilizados estão listados na Tabela 2.

Tabela 2. Sequências de primers utilizados durante este estudo.

Alvo	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Referência
q-RT-PCR			
<i>qseC</i>	cgctgaaagtgcaaaccgaa	ccgcgatagagtgagcagtt	ESTE ESTUDO
<i>visP</i>	atgcgttaacgatattgccg	cgaccgtagaaagcgcaaaa	ESTE ESTUDO
<i>rpoA</i>	gcgctcatcttctccgaat	cgcggtcgtgggtatgtg	MOREIRA; WEINSHENKER; SPERANDIO, 2010
<i>aggR</i>	ttccgataaggtcagaacaca	tgctgcttctcattcttg	AL SAFADI <i>et al.</i> , 2012
<i>stx2a</i>	acccacccggcagtt	gggtcaaaacgcgcctgata	RASKO <i>et al.</i> , 2008
<i>aggA</i>	ccgcaaaagtaacgacaagtga	cgggacctgtccccataac	ESTE ESTUDO
<i>agg3A</i>	gcgtgggaacaaatactggaca	tggtctggaataacagctgaactc	JØNSSON <i>et al.</i> , 2017
<i>pic</i>	cctgacagaggacagttca	tcaacctctgttctccaac	AL SAFADI <i>et al.</i> , 2012
<i>fliC</i>	ggatgccgcaatcgctaaa	ttggtgaccgcagaatccag	ESTE ESTUDO
<i>aap</i>	agcggttggaacgcagataa	tgcatatactgggacaccg	ESTE ESTUDO
<i>aar</i>	ttgctttgagctctggaaactg	tgctctattcatgcaccactct	ESTE ESTUDO
<i>sigA</i>	cagcctcagccagcatgtat	caacaaaagactgtcgcggg	ESTE ESTUDO
Universal Bacteria Eub338F/Eub518R	actcctacgggaggcagcagt	attaccgcggtgctggc	FIERER <i>et al.</i> , 2005
Firmicutes 928F- Firm/1040FirmR	tgaaactyaaaggaattgacg	accatgcaccacctgc	BACCHETTI DE GREGORIS <i>et al.</i> , 2011
Bacteroidetes 798cfbF/cfb967R	craacaggattagataccct	ggtaaggttcctcgcgtat	GUO <i>et al.</i> , 2008
γ -Proteobacteria 1080gF/g1202R	tcgtcagctcgtgytgga	cgtaagggccatgatg	BACCHETTI DE GREGORIS <i>et al.</i> , 2011
<i>Bacteroides</i> sp.	cgatggataggggttctgagagga	gctggcacggagttagccga	ROAGER <i>et al.</i> , 2014
<i>Prevotella</i> sp.	caccaaggcgacgatca	ggataacgccyggacct	ROAGER <i>et al.</i> , 2014
<i>Bifidobacterium</i> sp	tcgcgtc(c/t)ggtgtgaaag	ccacatccagc(a/g)tccac	RINTTILÄ <i>et al.</i> , 2004
<i>Lactobacillus</i> sp.	agcagtagggaatctcca	caccgctacacatggag	RINTTILÄ <i>et al.</i> , 2004
PCR			
<i>qseC</i> -pJP5603	atggtaccgcagcgcagaatgctcttaa	gagctccctgaaggttatccagtgagtc	ESTE ESTUDO
<i>qseC</i> -pBAD33	gcaccgggggaaatttaccacaactcttagtc	gcacttagataacatcatcaccatcaccaccc agcttaccttcgctc	ESTE ESTUDO
M13	gtaaacgacggccag	caggaaacagctatgac	INVITROGEN
<i>stx2a</i>	cagtcgtcactcactggtttcatca	ggatattctcccactctgacacc	BRIAN <i>et al.</i> , 1992

3.4. Construção de mutantes isogênicos via vetor suicida pJP5603

O nocaute gênico de *qseC* em ambas as cepas de EAEC O104:H4, C227-11 (Stx+) e BA3826 (Stx-), foi realizado utilizando o vetor suicida pJP5603, onde foi clonado um fragmento desse gene (PENFOLD; PEMBERTON, 1992). Esse vetor contém uma origem de replicação R6K ori, que depende da presença de genes que codificam para a proteína Pir, para que ocorra a sua replicação. Sendo assim, na ausência de Pir e a impossibilidade de sua replicação na célula hospedeira, ocorre a integração desse plasmídeo na região alvo e interrupção desta, através da sequência de homologia previamente clonada nesse vetor. Uma porção interna de 643 pb de *qseC* foi amplificada por PCR, utilizando os primers *qseC*-pJP5603 (forward) e *qseC*-pJP5603 (reverse), e o produto final da reação foi purificado através do *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen). Para a clonagem, o plasmídeo pJP5603 previamente extraído da *E. coli* DH5 α λ pir e o produto de PCR purificado, foram digeridos com as enzimas de restrição *KpnI* e *SacI* (New England Biolabs), em seguida, o fragmento foi ligado na região correspondente do vetor com o auxílio da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen). O produto da reação de ligação foi transformado por eletroporação na *E. coli* DH5 α λ pir eletrocompetente que, em seguida, foi plaqueada em meio seletivo contendo canamicina (50 μ g/mL). Os plasmídeos recombinantes foram extraídos de cultivos das colônias selecionadas para serem utilizados no processo de conjugação. A *E. coli* S17-1 λ pir foi transformada com o plasmídeo pJP5603 contendo o fragmento de *qseC* clonado. As cepas selvagens previamente cultivadas em antibiótico, C227-11 (Tet^R) e BA3826 (Nal^R) (receptoras), foram submetidas ao processo de conjugação com a *E. coli* S17-1 λ pir (Km^R) (doadora), em membranas de filtração de poros de 0,22 μ m (Millipore), com uma proporção de 1:10 (doadora/receptora) em placas de LB/ágar sem antibiótico por 24 horas. Após este período, as bactérias das membranas foram ressuspensas em 500 μ L de PBS estéril e plaqueadas em placas de LB/ágar contendo canamicina e tetraciclina ou canamicina e ácido nalidíxico e incubadas por 18 h a 37°C. A

confirmação da mutação das colônias selecionadas foi inicialmente confirmada por PCR, utilizando os primers M13 (reverse) e *qseC*-pJP5603 (reverse). Após essa confirmação, a inserção do plasmídeo na região alvo, foi checada por sequenciamento no Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco/ USP-SP. Todos os primers utilizados estão listados na Tabela 2.

3.5. Clonagem para complementação das cepas mutantes

Para a complementação plasmidial das cepas mutantes para *qseC*, esse gene foi integralmente clonado (1350 pb) no vetor de expressão pBAD33-Gm. O gene foi amplificado por PCR, utilizando o DNA das cepas C227-11 (Stx+) e BA3826 (Stx-) como molde. Os produtos de PCR foram purificados com o *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen). O plasmídeo pBAD33-Gm previamente extraído e os produtos de PCR foram digeridos com as enzimas de restrição *SmaI* e *XbaI* (New England Biolabs), em seguida, os fragmentos foram ligados na região correspondente do vetor com o auxílio da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen). Os produtos das reações de ligação foram transformados por eletroporação nas células eletrocompetentes da *E. coli* DH5 α , que foram plaqueadas em LB/ágar contendo gentamicina para selecionar as colônias positivas para a transformação. A partir das colônias selecionadas, os plasmídeos recombinantes foram extraídos e transformados também por eletroporação em suas respectivas cepas eletrocompetentes de EAEC mutantes para o gene *qseC* e, igualmente selecionadas em LB/ágar contendo gentamicina.

3.6. Curva de crescimento

A curva de crescimento bacteriana foi realizada a partir de cultivos prévios (16-18h) das cepas C227-11 (Stx+), BA3826 (Stx-), seus respectivos mutantes para o gene *qseC* e

complementados para este gene. Os cultivos bacterianos foram diluídos até atingir a D.O. 0,01 (600_{nm}) em LB, e incubados em microplacas de 96 poços com um volume final de 200 μL a 37°C e agitação orbital (\cong 143 rpm) no leitor de microplacas Tecan Infinite 200 Pro (Tecan, Männedorf, Suíça). O crescimento foi mensurado por leitura de absorbância a 600_{nm} por 13 horas.

3.7. Formação de biofilme

O padrão de formação de biofilme das cepas de EAEC em superfície abiótica foi investigado como previamente descrito (SHEIKH *et al.*, 2001; CURTIS *et al.*, 2014) e foi utilizado LB como meio de cultura. As bactérias foram previamente cultivadas por 16-18h em meio LB sob agitação (250 rpm a 37°C) e inoculadas em placas de poliestireno de 96 poços na proporção 1:100, incubadas estaticamente a 37°C em estufa com 5% de CO₂ por 24 horas. Foi utilizado PBS 1x estéril para lavagem dos poços. O biofilme foi corado com uma solução aquosa de 0,5% de cristal violeta por 20 minutos (200 μL por poço). O corante foi removido e os poços lavados 3 vezes com PBS 1x e a placa permaneceu por 30 minutos em temperatura ambiente para secar. Foi adicionado 200 μL de etanol a 95% em cada poço e a placa foi incubada por 5 minutos. Em seguida, 150 μL de cada poço foi transferido para uma nova placa e realizada a leitura por absorbância na faixa de 600_{nm} no Cytation Reader 3 (Bio Tek®).

3.8. Cultivo de células epiteliais Caco-2 e ensaio de adesão

Os ensaios de adesão foram realizados conforme previamente descrito e com adaptações (CRAVIOTO *et al.*, 1979). As células Caco-2 foram cultivadas em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de antibiótico-antimicótico (Gibco™) e mantidas a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Para os ensaios, 1×10^5 de células foram

retiradas de uma garrafa confluyente para serem adicionadas em placas de 12 poços, em triplicata para cada cepa e incubadas por 12 dias para sua polarização. Após esse período, as células foram infectadas com um MOI (multiplicidade de infecção) de 100:1, utilizando bactérias previamente cultivadas por 16-18h em meio LB e sob agitação (250 rpm a 37° C). As células infectadas foram incubadas por 3 horas a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Em seguida, foram lavadas 3 vezes com PBS 1x estéril e lisadas com 1% de Tritom-X100 em PBS por 10 minutos. Por fim, foram feitas diluições seriadas e plaqueamento em meio seletivo para contagem de UFC.

3.9. Ensaio de motilidade (*swimming*)

Para avaliar o perfil de motilidade via flagelos (*swimming*), foram utilizadas placas com LB/ágar semissólido (0,3%). As cepas bacterianas previamente cultivadas (16-18h) foram inoculadas individualmente (5µL) no centro das placas e, em seguida, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após esse período, o diâmetro do halo crescimento foi medido em centímetros (SPERANDIO *et al.*, 2003; MOREIRA; WEINSHENKER; SPERANDIO, 2010).

3.10. Isolamento de OMVs (vesículas de membrana externa)

Todos os experimentos para a análise de OMVs foram realizados no Instituto de Infectologia da Universidade de Münster na Alemanha, sob a supervisão do Dr. Christian Ruter. O isolamento das vesículas de membrana externa das cepas de interesse foi realizado com a utilização do *ExoBacteria™ OMV Isolation Kit (for E. coli and other Gram-negative bacteria)* (System Biosciences), de acordo com as instruções do fabricante. Inicialmente, foi realizado um cultivo prévio em 5 mL de LB e incubado por 24 horas a 37°C e 180rpm. Em seguida, foi feito um novo inóculo em LB com volume final de 50 mL e em uma proporção de 1:50,

utilizando as bactérias do cultivo anterior, que foi incubado nas mesmas condições citadas acima. Após o cultivo atingir a D.O. 0,5-0,7 (600_{nm}), foi adicionado 0.125 $\mu\text{g/mL}$ de Polimixina B para aumentar a produção de OMVs. As bactérias foram cultivadas por um período de 16 horas, centrifugadas a 4 °C e a 14,000 x g por 15 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi filtrado utilizando um filtro de 0,45 μm e, em seguida, um filtro de 0,22 μm e foi testado quanto a sua esterilidade em placas de LB incubadas por 24 horas a 37°C. Então, foi utilizado o kit citado acima para o isolamento das vesículas. Por fim, as OMVs foram liofilizadas para o envio para a Alemanha e realização dos ensaios a seguir. Esse protocolo foi realizado conforme previamente descrito e com adaptações (BIELASZEWSKA *et al.*, 2013).

3.10.1. Quantificação de OMVs por ensaio de BCA (ácido bicinonínico)

A quantificação das vesículas isoladas foi realizada por ensaio colorimétrico de BCA, que mensura o aumento da cor roxa que é proporcional a quantidade de proteínas. A troca de cor é o resultado da reação de Cu^{2+} a Cu^{1+} que é catalisada por proteínas em condições alcalinas e, em seguida, o Cu^{1+} reage com o ácido bicinonínico (SMITH *et al.*, 1985). As vesículas liofilizadas foram ressuspensas em PBS 1x e a quantificação foi feita em placa de 96 poços, utilizando o *PierceTM BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher), seguindo as instruções do fabricante. A leitura foi realizada a 562_{nm} no *SpectraMax M2 Microplate Reader* (Molecular Devices), com o auxílio do *software* Softmax Pro 7.0.2.

3.10.2. SDS-PAGE e immunoblot para detecção de OMVs

As OMVs isoladas foram inicialmente separadas por eletroforese em gel contendo 12% de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE). Cada amostra foi aplicada em uma concentração de 25 μg . A corrida foi realizada utilizando o MiniProtean Tetra System (Bio-

Rad). Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF (fluoreto de polivinilideno), utilizando o *Mini Trans-Blot® Cell* (Bio-Rad) com 100 V por 1 hora. Após a transferência a membrana foi bloqueada com 5% de leite magro por 1 hora. Então, a membrana foi incubada com anticorpo primário OmpA (marcador de OMVs) na proporção de 1:200, diluído em tampão PBS Tween 0,5% (PBS-T), por um período de ~16h a 4°C e sob agitação. A membrana foi lavada com PBS-T e incubada com o anticorpo secundário GAR-PO (IgG de cabra anti-coelho conjugado com peroxidase), diluído em PBS-T, na proporção de 1:5000, por 1 hora em temperatura ambiente e sob agitação. A revelação foi feita com o *Trident femto Western HRP Substrate* (Gene Tex) e a leitura no *Odyssey® Fc Imaging System* (LI-COR Biosciences), com o auxílio do *software* Image Studio 5.2 (BIELASZEWSKA *et al.*, 2013).

3.10.3. Marcação de OMVs com DiO

O corante DiO (perclorato de 3,3'-dioctadeciloxacarbocianina) é um agente lipofílico que expõe alta fluorescência verde quando é incorporado às membranas celulares. O máximo de absorção está em 484 nm e o máximo de emissão em 501 nm. A marcação das OMVs foi feita utilizando 1% (v/v) de *Vybrant™ DiO Cell-Labeling Solution* (Thermo Fisher). As OMVs foram incubadas com o corante por 30 minutos a 37°C e, em seguida, foram ultracentrifugadas por duas 2 horas a 235,00 x g. Após a primeira centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o tubo foi preenchido com PBS para repetir o processo. Por fim, o sobrenadante foi descartado e o sedimento contendo as vesículas foi ressuspenso em 500 µL de PBS. As vesículas marcadas com DiO foram armazenadas a 4°C e sob o abrigo da luz (PARKER *et al.*, 2010).

3.10.4. Citometria de fluxo

A análise de captação de OMVs em células Caco-2 foi realizada por citometria de fluxo. As células foram previamente cultivadas como descrito anteriormente (ver item 3.8). Inicialmente, ~75 µg de OMVs marcadas com DiO foram adicionadas a 5 mL de DMEM com 2×10^6 de células Caco-2 e foram incubadas por 1/3/6/24 horas a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Células incubadas sem OMVs foram usadas como controle. A fluorescência fora das células foi bloqueada utilizando 0,4% (v/v) de azul de tripan, e a captação de OMVs foi quantificada em placas de 96 poços (duplicata), medindo o aumento de fluorescência ao longo do tempo. A leitura foi feita no *CytoFLEX S* (Beckman Coulter) com o auxílio do *software* CytExpert (HED *et al.*, 1987; BIELASZEWSKA *et al.*, 2013).

3.10.5. Microscopia confocal de varredura a laser

Para microscopia confocal de varredura a laser, 5×10^4 de células Caco-2 previamente cultivadas (ver item 3.8), foram incubadas por ~24 horas em *slides* de câmara de 8 poços (Ibidi). Em seguida, foram incubadas com ~75µg de OMVs marcadas com DiO (verde) ou PBS por 3 e 24 horas. Após as incubações, as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído, a fluorescência basal foi bloqueada com 0,2% de glicina e foram permeabilizadas com 0,25% de Triton X-100. Em seguida, a actina foi contrastada (vermelho) com faloidina tetrametil rodamina (faloidina-TRITC) (Sigma) e os núcleos (azul) com DRAQ5 (Cell Signaling). Para o ensaio de colocalização, as OMVs marcadas com DiO (~75µg) foram adicionadas às células e incubadas por um período de 6 horas. Depois do período de incubação, as células foram preparadas como descrito anteriormente, e as OMVs marcadas com anticorpo primário para LPS O104 e com anticorpo secundário IgG de cabra anti-coelho conjugado com Cy3 (vermelho). Em seguida, apenas o núcleo foi corado (azul), como mencionado acima. Todas as incubações foram realizadas a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Por fim, foram adicionadas 4 gotas de meio de montagem de fluorescência (Dako) em cada poço, para as análises em

microscópio confocal de varredura a laser (microscópio LSM 510 META, equipado com uma objetiva de imersão em óleo Plan-Apochromat 63x/1.4; A Carl Zeiss) (BIELASZEWSKA *et al.*, 2013).

3.11. Extração de RNA

Foram realizadas extrações de RNA a partir de cultivo bacteriano em LB a 37°C, sob agitação e densidade óptica de 1,0 (DO₆₀₀), que corresponde à fase exponencial tardia de crescimento. O RNA também foi extraído diretamente de fezes coletadas durante os ensaios *in vivo* com camundongos infectados e do conteúdo dos reatores do SEMH®. Foi utilizado o TRIzol® (Thermo Fisher Scientific, Ambion-Life) para romper as células bacterianas, inativar nucleases e dissolver os componentes celulares. O clorofórmio foi empregado para separação de fases, sendo que a fase intermediária contém o DNA, a fase orgânica possui as proteínas e os outros componentes celulares, e o RNA encontra-se na fase aquosa. Sendo assim, a fase aquosa foi coletada e a ela adicionado etanol 100% para solubilizar o RNA, em seguida foi utilizado o *RiboPure Bacteria RNA Isolation Kit* (Thermo Fisher Scientific, Ambion-Life), seguindo as instruções do fabricante. O RNA purificado foi quantificado no NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific).

3.12. Análise de expressão gênica relativa via qRT-PCR

As reações para análise de expressão gênica via qRT-PCR foram realizadas no *QuantStudio3* (Thermo Fisher Scientific), e os ensaios foram feitos em triplicatas biológicas e duplicatas técnicas. As reações com o volume final de 20 uL cada uma, continham *Master Mix SYBR®*, *Multi-scribe® Reverse Transcriptase*, *RNAse inhibitor* (Thermo Fisher Scientific) e 100 ng de RNA. Os dados foram normalizados com controles endógenos, *rpoA* para genes de

virulência e *rRNA 16S* do Dominio Bacteria para o total de bactérias presentes na microbiota. Os resultados foram analisados pelo método de *Comparative critical threshold* ($\Delta\Delta CT$), como previamente descrito (WALTERS; SPERANDIO, 2006).

3.13. Ensaio *in vivo* com camundongos C57BL/6

Para analisar a cinética da infecção mediada pelo sensor quinase QseC, foram utilizadas as cepas C227-11 (Stx+) e BA3826 (Stx-) selvagens e mutantes para *qseC*, e o LED209, um bloqueador desse sensor, que foi cedido gentilmente pela Profa. Dra. Vanessa Sperandio, do Centro Médico da Universidade do Texas. Os animais utilizados têm como origem o CEMIB/UNICAMP e, após sua aquisição, foram mantidos no Biotério do Departamento de Ciências Biológicas da FCFAr/UNESP. A aprovação de uso de animais nesse trabalho foi concedida pela CEUA/FCF/CAR: 23/2016. Para este ensaio, foram utilizados 42 camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6J UNIB, com peso entre 12 e 15 gramas e idade entre 3 e 5 semanas. Os camundongos foram tratados com 20 mg/Kg de ampicilina por gavagem, 24 horas antes da infecção, para depleção parcial da microbiota intestinal. As cepas bacterianas foram cultivadas por 16-18 horas, centrifugadas e ressuspendidas em PBS. Em seguida, os animais foram infectados com 1×10^{10} de UFC por gavagem. Foi administrado 58,8 mg/Kg de LED209 ou veículo (5% de dimetilsulfóxido, 23% de polietilenoglicol 400, 70% de bicarbonato de sódio [pH 9], 2% de Tween 80), 3 horas antes da infecção (-3h), na hora da infecção (0h) e 3 horas após a infecção (+3h). Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com um estudo prévio que utilizou modelo de camundongos tratados com ampicilina (ZANGARI *et al.*, 2013), salvo modificações aqui apontadas. As fezes foram coletadas nos dias 1, 3, 5, 7, 10 e 14 após a infecção para a extração do RNA bacteriano e qRT-PCR, bem como para a contagem de UFC.

3.14. Ensaio no modelo colônico *in vitro* SEMH®

O Simulador de Ecossistema Microbiano Intestinal Humano (SEMH®) foi utilizado para simular o processo de digestão humana. O ensaio foi realizado no departamento de Alimentos e Nutrição da FCFAr/UNESP, em parceria com a Profa. Dra. Kátia Sivieri. O simulador é controlado via *software* e consiste em 5 compartimentos fechados que representam o estômago, intestino delgado, cólon ascendente, cólon transverso e cólon descendente (MOLLY *et al.*, 1994). O simulador foi adaptado para este estudo, onde o cólon transverso e descendente foi substituído pela triplicata do cólon ascendente (pH 5,6-5,9), com o objetivo de obter réplicas do experimento para comparação estatística dos dados (Fig. 6). Características específicas como volume, pH, temperatura (37°C) e tempo de retenção foram controladas com precisão (POSSEMIERS *et al.*, 2004). Os últimos três compartimentos foram homogeneizados com um agitador magnético durante todo o processo. A completa anaerobiose do sistema foi alcançada com a adição de nitrogênio e o pH corrigido em cada reator com ácido clorídrico (1M) ou hidróxido de sódio (1M), atingindo a faixa de pH de 5,6-5,9 (MOLLY *et al.*, 1994; POSSEMIERS *et al.*, 2004).

Figura 6. Visão geral do protocolo experimental empregado neste estudo.

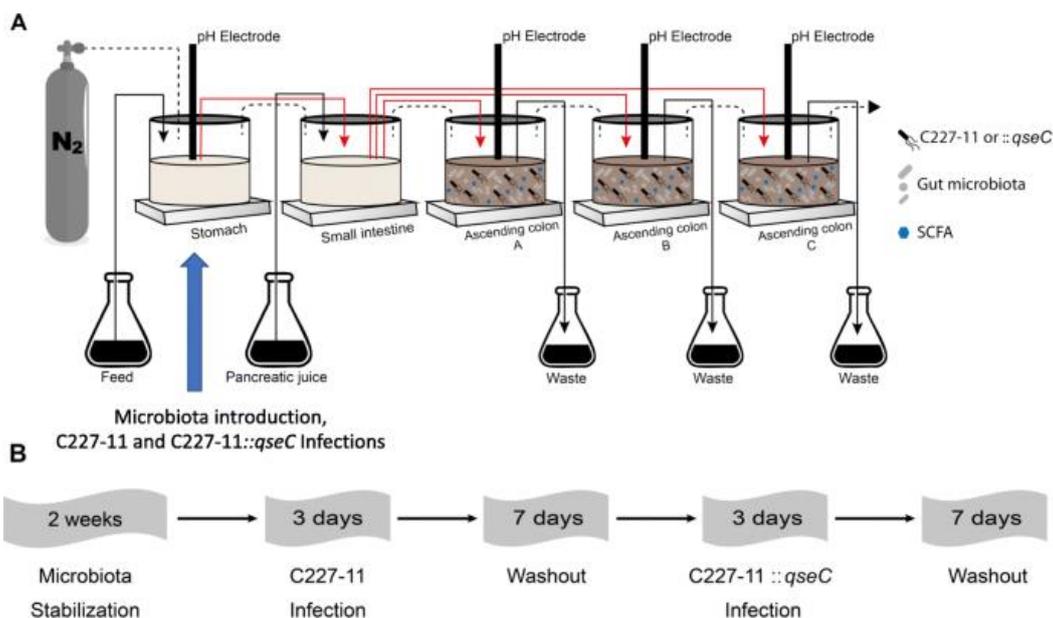


Fig. 6. Modelo do SEMH® adaptado com a triplicata do cólon ascendente. Os reatores mimetizam condições fisiológicas que são controladas com o auxílio de um *software* e representam o estômago, intestino delgado e a triplicata do cólon ascendente. As setas indicam a direção do fluxo das bombas, linhas tracejadas para gás e linhas sólidas para líquidos (A). Etapas do período experimental desenvolvidas em 5 semanas. Após o período de estabilização da microbiota, foram realizadas a infecções com as cepas C227-11 WT e *::qseC*, com um período de *washout* entre elas, período em que a saída das cepas do sistema foi verificada por PCR (B) (MACHADO RIBEIRO *et al.*, 2021).

