

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta **Tese** será disponibilizado somente a partir de 30/11/2023.



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.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030081P7
Esta ficha não pode ser modificada

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-Fenilenodiamina

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> diarreio gênicas	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. Ensaios 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* diarreio gênicas

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.

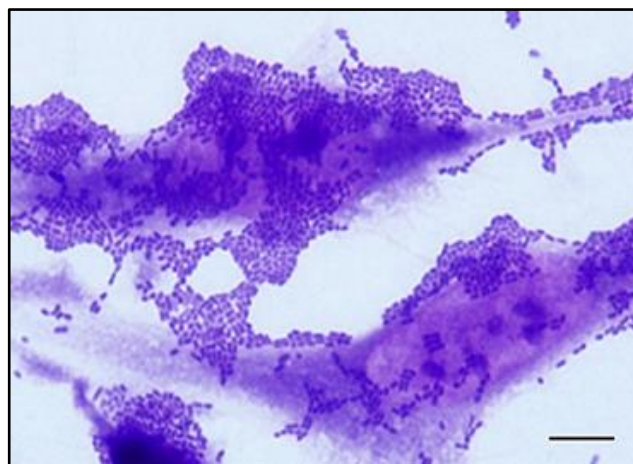


Fig. 1. Padrão clássico de adesão agregativa (AA) de EAEC, semelhante a tijolos empilhados, em cultivo de células epiteliais HeLa. A barra de escala representa 10 μm (DIAS *et al.*, 2020).

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* diarreiogênicas (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; CZECHULIN *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 fluidos 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+.

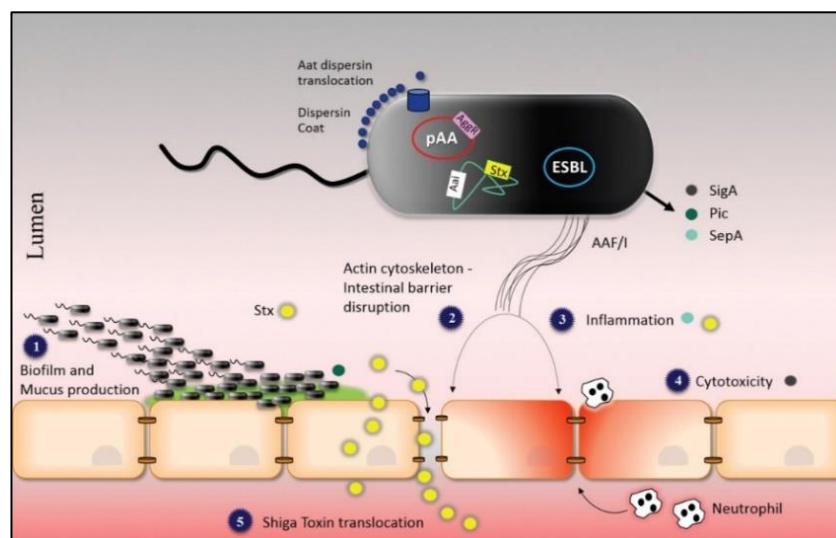


Fig. 2. Formação de um espesso biofilme e produção de muco, aumento da permeabilidade intestinal mediado pela AAF-I, indução de processo inflamatório, citotoxicidade e translocação da toxina de Shiga para a corrente sanguínea (BOISEN *et al.*, 2015).

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 intrarreinosa (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 efetor

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.

