Fernando Henrique Martins

**Papel da proteína EspFU em *Escherichia coli*
enteropatogênica atípica**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Dr. Waldir Pereira Elias Junior

Versão original

São Paulo
2017

RESUMO

MARTINS, F. H. **Papel da proteína EspFU em *Escherichia coli* enteropatogênica atípica.** 2017. 144 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Escherichia coli enteropatogênica atípica (aEPEC) é considerada um dos principais agentes etiológicos da diarreia em várias regiões do mundo. O mecanismo central da patogenicidade de aEPEC é a capacidade de induzir rearranjo do citoesqueleto de actina, culminando em lesões *attaching-effacing* (A/E) no epitélio intestinal. Esta propriedade é desencadeada por proteínas codificadas pela ilha de patogenicidade *locus of enterocyte effacement* (LEE). No entanto, proteínas efetoras codificadas fora de LEE também podem contribuir para a virulência de aEPEC. Enquanto algumas cepas utilizam a via de fosforilação de Tir (Y-P) para induzir a formação de pedestais, outras cepas podem empregar o efector não-LEE EspFU (TccP/TccP2) para uma eficiente polimerização de actina. Neste estudo foi avaliada a prevalência e produção de EspFU, como também o papel desempenhado por esta proteína na interação com células epiteliais e colonização intestinal, aspectos essenciais da patogênese de aEPEC. O gene *espFU* foi detectado em 45,8% das cepas de aEPEC, com uma predominância do alelo *tccP2*. A maioria das cepas apresentou o *tir* fosforilado (Y-P), sugerindo que possam utilizar diferentes mecanismos para a polimerização de actina. As cepas positivas para *tccP* e *tccP2* foram significativamente associadas com os filogrupos E e B1, respectivamente. A produção de EspFU (TccP/TccP2) foi favorecida em DMEM e variou de cepa-a-cepas, independentemente dos genótipos e filogrupos. A deleção do gene *espFU* em uma cepa de aEPEC O55:H7 (BA320) resultou em menor aderência bacteriana e comprometeu a capacidade de induzir polimerização de actina em células HeLa após 6 h de infecção. Adicionalmente, o mutante em *espFU* apresentou uma menor eficiência na colonização intestinal em um modelo murino de infecção. A análise da cinética da formação de pedestais por aEPEC mostrou que, embora cepas expressando EspFU tenham sido mais aderentes e induziram polimerização de actina mais rapidamente em comparação à via de TirY-P, não foram observadas diferenças significativas no número de pedestais formados após 6 h. Os ensaios de qRT-PCR demonstraram que a adesão bacteriana e formação de pedestais mediada por EspFU regulou negativamente a expressão de LEE durante o curso da infecção. Além disso, a análise da resposta transcricional epitelial por RNA-seq revelou uma maior ativação de genes pró-inflamatórios (NF- κ B, IL-6, IL-8, TNF, etc) em células infectadas por cepas expressando EspFU. Em contraste, a infecção pelo mutante em *espFU* resultou em uma forte supressão da resposta inflamatória, indicando a presença de mecanismos opostos de regulação da resposta imune em aEPEC. Em suma, a proteína EspFU é ampla e filogeneticamente distribuída em cepas de aEPEC, desempenha um importante papel na adesão bacteriana e colonização intestinal, e pode contribuir direta ou indiretamente para a indução de resposta inflamatória.

Palavras-chave: *Escherichia coli*. Patogenicidade. Proteína efetora. Transcriptoma. Inflamação.

ABSTRACT

MARTINS, F. H. **Role of EspFU protein in atypical enteropathogenic *Escherichia coli***. 2017. 144 p. Ph. D. thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) is one of the most important pathogens causing diarrhea disease worldwide. The hallmark of aEPEC pathogenesis is the ability to manipulate the host actin cytoskeleton, culminating in attaching and effacing (A/E) lesions on intestinal epithelium, a property triggered by proteins encoded on a pathogenicity island called locus of enterocyte effacement (LEE). However, non-LEE encoded effectors could also contribute to the virulence of aEPEC strains. While some aEPEC require tyrosine phosphorylation (Y-P) of Tir to trigger actin assembling, certain strains whose Tir is not tyrosine phosphorylated utilize the non-LEE T3SS-translocated effector Tir-cytoskeleton coupling protein (TccP/TccP2, also named EspFU) for efficient actin polymerization. In the present study, we evaluated the prevalence, production, and functions played by the EspFU protein on important aspects of aEPEC pathogenesis, such as interaction with epithelial cells and intestinal colonization. The *tccP* and/or *tccP2* genes were detected in 45.8% of the aEPEC strains, with a predominance of *tccP2* allele. Most of these strains carried *tir*^{Y-P}, suggesting that can trigger actin polymerization using both Tir tyrosine phosphorylation and TccP/TccP2 pathways. aEPEC strains carrying *tccP* or *tccP2* were significantly associated to phylogroups E and B1, respectively. We also observed a differential production of TccP/TccP2 among the strains, regardless genotypes and phylogeny. Deletion of *espFU* from aEPEC BA320 (serotype O55:H7) significantly decreased bacterial adherence and impaired the ability to induce actin rearrangement in HeLa cells after 6 h of infection. Also, the *espFU* mutant showed lower colonization levels compared to the wild-type strain in a murine infection model. Analysis of the kinetics of pedestal formation showed that, even though EspFU-expressing strains were more adherent and induced actin rearrangement more rapidly than Tir-phosphorylated (Tir^{Y-P}) producing aEPEC, no significant differences were observed regarding the pedestal numbers at 6 h postinfection. Importantly, bacterial adherence and pedestal formation driven by EspFU downregulated the LEE expression, and also induced changes in the epithelial transcriptional response, specifically by activating pro-inflammatory genes such as NF- κ B, IL-6, IL-8 and TNF α . In summary, our data suggest that EspFU protein is wide and phylogenetically distributed among aEPEC strains, and plays an important role on bacterial attachment and intestinal colonization. Moreover, aEPEC could induce inflammation in an EspFU-dependent manner.