3.14.1. Colonização da microbiota

Os compartimentos foram colonizados com fezes de dois voluntários saudáveis, com idades entre 18 e 22 anos, de acordo com os procedimentos descritos anteriormente. (POSSEMIERS *et al.*, 2010; DUQUE *et al.*, 2016). Os pré-requisitos para a seleção dos doadores foram: não terem feito uso de antibióticos nos 6 meses que antecederam a coleta, não serem portadores de doença crônica e não possuírem vínculo familiar.

As amostras foram homogeneizadas e 40g deste conteúdo foi diluído em 200 mL de tampão fosfato (pH 6,5) composto por 7,08 g/L de fosfato monossódico (Synth, SP, BR), 5,98 g/L de fosfato dissódico (Synth, SP, BR) e 1 g/L de tioglicolato de sódio (Merck, DE). Esta mistura foi homogeneizada em *stomacher* e centrifugada a 3.000 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e 40 mL foram adicionados aos últimos 3 reatores, juntamente com 500 mL de meio de alimentação estéril, que é um meio à base de carboidratos com importante papel na adaptação ambiental e crescimento do inóculo bacteriano, bem como na formação de uma comunidade estável e representativa (MOLLY *et al.*, 1994). Todos os componentes empregados na produção do meio carboidrato utilizados nos reatores são da Sigma Aldrich (EUA) e estão listados na Tabela 3.

Tabela 3. Composição do meio carboidrato e suco pancreático utilizados no SEMH®.

Meio carboidrato	
Componente^a	g/L
Arabinogalactana	1.0
Pectina	2.0
Amido de batata	3.0
Xilana	1.0
Glicose	0.4
Extrato de levedura	3.0
Peptona	1.0
Mucina	4.0
Cisteína	0.5
Água destilada estéril	q.s.p. ^b
Suco pancreático	
	g/L
Oxgall	6
NaHCO ₃	12.5
Pancreatina	0.9
Água destilada estéril	q.s.p.

^a Sigma.

^b Quantidade suficiente para 1L.

3.14.2. Infecção no SEMH®

O período experimental no reator SEMH® foi realizado continuamente durante 5 semanas (Fig. 6). No período de estabilização da microbiota (controle), o meio de alimentação (240 mL) e suco pancreático (60 mL) foram inseridos no sistema por 14 dias (DE WIELE *et al.*, 2004; POSSEMIERS *et al.*, 2004) (Tabela 3). Após duas semanas de estabilização, a primeira infecção foi realizada com 10^{10} UFC/mL de EAEC C227-11 WT, e adicionados 240 mL de meio de alimentação e suco pancreático (60 mL). Entre as duas infecções, foi realizado um período de *washout* de 7 dias, onde apenas o meio de alimentação (240 mL) e o suco pancreático (60 mL) foram adicionados. Após este período, em condições idênticas, a segunda infecção foi realizada com 10^{10} UFC/mL de EAEC C227-11::*qseC*. As duas infecções foram realizadas em triplicatas biológicas. A ausência de cepas EAEC WT ou::*qseC* foi verificada por PCR usando o gene cromossomal *stx2a* (Tabela 2). A análise da composição da microbiota durante o período de infecção foi realizada a partir de material coletado individualmente de cada reator do dia 0 ao dia 3 após a infecção. Desse material, foi extraído o RNA bacteriano para a análise de expressão gênica via qRT-PCR de filós e gêneros (Tabela 2).

3.14.3. Análise da produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)

Os ácidos graxos de cadeia curta foram analisados por cromatografia gasosa, como descrito anteriormente e com pequenas modificações (DUQUE *et al.*, 2016). As amostras (n = 3) foram centrifugadas (14.000 x g, 5 minutos) e 2 mL do sobrenadante armazenados para análise. As amostras foram filtradas através de filtros Millex® (0,45 µm) e, em seguida, injetadas em um cromatógrafo a gás Agilent HP-6890 equipado com um detector seletivo de massa modelo Agilent HP-5975. Uma coluna capilar DB-WAX (60m x 0,25mm x 0,25µm) foi usada nas seguintes condições: temperatura do injetor = 220°C, coluna = 35°C, 2°C/minuto,

38°C; 10°C/minuto, 75°C; 35°C/minuto, 120°C (1 minuto); 10°C/min, 170°C (2 minutos); 40°C/minuto, 170°C (2 minutos) e detector = 250°C. O hélio foi usado como gás de arraste a uma vazão de 1 mL/minuto.

3.14.4. ELISA de captura

A detecção de Stx2 foi feita por ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) de captura, a partir do conteúdo coletado no SEMH® nos dias 1 e 3 após a infecção. Os ensaios foram realizados em parceria com a Dra. Roxane M. F. Piazza, no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan. Placas de microtitulação (NUNC) foram sensibilizadas por 16 horas a 4°C com 25 µg/mL de anticorpo policlonal Stx2 (pAb). Após o período de incubação, os poços foram incubados com 1% de BSA durante 1 hora a 37°C. Então, o material coletado dos reatores foi incubado na placa por 1 hora a 37°C. A toxina ligada a Stx2 pAb foi detectada com 5 µg/mL de anticorpo monoclonal Stx2 (MAB) e posterior incubação com soro de coelho anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma). Ambas as incubações foram realizadas a 37°C por 1 hora. Em seguida, a reação foi revelada com uma solução contendo OPD (o-Fenilenodiamina) e peróxido de hidrogênio. Entre as incubações, as placas foram lavadas três vezes com 0,05% de PBS-tween. O material coletado do dia 0 e a toxina Stx2a purificada, foram utilizados como controle. A leitura foi realizada no leitor de ELISA (Labsystems) a 492_{nm}. As análises foram feitas em duplicata.

3.15. Análise estatística

Todas as análises estatísticas utilizadas neste estudo foram realizadas com o auxílio do *software* GraphPad Prism 7.04. A significância estatística entre os grupos experimentais foi

determinada por meio do teste t- *Student* e ANOVA (*analysis of variance*), considerando os valores de P inferiores ou iguais a 0,05 estatisticamente significativos.

4. Resultados

Para a caracterização do papel do sensor histidina quinase QseC, foram utilizadas nos ensaios *in vitro* e *in vivo* as cepas selvagens de EAEC O104:H4 C227-11 (Stx+) e BA3826 WT (Stx-), suas respectivas cepas mutantes para o gene *qseC* confirmadas por sequenciamento, assim como as cepas complementadas com o gene reinserido via plasmídeo.

4.1. Curva de crescimento

De modo a analisar se o nocaute do gene *qseC* resultaria em algum prejuízo para o crescimento das cepas mutantes, foram analisadas as curvas de crescimento das cepas C227-11 WT, C227-11 *::qseC*, C227-11 *qseC+*, BA3826 WT, BA3826 *::qseC* e BA3826 *qseC+*. Foi possível observar que nas condições testadas, as curvas foram similares durante o período de crescimento entre as cepas mutantes para o gene *qseC* e cepas complementadas para este gene, em comparação com a cepa selvagem em ambos os grupos de EAEC, C227-11 (Stx+) e BA3826 (Stx-) (Fig. 7 e 8).

Figura 7. Curva de crescimento das cepas C227-11 (Stx+).

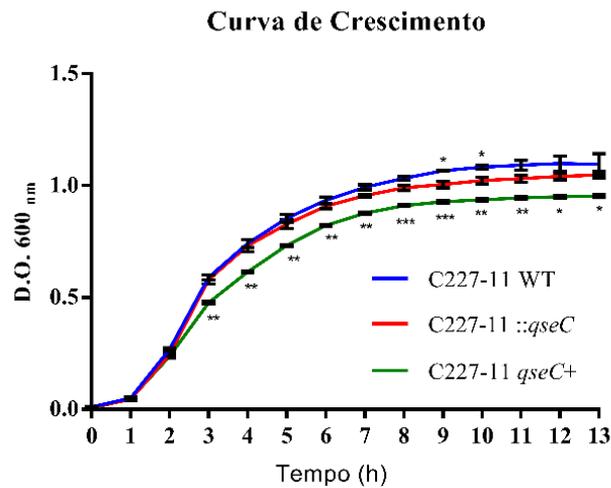


Fig. 7. Curva de crescimento das cepas de EAEC O104:H4 C227-11 WT, *qseC*⁻ e *qseC*⁺ em LB, incubadas por 13 horas a 37°C e sob agitação (\cong 143 rpm). O crescimento foi estimado por D.O. 600nm. Significância estatística em relação a cepa C227-11 WT, $p < 0,05$ (*), $p < 0,001$ (**), $p < 0,0001$ (***)).

Figura 8. Curva de crescimento das cepas BA3826 (Stx-).

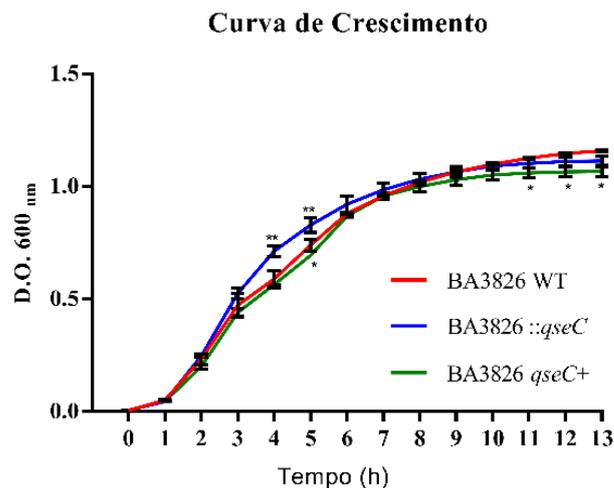


Fig. 8. Curva de crescimento das cepas de EAEC O104:H4 BA3826 WT, *qseC*⁻ e *qseC*⁺ em LB, incubadas por 13 horas a 37°C e sob agitação (\cong 143 rpm). Crescimento estimado por D.O. 600nm. Significância estatística em relação a cepa BA3826 WT, $p < 0,05$ (*), $p < 0,001$ (**).

4.2. Padrão de formação de biofilme

Os ensaios de formação de biofilme em superfície abiótica foram realizados com objetivo de avaliar o papel de QseC nesse fenótipo. Para tanto, a produção do biofilme foi mensurada indiretamente com a utilização da técnica de coloração por cristal violeta (Fig. 9 e 10). Os ensaios foram realizados com as cepas de EAEC O104:H4 C227-11 WT e BA3826 WT, assim como com as suas respectivas cepas mutantes para o gene *qseC* e complementadas com esse gene.

Na quantificação de biomassa total, a cepa C227-11::*qseC* apresentou uma redução de 18,2% na formação de biofilme e sua cepa *qseC*⁺ apresentou uma menor redução de 16,7%, ambas em relação a cepa selvagem (Fig. 9). A cepa BA3826::*qseC* teve um aumento de 30,6% na formação de biofilme e sua cepa *qseC*⁺ não apresentou diferenças significativas, ambas comparadas com a cepa BA3826 WT. Neste caso, a cepa complementada com *qseC*, reestabeleceu por completo o fenótipo de formação de biofilme da cepa selvagem (Fig. 10).

Figura 9. Análise do biofilme das cepas C227-11 (Stx+) por coloração com cristal violeta.

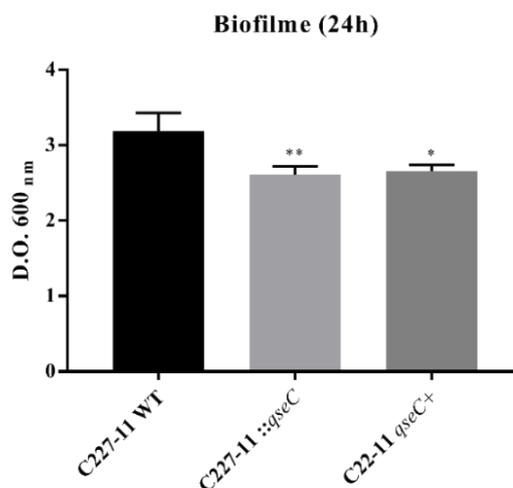


Fig. 9. Formação de biofilme das cepas de EAEC O104:H4 C227-11 WT,::*qseC* e *qseC*⁺ em superfície abiótica, após 24 horas de incubação estática a 37°C em estufa com 5% de CO₂.

Biomassa total mensurada por D.O. 600_{nm}, após coloração com cristal violeta. Significância estatística em relação a cepa C227-11 WT, $p < 0,05$ (*), $p < 0,001$ (**).

Figura 10. Análise do biofilme das cepas BA3826 (Stx-) por coloração com cristal violeta.

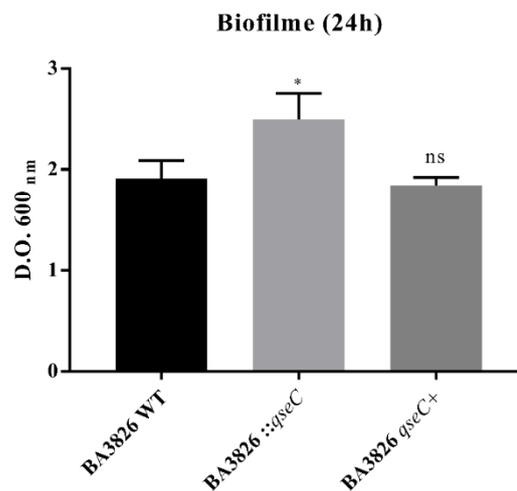


Fig. 10. Formação de biofilme das cepas de EAEC O104:H4 BA3826 WT, $::qseC$ e $qseC+$ em superfície abiótica, após 24 horas de incubação estática a 37°C em estufa de CO₂. Biomassa total mensurada por D.O. 600_{nm}, após coloração com cristal violeta. Significância estatística em relação a cepa BA3826 WT, $p < 0,05$ (*), ns- não significativo.

4.3. Ensaio de adesão em células epiteliais polarizadas Caco-2

Os ensaios de adesão em células polarizadas foram feitos com o intuito de avaliar se QseC teria alguma influência neste fenótipo. As análises foram realizadas por contagem de UFC, através do plaqueamento bacteriano em meio seletivo, após o período de incubação. A cepa C227-11 $::qseC$ apresentou uma redução de 0,4 ordem de magnitude para este fenótipo e a cepa complementada não apresentou diferença significativa. Os resultados foram comparados com a cepa C227-11 WT (Fig.11). No entanto, para a cepa BA3826 (Stx-), a ausência de $qseC$ não resultou em diferença significativa no perfil de adesão, bem como para a cepa complementada (Fig. 12).

Figura 11. Perfil de adesão das cepas C227-11 (Stx+) em células Caco-2.

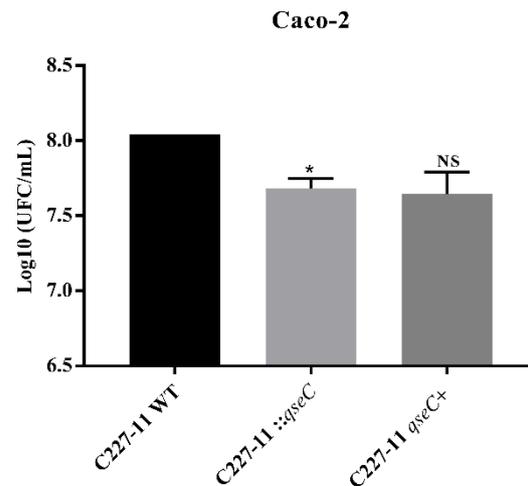


Fig. 11. Análise do perfil de adesão das cepas C227-11 WT, *::qseC*, *qseC+* em células Caco-2, após o período de 3 horas de incubação a 37°C em estufa com 5% de CO₂. As células viáveis foram quantificadas por contagem de UFC. Significância estatística em relação a cepa C227-11 WT, $p < 0,05$ (*), ns- não significativo.

Figura 12. Perfil de adesão das cepas BA3826 (Stx-) em células Caco-2.

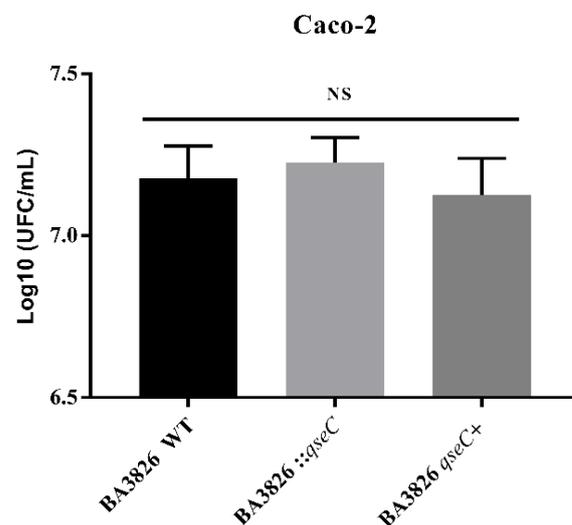


Fig. 12. Análise do perfil de adesão das cepas BA3826 WT, *::qseC*, *qseC+* em células Caco-2, após o período de 3 horas de incubação a 37°C em estufa com 5% de CO₂. As células viáveis foram quantificadas por contagem de UFC. Significância estatística em relação a cepa BA3826 WT, ns- não significativo.

4.4. Ensaio de motilidade (*swimming*)

Para verificar se QseC exerce alguma influência no perfil de motilidade de EAEC, foi realizado o ensaio dependente de flagelos tipo *swimming*, com as cepas de EAEC O104:H4 C227-11 WT e BA3826 WT, assim como com as suas respectivas cepas mutantes para o gene *qseC* e complementadas com esse gene. Os halos de crescimento foram mensurados após 24 horas de incubação e, a cepa C227-11 WT, bem como suas respectivas cepas mutante e complementada, não apresentaram diferença de motilidade nessas condições (Fig. 13). Similarmente, a cepa BA3826 WT, bem como sua respectiva cepa mutante não apresentaram diferenças, com exceção da cepa complementada que apresentou uma discreta redução para este perfil, quando comparada com a cepa BA3826 WT (Fig. 14).

Figura 13. Perfil de motilidade das cepas C227-11 (Stx+).

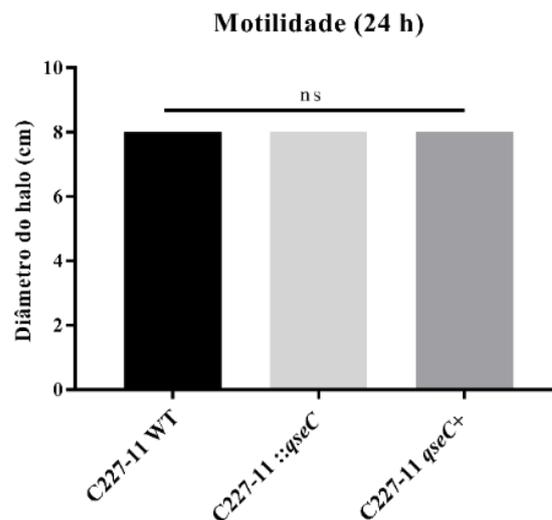


Fig. 13. Halo de crescimento das cepas C227-11 WT, *::qseC* e *qseC+* medido após 24 horas de incubação a 37°C em LB/ágar 0,3%. Significância estatística em relação a cepa C227-11 WT, ns- não significativo.

Figura 14. Perfil de motilidade das cepas BA3826 (Stx-).

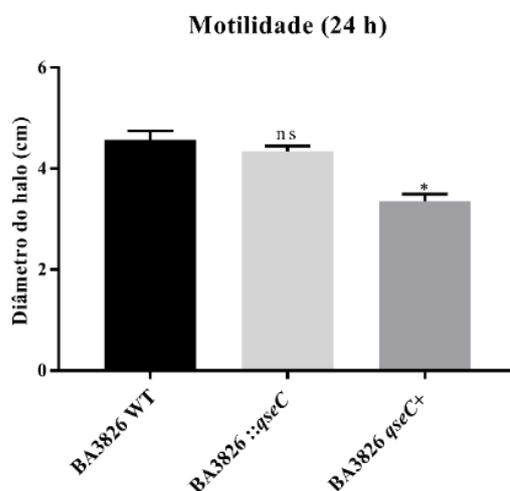


Fig. 14. Halo de crescimento das cepas BA3826 WT, ::*qseC* e *qseC*⁺ medido após 24 horas de incubação a 37°C em LB/ágar 0,3%. Significância estatística em relação a cepa C227-11 WT, $p < 0,05$ (*), ns- não significativo.

4.5. Análise de expressão gênica *in vitro*

Para avaliar se QseC exercia alguma influência na expressão de genes de virulência em comum entre as cepas de EAEC C227-11 (Stx+) e BA3826 (Stx-), foram realizados ensaios de qRT-PCR, tendo como alvo os genes *aar* (regulador ativado por AggR), (*aggR* ativador transcricional), *aap* (dispersina), *pic* (proteína envolvida na colonização), *sigA* (proteína relacionada a efeitos citopáticos), *fliC* (flagelina H4) e *visP* (proteína periplasmática). Por possuírem fímbrias de aderência agregativa distintas, foi analisado o gene *agg3A* (subunidade principal da pilina da AAF-III) para a cepa BA3826 e *aggA* (subunidade principal da pilina AAF-I) para a cepa C227-11, bem como *stx2a* (toxina de Shiga) para essa última.

Na ausência do sensor quinase QseC, representado pela cepa C227-11 ::*qseC*, todos os genes envolvidos na formação de biofilme e colonização apresentaram um expressão maior em relação a cepa selvagem C227-11 WT (Fig. 15). Todos os resultados apresentados a seguir, se

referem a expressão gênica da cepa C227-11 *::qseC* e da cepa C227-11 *qseC+*, ambos os resultados em comparação com a cepa C227-11 WT (Fig. 15 e 16). O gene *aar*, que codifica para Aar, um regulador negativo de AggR, apresentou um aumento de 9,7 vezes e a cepa complementada um aumento de 8,9 vezes. O gene *aggR*, codificador de AggR, um importante ativador transcricional de genes de virulência de EAEC, estava 7,3 vezes mais expresso e na cepa *qseC+* apenas 2,7 vezes mais expresso. A expressão da AAF-I, representada pelo gene *aggA*, responsável pelo padrão de adesão AA e formação de biofilme, foi 12,8 vezes maior e na cepa complementada se apresentou 18,6 vezes mais expresso. Ao mesmo tempo em que a AAF-I apresentou uma superexpressão, o gene *aap* que codifica para a proteína dispersina, envolvida na dispersão da bactéria no epitélio intestinal, apresentou um nível de expressão 21,9 vezes maior e a cepa complementada 10,4 vezes maior. Foi possível observar que a cepa complementada para *qseC* (C227-11 *qseC+*) apresentou um reestabelecimento parcial dos níveis de expressão dos genes *aggR* e *aap*, mas não apresentou o reestabelecimento dos níveis de expressão para o gene *aggA*, quando comparados aos resultados da cepa selvagem (Fig. 15).

O gene *pic*, envolvido no processo de colonização, apresentou um nível de expressão 1,3 vezes maior e, para a cepa complementada *qseC+*, este gene estava 1,2 vezes mais expresso, reestabelecendo parcialmente os níveis da cepa selvagem. O gene *sigA*, que codifica para uma serinoprotease assim como *pic*, apresentou uma redução de 2,7 vezes e a cepa complementada uma redução de 1,5 vezes, também reestabelecendo parcialmente os níveis de expressão da cepa selvagem (Fig. 16).

Figura 15. Análise da expressão de genes envolvidos na formação de biofilme e colonização nas cepas C227-11 (Stx+) em fase exponencial tardia.

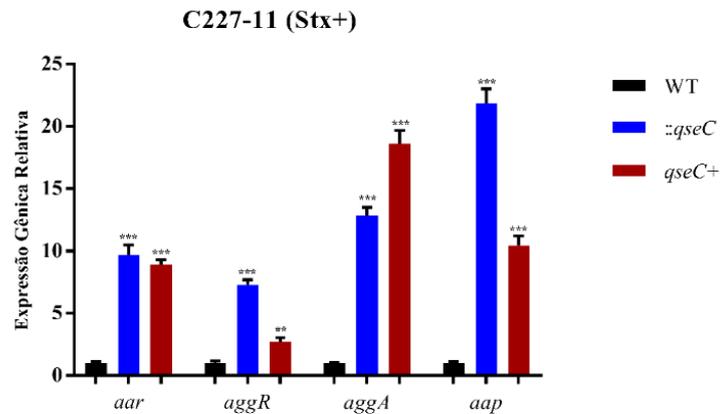


Fig. 15. Análise de expressão gênica relativa via qRT-PCR das cepas C227-11 WT, $\Delta qseC$ e $qseC^+$, a partir de RNA extraído após o cultivo em LB (37°C e 250 rpm) e D.O. 1.0 (600nm). Foram analisados os genes *aar*, *aggR*, *aggA* e *aap*. Análise estatística em comparação com a cepa C227-11 WT, $p < 0,001$ (**), $p < 0,0001$ (***)).