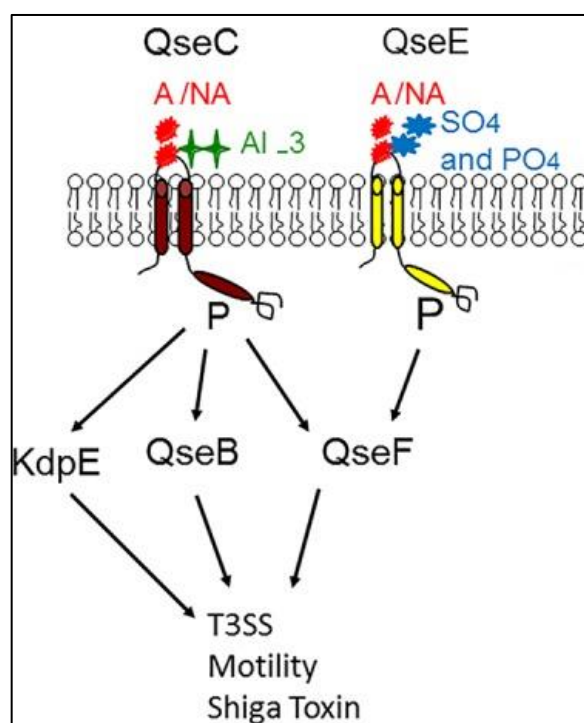


Fig. 3. Sistemas de dois componentes QseBC e QseEF na regulação da transcrição de genes envolvidos na montagem do Sistema de Secreção do Tipo III, motilidade e produção da toxina de Shiga. As siglas A/NA representam Epi/NE (KENDALL; SPERANDIO, 2016). Adaptado.

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-feniltiourea)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), fosfolipídeos, 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 peptidoglicano 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.

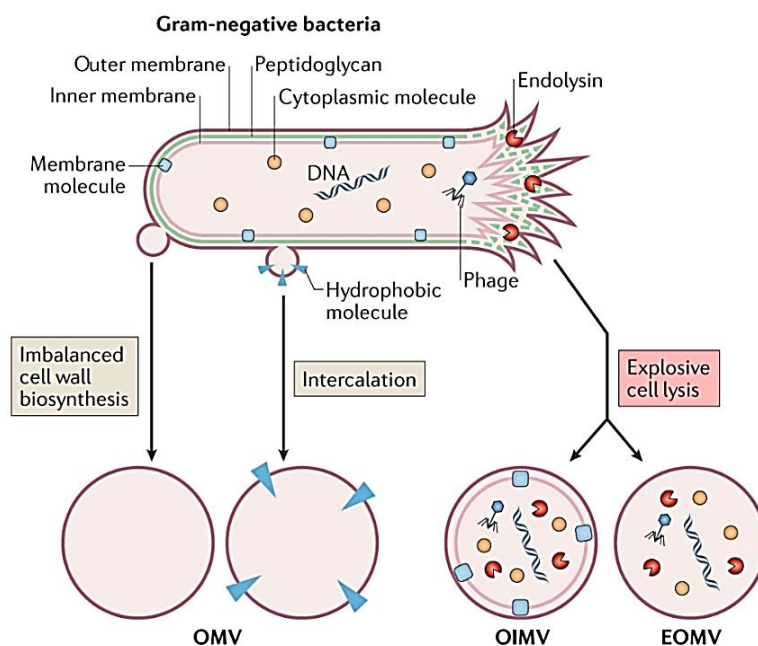


Fig. 4. Modelo esquemático da produção de OMVs (*Outer Membrane Vesicles*) através da formação de bolhas na membrana externa bacteriana, após um distúrbio no envelope celular. Formação de OIMVs (*Outer-Inner Membrane Vesicles*) e EOMVs (*Explosive Outer Membrane Vesicles*) através da lise celular por 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 matem 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.

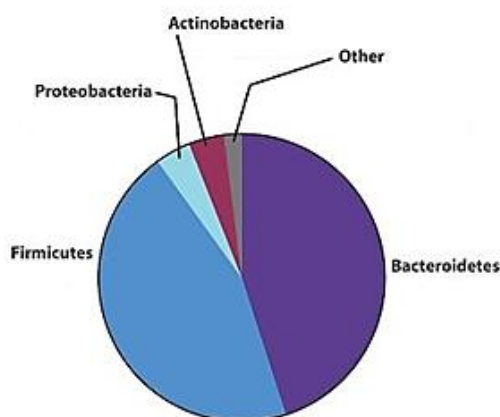


Fig. 5. Bacteroidetes e Firmicutes representam os filos mais abundantes, seguido pelos filos Proteobacteria e Actinobacteria (MCKENNEY; KENDALL, 2016). Adaptado.

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.

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.* Enteraggregative *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/es.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.* Enteraggregative *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 enteraggregative *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.* Enteraggregative *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.* Enteraggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteraggregative *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 enteraggregative *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 enteraggregative *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 Bakteriolog 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 HOUDT, 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.