Figura 16. Análise da expressão gênica de serinoproteases nas cepas C227-11 (Stx+) em fase exponencial tardia.

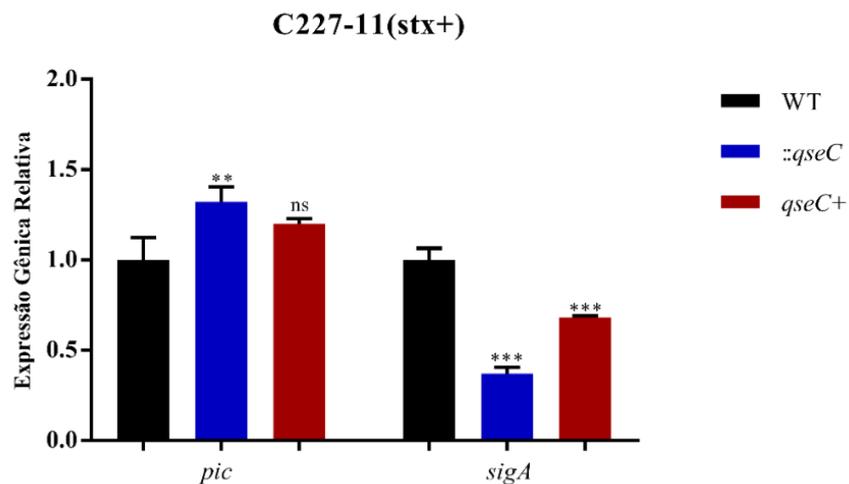


Fig. 16. Análise de expressão gênica relativa via qRT-PCR das cepas C227-11 WT, $\Delta qseC$ e $qseC^+$, a partir de RNA extraído após o cultivo em LB (37°C e 250 rpm) e D.O. 1.0 (600nm).

Foram analisados os genes *pic* e *sigA*. Análise estatística em comparação com a cepa C227-11 WT, $p < 0,001$ (**), $p < 0,0001$ (***), ns- não significativo.

Assim como para a cepa C227-11(Stx+), QseC também demonstrou ter participação na expressão de fatores de virulência na cepa BA3826 (Stx-). No entanto, nem todos os genes foram superexpresso na ausência desse sensor para a EAEC Stx-. A seguir, serão apresentados os resultados referentes a cepa mutante para *qseC* BA3826::*qseC* e a cepa complementada para este gene BA3826 *qseC*+, em comparação com os níveis de expressão gênica da cepa selvagem (Fig. 17 e 18). O gene *aar* apresentou uma redução em sua expressão de 3,3 e a cepa complementada uma redução de 1,4 vezes. A expressão de *aggR* foi 1,4 vezes menor e a cepa complementada apresentou um reestabelecimento total de expressão, em relação a cepa selvagem. O gene *agg3A* também se apresentou mais expresso, sua expressão foi 1,4 vezes maior e para a cepa complementada foi 2,7 vezes maior. A expressão do *aap* apresentou um aumento de 1,6 vezes nos níveis de expressão, já para a cepa complementada a expressão desse gene foi 3,8 vezes maior. Assim como para a cepa C227-11 *qseC*+, a complementação gênica de *qseC* para a cepa BA3826::*qseC*, não apresentou o reestabelecimento dos níveis de expressão para todos os genes, sendo observado apenas para *aar* e *aggR*. Por outro lado, o reestabelecimento dos níveis de expressão em relação a cepa selvagem, não foi observado para os genes *agg3A* e *aap* (Fig. 17).

O gene *pic* também apresentou uma expressão menor de 1,2 vezes, e a cepa complementada uma expressão 2,1 vezes maior. A expressão do gene *sigA* não apresentou diferença em sua expressão para ambas as cepas, mutante e complementada (Fig. 18).

Figura 17. Análise da expressão de genes envolvidos na formação de biofilme e colonização nas cepas BA3826 (Stx-) em fase exponencial tardia.

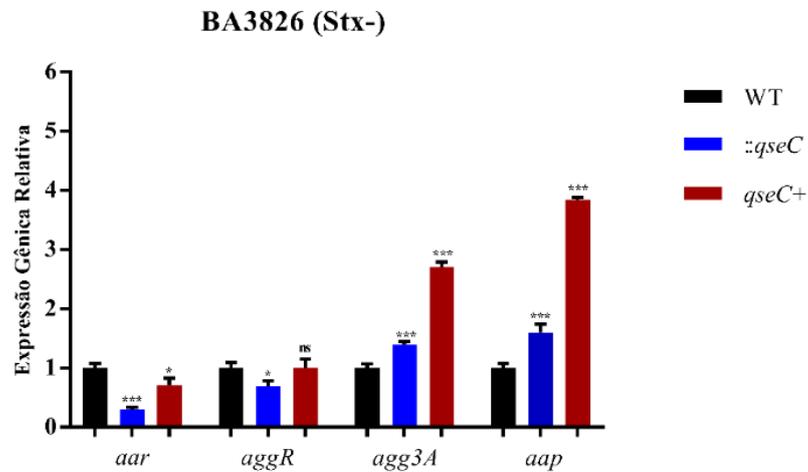


Fig. 17. Análise de expressão gênica relativa via qRT-PCR das cepas BA3826 WT, ::*qseC* e *qseC+*, a partir de RNA extraído após o cultivo em LB (37°C e 250 rpm) e D.O. 1.0 (600nm). Foram analisados os genes *aar*, *aggR*, *agg3A* e *aap*. Análise estatística em comparação com a cepa BA3826 WT, $p < 0,05$ (*), $p < 0,0001$ (***), ns- não significativo.

Figura 18. Análise da expressão gênica de serinoproteases nas cepas BA3826 (Stx-) em fase exponencial tardia.

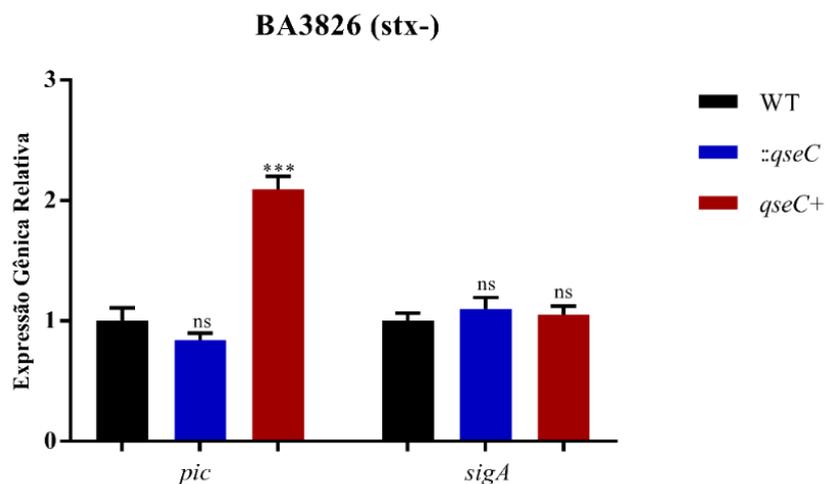


Fig. 18. Análise de expressão gênica relativa via qRT-PCR das cepas BA3826 WT, ::*qseC* e *qseC+*, a partir de RNA extraído após o cultivo em LB (37°C e 250 rpm) e D.O. 1.0 (600nm).

Foram analisados os genes *pic* e *sigA*. Análise estatística em comparação com a cepa BA3826 WT, $p < 0,0001$ (***) , ns- não significativo.

Figura 19. Análise da expressão gênica de toxina de Shiga nas cepas C227-11 (Stx+) em fase exponencial tardia.

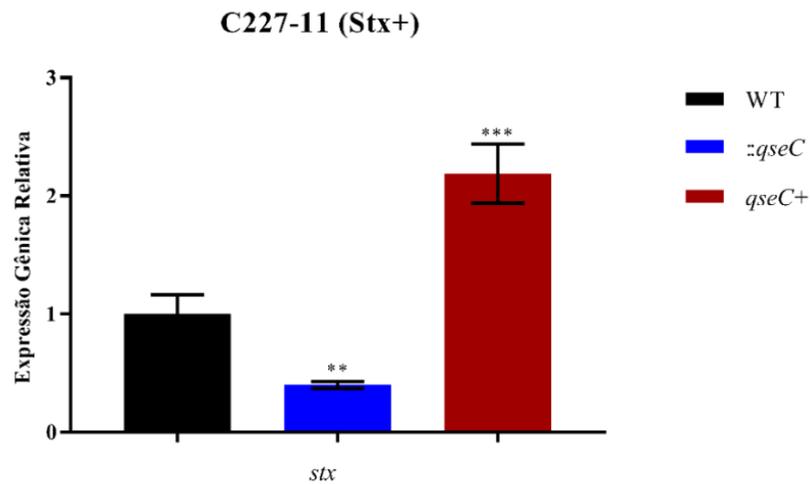


Fig. 19. Análise de expressão gênica relativa de *stx2a* via qRT-PCR das cepas C227-11 WT, $\Delta qseC$ e $qseC+$, a partir de RNA extraído após o cultivo em LB (37°C e 250 rpm) e D.O. 1.0 (600nm). Análise estatística em comparação com a cepa C227-11 WT, $p < 0,001$ (**), $p < 0,0001$ (***) .

A expressão para toxina de Shiga foi avaliada pelo gene *stx2a* e, na ausência de *qseC*, ocorreu uma redução de 2,5 vezes na expressão desse gene, e a cepa complementada para *qseC* apresentou uma expressão 2,2 vezes maior em relação aos níveis da cepa selvagem (Fig. 19).

Figura 20. Análise de expressão de gene envolvido na motilidade das cepas C227-11 (Stx+) em fase exponencial tardia.

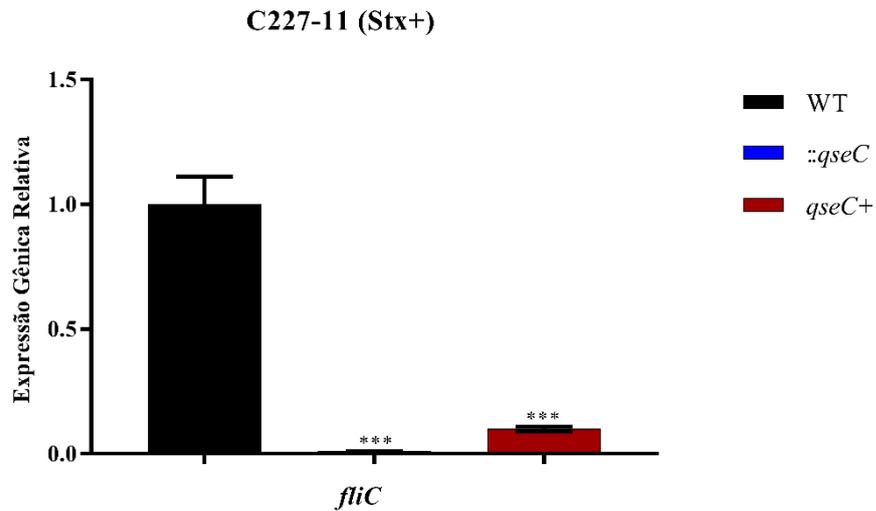


Fig. 20. Análise de expressão gênica relativa de *fliC* via qRT-PCR das cepas C227-11WT, *::qseC* e *qseC+*, a partir de RNA extraído após o cultivo em LB (37°C e 250 rpm) e D.O. 1.0 (600_{nm}). Análise estatística em comparação com a cepa C227-11 WT, $p < 0,0001$ (***)

Figura 21. Análise de expressão de gene envolvido na motilidade das cepas BA3826 (Stx-) em fase exponencial tardia.

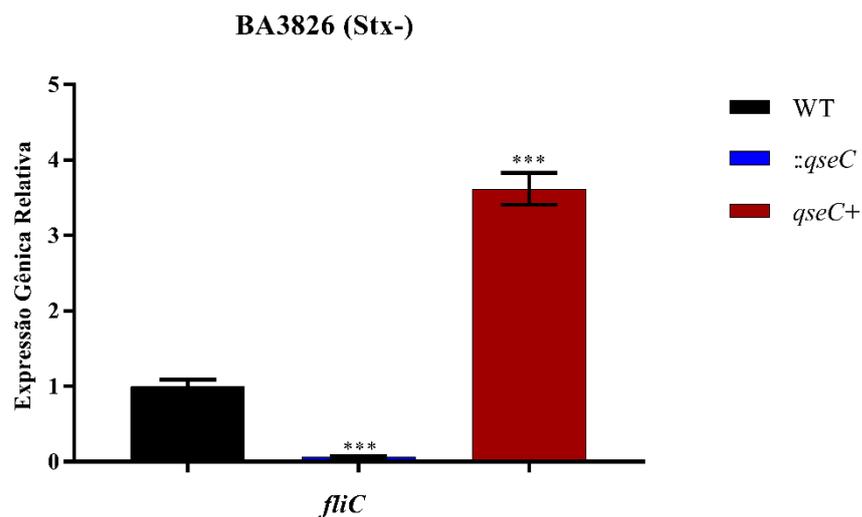


Fig. 21. Análise de expressão gênica relativa de *fliC* via qRT-PCR das cepas BA3826 WT, *::qseC* e *qseC+*, a partir de RNA extraído após o cultivo em LB (37°C e 250 rpm) e D.O. 1.0 (600_{nm}). Análise estatística em comparação com a cepa BA3826 WT, $p < 0,0001$ (***)

A análise do gene *fliC*, que codifica para a flagelina, evidenciou uma notável redução na expressão para ambas as cepas de EAEC, C227-11::*qseC* e BA3826::*qseC*, atingindo uma diminuição de 123,2 e 14,8 vezes, respectivamente (Fig. 20 e 21). As cepas complementadas C227-11 *qseC*⁺ e BA3826 *qseC*⁺, apresentaram um nível de expressão de 10,3 vezes menor e 3,6 vezes maior, respectivamente. Esses resultados evidenciaram o reestabelecimento parcial para os níveis de expressão desse gene para ambas as cepas, em comparação aos níveis das cepas selvagens (Fig. 20 e 21).

Figura 22. Análise de expressão gênica das cepas C227-11 (Stx+) de gene envolvido na tolerância ao estresse bacteriano em pH neutro.

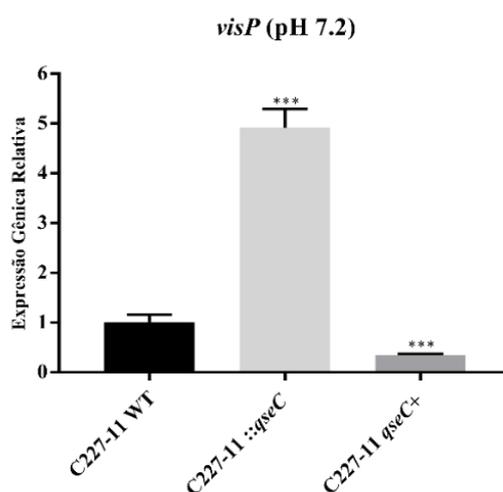


Fig. 22. Análise de expressão gênica relativa de *visP* via qRT-PCR das cepas C227-11 WT,::*qseC* e *qseC*⁺, a partir de RNA extraído após o cultivo em LB com pH 7.2 a 37°C e D.O. 1.0 (600nm). Análise estatística em comparação com a cepa C227-11 WT, $p < 0,0001$ (***)

Figura 23. Análise de expressão gênica das cepas BA3826 (Stx-) de gene envolvido na tolerância ao estresse bacteriano em pH neutro.

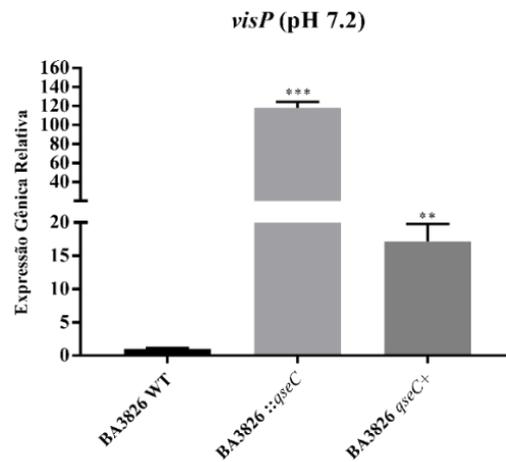


Fig. 23. Análise de expressão gênica relativa de *visP* via qRT-PCR das cepas BA3826 WT, ::*qseC* e *qseC+*, a partir de RNA extraído após o cultivo em LB com pH 7.2 a 37°C e D.O. 1.0 (600nm). Análise estatística em comparação com a cepa BA3826 WT, $p < 0,001$ (**), $p < 0,0001$ (***).

Figura 24. Análise de expressão gênica das cepas C227-11 (Stx+) de gene envolvido na tolerância ao estresse bacteriano em pH ácido.

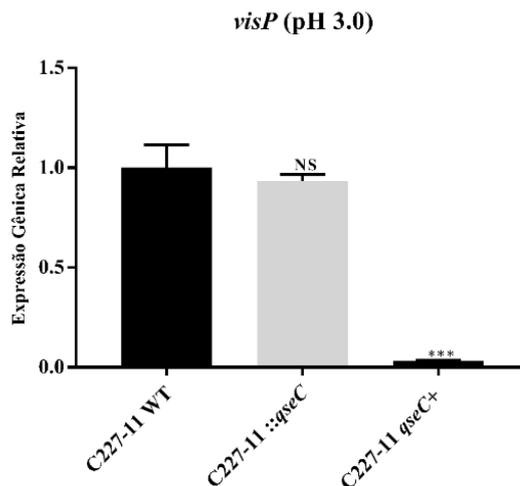


Fig. 24. Análise de expressão gênica relativa de *visP* via qRT-PCR das cepas C227-11 WT, ::*qseC* e *qseC+*, a partir de RNA extraído após incubação por 1 hora em LB com pH 3.0 a 37°C. Análise estatística em comparação com a cepa C227-11 WT, $p < 0,0001$ (***), ns- não significativo.

Figura 25. Análise de expressão gênica das cepas BA3826 (Stx-) de gene envolvido na tolerância ao estresse bacteriano em pH ácido.

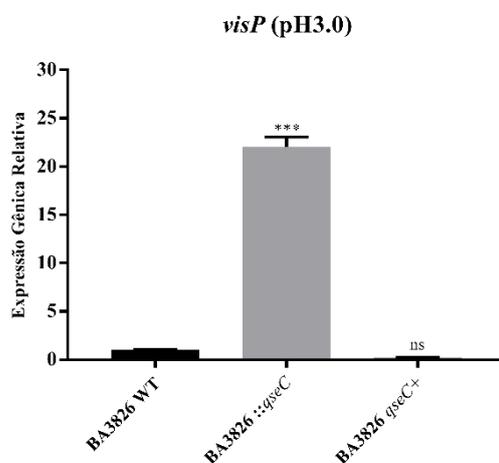


Fig. 25. Análise de expressão gênica relativa de *visP* via qRT-PCR das cepas BA3826 WT, *::qseC* e *qseC+*, a partir de RNA extraído após incubação por 1 hora em LB com pH 3.0 a 37°C. Análise estatística em comparação com a cepa BA3826 WT, $p < 0,0001$ (***), ns- não significativo.

Para verificar a influência de QseC na expressão gênica de *visP*, que codifica para uma proteína periplasmática envolvida na tolerância ao estresse bacteriano, foram analisados os níveis de expressão desse gene em condições de pH neutro (7.2) e pH ácido (3.0), semelhante ao encontrado no estômago (Fig. 22-25). Em pH neutro, a cepa C227-11 *::qseC* apresentou um aumento de 4,9 vezes para este gene, quando comparada aos níveis de expressão da cepa C227-11 WT. Já a cepa C227-11 complementada com o gene *qseC*, apresentou uma redução de 2,9 vezes na expressão de *visP*, com um reestabelecimento parcial dos níveis da cepa selvagem (Fig. 22). A expressão de *visP* na cepa BA3826 *::qseC*, quando comparada a sua respectiva cepa selvagem, evidenciou também em pH neutro, uma superexpressão desse gene de 118 vezes, e a cepa complementada apresentou uma expressão 17,2 vezes maior em relação a cepa selvagem, mas uma redução de 100,8 vezes em relação a cepa *::qseC* (Fig. 23). Em pH ácido, para a cepa C227-11 *::qseC* não foi observada diferença significativa na expressão de *visP*,

quando comparada aos níveis de expressão da cepa C227-11 WT. A cepa complementada C227-11 *qseC*⁺ apresentou uma significativa redução de 29,4 vezes (Fig. 24). A cepa BA3826 apresentou um aumento de expressão para esse gene de 22 vezes em pH ácido e sua respectiva cepa complementada não apresentou diferença significativa em relação a cepa selvagem (Fig. 25).

4.6. Análise de associação de OMVs em linhagem de célula intestinal Caco-2

Para verificar o perfil de associação das OMVs extraídas das cepas C227-11 WT, *::qseC* e *qseC*⁺, foi inicialmente confirmado o isolamento das vesículas por *immunoblot* com anticorpo para OmpA (marcador de OMV), seguido de análise da cinética de sua captação e internalização por citometria de fluxo e microscopia confocal de varredura a laser. As células epiteliais intestinais Caco-2 foram incubadas por diferentes períodos com as vesículas previamente marcadas com DiO (sonda molecular). Alternativamente, as vesículas foram incubadas com anticorpo para LPS O104, específico para a cepa C227-11, durante o ensaio de análise de colocalização por microscopia confocal.

Figura 26. Análise de vesículas de membrana externa extraídas das cepas C227-11(Stx+).

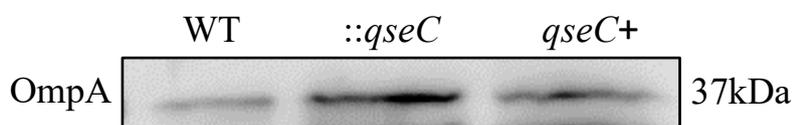


Fig. 26. *Immunoblot* da proteína OmpA (marcador de OMVs) realizado a partir do isolamento de OMVs do sobrenadante bacteriano do cultivo das cepas C227-11 WT, *::qseC* e *qseC*⁺. Foi utilizado 25µg de OMVs por cepa. O peso molecular da proteína está indicado em kDa.

Foi possível evidenciar a partir da análise por *immunoblot*, que as extrações de OMVs a partir do sobrenadante do cultivo das cepas C227-11 WT, *::qseC* e *qseC+* foram bem sucedidas (Fig. 26). Deste modo, foi possível prosseguir com os experimentos seguintes.

Figura 27. Cinética da captação de OMVs das cepas C227-11 (Stx+) por células Caco-2.

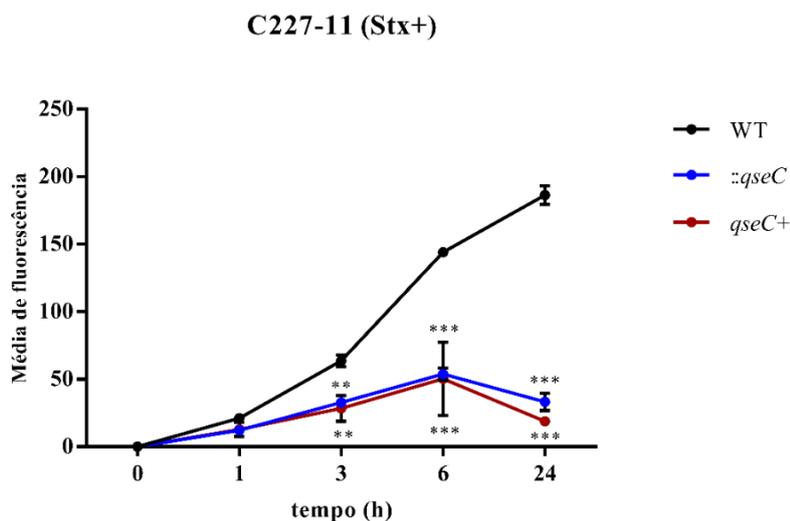


Fig. 27. Citometria de fluxo para análise da cinética de captação de OMVs (marcadas com DiO) extraídas das cepas C227-11 WT, *::qseC* e *qseC+* por células epiteliais Caco-2 após do período de incubação de 1, 3, 6 e 24 horas. As análises estatísticas foram realizadas individualmente para cada período e em comparação com a cepa C227-11 WT, $p < 0,001$ (**), $p < 0,0001$ (***)

A análise da cinética de captação de OMVs por células Caco-2 evidenciou uma associação tempo-dependente para todas as cepas. A média de fluorescência para a cepa C227-11 WT foi superior às médias das cepas *::qseC* e *qseC+* nos períodos de 3, 6 e 24 horas (~64, ~144 e ~186). A redução na média de fluorescência para os períodos de 3, 6 e 24 foi similar para ambas as cepas *::qseC* (~33, ~54 e ~33) e *qseC+* (~28, ~50 e ~19), em comparação com a cepa selvagem (Fig. 27).

Figura 28. Internalização de OMVs das cepas C227-11 (Stx+) em células Caco-2.

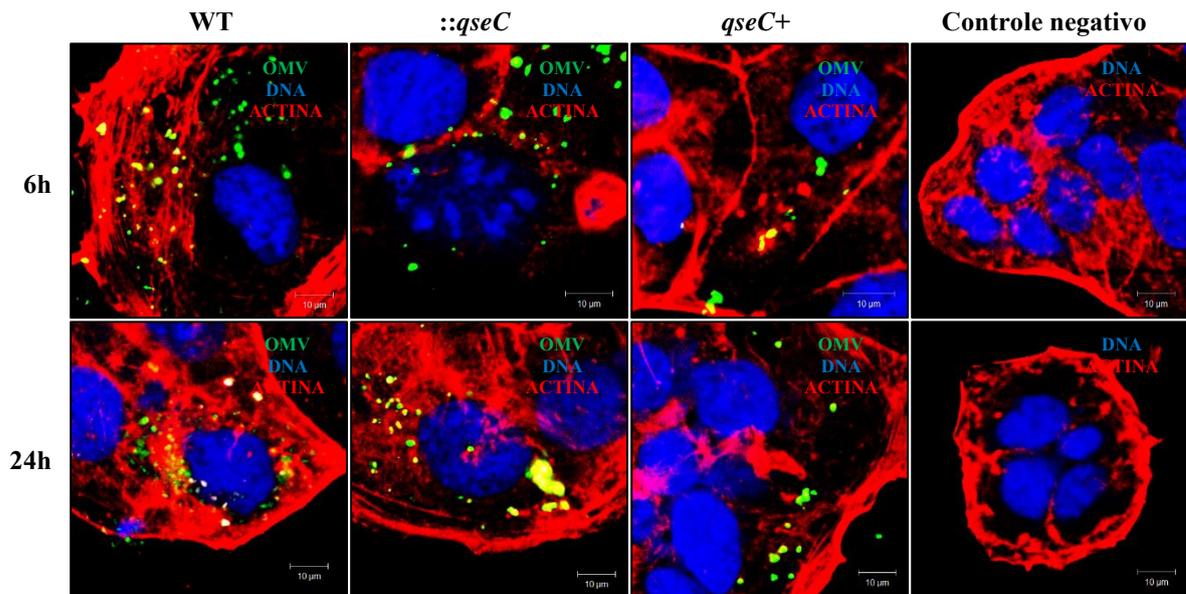


Fig. 28. Microscopia Confocal de Varredura a Laser para análise da internalização de OMVs extraídas das cepas C227-11 WT, *::qseC* e *qseC+* em células epiteliais Caco-2 após o período de incubação de 6 e 24 horas. As OMVs foram marcadas com DiO (verde), a actina foi corada com faloidina-TRITC (vermelho) e o núcleo corado com DRAQ5 (azul). As células para controle negativo foram incubadas sem OMVs e coradas como mencionado acima. As imagens foram capturadas no microscópio LSM 510 META, foram mescladas e consistem em uma seção óptica de uma série-z com um pinhole de 1 unidade de airy. As barras de escala representam 10 μm.

Figura 29. Colocalização de OMVs das cepas C227-11 (Stx+) em células Caco-2.

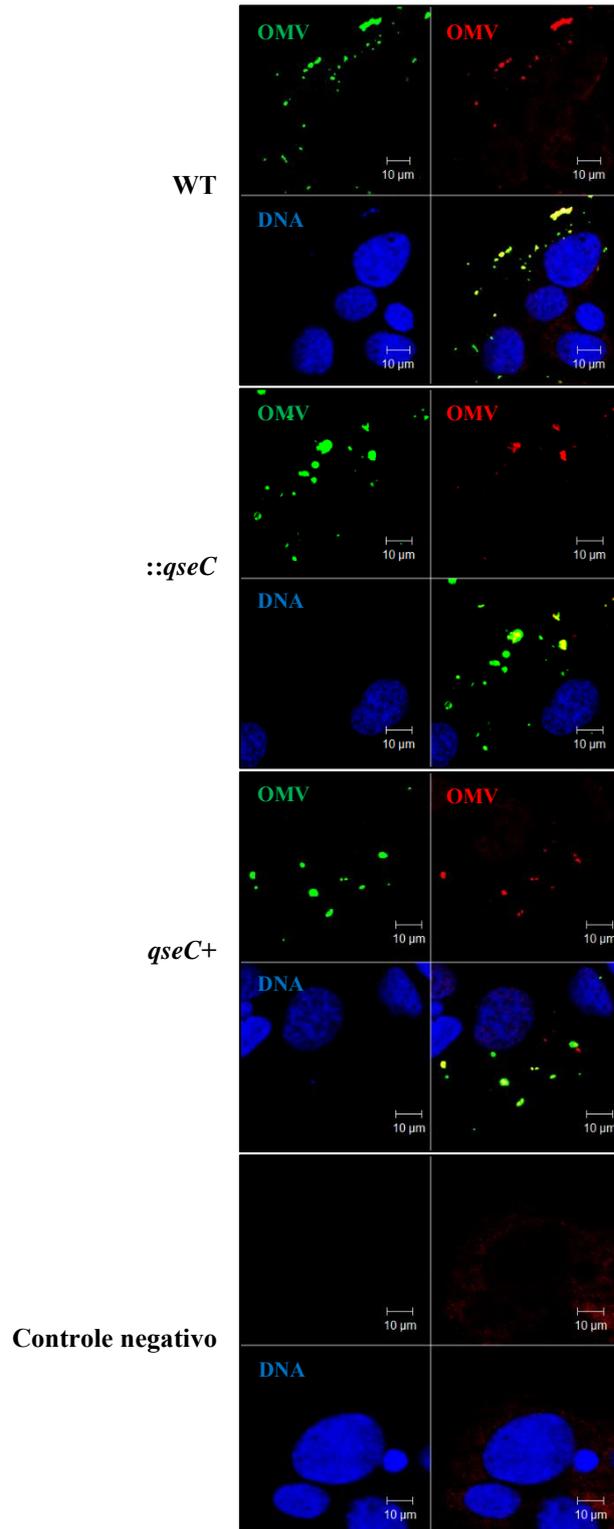


Fig. 29. Microscopia Confocal de Varredura a Laser para análise da internalização e colocalização de OMVs extraídas das cepas C227-11 WT, *::qseC* e *qseC+* em células epiteliais Caco-2 após o período de incubação de 6 horas. Para a detecção, as OMVs foram marcadas com DiO (verde) e com anticorpo anti-LPS O104 e IgG de cabra anti-coelho conjugado com Cy3 (vermelho). O núcleo foi corado com DRAQ5 (azul). As células para controle negativo

foram incubadas sem OMVs, coradas e incubadas com anticorpos como mencionado acima. Todas as imagens foram capturadas no microscópio LSM 510 META. As três imagens foram mescladas e os canais de fluorescência únicos estão nas imagens inferiores do lado direito de cada grupo (colocalização das OMVs verdes e vermelhas aparecem em amarelo) e consistem em uma seção óptica de uma série-z com um pinhole de 1 unidade de airy. As barras de escala representam 10 μm .

A captação das OMVs pelas células Caco-2 foi confirmada por microscopia confocal e os resultados foram similares tanto para a cepa C227-11 WT quanto para suas respectivas cepas mutante para *qseC* e complementada para este gene. No período de 6 horas de incubação foi observada a internalização das vesículas e, após 24 horas de incubação, se apresentaram mais concentradas em direção a região perinuclear (Fig. 28). A confirmação da especificidade das vesículas marcadas com DiO (verde) foi evidenciada também por microscopia confocal, a partir dessas OMVs marcadas com anticorpo específico para o LPS O104 e com um anticorpo secundário Cy3 (vermelho), cuja colocalização resultou na coloração amarela. Desta forma, confirmou-se esse resultado para todas as cepas (Fig. 29). Juntos, esses dados evidenciam a participação de QseC na produção de OMVs nessa cepa de EAEC.

4.7. Ensaio de colonização bacteriana *in vivo* com camundongos C57BL/6

De modo a analisar se o bloqueio da via de sinalização química mediada pelo sistema QseBC teria influência no processo de colonização em modelo *in vivo* de infecção para EAEC, foram realizados ensaios com camundongos C57BL/6 infectados com as cepas C227-11 WT e BA3826 WT, bem como com as suas respectivas cepas mutantes para *qseC*, tratados ou não com o bloqueador específico para QseC, o composto LED209.

Figura 30. Colonização das cepas C227-11 (Stx+) em camundongos C57BL/6.

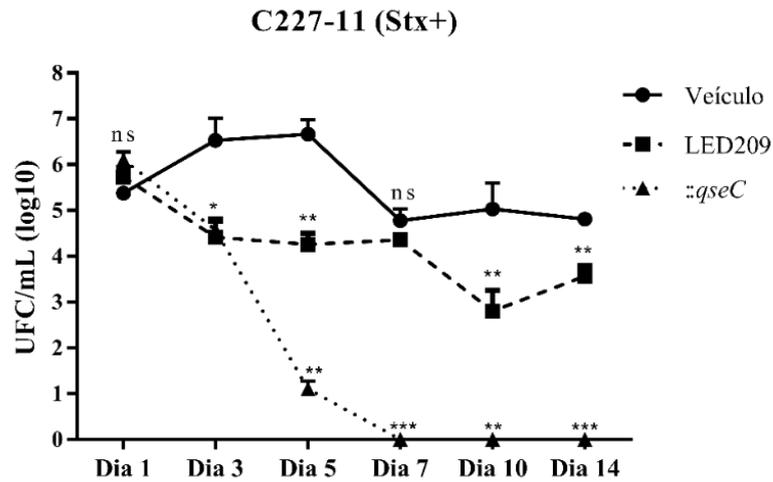


Fig. 30. Contagem de UFC a partir de fezes coletadas do dia 1 ao dia 14 após a infecção de camundongos com 10^{10} UFC das cepas C227-11 WT e C227-11 $\Delta qseC$, na presença ou ausência de 58.8 mg/kg de LED209. Análise estatística em comparação com a cepa C227-11 WT (veículo), $p < 0,05$ (*), $p < 0,001$ (**), $p < 0,0001$ (***) , ns- não significativo.

Figura 31. Colonização da cepa BA3826 (Stx-) em camundongos C57BL/6.

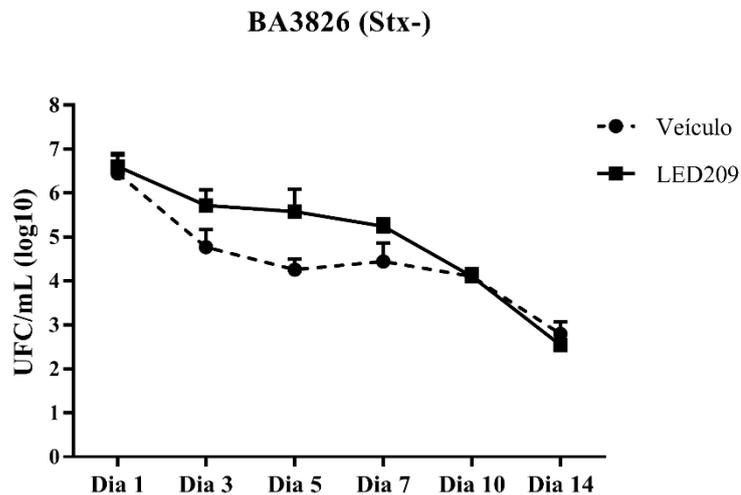


Fig. 31. Contagem de UFC a partir de fezes coletadas do dia 1 ao dia 14 após a infecção de camundongos com 10^{10} UFC da cepa BA3826 WT, na presença ou ausência de 58.8 mg/kg de LED209. Análise estatística em comparação com a cepa BA3826 WT (veículo).

Figura 32. Colonização das cepas BA3826 (Stx-) em camundongos C57BL/6.

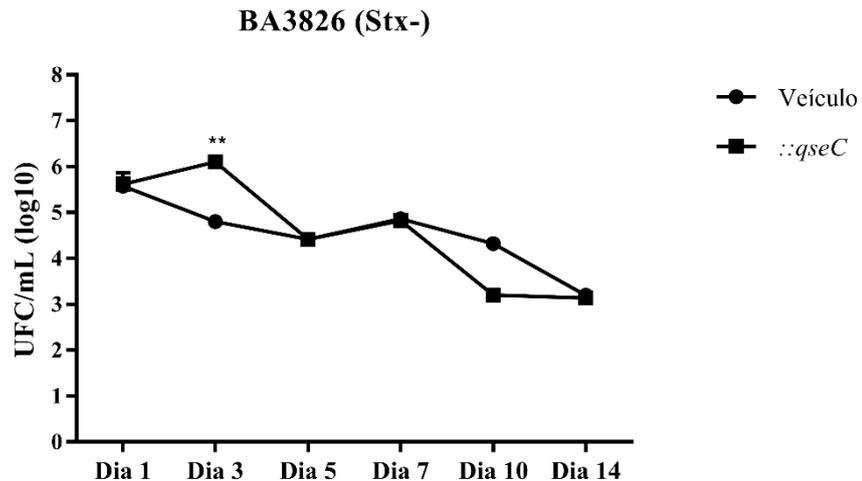


Fig. 32. Contagem de UFC a partir de fezes coletadas do dia 1 ao dia 14 após a infecção de camundongos com 10^{10} UFC das cepas BA3826 WT e C227-11 ::*qseC*. Análise estatística em comparação com a cepa BA3826 WT (veículo), $p < 0,001$ (**).

A cepa C227-11 (Stx+) exposta ao LED209 apresentou uma significativa redução na colonização *in vivo*, em relação ao grupo não tratado, além disso, foi observada uma redução notável a partir do dia 3 após a infecção, com uma diferença de 2,1 ordens de magnitude (Fig. 30). Em seguida, o dia 5 após a infecção, apresentou a maior redução na colonização durante todo o período experimental, com uma diferença que atingiu 2,4 ordens de magnitude. Nos dias 7, 10 e 14, foram observadas reduções de 0,4 (não significativo), 2,2 e 1,2 ordens de magnitude, respectivamente (Fig. 30). A cepa mutante para *qseC* apresentou uma redução de 2 e 5,5 ordens de magnitude nos dias 3 e 5 após a infecção, em comparação com a cepa selvagem, e não foram recuperadas UFC nos dias seguintes do período experimental (Fig. 30). Não houve diferença relevante na recuperação de UFC da cepa BA3026 WT entre os grupos tratado e não tratado com LED209 (Fig. 31). Similarmente, a cepa BA3826 ::*qseC* não apresentou diferenças significativas durante o processo de colonização, com exceção do dia 1 após a infecção, onde ocorreu uma redução de 1,3 ordem de magnitude para a cepa selvagem (Fig. 32). Deste modo,

observou-se um papel mais evidente de QseC na colonização da EAEC C227-11 (Stx+) (Fig. 30).

Figura 33. Análise de expressão gênica após o bloqueio de QseC da cepa C227-11 (Stx+) com LED209.

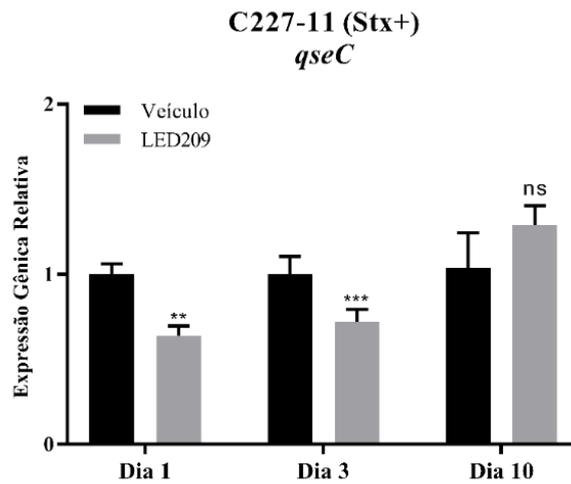


Fig. 33. Análise da expressão de *qseC* a partir de RNA extraído das fezes coletadas nos dias 1, 3 e 10 após a infecção dos camundongos com 10^{10} UFC da cepa C227-11 WT. Material coletado do grupo tratado e não tratado com 58,8 mg/Kg de LED209. Análise estatística em comparação com a cepa C227-11 WT (veículo), $p < 0,001$ (**), $p < 0,0001$ (***), ns- não significativo.

Figura 34. Análise de expressão gênica após o bloqueio de QseC da cepa BA3826 (Stx-) com LED209.

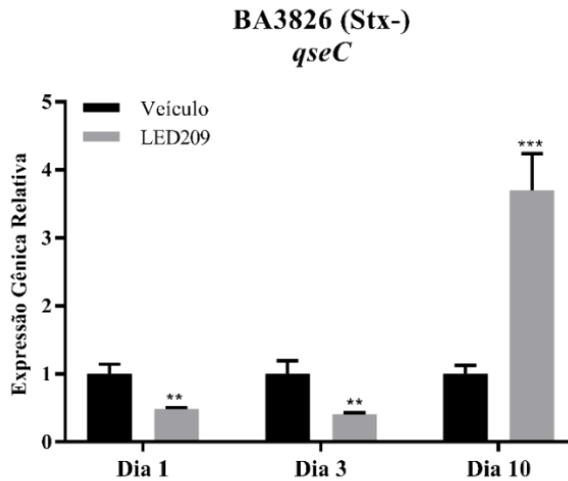


Fig. 34. Análise da expressão de *qseC* a partir de RNA extraído das fezes coletadas nos dias 1, 3 e 10 após a infecção dos camundongos com 10^{10} UFC da cepa BA3826 WT. Material coletado do grupo tratado e não tratado com 58,8 mg/Kg de LED209. Análise estatística em comparação com a cepa BA3826 WT (veículo), $p < 0,001$ (**), $p < 0,0001$ (***)).

Após o bloqueio de QseC com LED209, foi avaliada a expressão gênica do gene *qseC*, que codifica para essa proteína, e foi observada uma redução nos dias 1 e 3 após a infecção de 1,6 e 1,4 vezes, respectivamente, para a cepa C227-11 WT. No dia 10 após a infecção, não houve diferença significativa na expressão de *qseC* entre os dois grupos (Fig. 33). De modo semelhante, foi evidenciado para a cepa BA3826 WT uma redução na expressão de *qseC* nos dias 1 e 3 de 2,0 e 2,4 vezes, respectivamente. No dia 10 após a infecção, a expressão voltou a subir, atingindo um nível 3,7 vezes maior em relação à cepa não exposta ao LED209 (Fig. 34).

Figura 35. Análise de expressão gênica após o bloqueio de QseC da cepa C227-11 (Stx+) com LED209.

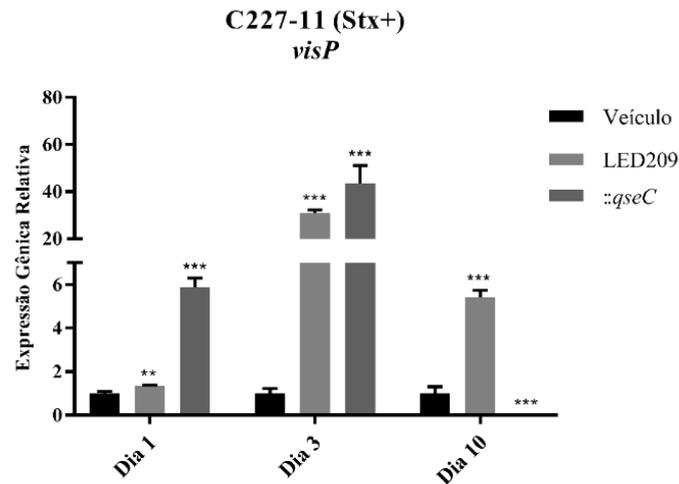


Fig. 35. Análise da expressão de *visP* a partir de RNA extraído das fezes coletadas nos dias 1, 3 e 10 após a infecção dos camundongos com 10^{10} UFC da cepa C227-11 WT e *::qseC*. Material coletado do grupo tratado e não tratado com 58,8 mg/Kg de LED209. Análise estatística em comparação com a cepa C227-11 WT (veículo), $p < 0,001$ (**), $p < 0,0001$ (***)

Figura 36. Análise de expressão gênica após o bloqueio de QseC da cepa BA3826 (Stx-) com LED209.

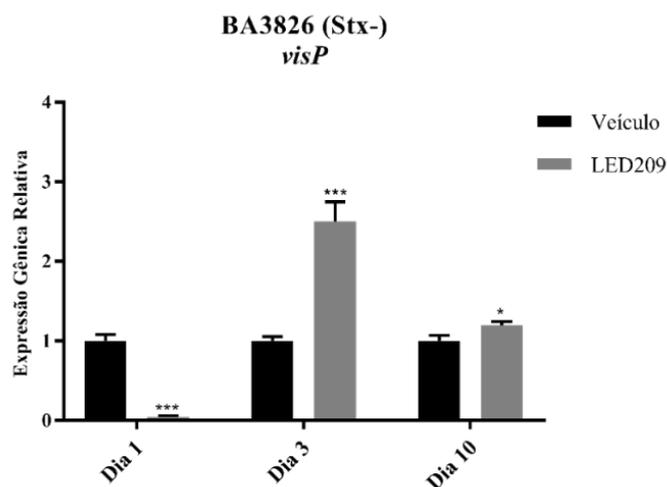


Fig. 36. Análise da expressão de *visP* a partir de RNA extraído das fezes coletadas nos dias 1, 3 e 10 após a infecção dos camundongos com 10^{10} UFC da cepa BA3826 WT. Material coletado do grupo tratado e não tratado com 58,8 mg/Kg de LED209. Análise estatística em comparação com a cepa BA3826 WT (veículo), $p < 0,05$ (*), $p < 0,0001$ (***)

Figura 37. Análise de expressão gênica após o nocaute de *qseC* na cepa BA3826

(Stx-).

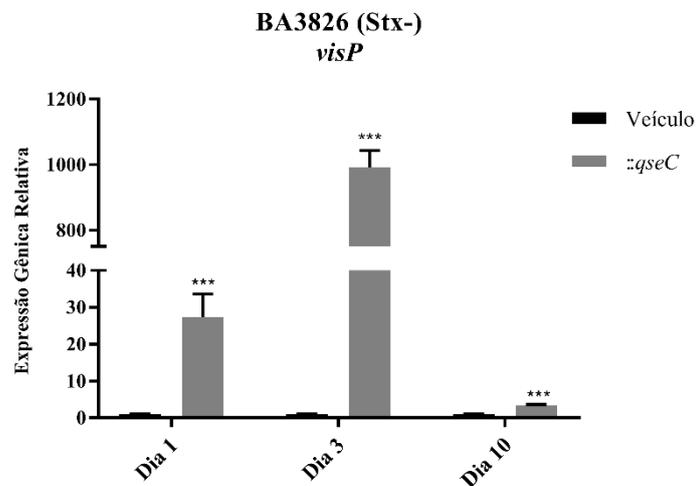


Fig. 37. Análise da expressão de *visP* a partir de RNA extraído das fezes coletadas nos dias 1, 3 e 10 após a infecção dos camundongos com 10^{10} UFC das cepas BA3826 WT e *::qseC*. Análise estatística em comparação com a cepa BA3826 WT (veículo), $p < 0,0001$ (***).

A expressão do gene *visP*, tanto para a cepa C227-11 WT exposta ao LED209 quanto para a cepa mutante para *qseC*, apresentou uma superexpressão nos dias 1, 3 e 10 após a infecção, exceto para a cepa mutante no dia 10 (Fig. 35). No entanto, a cepa BA3826 WT, após o tratamento com LED209, apresentou uma redução na expressão de *visP* de 2,2 vezes no dia 1 após a infecção. Nos dias 3 e 10, ocorreu um aumento de 2,5 e 1,2 vezes, respectivamente (Fig. 36). Quando a expressão de *visP* foi avaliada na cepa BA3826 mutante para *qseC*, ocorreu um notável aumento nos dias 1, 3 e 10 de 27, 992 e 3,4 vezes, respectivamente (Fig. 37). Os resultados apresentados *in vivo* acerca da expressão de *visP*, corroboram os resultados do notável aumento de expressão desse gene *in vitro*, após a deleção de *qseC*.

4.8. Modulação da microbiota intestinal humana no SEMH® e análise da produção de AGCC

Para avaliar a modulação da microbiota intestinal durante o período de infecção pela cepa C227-11 WT e *::qseC*, foi utilizada uma triplicata do cólon ascendente no modelo colônico *in vitro* SEMH®. O período experimental foi de 3 dias, e o material foi coletado individualmente nos dias 0, 1, 2, e 3 após a infecção, para extração de RNA e análise de expressão gênica, bem como para análise da produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Toda a análise foi realizada em comparação ao dia 0, ou seja, com dados do dia anterior à infecção. Além disso, a produção de toxina de Shiga foi mensurada por ELISA nos dias 1 e 3 após a infecção.

Figura 38. Abundância de filós após a infecção com a cepa C227-11 WT (Stx+).

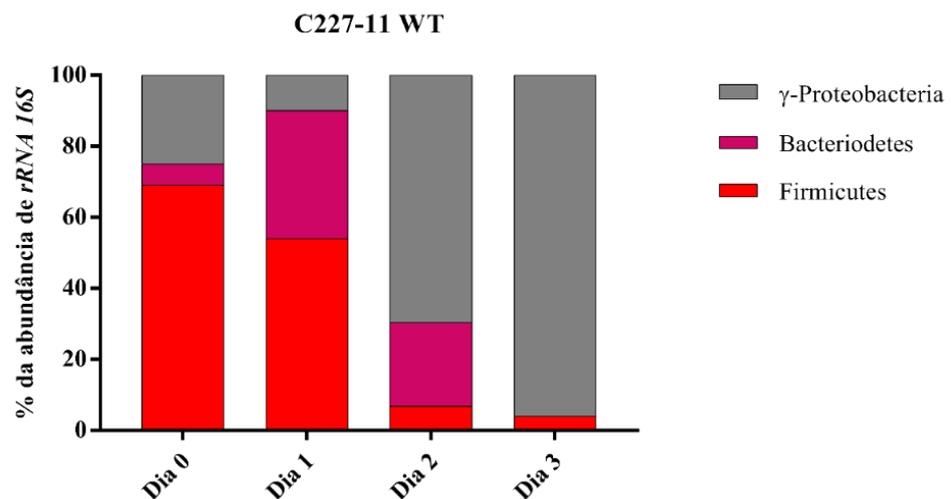


Fig. 38. Modulação da microbiota após a infecção com a cepa C227-11WT. Análise relativa da abundância de filós via qRT-PCR de *rRNA 16S*. Composição da microbiota dos dias 0 a 3 após a infecção.

Figura 39. Abundância de gêneros durante a infecção com a cepa C227-11 WT (Stx+).

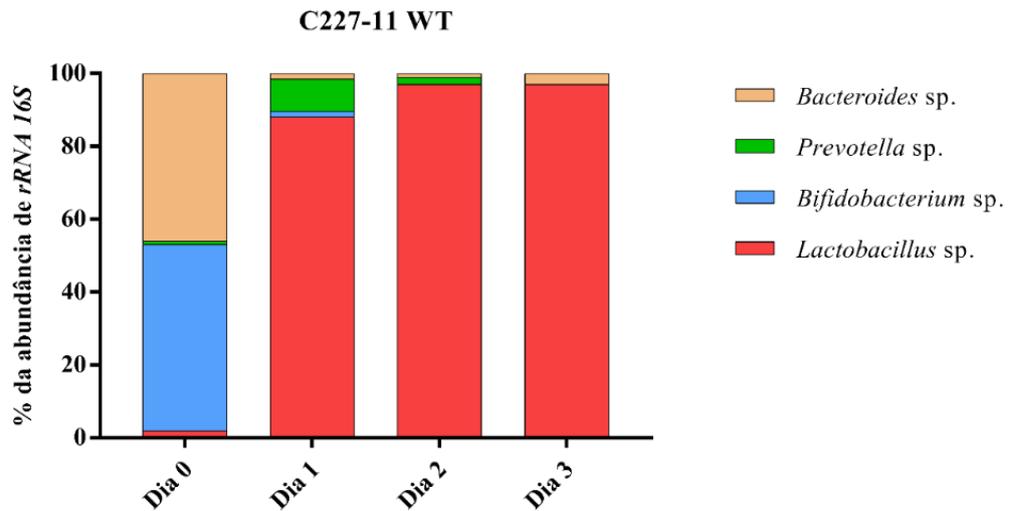


Fig. 39. Modulação da microbiota após a infecção com a cepa C227-11 WT. Análise relativa da abundância de gêneros via qRT-PCR de rRNA 16S. Composição de microbiota dos dias 0 ao 3 após a infecção.

Figura 40. Abundância de filos durante a infecção com a cepa C227-11 ::*qseC*.

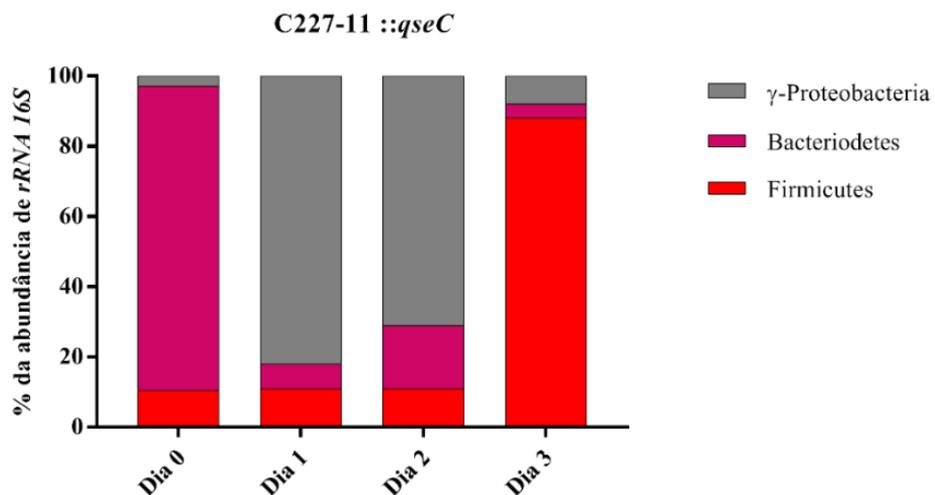


Fig. 40. Modulação da microbiota durante a infecção com a cepa C227-11 ::*qseC*. Análise relativa da abundância de filos via qRT-PCR de rRNA 16S. Composição de microbiota dos dias 0 ao 3 após a infecção.

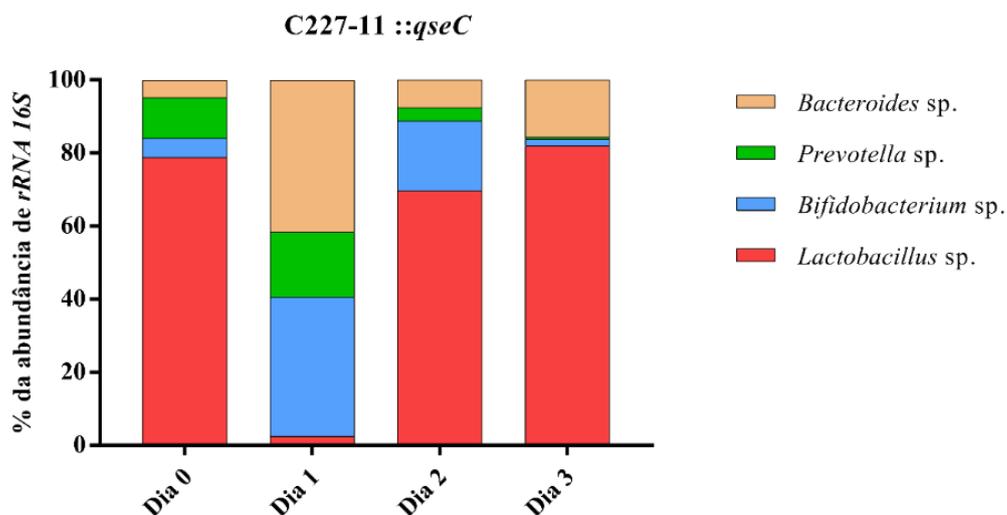
Figura 41. Abundância de gêneros durante a infecção com a cepa C227-11 ::*qseC*.

Fig. 41. Modulação da microbiota após a infecção com a cepa C227-11 ::*qseC*. Análise relativa da abundância de gêneros via qRT-PCR de *rRNA 16S*. Composição de microbiota dos dias 0 ao 3 após a infecção.

Durante o experimento com a cepa C227-11 WT, houve um aumento de 30% em Bacteroidetes, uma diminuição de 15% de γ -Proteobacteria e Firmicutes, no dia 1 após a infecção quando comparados ao dia 0. O filo γ -Proteobacteria foi predominante entre todos os filos analisados aqui após o primeiro dia de infecção, atingindo um pico de 70% e 96% nos dias 2 e 3, respectivamente, com conseqüente diminuição de Firmicutes e Bacteroidetes (Fig. 38). Ao nível de gênero, observamos uma diminuição de 44% nos níveis de *Bacteroides* sp., 49% de *Bifidobacterium* sp. e um pequeno aumento de 8% em *Prevotella* sp no dia 1 após a infecção quando comparados ao dia 0. No entanto, o gênero *Lactobacillus* sp. mostrou um aumento notável, atingindo um nível de 97%, nos dias 2 e 3 após a infecção (Fig. 39).

Por outro lado, durante o ensaio com a cepa C227-11 ::*qseC*, o filo γ -Proteobacteria representou 82% e 71% no dia 1 e no dia 2 após a infecção, respectivamente. No entanto, no dia 3 após a infecção, foi evidenciado um decréscimo drástico nos níveis de γ -Proteobacteria, que representou apenas 8%, seguido por 4% de Bacteroidetes, e um grande aumento de 88% para Firmicutes, todos no dia 3 após a infecção (Fig. 40). A análise de gêneros demonstrou

apenas 3% de *Lactobacillus* sp. no dia 1, com o seu aumento gradual que atingindo um pico de 70% e 82% nos dias 2 e 3 após a infecção, respectivamente. Além disso, foi observada uma baixa quantidade de *Prevotella* sp. e *Bacteroides* sp. no dia 2 (4% e 8%) e no dia 3 após a infecção (1% e 16%) (Fig. 41).

Juntos, esses dados apontam para uma modulação diferenciada da microbiota na presença e ausência do sensor quinase QseC na cepa C227-11(Stx+).

Figura 42. Produção de AGCC durante a infecção com a cepa C227-11 WT (Stx+).

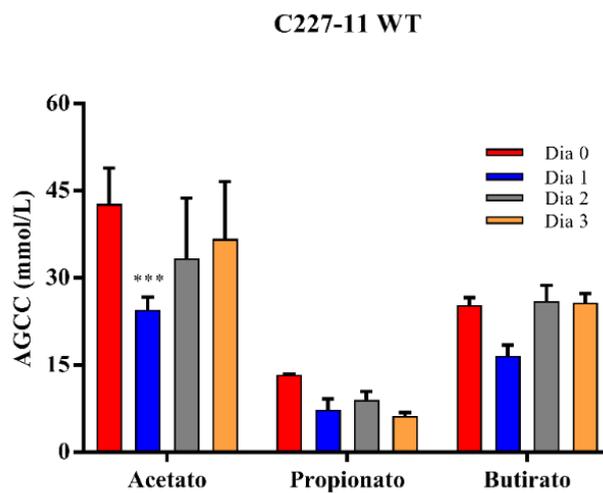


Fig. 42. Análise da produção de acetato, propionato e butirato (mmol/L) via cromatografia gasosa do dia 0 ao dia 3 após a infecção com a cepa C227-11 WT. As análises estatísticas foram realizadas individualmente para cada AGCC comparado ao dia 0, $p < 0,0001$ (***)

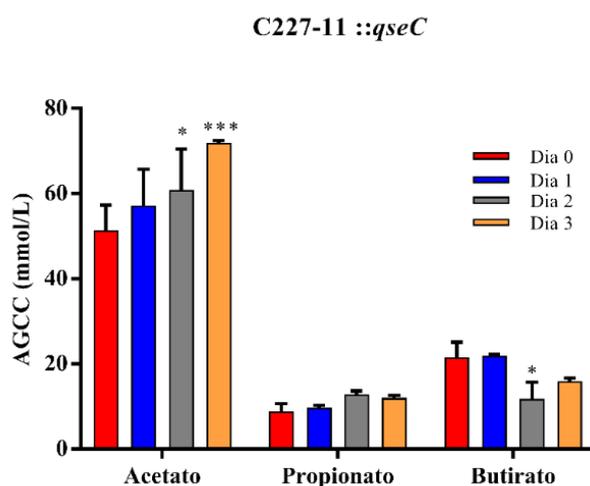
Figura 43. Produção de AGCC durante a infecção com a cepa C227-11 ::*qseC*.

Fig. 43. Análise da produção de acetato, propionato e butirato (mmol/L) via cromatografia gasosa do dia 0 ao dia 3 após a infecção com a cepa C227-11 ::*qseC*. As análises estatísticas foram realizadas individualmente para cada AGCC comparado ao dia 0, $p < 0,05$ (*), $p < 0,0001$ (***)).

Foi analisada a produção de AGCC durante a infecção no SEMH® por cromatografia em fase gasosa do dia 0 ao dia 3 após a infecção. Os resultados da infecção com a cepa C227-11 WT mostraram uma diminuição de 42,6% na produção de acetato no dia 1 após a infecção, e nenhuma diferença significativa foi observada nos dias seguintes, bem como para propionato e butirato (Fig.42). Durante a infecção com a cepa C227-11 :: *qseC*, foi observado um aumento gradual dos níveis de acetato do dia 0 ao dia 3 após a infecção, com um notável aumento de 18,5% e 39,9% nos dias 2 e 3, respectivamente (Fig.43). A produção de propionato não mostrou mudanças significativas, por outro lado, a produção de butirato mostrou uma diminuição de 45,4% no dia 2 após a infecção (Fig.43).

Figura 44. Análise da produção de toxina de Shiga durante a infecção com as cepas C227-11 (Stx+).

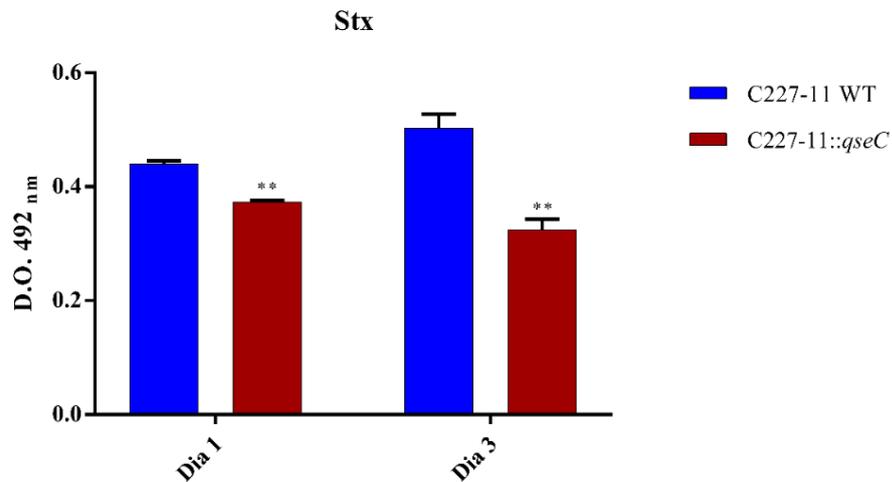


Fig. 44. Análise da produção de Stx via ELISA nos dias 1 e 3 após a infecção com as cepas C227-11 WT e *::qseC*. As análises estatísticas foram realizadas individualmente para cada dia e em comparação com a cepa C227-11 WT, $p < 0,001$ (**).

A análise de produção de toxina de Shiga evidenciou uma significativa redução de 15,9% e 36% nos dias 1 e 3 após a infecção com a cepa C227-11 *::qseC*, quando comparada à cepa selvagem (Fig. 44). Esse resultado enfatiza mais uma vez a importância de QseC durante o processo infeccioso causado por EAEC.

5. Discussão

A EAEC é um patógeno emergente de distribuição global e que possui grande heterogeneidade quanto aos fatores de virulência associados à sua patogênese. Deste modo, existem muitos pontos a serem desvendados acerca do desenvolvimento da doença diarreica por bactérias dessa categoria (ESTRADA-GARCIA *et al.*, 2014). O papel do sistema de 2-componentes QseBC na regulação da cascata de expressão de genes de virulência, tem sido

descrito em diversos importantes enteropatógenos humanos, como *E. coli* uropatogênica, *E. coli* enterohemorrágica, *S. Typhimurium*, entre outros (KENDALL; SPERANDIO, 2016).

Conforme esperado, foi observado que a ausência de *qseC* não resultou em prejuízos para o crescimento de ambas as cepas de EAEC O104:H4 Stx+ e Stx- (Fig. 7 e 8), assim como evidenciado anteriormente para EHEC (RASKO *et al.*, 2008).

A formação de biofilme é um fator de suma importância para o estabelecimento do nicho infeccioso de diversos patógenos e que pode contribuir para os casos de infecções crônicas. Essas colônias bacterianas envolvidas por uma densa massa exopolissacarídica (EPS), resulta em uma maior tolerância a compostos tóxicos, assim como às respostas de defesa do sistema imunológico do hospedeiro (KOO *et al.*, 2017). O biofilme é uma característica marcante de EAEC e, provavelmente, está relacionado aos casos reportados de diarreia persistente (NATARO; STEINER; GUERRANT, 1998). Na ausência do sensor quinase QseC, a cepa C227-11 (Stx+), apresentou uma significativa redução na formação da biomassa total de biofilme, que inclui a matriz de EPS (Fig.9), diferentemente da cepa BA3826 (Stx-), que apresentou um ligeiro aumento (Fig.10). Sendo assim, o fato da cepa C227-11 ::*qseC* ter produzido uma biomassa menos densa, pode resultar em uma maior susceptibilidade às respostas contra a sua colonização durante o processo infeccioso *in vivo* (Fig. 30). Além disso, esse resultado corrobora um trabalho anterior, que evidenciou um resultado semelhante na diminuição da formação de biofilme pela cepa C227-11 (Stx+), após o bloqueio de QseC por LED209 (CURTIS *et al.*, 2014).

A adesão inicial ao epitélio intestinal é essencial para que ocorra a colonização e formação de biofilme, bem como para que se estabeleça o processo infeccioso causado por EAEC (HUANG *et al.*, 2004). Durante os ensaios com células intestinais polarizadas Caco-2, a cepa C227-11 mutante para *qseC*, apresentou um fenótipo atenuado de adesão (Fig. 11), mas nenhuma diferença para a cepa BA3826 ::*qseC* (Fig. 12), corroborando novamente os resultados *in vivo* para ambas as cepas de EAEC (Fig. 30-32).

Outro importante fator de virulência bacteriano é a motilidade flagelar, uma vez que confere à bactéria a habilidade de se deslocar em busca de novos nichos de colonização, assim como para a fuga de substâncias nocivas à sua sobrevivência (VAN HOUDT; MICHIELS, 2005; PARK; PONTES; GROISMAN, 2015). Ambas as cepas, C227-11 e BA3826 mutantes para *qseC*, não apresentaram diferença para o perfil de motilidade no período de 24 horas de incubação (Fig. 13 e 14). No entanto, levando em consideração que a expressão de *fliC* esteve extremamente reduzida nas duas cepas mutantes (Fig. 20 e 21), seria interessante avaliar a motilidade de ambas em períodos anteriores a este de 24 horas. Anteriormente, foi evidenciado que o flagelo da cepa C227-11, além de atuar na motilidade, apresentou um importante papel na resposta inflamatória, com grande indução de IL-8 (KUNSMANN *et al.*, 2015). Além disso, a flagelina H4 tem um papel importante durante as infecções extraintestinais de *E. coli*, como em UPEC ST131, participando da adesão em células epiteliais, invasão e aumento da indução de IL-10 (KAKKANAT *et al.*, 2015).

De fato, QseC atua na regulação de outros importantes fatores de virulência na cepa C227-11 (Stx+) e, na sua ausência, ocorreu um aumento da expressão desses genes (Fig. 15), desta forma funcionando como um regulador negativo. No entanto, ao mesmo tempo em que se apresenta superexpressa a fímbria AAF-I (*aggA*), a proteína dispersina (*aap*) apresenta uma expressão ainda maior (Fig. 15). A dispersina possui um importante papel na dispersão da bactéria no lúmen intestinal e de inibição parcial da auto-agregação das células bacterianas (SHEIKH *et al.*, 2002), sendo assim, é possível levantar a hipótese de que a elevada expressão *aap* possa ter contribuído para um processo antagônico quanto à adesão ao epitélio do intestino mediada pela AAF-I, *in vivo* (Fig.30). Do mesmo modo, uma menor adesão ao epitélio intestinal (Fig. 30), pode ter diminuído a influência do efeito de mucinase da proteína Pic (*pic*) no processo de colonização (HARRINGTON *et al.*, 2009), cujo gene também se apresenta mais expresso na ausência de *qseC* (Fig.16). A expressão do gene *sigA*, que codifica para a

serinoprotease SigA, assim como *pic*, apresentou-se menos expresso para cepa C227-11::*qseC* (Fig. 16), corroborando mais uma vez os resultados de menor colonização *in vivo* (Fig. 30). Em um trabalho anterior publicado por Munera e colaboradores (2013), evidenciou-se que tanto Pic quanto SigA, apresentam um papel importante para a cepa C227-11 (Stx+) durante a colonização em coelhos.

Aar (regulador ativado por AggR) é uma pequena proteína pertencente à família ANR (reguladores negativos de AraC), descrita na cepa protótipo 042 de EAEC como um regulador negativo de AggR (SANTIAGO *et al.*, 2014). Além disso, foi também descrita sua atividade antirrepressora através de sua interação com H-NS, uma proteína de regulação global que geralmente está relacionada como repressora de transcrição gênica em *E. coli* (DORMAN, 2004; MICKEY; NATARO, 2020). Foi evidenciado para a cepa 042, que Aar ativa genes *housekeeping* que são independentes da regulação de AggR, incluindo H-NS (SANTIAGO *et al.*, 2017). Embora a expressão de *aar* esteja aumentada na cepa C227-11::*qseC* (Fig. 15), é possível que sua função repressora não seja efetivamente evidenciada para *aggR*, bem como para os genes por ele regulado, uma vez que *aggR* também apresentou uma elevada expressão. A transcrição de *aar* é ativada por AggR, sendo assim, uma superexpressão de *aggR* corrobora o aumento de sua expressão (Fig. 15).

O relevante aumento da expressão do gene *aggR* que codifica para o AggR, que atua na ativação transcricional de *aggA* e *aap*, corrobora para a observada superexpressão desses genes (Fig. 15). O AggR, ativa a transcrição de pelo menos 44 genes, sendo que muitos ainda não foram completamente caracterizados, além de regular positivamente sua própria expressão (MORIN *et al.*, 2010; MORIN *et al.*, 2013). Anteriormente, foi evidenciado que a deleção de *aggA* e *aggR* na cepa C227-11 (Stx+) de EAEC, reduziu significativamente a adesão em células epiteliais T84, além da permeabilidade dessa monocamada celular e, conseqüentemente, menor translocação da toxina de Shiga (BOISEN *et al.*, 2014). No entanto, durante a colonização da mesma cepa em coelhos, o plasmídeo pAA, que alberga os genes *aggR*, *aap*, *aggA*, não se

apresentou importantes durante o processo infeccioso neste modelo, sugerindo que apesar de seu papel fundamental na adesão bacteriana *in vitro*, é possível que esses genes presentes nele não sejam requeridos da mesma forma *in vivo*. Além disso, a expressão desses genes foi notavelmente baixa *in vivo*, quando comparada com os resultados *in vitro* (MUNERA *et al.*, 2014). Recentemente, foi publicado um trabalho com modelo de infecção de camundongos, onde foi evidenciado que a cepa C227-11 curada do plasmídeo pAA, bem como cepas mutantes para *aggR* e *aggA*, apresentaram uma menor colonização e redução da morbidade dos animais (BOISEN *et al.*, 2019). Deste modo, é possível observar que os diferentes modelos *in vivo* de infecção para EAEC, podem proporcionar diferentes respostas quanto aos seus fatores de virulência durante o processo infeccioso. Além disso, esses diferentes resultados corroboram às diversas limitações existentes quanto aos modelos animais para o estudo da patogênese de EAEC, uma vez que eles apresentam respostas variadas quanto ao desenvolvimento de morbidade e mortalidade durante o processo infeccioso (PHILIPSON *et al.*, 2013).

Por outro lado, para a cepa BA3826, a ausência de *qseC* resultou em menor expressão de *aggR* e, conseqüentemente, na diminuição da expressão de *aar* (Fig. 17). Sendo assim, ocorreu uma superexpressão dos genes ativados por AggR, *agg3A* (AAF-III) e *aap* (dispersina), pois houve uma menor disponibilidade do seu regulador negativo Aar (Fig. 17), assim como evidenciado na literatura anteriormente para a cepa 042 de EAEC (MICKEY; NATARO, 2020). No entanto, *pic* e *sigA* não apresentaram diferenças significativas para a cepa BA3826::*qseC* (Fig. 18). Em conjunto, esses resultados provavelmente contribuíram tanto para a maior formação de biofilme *in vitro* (Fig. 10), quanto para uma colonização mais eficiente *in vivo* (Fig. 31 e 32).

A expressão da toxina de Shiga (*stx2a*) apresentou uma significativa diminuição na ausência de *qseC* na cepa C227-11 (Stx+) (Fig.19). Esse resultado corrobora um estudo anterior em que o bloqueio de QseC por LED209, diminuiu a expressão de Stx nessa cepa (CURTIS *et al.*, 2014). Em um estudo realizado por Zangari e colaboradores (2013), foi evidenciado que a

Stx foi o fator chave para a morbidade e mortalidade dos camundongos infectados com a cepa C227-11 (Stx+). Uma vez que a produção dessa toxina, em conjunto com a adesão mediada principalmente pela AAF-I, são importantes fatores de virulência dessa cepa de surto (ZANGARI *et al.*, 2013; BOISEN *et al.*, 2015), as modificações geradas pelo bloqueio dessa via de sinalização mediada por QseC, abrem perspectivas promissoras quanto ao estudo desse sensor em EAEC.

A proteína periplasmática VisP foi descrita na tolerância ao estresse, como pH ácido, exposição ao peróxido de hidrogênio e cloreto de cádmio, em *E. coli* não patogênica e *S. Typhimurium* (LEE *et al.*, 2010; MOREIRA *et al.*, 2013). Recentemente, foi evidenciado pelo nosso grupo, que em *S. Typhimurium*, VisP está diretamente relacionada à montagem das cadeias de antígeno-O, uma cadeia polissacarídica altamente imunogênica do LPS, além de seu importante papel na sobrevivência no interior de macrófagos, na colonização em modelo murino de infecção e perfil de motilidade (DA SILVA *et al.*, 2018). O LPS é um componente essencial do envelope de células bacterianas Gram-negativas e está diretamente relacionado à integridade celular, como no equilíbrio de permeabilidade da membrana externa, impedindo a entrada de substâncias indesejadas (RAETZ; WHITFIELD, 2002). As cepas C227-11 (Stx+) e BA3826 (Stx-), em meio com pH 7.2 (neutro), apresentaram uma superexpressão de *visP*, na ausência de *qseC* (Fig. 22 e 23), como previamente evidenciado para EHEC e *S. Typhimurium* (MOREIRA *et al.*, 2013). O pH ácido do estômago é uma das primeiras barreiras a serem superadas durante o processo de colonização por bactérias entéricas (GORDEN; SMALL, 1993; ARNOLD; KASPAR, 1995). Quando analisada em meio com pH 3.0, semelhante ao encontrado no estômago, a expressão de *visP* na ausência de *qseC*, não apresentou diferenças significativas para a cepa C227-11 (Stx+), mas a cepa BA3826 (Stx-) apresentou um aumento significativo na expressão nessas condições (Fig. 24 e 25). Desta forma, a expressão de *visP*, apresenta-se de maneira diferente entre as duas cepas de EAEC na ausência de *qseC*, bem como outros fatores de virulência clássicos dessa categoria bacteriana.

As OMVs são consideradas um importante mecanismo de distribuição de uma grande variedade de biomoléculas em bactérias Gram-negativas, que incluem fatores de virulência (JAN, 2017). Em um estudo realizado anteriormente, foi demonstrado que a cepa O104:H4 de EAEC, utiliza as OMVs para liberar um conjunto de fatores de virulência, tais como toxina de Shiga, flagelina e LPS. Evidenciando, assim, um mecanismo diretamente relacionado a danos nas células do hospedeiro e estabelecimento do seu nicho infeccioso (KUNSMANN *et al.*, 2015; BAUWENS *et al.*, 2017).

Os nossos resultados evidenciaram uma considerável diminuição da internalização de OMVs produzidas pela cepa C227-11 mutante para *qseC* (Fig. 27-29), o que pode suscitar a hipótese de uma menor distribuição de fatores de virulência, como Stx e flagelina, uma vez que essa cepa apresentou uma menor expressão desses fatores (Fig. 19 e 20). Além disso, foi evidenciado que a toxina de Shiga transportada pelas OMVs, foi diretamente relacionada com a citotoxicidade em ensaios com células epiteliais intestinais, e que o LPS e a flagelina associados às OMVs, foram os maiores responsáveis pela indução da secreção de IL-8, uma citocina pró-inflamatória (KUNSMANN *et al.*, 2015). Deste modo, uma menor quantidade de OMVs associadas às células intestinais apresentada aqui (Fig. 27-29), também pode corroborar para uma menor citotoxicidade, bem como para uma menor indução da ativação de processos inflamatórios, assim como evidenciado anteriormente para EAEC, EHEC e para vários outros patógenos (ELLIS; KUEHN, 2010; KAPARAKIS-LIASKOS; FERRERO, 2015; KUNSMANN *et al.*, 2015; BIELASZEWSKA *et al.*, 2018).

Inicialmente, o composto LED209 foi descrito na inibição da autofosforilação de QseC, antagonizando diretamente a ligação de epinefrina ao sensor quinase. Além disso, ensaios *in vitro* com LED209, demonstraram a diminuição global da expressão de genes de virulência em EHEC, *S. Typhimurium* e *F. tularensis* (RASKO *et al.*, 2008). Outros resultados promissores com o LED209 foram evidenciados na redução de formação de biofilme em isolados clínicos de bactérias MDR, como UPEC, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, bem como

na cepa de EAEC C227-11(Stx+) (CURTIS *et al.*, 2014). Além disso, outro estudo recente mostrou a importância do LED209 como estratégia terapêutica para bactérias associadas à colite, durante a doença inflamatória intestinal causada por *E. coli* aderente-invasiva (AIEC) (ROOKS *et al.*, 2017).

A colonização *in vivo*, após o bloqueio parcial de QseC por LED209 ou na ausência desse sensor, evidenciou um processo de colonização menos eficiente para a cepa C227-11 (Stx+) (Fig. 30), corroborando os resultados *in vitro* de formação de biofilme, adesão e expressão de genes de virulência (Fig. 9, 11, 15, 16). No entanto, a cepa BA3826 (Stx-) exposta ao LED209, apresentou um padrão de colonização estatisticamente não significativo, quando comparado com a cepa não exposta, embora tenha apresentado uma tendência a maior colonização (Fig. 31). De modo semelhante, a cepa BA3826 mutante para *qseC*, apresentou diferença significativa apenas no dia 3 após a infecção, sem diferenças consideráveis até o final da colonização (Fig. 32). Sendo assim, esses resultados também corroboram àqueles apresentados *in vitro*, com uma maior biomassa total na formação de biofilme e nenhuma diferença na adesão em células Caco-2 (Fig. 10 e 12), bem como à expressão de *agg3A* (AAF-III) (Fig. 17). Provavelmente, a baixa expressão de *fliC* (Fig. 21), não contribuiu para uma deficiência de sua colonização *in vivo* (Fig.31 e 32).

Não obstante, esses dados corroboram estudos anteriores com camundongos infectados com *S. Typhimurium* e *F. tularensis*, que evidenciaram uma porcentagem significativamente maior de sobrevivência, quando tratados com o LED209. Além disso, esses patógenos apresentaram menor eficiência durante a colonização *in vivo*, quando o LED209 foi usado, especialmente durante o período inicial da infecção (RASKO *et al.*, 2008; CURTIS *et al.*, 2014). Ademais, a cepa C227-11 (Stx+) mutante para o gene *qseC*, apresentou resultados semelhantes aos da cepa selvagem que foi exposta ao LED209, um achado que concorda com o papel de QseC relatado anteriormente para EHEC e *S. Typhimurium* durante infecções *in vivo* (BEARSON; BEARSON, 2008; RASKO *et al.*, 2008; MOREIRA *et al.*, 2016).

A análise de expressão gênica de *qseC in vivo*, após o tratamento com LED209, evidenciou o boqueio parcial da expressão desse gene (Fig. 33 e 34), o que se mostrou importante para os dias iniciais da colonização (Fig. 30 e 31). Além do que, o aumento da expressão de *qseC* no dia 10 após a infecção, nas cepas C227-11 (Stx+) e BA3826 (Stx-) (Fig. 33 e 34), coincide com o início do declínio da colonização (Fig. 30 e 31) e provavelmente menor disponibilidade do composto, uma vez que o LED209 foi administrado durante o período inicial das infecções nesses camundongos, como anteriormente descrito (RASKO *et al.*, 2008). Os dados aqui apresentados enfatizam o papel relevante do sensor quinase QseC durante o curso da doença causada por cepas produtoras de toxina Shiga, como as infecções causadas por EHEC O157:H7 em modelos de infecção de camundongo, coelho e bovino (VLISIDOU *et al.*, 2004; CLARKE *et al.*, 2006).

A expressão de *visP in vivo*, após o bloqueio de QseC com LED209 ou na ausência de *qseC*, apresentou níveis acentuados em ambas as cepas C227-11 (Stx+) e BA3826 (Stx-) (Fig. 35, 36 e 37), de forma similar aos resultados apresentados *in vitro* (Fig. 22 e 23). Não se sabe exatamente por que esse aumento ocorre, no entanto, é provável que a ausência de *qseC* resulte na ativação de outros mecanismos de sobrevivência, assim como VisP.

A microbiota intestinal exerce um papel fundamental na resistência à colonização por patógenos invasores, envolvendo mecanismos diretos e indiretos e, junto com o sistema imunológico, funciona como uma linha essencial de defesa do hospedeiro. Entre os mecanismos diretos de defesa, encontram-se a liberação de bacteriocinas, o Sistema de Secreção do Tipo VI (T6SS) e a produção de AGCC. De forma indireta, esses mecanismos melhoram as respostas imunológicas do hospedeiro, além da competição por espaço e nutrientes (KAMADA *et al.*, 2013; MCKENNEY; KENDALL, 2016). Portanto, é crucial a melhor compreensão da interação entre a microbiota e patógenos intestinais durante o desenvolvimento da doença.

Um desequilíbrio evidente foi observado durante a infecção pela cepa C227-11 WT no SEMH®, com o aumento de γ -Proteobacteria e *Lactobacillus* sp. (Fig. 38 e 39). Os altos níveis do filo γ -Proteobacteria, que inclui bactérias Gram-negativas, tendem a aumentar a permeabilidade intestinal e desencadear um processo inflamatório por liberar LPS (lipopolissacarídeo), uma endotoxina bacteriana. Esse filo alberga enteropatógenos cruciais, como os patótipos de *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Vibrio* e *Pseudomonas*; portanto, seu aumento pode ser permissivo à saúde humana (FARHADI *et al.*, 2003; CANI *et al.*, 2007; WILLIAMS *et al.*, 2010). Por outro lado, durante a infecção com a cepa C227-11 ::*qseC*, claramente a recuperação da microbiota foi observada no dia 3 após a infecção (Fig.40 e 41). Foi observado também, um alto nível de Firmicutes (Fig. 40), considerado o maior produtor de bacteriocinas (DRISSI *et al.*, 2015), assim como níveis significativos de *Bacteroides* sp. e *Bifidobacteria* sp. (Fig.41), ambos importantes produtores de acetato (WRZOSEK *et al.*, 2013; LEBLANC *et al.*, 2017). Membros do filo Bacteroidetes, mais especificamente *Bacteroides* sp., são os principais responsáveis pela produção de acetato e propionato, enquanto membros do filo Firmicutes, são os principais produtores de butirato (LEVY; THAISS; ELINAV, 2016). No entanto, sabe-se que membros dos quatro principais filos contribuem substancialmente para a produção de AGCC, portanto, o desequilíbrio da microbiota intestinal pode resultar em alterações na produção desses metabólitos e distúrbios na saúde do indivíduo (SUN; O'RIORDAN, 2013; RÍOS-COVIÁN *et al.*, 2016). Um trabalho anterior evidenciou que, durante a infecção por *E. coli* enterotoxigênica em células intestinais Caco-2, as cepas probióticas *Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus rhamnosus* inibiram a adesão desse patógeno e diminuíram o processo inflamatório (ROSELLI *et al.*, 2006). Algumas espécies de *Bacteroides* são capazes de digerir polissacarídeos no cólon e competir de forma mais eficiente por nutrientes, em comparação com os patógenos entéricos como EHEC, *Salmonella* e *Shigella* (MCKENNEY; KENDALL, 2016). Interessantemente, as duas cepas de EAEC causaram uma redução proeminente nos níveis de *Prevotella* sp. nos dias 2 e 3 após a infecção (Fig. 39 e 41).

Embora esse gênero esteja amplamente presente em indivíduos saudáveis, algumas espécies de *Prevotella* podem estar associadas a doenças intestinais e estimular a produção de mediadores inflamatórios durante a colonização (LARSEN, 2017).

Ademais, um trabalho do grupo evidenciou a importância de QseC durante a infecção por *Citrobacter rodentium*, um patógeno natural de camundongos que é utilizado como modelo alternativo de lesão A/E *in vivo*, causada por patógenos como EHEC e EPEC, na redução da expressão de fatores de colonização e virulência como *espA* e *tir*, além de diminuir os níveis de γ -Proteobacteria (MOREIRA *et al.*, 2016).

Os níveis adequados de AGCC no intestino são importantes para a saúde humana, pois desempenham funções vitais para o sistema gastrointestinal (HAVENAAR, 2011). Aqui, a infecção pela cepa C227-11 WT não apresentou alterações significativas nos níveis de AGCC, exceto uma diminuição de 42% na produção de acetato no dia 1 após a infecção (Fig. 42). Provavelmente, a ausência do sensor histidina quinase QseC na cepa C227-11 (Stx+), contribuiu para a modulação positiva da microbiota durante o período de infecção e para o aumento da produção de acetato (Fig. 43). Trabalhos prévios com esses metabólitos também mostraram que eles podem atravessar a membrana bacteriana e se acumular no citoplasma, levando ao influxo de prótons e consequente acidificação intracelular (SUN; O'RIORDAN, 2013). Especificamente, altos níveis de acetato produzidos por *Bifidobacterium* sp. foram correlacionados com a proteção contra a infecção por EHEC O157:H7 em camundongos. Além disso, o acetato impediu a diminuição da resistência elétrica transepitelial, o que contribuiu para uma menor translocação da toxina Shiga para a corrente sanguínea (FUKUDA *et al.*, 2011). Condições ácidas *in vitro* inibiram o crescimento de *S. dublin* e EHEC O157:H7 na presença de AGCC, como acetato (EL-GEDAILY *et al.*, 1997; SHIN; SUZUKI; MORISHITA, 2002). Os níveis de acetato, propionato e butirato no lúmen intestinal atingem uma proporção de aproximadamente 60:20:20 mM e sua abundância está relacionada à composição da microbiota, dieta, características genéticas do hospedeiro, bem como com tráfego intestinal (WONG *et al.*,

2006; CHAMBERS *et al.*, 2018). Por exemplo, durante a infecção por *Shigella flexneri in vivo*, outro importante patógeno intestinal humano, a administração de AGCC como acetato, propionato e butirato, na proporção distinta de 60:30:40mM, resultou em diminuição da colonização e melhora dos sintomas clínicos (RABBANI *et al.*, 1999). O acetato é produzido principalmente por bactérias do cólon, como *Lactobacillus sp.*, *Bifidobacterium sp* e *Bacteroides sp.* (FERNÁNDEZ *et al.*, 2016), assim, o declínio deste AGCC no dia 1 após a infecção durante o experimento com a cepa C227-11 WT (Fig. 42), provavelmente está relacionado à queda repentina dessas espécies, levando a um desequilíbrio de sua produção nesse período e ao restabelecimento nos dias seguintes (Fig. 39). Por outro lado, a proporção entre acetato, propionato e butirato em cada dia permaneceu sem alterações significativas e não pôde ser diretamente correlacionada com as alterações da microbiota no período avaliado (Fig. 38, 39 e 42). Outro ponto muito interessante, foi o aumento na produção de acetato nos dias 2 e 3 após a infecção com a cepa C227-11 ::*qseC*, que está diretamente correlacionado com os altos níveis de *Lactobacillus sp.*, *Bacteroides sp.* e *Firmicutes* (Fig. 40, 41 e 43), além disso, o filo Firmicutes se estabelece como o principal produtor de butirato (FENG; AO; PENG *et al.*, 2018).

Por fim, a produção de toxina de Shiga nos dias 1 e 3 após a infecção (Fig. 44), apresentou uma significativa diminuição na ausência de *qseC*, corroborando o baixo nível de expressão gênica de *stx2a in vitro* (Fig. 19), bem como a importância desse sensor quinase para a produção dessa toxina, conforme evidenciado anteriormente para EHEC (RASKO *et al.*, 2008).

6. Conclusões

A sinalização química mediada por QseC apresenta influência no desenvolvimento da patogênese de ambas as cepas de EAEC O104:H4 Stx+ e Stx-, no entanto, por mecanismos distintos. Sendo assim, se faz necessária a compreensão mais ampla acerca do papel detalhado do sensor quinase QseC, conjuntamente com o regulador de resposta QseB, na regulação desses mecanismos em EAEC.

Visivelmente, demonstramos aqui que o bloqueio dessa via de sinalização na cepa C227-11 (Stx+), resultou em um desequilíbrio na expressão de fatores de virulência e menor habilidade de colonização *in vivo*, além de uma menor internalização de OMVs em linhagem de células intestinais, ou seja, influencia o estabelecimento inicial do processo patogênico. Além disso, permitiu o restabelecimento da microbiota intestinal humana, aumento da produção de acetato e níveis equilibrados de propionato e butirato, assim como uma menor produção de Stx, durante a infecção no modelo colônico *in vitro* SEMH®.

Finalmente, nossos resultados enfatizam o importante potencial de QseC como um dos alvos de estudos no desenvolvimento de novas terapias para infecções por EAEC, principalmente levando em consideração a sua condição de bloqueador da cascata de virulência desses patógenos.

7. Referências bibliográficas

ADACHI, J. A. *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* as a major etiologic agent in traveler's diarrhea in 3 regions of the world. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. 12, p. 1706-09, jun. 2001. DOI: 10.1086/320756.

AL SAFADI, R. *et al.* Correlation between *in vivo* biofilm formation and virulence gene expression in *Escherichia coli* O104:H4. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e416-28, jul. 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0041628.

AL-HASANI, K. *et al.* The sigA gene which is borne on the she pathogenicity island of *Shigella flexneri* 2a encodes an exported cytopathic protease involved in intestinal fluid

accumulation. **Infect Immun**, v. 68, n. 5, p. 2457-63, maio 2000. DOI: 10.1128/IAI.68.5.2457-2463.2000.

AL-LAHHAM, S. H. *et al.* Biological effects of propionic acid in humans; metabolism, potential applications and underlying mechanisms. **Biochim Biophys Acta**, v.1801, n. 11, p. 1175-83, nov. 2010. DOI: 10.1016/j.bbali.2010.07.007.

AMANO, A.; TAKEUCHI, H.; FURUTA, N. Outer membrane vesicles function as offensive weapons in host-parasite interactions. **Microbes Infect**, v.12, n. 11, p. 791-98, out. 2010. DOI: 10.1016/j.micinf.2010.05.008.

AMAYA, E. *et al.* Antibiotic resistance patterns of intestinal *Escherichia coli* isolates from Nicaraguan children. **J Med Microbiol**, v. 60, n. Pt 2, p. 216-22, fev. 2011. DOI: 10.1099/jmm.0.020842-0.

ANDRADE, F. B. *et al.* Distribution of serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae in typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect Genet Evol**, v. 50, p. 83-86, jun. 2017. DOI: 10.1016/j.meegid.2017.02.018.

ARNOLD, K. W.; KASPAR, C. W. Starvation- and stationary-phase-induced acid tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. **Appl Environ Microbiol**, v. 61, n. 5, p. 2037-9, maio 1995. DOI: 10.1128/aem.61.5.2037-2039.1995.

ASLANI, M. M. *et al.* Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) clinical isolates and their antibiotic resistance pattern. **Int J Infect Dis**, v. 15, n. 2, p. e136-39, fev. 2011. DOI: 10.1016/j.ijid.2010.10.002.

AUSUBEL, F. M. *et al.* **Short protocols in molecular biology**. 3rd ed. 1996. ISBN 0168-9525.

AVILA-CALDERON, E. D. *et al.* Roles of bacterial membrane vesicles. **Arch Microbiol**, v.197, n. 1, p 1-10, jan. 2015. DOI: 10.1007/s00203-014-1042-7.

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. 351-56, set. 2011. DOI: 10.1016/j.mimet.2011.06.010.

BASSLER, B. L. Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria. **Cell**, v. 109, n. 4, p. 421-24, maio 2002. DOI: 10.1016/s0092-8674(02)00749-3.

BASSLER, B. L.; LOSICK, R. Bacterially speaking. **Cell**, v. 125, n. 2, p. 237-46, abr. 2006. DOI: 10.1016/j.cell.2006.04.001.

BAUDRY, B. *et al.* A sensitive and specific DNA probe to identify enteroaggregative *Escherichia coli*, a recently discovered diarrheal pathogen. **J Infect Dis**, v. 161, n. 6, p. 1249-51, jun. 1990. DOI: 10.1093/infdis/161.6.1249.

BAUWENS, A. *et al.* Antibiotic-mediated modulations of outer membrane vesicles in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 and O157:H7. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, n. 9, p. e00937-17, set. 2017. DOI: 10.1128/AAC.00937-17.

BAXTER, N. T. *et al.* Dynamics of human gut microbiota and short-chain fatty acids in response to dietary interventions with three fermentable fibers. **mBio**, v. 10, n. 1, p. e02566-18, jan. 2019. DOI: 10.1128/mBio.02566-18.

BEARSON, B. L.; BEARSON, S. M. The role of the QseC quorum-sensing sensor kinase in colonization and norepinephrine-enhanced motility of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Microb Pathog**, v. 44, n. 4, p. 271-78, abr. 2008. DOI: 10.1016/j.micpath.2007.10.001.

BENJELLOUN-TOUIMI, Z.; SANSONETTI, P. J.; PARSOT, C. SepA, the major extracellular protein of *Shigella flexneri*: autonomous secretion and involvement in tissue invasion. **Mol Microbiol**, v. 17, n. 1, p. 123-35, jul. 1995. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_17010123.x.

BERGMAN, E. N. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiol Rev**, v. 70, n. 2, p. 567-90, abr. 1990. DOI: 10.1152/physrev.1990.70.2.567.

BERNIER, C.; GOUNON, P.; LE BOUGUÉNEC, C. Identification of an aggregative adhesion fimbria (AAF) type III-encoding operon in enteroaggregative *Escherichia coli* as a sensitive probe for detecting the AAF-encoding operon family. **Infect Immun**, v. 70, n. 8, p. 4302-11, ago. 2002. DOI: 10.1128/IAI.70.8.4302-4311.2002.

BHARGAVA, S. *et al.* Heat-resistant agglutinin 1 is an accessory enteroaggregative *Escherichia coli* colonization factor. **J Bacteriol**, v. 191, n. 15, p. 4934-42, ago. 2009. DOI: 10.1128/JB.01831-08.

BIELASZEWSKA, M. *et al.* Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 outer membrane vesicles induce interleukin 8 production in human intestinal epithelial cells by signaling via Toll-like receptors TLR4 and TLR5 and activation of the nuclear factor NF- κ B. **Int J Med Microbiol**, v. 308, n. 7, p. 882-89, out. 2018. DOI: 10.1016/j.ijmm.2018.06.004.

BIELASZEWSKA, M. *et al.* Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. **Lancet Infect Dis**, v. 11, n. 9, p. 671-76, set. 2011. DOI: 10.1016/S1473-3099(11)70165-7.

BIELASZEWSKA, M. *et al.* Enterohemorrhagic *Escherichia coli* hemolysin employs outer membrane vesicles to target mitochondria and cause endothelial and epithelial apoptosis. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 12, p. e1003797, dez. 2013. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003797.

BOISEN, N. *et al.* The presence of the pAA plasmid in the German O104:H4 Shiga toxin type 2a (Stx2a)-producing enteroaggregative *Escherichia coli* strain promotes the translocation of Stx2a across an epithelial cell monolayer. **J Infect Dis**, v. 210, n. 12, p. 1909-19, dez. 2014. DOI: 10.1093/infdis/jiu399.

BOISEN, N. *et al.* The role of the AggR regulon in the virulence of the Shiga Toxin-producing enteroaggregative *Escherichia coli* epidemic O104:H4 strain in mice. **Front Microbiol**, v. 10, p. 1824, ago. 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01824.

BOISEN, N. *et al.* Shiga toxin 2a and Enteroaggregative *Escherichia coli* - a deadly combination. **Gut Microbes**, v. 6, n. 4, p. 272-78, jul. 4 2015. DOI: 10.1080/19490976.2015.1054591.

BOISEN, N. *et al.* Short report: high prevalence of serine protease autotransporter cytotoxins among strains of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 80, n. 2, p. 294-301, fev. 2009. ISSN 1476-1645.

BOISEN, N. *et al.* New adhesin of enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF family. **Infect Immun**, v. 76, n. 7, p. 3281-92, jul. 2008. DOI: 10.1128/IAI.01646-07.

BOOP, C. A. *et al.* *Echerichia, Shigella and Salmonella*. In: MURRAY, P. R.; BARONE, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R. H. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**. 7th ed.. Washington, D. C.:ASM Press, 1999. cap. 28, p.459-65.

BRIAN, M. J. *et al.* Polymerase chain reaction for diagnosis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection and hemolytic-uremic syndrome. **J Clin Microbiol**, v. 30, n. 7, p. 1801-1806, jul. 1992. DOI: 10.1128/jcm.30.7.1801-1806.1992.

BUCHHOLZ, U. *et al.* German outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 associated with sprouts. **N Engl J Med**, v. 365, n. 19, p. 1763-70, nov. 2011. DOI: 10.1056/NEJMoa1106482.

BUERIS, V. *et al.* Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 7, p. 839-44, nov. 2007. DOI: 10.1590/s0074-02762007005000116.

BUFFIE, C. G.; PAMER, E. G. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 11, p. 790-801, nov. 2013. DOI: 10.1038/nri3535.

BYNDLOSS, M. X.; PERNITZSCH, S. R.; BAUMLER, A. J. Healthy hosts rule within: ecological forces shaping the gut microbiota. **Mucosal Immunol**, v. 11, n. 5, p. 1299-1305, set. 2018. DOI: 10.1038/s41385-018-0010-y.

CAÑAS, M. A. *et al.* Outer membrane vesicles from probiotic and commensal *Escherichia coli* activate NOD1-mediated immune responses in intestinal epithelial cells. **Front Microbiol**, v. 9, p. 498, mar. 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00498.

CANI, P. D. *et al.* Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. **Diabetes**, v. 56, n. 7, p. 1761-72, jul. 2007. DOI: 10.2337/db06-1491.

CANIZALEZ-ROMAN, A.; NAVARRO-GARCIA, F. Fodrin CaM-binding domain cleavage by Pet from enteroaggregative *Escherichia coli* leads to actin cytoskeletal disruption. **Mol Microbiol**, v. 48, n. 4, p. 947-58, maio 2003. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03492.x.

CHAMBERS, E. S. *et al.* Role of gut microbiota-generated short-chain fatty acids in metabolic and cardiovascular health. **Curr Nutr Rep**, v. 7, n. 4, p. 198-206, dez. 2018. DOI: 10.1007/s13668-018-0248-8.

CHANG, P. V. *et al.* The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 6, p. 2247-52, fev. 2014. DOI: 10.1073/pnas.1322269111.

CHAUDHURI, R. R. *et al.* Complete genome sequence and comparative metabolic profiling of the prototypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain 042. **PLoS One**, v. 5, n. 1, p. e8801, jan. 2010. DOI: 10.1371/journal.pone.0008801.

CLAESSION, M. J. *et al.* Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. **Nature**, v.488, n. 7410, p. 178-84, ago. 2012. DOI: 10.1038/nature11319.

CLARKE, M. B. *et al.* The QseC sensor kinase: a bacterial adrenergic receptor. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 103, p. 10420-10425, jul. 2006. DOI: 10.1073/pnas.0604343103.

CLARKE, M. B.; SPERANDIO, V. Transcriptional autoregulation by quorum sensing *E. coli* regulators B and C (QseBC) in enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC). **Mol Microbiol**, v. 58, p. 441-55, out. 2005a. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2005.04819.x.

CLARKE, M. B.; SPERANDIO, V. Transcriptional regulation of flhDC by QseBC and [sigma]28 (FliA) in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. **Mol Microbiol**, v. 57, p. 1734-49, set. 2005b. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2005.04792.x.

CLEMENTS, A. *et al.* Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Microbes**, v. 3, n. 2, p. 71-87, mar./abr. 2012. DOI: 10.4161/gmic.19182.

CRAVIOTO, A. *et al.* An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. **Curr Microbiol**, v. 3, n. 2, p. 95-99, mar. 1979. DOI: 10.1007/BF02602439.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nat Rev Microbiol**, v.8, n. 1, p.26-38, jan. 2010. DOI: 10.1038/nrmicro2265.

CURTIS, M. M. *et al.* QseC inhibitors as an antivirulence approach for Gram-negative pathogens. **mBio**, v. 5, n. 6, p. e02165, nov. 2014. DOI: 10.1128/mBio.02165-14.

CZECZULIN, J. R. *et al.* Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 65, n. 10, p. 4135-45, out. 1997. DOI: 10.1128/iai.65.10.4135-4145.1997.

CZECZULIN, J. R. *et al.* Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 67, n. 6, p. 2692-99, jun. 1999. DOI: 10.1128/IAI.67.6.2692-2699.1999.

DA SILVA, P. *et al.* Novel role of VisP and the Wzz system during O-antigen assembly in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium pathogenesis. **Infect Immun**, v. 86, n. 8, p. e00319-18, ago. 2018. DOI: 10.1128/IAI.00319-18.

DE WIELE, T. V. *et al.* Prebiotic effects of chicory inulin in the simulator of the human intestinal microbial ecosystem. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 51, n. 1, p. 143-53, dez. 2004. DOI: 10.1016/j.femsec.2004.07.014.

DEBROY, C. *et al.* Plasmid-coded DNA fragment developed as a specific gene probe for the identification of enteroaggregative *Escherichia coli*. **J Med Microbiol**, v. 41, n. 6, p. 393-8, dez. 1994. DOI: 10.1099/00222615-41-6-393.

DIAS, R. C. B. *et al.* Analysis of the virulence profile and phenotypic features of typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) isolated from diarrheal patients in Brazil. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 10, p. 144, abr. 2020. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00144.

DORMAN, C. J. H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. **Nat Rev Microbiol**, v. 2, n. 5, p. 391-400, maio 2004. DOI: 10.1038/nrmicro883.

DRISSI, F. *et al.* Common occurrence of antibacterial agents in human intestinal microbiota. **Front Microbiol**, v.6, p. 441, maio 2015. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00441.

DUDLEY, E. G. *et al.* Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a pheU pathogenicity island in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Mol Microbiol**, v. 61, n. 5, p. 1267-82, set. 2006. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05281.x.

DUQUE, A. L. R. F. *et al.* An exploratory study on the influence of orange juice on gut microbiota using a dynamic colonic model. **Food Res Int**, v. 84, p. 160-69, jun. 2016. DOI: 10.1016/j.foodres.2016.03.028.

DURRER, P. *et al.* Intestinal infection due to enteroaggregative *Eschevichia coli* among human immunodeficiency virus- infected persons. **J Infect Dis**, v. 182, n. 5, p. 1540-44, nov. 2000. DOI: 10.1086/315885.

DUTTA, P. R. *et al.* Functional comparison of serine protease autotransporters of enterobacteriaceae. **Infect Immun**, v. 70, n. 12, p. 7105-13, dez. 2002. DOI: 10.1128/IAI.70.12.7105-7113.2002.

ELDRUP, E.; RICHTER, E. A. DOPA, dopamine, and DOPAC concentrations in the rat gastrointestinal tract decrease during fasting. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.279, n. 4, p. 815-22, out. 2000. DOI: 10.1152/ajpendo.2000.279.4.E815.

EL-GEDAILY, A. *et al.* Plasmid virulence gene expression induced by short-chain fatty acids in *Salmonella dublin*: identification of rpoS-dependent and rpo-S-independent mechanisms. **J Bacteriol**, v.179, n. 4, p 1409-12, fev. 1997. DOI: 10.1128/jb.179.4.1409-1412.1997.

ELIAS, W. P., JR. *et al.* Organization of biogenesis genes for aggregative adherence fimbria II defines a virulence gene cluster in enteroaggregative *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, v. 181, n. 6, p. 1779-85, mar. 1999. DOI: 10.1128/JB.181.6.1779-1785.1999.

ELLIOTT, S. J.; KAPER, J. B. Role of type 1 fimbriae in EPEC infections. **Microb Pathog**, v. 23, n. 2, p. 113-18, ago. 1997. DOI: 10.1006/mpat.1997.0135.

ELLIOTT, S. J. *et al.* The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. **Mol Microbiol**, v. 28, n. 1, p. 1-4, abr. 1998. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1998.00783.x.

ELLIS, T. N.; KUEHN, M. J. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 74, n. 1, p. 81-94, mar. 2010. DOI: 10.1128/MMBR.00031-09.

ESLAVA, C. *et al.* Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 66, n. 7, p. 3155-63, jul. 1998. DOI: 10.1128/IAI.66.7.3155-3163.1998.

ESTRADA-GARCIA, T.; NAVARRO-GARCIA, F. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathotype: a genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 66, n. 3, p. 281-98, dez. 2012. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2012.01008.x.

- ESTRADA-GARCIA, T. *et al.* Enteroaggregative *coli*: a pathogen bridging the north and south. **Curr Trop Med Rep**, v. 1, n. 2, p. 88-96, jun. 1 2014. DOI: 10.1007/s40475-014-0018-7.
- FARFAN, M. J.; INMAN, K. G.; NATARO, J. P. The major pilin subunit of the AAF/II fimbriae from enteroaggregative *Escherichia coli* mediates binding to extracellular matrix proteins. **Infect Immun**, v.76, n. 10, p. 4378-84, out. 2008. DOI: 10.1128/IAI.00439-08.
- FARHADI, A. *et al.* Intestinal barrier: an interface between health and disease. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 18, n. 5, p. 479-97, maio 2003. DOI: 10.1046/j.1440-1746.2003.03032.x.
- FASANO, A. *et al.* Shigella enterotoxin 1: an enterotoxin of *Shigella flexneri* 2a active in rabbit small intestine *in vivo* and *in vitro*. **J Clin Invest**, v. 95, n. 6, p. 2853-61, jun. 1995. DOI: 10.1172/JCI117991.
- FENG, W.; AO, H.; PENG, C. Gut microbiota, short-chain fatty acids, and herbal medicines. **Front Pharmacol**, v. 9, p. 1354, nov. 2018. DOI: 10.3389/fphar.2018.01354.
- FERNÁNDEZ, J. *et al.* Colon microbiota fermentation of dietary prebiotics towards short-chain fatty acids and their roles as anti-inflammatory and antitumour agents: A review. **J Func Foods**, v. 25, p. 511-22, ago. 2016. Doi: 10.1016/j.jff.2016.06.032.
- FIERER, N. *et al.* Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. **Appl Environ Microbiol**, v. 71, n. 7, p. 4117-20, jul. 2005. DOI: 10.1128/AEM.71.7.4117-4120.2005.
- FRANK, C. *et al.* Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. **N Engl J Med**, v. 365, n. 19, p. 1771-80, nov. 2011. DOI: 10.1056/NEJMoa1106483.
- FREDDOLINO, P. L. Predicted 3D structure for the human beta 2 adrenergic receptor and its binding site for agonists and antagonists. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 101, p. 2736-41, mar. 2004. DOI: 10.1073/pnas.0308751101.
- FRICK, J. S.; AUTENRIETH, I. B. The gut microflora and its variety of roles in health and disease. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 358, p. 273-89, 2013. DOI: 10.1007/82_2012_217.
- FRIEDRICH, A. W. *et al.* *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. **J Infect Dis**, v. 185, n. 1, p. 74-84, jan. 2002. DOI: 10.1086/338115.
- FUKUDA, S. *et al.* Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. **Nature**, v.469, n. 7331, p. 543-47, jan. 2011. DOI: 10.1038/nature09646.
- 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. DOI: 10.1146/annurev.micro.50.1.727.
- FUQUA, W. C.; WINANS, S. C.; GREENBERG, E. P. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. **J Bacteriol**, v. 176, n. 2, p. 269-75, jan. 1994. DOI: 10.1128/jb.176.2.269-275.1994.

FURNESS, J. B. Types of neurons in the enteric nervous system. **J Auton Nerv Syst**, v. 81, p. 87-96, n. 1-3, jul. 2000. DOI: 10.1016/s0165-1838(00)00127-2.

GASSAMA-SOW, A. *et al.* Characterization of pathogenic *Escherichia coli* in human immunodeficiency virus-related diarrhea in Senegal. **J Infect Dis**, v. 189, n. 1, p. 75-78, jan. 2004. DOI: 10.1086/380489.

GAULT, G. *et al.* Outbreak of haemolytic uraemic syndrome and bloody diarrhoea due to *Escherichia coli* O104:H4, south-west France, jun. 2011. **Euro Surveill**, v. 16, n. 26, jun. 30 2011. DOI: 10.2807/ese.16.26.19905-en.

GBD 2016 DIARRHOEAL DISEASE COLLABORATORS. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoea in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **Lancet Infect Dis**, v. 18, n. 11, p. 1211-1228, nov. 2018. DOI: 10.1016/S1473-3099(18)30362-1.

GBD DIARRHOEAL DISEASES COLLABORATORS. Estimates of global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoeal diseases: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **Lancet Infect Dis**, v. 17, n. 9, p. 909-48, set. 2017. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30276-1.

GERLACH, R. G.; HENSEL, M. Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens. **Int J Med Microbiol**, v. 297, n. 6, p. 401-15, maio 2007. DOI: 10.1016/j.ijmm.2007.03.017.

GILMAN, AG. G Proteins: Transducers of receptor-generated signals. **Annu Rev Biochem**, v. 56, p. 615-49, 1987. DOI: 10.1146/annurev.bi.56.070187.003151.

GOMES, T. A. *et al.* Adherence patterns and adherence-related DNA sequences in *Escherichia coli* isolates from children with and without diarrhea in São Paulo city, Brazil. **J Clin Microbiol**, v. 36, n. 12, p. 3609-13, dez. 1998. DOI: 10.1128/JCM.36.12.3609-3613.1998.

GORDEN, J.; SMALL, P. L. Acid resistance in enteric bacteria. **Infect Immun**, v. 61, n. 1, p. 364-7, jan. 1993. DOI: 10.1128/iai.61.1.364-367.1993.

GUIRAL, E. *et al.* CTX-M-15-producing enteroaggregative *Escherichia coli* as cause of travelers' diarrhea. **Emerg Infect Dis**, v. 17, n. 10, p. 1950-3, out. 2011. DOI: 10.3201/eid1710.110022.

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. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2008.02408.x.

GUYER, D. M. *et al.* Identification of sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. **Mol Microbiol**, v. 38, n. 1, p. 53-66, out. 2000. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2000.02110.x.

GUYER, D. M. *et al.* Sat, the secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*, is a vacuolating cytotoxin for bladder and kidney epithelial cells. **Infect Immun**, v. 70, n. 8, p. 4539-46, ago. 2002. DOI: 10.1128/IAI.70.8.4539-4546.2002.

HAMER, H. M. *et al.* Review article: the role of butyrate on colonic function. **Aliment Pharmacol Ther**, v.27, n. 2, p. 104-19, jan. 2008. DOI: 10.1111/j.1365-2036.2007.03562.x.

HARRINGTON, S. M.; DUDLEY, E. G.; NATARO, J. P. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **FEMS Microbiol Lett**, v. 254, n. 1, p. 12-8, jan. 2006. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2005.00005.x.

HARRINGTON, S. M. *et al.* The Pic protease of enteroaggregative *Escherichia coli* promotes intestinal colonization and growth in the presence of mucin. **Infect Immun**, v. 77, n. 6, p. 2465-73, jun. 2009. DOI: 10.1128/IAI.01494-08.

HAVENAAR, R. Intestinal health functions of colonic microbial metabolites: a review. **Benef Microbes**, v.2, n. 2, p. 103-14, jun. 2011. DOI: 10.3920/bm2011.0003.

HED, J. *et al.* The use of fluorescence quenching in flow cytofluorometry to measure the attachment and ingestion phases in phagocytosis in peripheral blood without prior cell separation. **J Immunol Methods**, v. 101, n. 1, p. 119-25, jul. 1987. DOI: 10.1016/0022-1759(87)90224-9.

HENDERSON, I. R. *et al.* Characterization of Pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 67, n. 11, p. 5587-96, nov. 1999. DOI: 10.1128/IAI.67.11.5587-5596.1999.

HENDERSON, I. R. *et al.* Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 68, n. 4, p. 692-744, dez. 2004. DOI: 10.1128/MMBR.68.4.692-744.2004.

HICKS, S.; CANDY, D. C.; PHILLIPS, A. D. Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa *in vitro*. **Infect Immun**, v. 64, n. 11, p. 4751-60, nov. 1996. DOI: 10.1128/iai.64.11.4751-4760.1996.

HORGER, S.; SCHULTHEISS, G.; DIENER, M. Segment-specific effects of epinephrine on ion transport in the colon of the rat. **Am J Physiol**, v. 275, n. 6, p. G1367-76, dez. 1998. DOI: 10.1152/ajpgi.1998.275.6.G1367.

HUANG, D. B. *et al.* Seroprevalence of the enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factor dispersin among USA travellers to Cuernavaca, Mexico: a pilot study. **J Med Microbiol**, v. 57, n. Pt 4, p. 476-79, abr. 2008. DOI: 10.1099/jmm.0.47495-0.

HUANG, D. B. *et al.* Virulence characteristics and the molecular epidemiology of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from travellers to developing countries. **J Med Microbiol**, v. 56, n. Pt 10, p. 1386-92, out. 2007. DOI: 10.1099/jmm.0.47161-0.

HUANG, D. B. *et al.* A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli*. **J Med Microbiol**, v. 55, n. Pt 10, p. 1303-11, out. 2006. ISSN 0022-2615. DOI: 10.1099/jmm.0.46674-0.

HUANG, D. B. *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli*: an emerging enteric pathogen. **Am J Gastroenterol**, v. 99, n. 2, p. 383-89, fev. 2004. DOI: 10.1111/j.1572-0241.2004.04041.x.

HUGHES, D. T. *et al.* The QseC adrenergic signaling cascade in Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC). **PLoS Pathog**, v. 5, n. 8, p. e1000553, ago. 2009. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000553.

HUGHES, D. T.; SPERANDIO, V. Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts. **Nat Rev Microbiol**, v. 6, n. 2, p. 111-20, fev. 2008. DOI: 10.1038/nrmicro1836.

HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. **Nature**, v. 486, n. 7402, p. 207-14, jun. 2012. DOI: 10.1038/nature11234.

IMUTA, N. *et al.* Phylogenetic analysis of Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) isolates from Japan reveals emergence of CTX-M-14-producing EAEC O25:H4 clones related to sequence Type 131. **J Clin Microbiol**, v. 54, n. 8, p. 2128-34, ago. 2016. DOI: 10.1128/JCM.00711-16.

IZQUIERDO, M. *et al.* Identification of cell surface-exposed proteins involved in the fimbria-mediated adherence of enteroaggregative *Escherichia coli* to intestinal cells. **Infect Immun**, v. 82, n. 4, p. 1719-24, abr. 2014. DOI: 10.1128/IAI.01651-13.

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

JAN, A. T. Outer membrane vesicles (OMVs) of Gram-negative bacteria: a perspective update. **Front Microbiol**, v. 8, p. 1053, jun. 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01053.

JENKINS, C. Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 416, p. 27-50, 2018. DOI: 10.1007/82_2018_105.

JENSEN, B. H. *et al.* Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Clin Microbiol Rev**, v. 27, n. 3, p. 614-30, jul. 2014. DOI: 10.1128/CMR.00112-13.

JIANG, Z. D. *et al.* Rate of occurrence and pathogenic effect of Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in international travelers. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 11, p. 4185-90, nov. 2002. DOI: 10.1128/JCM.40.11.4185-4190.2002.

JIMENEZ, N. *et al.* Genetics and proteomics of *Aeromonas salmonicida* lipopolysaccharide core biosynthesis. **J Bacteriol**, v. 191, n. 7, abr. 2009. DOI: 10.1128/JB.01395-08.

JONSSON, R. *et al.* Novel aggregative adherence fimbria variant of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 83, n. 4, p. 1396-405, abr. 2015. DOI: 10.1128/IAI.02820-14.

JØNSSON, R. *et al.* A novel pAA virulence plasmid encoding toxins and two distinct variants of the fimbriae of Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Front Microbiol**, v. 8, p. 263, fev. 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00263.

KABACK, H. R. Transport studies in bacterial membrane vesicles. **Science**, v. 186, n. 4167, p. 882-92, dez. 1974. DOI: 10.1126/science.186.4167.882.

KAKKANAT, A. *et al.* The role of H4 flagella in *Escherichia coli* ST131 virulence. **Sci Rep**, v. 5, n. 16149, 2015. DOI: 10.1038/srep16149.

KAMADA, N. *et al.* Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. **Nat Immunol**, v.14, n. 7, p. 685-90, jul. 2013. DOI: 10.1038/ni.2608.

KAPARAKIS-LIASKOS, M.; FERRERO, R. L. Immune modulation by bacterial outer membrane vesicles. **Nat Rev Immunol**, v. 15, n. 6, p. 375-87, jun. 2015. DOI: 10.1038/nri3837.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat Rev Microbiol**, v. 2, n. 2, p. 123-40, fev. 2004. DOI: 10.1038/nrmicro818.

KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. Overview and historical perspectives. **Microbiol Spectr**, v. 2, n. 6, dez. 2014. DOI: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0028-2014.

KARMALI, M. A. *et al.* Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. **Lancet**, v. 1, n. 8325, p. 619-20, mar. 1983. DOI: 10.1016/s0140-6736(83)91795-6.

KENDALL, M. M.; SPERANDIO, V. What a dinner party! Mechanisms and functions of interkingdom signaling in host-pathogen associations. **mBio**, v. 7, n. 2, p. e01748-15, mar. 2016. DOI: 10.1128/mBio.01748-15.

KIM, C. S. *et al.* Characterization of autoinducer-3 structure and biosynthesis in *E. coli*. **ACS Cent Sci**, v. 6, n. 2, p. 197-206, fev. 2020. DOI: 10.1021/acscentsci.9b01076.

KOEPPEN, K. *et al.* A novel mechanism of host-pathogen interaction through sRNA in bacterial outer membrane vesicles. **PLoS Pathog**, v. 12, n. 6, p. e1005672, jun. 2016. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005672.

KOH, A. *et al.* From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. **Cell**, v. 165, n. 6, p. 1332-45, jun. 2016. DOI: 10.1016/j.cell.2016.05.041.

KONG, H.; HONG, X.; LI, X. Current perspectives in pathogenesis and antimicrobial resistance of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Microb Pathog**, v. 85, p. 44-49, ago. 2015. DOI: 10.1016/j.micpath.2015.06.002.

KONOWALCHUK, J.; SPEIRS, J. I.; STAVRIC, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 18, n. 3, p. 775-9, dez. 1977. DOI: 10.1128/iai.18.3.775-779.1977.

KOO, H. *et al.* Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. **Nat Rev Microbiol**, v. 15, n. 12, p. 740-55, dez. 2017. DOI: 10.1038/nrmicro.2017.99.

KUEHN, M. J.; KESTY, N. C. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. **Genes Dev**, v. 19, n. 22, p. 2645-55, nov. 2005. DOI: 10.1101/gad.1299905.

KULP, A.; KUEHN, M. J. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. **Annu Rev Microbiol**, v. 64, p. 163-84, out. 2010. DOI: 10.1146/annurev.micro.091208.073413.

KUNSMANN, L. *et al.* Virulence from vesicles: novel mechanisms of host cell injury by *Escherichia coli* O104:H4 outbreak strain. **Sci Rep**, v. 5, p. 13252, ago. 18 2015. DOI: 10.1038/srep13252.

LÄÄVERI, T. *et al.* High number of diarrhoeal co-infections in travellers to Benin, West Africa. **BMC Infect Dis**, v. 14, n. 1, p. 81, fev. 2014. DOI: 10.1186/1471-2334-14-81.

LANATA, C. F. *et al.* Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: a systematic review. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e72788, set. 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0072788.

LARSEN, J. M. The immune response to *Prevotella* bacteria in chronic inflammatory disease. **Immunology**, v. 151, n. 4, p. 363-74, ago. 2017. DOI: 10.1111/imm.12760.

LEBLANC, J. G. *et al.* Beneficial effects on host energy metabolism of short-chain fatty acids and vitamins produced by commensal and probiotic bacteria. **Microb Cell Fact**, v. 16, n. 1, p. 79, maio 2017. DOI: 10.1186/s12934-017-0691-z.

LEE, J. *et al.* Identification of stress-related proteins in *Escherichia coli* using the pollutant cis-dichloroethylene. **J Appl Microbiol**, v. 108, n. 6, p. 2088-102, jun. 2010. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04611.x.

LEVY, M.; THAISS, C. A.; ELINAV, E. Metabolites: messengers between the microbiota and the immune system. **Genes Dev**, v. 30, n. 14, p. 1589-97, jul. 2016. DOI: 10.1101/gad.284091.116.

LIEVIN-LE MOAL, V. *et al.* Secreted autotransporter toxin (Sat) triggers autophagy in epithelial cells that relies on cell detachment. **Cell Microbiol**, v. 13, n. 7, p. 992-1013, jul. 2011. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2011.01595.x.

LIMA, A. A. *et al.* Persistent diarrhea in northeast Brazil: etiologies and interactions with malnutrition. **Acta Paediatr Suppl**, v. 381, p. 39-44, set. 1992. DOI: 10.1111/j.1651-2227.1992.tb12370.x.

LOUIS, P. *et al.* Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine. **J Appl Microbiol**, v. 102, n. 5, p. 1197-208, maio 2007. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03322.x.

LUNA-GIERKE, R. E. *et al.* Outbreaks of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection: USA. **Epidemiol Infect**, v. 142, n. 11, p. 2270-80, nov. 2014. DOI: 10.1017/S0950268813003233.

MACDONALD, I. A.; KUEHN, M. J. Stress-induced outer membrane vesicle production by *Pseudomonas aeruginosa*. **J Bacteriol**, v. 195, n. 13, p. 2971-81, jul. 2013. DOI: 10.1128/JB.02267-12.

MACFARLANE, S.; MACFARLANE, G. T. Regulation of short-chain fatty acid production. **Proc Nutr Soc**, v. 62, n. 1, p. 67-72, fev. 2003. DOI: 10.1079/PNS2002207.

MACHADO RIBEIRO, T. R. *et al.* Human microbiota modulation via QseC sensor kinase mediated in the *Escherichia coli* O104:H4 outbreak strain infection in microbiome model. **BMC Microbiol**, v. 21, n. 1, jun. 2021. DOI: 10.1186/s12866-021-02220-3.

MARONCLE, N. M. *et al.* Protease activity, secretion, cell entry, cytotoxicity, and cellular targets of secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 74, n. 11, p. 6124-34, nov. 2006. DOI: 10.1128/IAI.01086-06.

MASHBURN-WARREN, L. M.; WHITELEY, M. Special delivery: vesicle trafficking in prokaryotes. **Mol Microbiol**, v. 61, n. 4, p. 839-46, ago. 2006. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05272.x.

MAYER, H. B.; WANKE, C. A. Enteroaggregative *Escherichia coli* as a possible cause of diarrhea in an HIV-infected patient. **N Engl J Med**, v. 332, n. 4, p. 273-4, jan. 1995. DOI: 10.1056/NEJM199501263320417.

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, fev. 1995. DOI: 10.1073/pnas.92.5.1664.

MCKENNEY, E. S.; KENDALL, M. M. Microbiota and pathogen 'pas de deux': setting up and breaking down barriers to intestinal infection. **Pathog Dis**, v. 74, n. 5, p. ftw051, jul. 2016. DOI: 10.1093/femspd/ftw051.

MELTON-CELSA, A. R. Shiga Toxin (Stx) classification, structure, and function. **Microbiol Spectr**, v. 2, n. 4, p. Ehec-0024-2013, ago. 2014. DOI: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0024-2013.

MICKEY, A. S.; NATARO, J. P. Dual function of Aar, a member of the new AraC negative regulator family, in *Escherichia coli* gene expression. **Infect Immun**, v. 88, n. 6, p. e00100-20, maio 2020. DOI: 10.1128/IAI.00100-20.

MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. Quorum sensing in bacteria. **Annu Rev Microbiol**, v. 55, p. 165-99, out. 2001. DOI: 10.1146/annurev.micro.55.1.165.

MILLS, A. Health care systems in low- and middle-income countries. **N Engl J Med**, v. 370, n. 6, p. 552-7, fev. 2014. DOI: 10.1056/NEJMra1110897.

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, 1994. DOI: 10.3109/08910609409141354.

MOLLY, K.; WOESTYNE, M. V.; VERSTRAETE, W. Development of a 5-step multi-chamber reactor as a simulation of the human intestinal microbial ecosystem. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 39, n. 2, p. 254-58, maio 1993. DOI: 10.1007/BF00228615.

MONTEIRO, B. T. *et al.* The dispersin-encoding gene (*aap*) is not restricted to enteroaggregative *Escherichia coli*. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 65, n. 1, p. 81-4, set. 2009. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2009.05.011.

MONTEIRO-NETO, V. *et al.* Characterization of an outer membrane protein associated with haemagglutination and adhesive properties of enteroaggregative *Escherichia coli* O111:H12. **Cell Microbiol**, v. 5, n. 8, p. 533-47, ago. 2003. DOI: 10.1046/j.1462-5822.2003.00299.x.

MOREIRA, C. G. *et al.* Virulence and stress-related periplasmic protein (VisP) in bacterial/host associations. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 4, p. 1470-5, jan. 2013. DOI: 10.1073/pnas.1215416110.

MOREIRA, C. G. *et al.* Bacterial adrenergic sensors regulate virulence of enteric pathogens in the gut. **mBio**, v. 7, n. 3, p. e00826-16, jun. 07 2016. DOI: 10.1128/mBio.00826-16.

MOREIRA, C. G.; WEINSHENKER, D.; SPERANDIO, V. QseC mediates *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence *in vitro* and *in vivo*. **Infect Immun**, v. 78, n. 3, p. 914-26, mar. 2010. DOI: 10.1128/IAI.01038-09.

MORIN, N. *et al.* Characterization of the AggR regulon in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 81, n. 1, p. 122-32, jan. 2013. DOI: 10.1128/IAI.00676-12.

MORIN, N. *et al.* Autoactivation of the AggR regulator of enteroaggregative *Escherichia coli* *in vitro* and *in vivo*. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 58, n. 3, p. 344-55, abr. 2010. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2010.00645.x.

MUNERA, D. *et al.* Autotransporters but not pAA are critical for rabbit colonization by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4. **Nat Commun**, v. 5, p. 3080, 2014. DOI: 10.1038/ncomms4080.

NATARO, J. P. *et al.* Detection of an adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli* with a DNA probe. **J Infect Dis**, v. 152, n. 3, p. 560-5, set. 1985. DOI: 10.1093/infdis/152.3.560.

NATARO, J. P. *et al.* Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated in volunteers. **J Infect Dis**, v. 171, n. 2, p. 465-8, fev. 1995. DOI: 10.1093/infdis/171.2.465.

NATARO, J. P. *et al.* Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEP-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. **Infect Immun**, v. 60, n. 6, p. 2297-304, jun. 1992. DOI: 10.1128/iai.60.6.2297-2304.1992.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin Microbiol Rev**, v. 11, n. 1, p. 142-201, jan. 1998. DOI: 10.1128/CMR.11.1.142.

NATARO, J. P. *et al.* Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEP-2 cells. **Pediatr Infect Dis J**, v. 6, n. 9, p. 829-31, set. 1987. DOI: 10.1097/00006454-198709000-00008.

NATARO, J. P.; STEINER, T.; GUERRANT, R. L. Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Emerg Infect Dis**, v. 4, n. 2, p. 251-61, abr./jun. 1998. DOI: 10.3201/eid0402.980212.

NATARO, J. P. *et al.* AggR, a transcriptional activator of aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, v. 176, n. 15, p. 4691-9, ago. 1994. DOI: 10.1128/jb.176.15.4691-4699.1994.

NEALSON, K. H.; PLATT, T.; HASTINGS, J. W. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. **J Bacteriol**, v. 104, n. 1, p. 313-22, out. 1970. DOI: 10.1128/jb.104.1.313-322.1970.

NEUMAN, H. *et al.* Microbial endocrinology: the interplay between the microbiota and the endocrine system. **FEMS Microbiol Rev**, v. 39, n. 4, p. 509-21, jul. 2015. DOI: 10.1093/femsre/fuu010.

NISHI, J. *et al.* The export of coat protein from enteroaggregative *Escherichia coli* by a specific ATP-binding cassette transporter system. **J Biol Chem**, v. 278, n. 46, p. 45680-9, nov. 2003. DOI: 10.1074/jbc.M306413200.

NJOROGE, J.; SPERANDIO, V. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence regulation by two bacterial adrenergic kinases, QseC and QseE. **Infect Immun**, v. 80, n. 2, p. 688-703, fev. 2012. DOI: 10.1128/IAI.05921-11.

NOVICK, R. P. *et al.* The agr P2 operon: an autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. **Mol Gen Genet**, v. 248, n. 4, p. 446-58, ago. 1995. DOI: 10.1007/BF02191645.

NOWICKI, B. *et al.* The Dr hemagglutinin, afimbrial adhesins AFA-I and AFA-III, and F1845 fimbriae of uropathogenic and diarrhea-associated *Escherichia coli* belong to a family of hemagglutinins with Dr receptor recognition. **Infect Immun**, v. 58, n. 1, p. 279-81, jan. 1990. DOI: 10.1128/iai.58.1.279-281.1990.

O'BRIEN, A. O. *et al.* *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (SHIGA) like cytotoxin. **Lancet**, v. 1, n. 8326 Pt 1, p. 702, mar. 1983. DOI: 10.1016/s0140-6736(83)91987-6.

OPINTAN, J. A. *et al.* Pediatric diarrhea in southern Ghana: etiology and association with intestinal inflammation and malnutrition. **Am J Trop Med Hyg**, v. 83, n. 4, p. 936-43, out. 2010. DOI: 10.4269/ajtmh.2010.09-0792.

ORENCH-RIVERA, N.; KUEHN, M. J. Environmentally controlled bacterial vesicle-mediated export. **Cell Microbiol**, v. 18, n. 11, p. 1525-36, nov. 2016. DOI: 10.1111/cmi.12676.

OUNDO, J. O. *et al.* High incidence of Enteroaggregative *Escherichia coli* among food handlers in three areas of Kenya: a possible transmission route of travelers' diarrhea. **J Travel Med**, v. 15, n. 1, p. 31-38, jan./fev. 2008. DOI: 10.1111/j.1708-8305.2007.00174.x.

PANEL ON BIOLOGICAL HAZARDS. Public health risks associated with Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) as a food-borne pathogen. **EFSA Journal**, v. 13, n. 12, p. 4330, dez. 2015. Disponível em: < <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4330> >.

PARK, S. Y.; PONTES, M. H.; GROISMAN, E. A. Flagella-independent surface motility in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 112, n. 6, p. 1850-5, fev. 2015. DOI: 10.1073/pnas.1422938112.

PARKER, C. T.; SPERANDIO, V. Cell-to-cell signalling during pathogenesis. **Cell Microbiol**, v. 11, n. 3, p. 363-9, mar. 2009. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2008.01272.x

PARKER, H. *et al.* Uptake of *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles by gastric epithelial cells. **Infect Immun**, v. 78, n. 12, p. 5054-61, dez. 2010. DOI: 10.1128/IAI.00299-10.

PASCHKE, C. *et al.* Controlled study on enteropathogens in travellers returning from the tropics with and without diarrhoea. **Clin Microbiol Infect**, v. 17, n. 8, p. 1194-200, ago. 2011. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2010.03414.x.

PATON, J. C.; PATON, A. W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Clin Microbiol Rev**, v. 11, n. 3, p. 450-79, jul. 1998. DOI: 10.1128/CMR.11.3.450.

PAVIA, A. T. *et al.* Diarrhea among African children born to human immunodeficiency virus 1-infected mothers: clinical, microbiologic and epidemiologic features. **Pediatr Infect Dis J**, v. 11, n. 12, p. 996-1003, dez. 1992. ISSN 0891-3668 (Print) 0891-3668.

PENFOLD, R. J.; PEMBERTON, J. M. An improved suicide vector for construction of chromosomal insertion mutations in bacteria. **Gene**, v. 118, n. 1, p. 145-6, set. 1992. DOI: 10.1016/0378-1119(92)90263-o.

PEREIRA, A. L. *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence markers: positive association with distinct clinical characteristics and segregation into 3 Enteropathogenic *E. coli* serogroups. **J Infect Dis**, v. 195, n. 3, p. 366-74, fev. 2007. DOI: 10.1086/510538.

PESCI, E. C. *et al.* Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 20, p. 11229-34, set. 1999. DOI: 10.1073/pnas.96.20.11229.

PHILIPSON, C. W.; BASSAGANYA-RIERA, J.; HONTECILLAS, R. Animal models of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **Gut Microbes**, v. 4, n. 4, p. 281-91, jul./ago. 2013. DOI: 10.4161/gmic.24826.

POSSEMIERS, S. *et al.* Bacteria and chocolate: a successful combination for probiotic delivery. **Int J Food Microbiol**, v. 141, n. 1-2, p. 97-103, jun. 2010. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.008.

POSSEMIERS, S. *et al.* PCR-DGGE-based quantification of stability of the microbial community in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 49, n. 3, p. 495-507, set. 2004. DOI: 10.1016/j.femsec.2004.05.002.

PURVES, D. *et al.* **Neuroscience**. 2nd ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2001. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10799/> >.

RABBANI, G. H. *et al.* Short-chain fatty acids improve clinical, pathologic, and microbiologic features of experimental shigellosis. **J Infect Dis**, v. 179, n. 2, p. 390-7, fev. 1999. DOI: 10.1086/314584.

RAETZ, C. R.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annu Rev Biochem**, v. 71, p. 635-700, jul. 2002. DOI: 10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414.

RAJAKUMAR, K.; SASAKAWA, C.; ADLER, B. Use of a novel approach, termed island probing, identifies the *Shigella flexneri* she pathogenicity island which encodes a homolog of the immunoglobulin A protease-like family of proteins. **Infect Immun**, v. 65, n. 11, p. 4606-14, nov. 1997. DOI: 10.1128/iai.65.11.4606-4614.1997.

RASKO, D. A. *et al.* Targeting QseC signaling and virulence for antibiotic development. **Science**, v. 321, n. 5892, p. 1078-80, ago. 2008. DOI: 10.1126/science.1160354.

RASKO, D. A. *et al.* Origins of the *E. coli* strain causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany. **N Engl J Med**, v. 365, n. 8, p. 709-17, ago. 2011. DOI: 10.1056/NEJMoa1106920.

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. DOI: 10.1128/JB.01848-06.

READING, N. C. *et al.* The two-component system QseEF and the membrane protein QseG link adrenergic and stress sensing to bacterial pathogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 14, p. 5889-94, abr. 2009. DOI: 10.1073/pnas.0811409106.

RINTTILÄ, 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. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2004.02409.x.

RÍOS-COVIÁN, D. *et al.* Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health. **Front Microbiol**, v. 7, p. 185, fev. 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00185.

RIVIÈRE, A. *et al.* Bifidobacteria and butyrate-producing colon bacteria: importance and strategies for their stimulation in the human gut. **Front Microbiol**, v. 7, p. 979, jun. 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00979.

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. **Appl Environ Microbiol**, v. 80, n. 3, p. 1142-9, fev. 2014. DOI: 10.1128/AEM.03549-13.

ROBINS-BROWNE, R. M. *et al.* Are *Escherichia coli* pathotypes still relevant in the era of whole-genome sequencing? **Front Cell Infect Microbiol**, v. 6, p. 141, nov. 2016. DOI: 10.3389/fcimb.2016.00141.

ROOKS, M. G. *et al.* QseC inhibition as an antivirulence approach for colitis associated bacteria. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 114, n. 1, p. 142-47, jan. 2017. DOI: 10.1073/pnas.1612836114.

ROSELLI, M. *et al.* Probiotic bacteria *Bifidobacterium animalis* MB5 and *Lactobacillus rhamnosus* GG protect intestinal Caco-2 cells from the inflammation-associated response induced by enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. **Br J Nutr**, v. 95, n. 6, p. 1177-84, jun. 2006. DOI: 10.1079/bjn20051681.

RUMBAUGH, K. P. Convergence of hormones and autoinducers at the host/pathogen interface. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 387, n. 2, p. 425-35, jan. 2007. DOI: 10.1007/s00216-006-0694-9.

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

SAMIE, A. *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* in Venda, South Africa: distribution of virulence-related genes by multiplex polymerase chain reaction in stool samples of human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative individuals and primary school children. **Am J Trop Med Hyg**, v. 77, n. 1, p. 142-50, jul. 2007. ISSN 0002-9637.

SANTIAGO, A. E. *et al.* A large family of antivirulence regulators modulates the effects of transcriptional activators in Gram-negative pathogenic bacteria. **PLoS Pathog**, v. 10, n. 5, p. e1004153, maio 2014. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004153.

SANTIAGO, A. E. *et al.* The AraC negative regulator family modulates the activity of histone-like proteins in pathogenic bacteria. **PLoS Pathog**, v. 13, n. 8, p. e1006545, ago. 2017. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006545.

SAVARINO, S. J. *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 7, p. 3093-7, abr. 1993. DOI: 10.1073/pnas.90.7.3093.

SAVARINO, S. J. *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *E. coli*. **J Infect Dis**, v. 173, n. 4, p. 1019-22, abr. 1996. DOI: 10.1093/infdis/173.4.1019.

SCHAUDER, S.; BASSLER, B. L. The languages of bacteria. **Genes Dev**, v. 15, n. 12, p. 1468-80, jun. 2001. DOI: 10.1101/gad.899601.

SCHEUTZ, F. *et al.* Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. **J Clin Microbiol**, v. 50, n. 9, p. 2951-63, set. 2012. DOI: 10.1128/JCM.00860-12.

SCHUBERT, S. *et al.* Prevalence of the "high-pathogenicity island" of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. **Infect Immun**, v. 66, n. 2, p. 480-5, fev. 1998. DOI: 10.1128/IAI.66.2.480-485.1998.

SCHWECHHEIMER, C.; KUEHN, M. J. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. **Nat Rev Microbiol**, v. 13, n. 10, p. 605-19, out. 2015. DOI: 10.1038/nrmicro3525.

SEKIROV, I.; FINLAY, B. B. The role of the intestinal microbiota in enteric infection. **J Physiol**, v. 587, n. Pt 17, p. 4159-67, set. 2009. DOI: 10.1113/jphysiol.2009.172742.

SERVIN, A. L. Pathogenesis of Afa/Dr Diffusely Adhering *Escherichia coli*. **Clin Microbiol Rev**, v. 18, n. 2, abr. 2005. DOI: 10.1128/CMR.18.2.264-292.2005.

SHARON, G. *et al.* The central nervous system and the gut microbiome. **Cell**, v.167, n. 4, p. 915-32, nov. 2016. DOI: 10.1016/j.cell.2016.10.027.

SHEIKH, J. *et al.* A novel dispersin protein in enteroaggregative *Escherichia coli*. **J Clin Invest**, v. 110, n. 9, p. 1329-37, nov. 2002. DOI: 10.1172/JCI16172.

SHEIKH, J. *et al.* Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. **Mol Microbiol**, v. 41, n. 5, p. 983-97, set. 2001. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2001.02512.x.

SHIGA K. Ueber den Dysenterie-bacillus (*Bacillus dysenteriae*). **Zentralbl Bacteriol Orig**, V. 24, p. 913-918, 1898.

SHIN, R.; SUZUKI, M.; MORISHITA, Y. Influence of intestinal anaerobes and organic acids on the growth of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **J Med Microbiol**, v. 51, n. 3, p. 201-06, mar. 2002. DOI: 10.1099/0022-1317-51-3-201.

SIMON, R.; PRIEFER, U.; PÜHLER, A. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. **Nat Biotechnol**, v. 1, p. 784-91, nov. 1983. DOI: 10.1038/nbt1183-784.

SJÖSTRÖM, A. E. *et al.* Membrane vesicle-mediated release of bacterial RNA. **Sci Rep**, v. 5, p. 15329, out. 2015. DOI: 10.1038/srep15329.

SMITH, P. K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Anal Biochem**, v. 150, n. 1, p. 76-85, out. 1985. DOI: 10.1016/0003-2697(85)90442-7.

SPERANDIO, V. *et al.* Bacteria-host communication: the language of hormones. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 15, p. 8951-6, jul. 2003. DOI: 10.1073/pnas.1537100100.

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, fev. 2002. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2002.02803.x.

STEINER, T. S. *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* produce intestinal inflammation and growth impairment and cause interleukin-8 release from intestinal epithelial cells. **J Infect Dis**, v. 177, n. 1, p. 88-96, jan. 1998. DOI: 10.1086/513809.

STOCK, A.M.; ROBINSON, V.L.; GOUDREAU, P.N. Two-component signal transduction. **Annu Rev Biochem**, v. 69, p. 183-215, jul. 2000. DOI: 10.1146/annurev.biochem.69.1.183.

SUN, Y.; O'RIORDAN, M. X. Regulation of bacterial pathogenesis by intestinal short-chain fatty acids. **Adv Appl Microbiol**, v.85, p. 93-118, 2013. DOI: 10.1016/b978-0-12-407672-3.00003-4.

TAN, J. *et al.* The role of short-chain fatty acids in health and disease. **Adv Immunol**, v.121, p. 91-119, 2014. DOI: 10.1016/b978-0-12-800100-4.00003-9.

TARR, P. I. *et al.* Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. **Infect Immun**, v. 68, n. 3, p. 1400-7, mar. 2000. DOI: 10.1128/IAI.68.3.1400-1407.2000.

TOKUDA, K. *et al.* Characterization of typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli* in Kagoshima, Japan: biofilm formation and acid resistance. **Microbiol Immunol**, v. 54, n. 6, p. 320-29, jun. 2010. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2010.00210.x.

TORRES, A. G. ***Escherichia coli* in the Americas**. 1st ed. Switzerland: Springer, Cham, 2016. DOI: 10.1007/978-3-319-45092-6.

TORRES, A. G. *et al.* Genes related to long polar fimbriae of pathogenic *Escherichia coli* strains as reliable markers to identify virulent isolates. **J Clin Microbiol**, v. 47, n. 8, p. 2442-51, ago. 2009. DOI: 10.1128/JCM.00566-09.

TORRES, A. G. *et al.* Identification and characterization of lpfABCC'DE, a fimbrial operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Infect Immun**, v. 70, n. 10, p. 5416-27, out. 2002. DOI: 10.1128/IAI.70.10.5416-5427.2002.

TOYOFUKU, M.; NOMURA, N.; EBERL, L. Types and origins of bacterial membrane vesicles. **Nat Rev Microbiol**, v. 17, n. 1, p. 13-24, jan. 2019. DOI: 10.1038/s41579-018-0112-2.

TRACHTMAN, H. *et al.* Renal and neurological involvement in typical Shiga toxin-associated HUS. **Nat Rev Nephrol**, v. 8, n. 11, p. 658-69, nov. 2012. DOI: 10.1038/nrneph.2012.196.

VAN HOUTDT, R.; MICHIELS, C. W. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. **Res Microbiol**, v. 156, n. 5-6, p. 626-33, jun./jul. 2005. DOI: 10.1016/j.resmic.2005.02.005.

VELARDE, J. J. *et al.* Solution structure of the novel dispersin protein of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Mol Microbiol**, v. 66, n. 5, p. 1123-35, dez. 2007. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2007.05985.x.

VIEIRA, P. C. G. *et al.* Secreted autotransporter toxin (Sat) induces cell damage during enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **PLoS One**, v. 15, n. 2, p. e0228959, fev. 2020. DOI: 10.1371/journal.pone.0228959.

VILA, J. *et al.* Susceptibility patterns of enteroaggregative *Escherichia coli* associated with traveller's diarrhoea: emergence of quinolone resistance. **J Med Microbiol**, v. 50, n. 11, p. 996-1000, nov. 2001. DOI: 10.1099/0022-1317-50-11-996.

VILLASECA, J. M. *et al.* Pet toxin from enteroaggregative *Escherichia coli* produces cellular damage associated with fodrin disruption. **Infect Immun**, v. 68, n. 10, p. 5920-7, out. 2000. DOI: 10.1128/IAI.68.10.5920-5927.2000.

VLISIDOU, I. *et al.* The neuroendocrine stress hormone norepinephrine augments *Escherichia coli* O157:H7-induced enteritis and adherence in a bovine ligated ileal loop model of infection. **Infect Immun**, v. 72, n. 9, p. 5446-51, set. 2004. DOI: 10.1128/IAI.72.9.5446-5451.2004.

WAKIMOTO, N. *et al.* Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for enteroaggregative *Escherichia coli*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 71, n. 5, p. 687-90, nov. 2004. ISSN 0002-9637.

WALTERS, M.; SIRCILI, M. P.; SPERANDIO, V. AI-3 synthesis is not dependent on luxS in *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, v. 188, n. 16, p. 5668-81, ago. 2006. DOI: 10.1128/JB.00648-06.

WALTERS, M.; SPERANDIO, V. Autoinducer 3 and epinephrine signaling in the kinetics of locus of enterocyte effacement gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 74, n. 10, p. 5445-55, out. 2006. DOI: 10.1128/IAI.00099-06.

WATERS, C. M.; BASSLER, B. L. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 21, p. 319-46, nov. 2005. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001.

WILLIAMS, K. P. *et al.* Phylogeny of gammaproteobacteria. **J Bacteriol**, v. 192, n. 9, p. 2305-14, maio 2010. DOI: 10.1128/JB.01480-09.

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. DOI: 10.1097/00004836-200603000-00015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Health Statistics**. Geneva: WHO Press, 2012. Disponível em: https://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2012/en/.

WRZOSEK, L. *et al.* *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Faecalibacterium prausnitzii* influence the production of mucus glycans and the development of goblet cells in the colonic epithelium of a gnotobiotic model rodent. **BMC Biol**, V. 11, p. 61, maio 2013. DOI: 10.1186/1741-7007-11-61.

ZANGARI, T. *et al.* Virulence of the Shiga toxin type 2-expressing *Escherichia coli* O104:H4 German outbreak isolate in two animal models. **Infect Immun**, v. 81, n. 5, p. 1562-74, maio 2013. DOI: 10.1128/IAI.01310-12.

ZHANG, Y. J. *et al.* Impacts of gut bacteria on human health and diseases. **Int J Mol Sci**, V, 16, n. 4. p. 7493-519, abr. 2015. DOI: 10.3390/ijms16047493.