Keywords: *Escherichia coli*. Pathogenesis. Effector protein. Transcriptome. Inflammation.

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)

Bactérias patogênicas têm desenvolvido mecanismos complexos e sofisticados de virulência para manipular vias de sinalização do hospedeiro e, deste modo, estabelecer condições mais favoráveis para sua sobrevivência e colonização. Uma importante estratégia de infecção empregada por patógenos bacterianos é a produção de sistemas de secreção que translocam uma variedade de proteínas efetoras para a célula hospedeira (DEAN; KENNY, 2009). Uma vez translocados para a célula hospedeira, os efetores ligam-se especificamente a seus alvos celulares, possibilitando deste modo que, mesmo em baixas concentrações, possam desempenhar suas funções. Interessantemente, o mecanismo de ação de muitos efetores consiste em mimetizar proteínas do hospedeiro envolvidas em várias vias de sinalização, como a dinâmica do citoesqueleto, tráfego de membrana, transcrição, progressão do ciclo celular, transdução de sinal e ubiquitinação (HICKS; GALAN, 2013).

Um modelo extensivamente explorado de como patógenos podem utilizar a maquinaria da célula hospedeira em seu benefício é a modulação do citoesqueleto de actina promovido por *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), uma das principais causas bacterianas de diarreia aguda e persistente em várias regiões do mundo, especialmente entre crianças menores de cinco anos de idade (HU; TORRES, 2015; LANATA et al., 2013).

Historicamente, o termo EPEC foi utilizado pela primeira vez para descrever cepas de *E. coli* pertencentes a certos sorogrupos que foram epidemiologicamente associadas com surtos de diarreia infantil entre os anos 1940 e 1950 na Europa e América do Norte (BRAY, 1945; NETER et al., 1955). A atual definição de EPEC refere-se a cepas diarreiogênicas de *E. coli* que induzem uma histopatologia no epitélio intestinal denominada lesão *attaching and effacing* (A/E) e não produzem toxinas Shiga (Stx), uma característica que as difere de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (NATARO; KAPER, 1998).

Cepas de EPEC são divididas em típicas (tEPEC) e atípicas (aEPEC) com base na presença ou ausência do plasmídeo *EPEC adherence fator* (EAF), respectivamente (KAPER, 1996). Este plasmídeo codifica a fímbria *Bundle-Forming*

Pilus (BFP) (GIRÓN et al., 1991), que é responsável pela formação do padrão de adesão localizada (AL), um fenótipo característico de tEPEC (SCALETISKY et al., 1984). Já aEPEC podem apresentar diferentes fenótipos de aderência, como adesão localizada-*like* (ALL), tido como o mais comum (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002), além de adesão difusa (AD), adesão agregativa (AA), padrões indefinidos e cepas não-aderentes (NA) *in vitro* (ABE et al., 2009; DULGUER et al., 2003; GOMES et al., 2004; NUNES et al., 2003; ROBINS-BROWNE et al., 2004; SCALETISKY et al., 1999; SCALETISKY et al., 2010; VIEIRA et al., 2001).

Enquanto que as cepas de tEPEC geralmente pertencem a um conjunto bem estabelecido de sorogrupos (O55, O86, O111, O114, O119, O127 e O142), aEPEC estão distribuídas em uma grande diversidade de sorotipos (GOMES et al., 2016a; HERNANDES et al., 2009; INGLE et al., 2016a).

Nos últimos anos, diversos estudos epidemiológicos demonstraram que aEPEC tem sido frequentemente detectada tanto em países industrializados quanto em desenvolvimento (GOMES et al., 2016b; HERNANDES et al., 2009; HU; TORRES, 2015; OCHOA et al., 2008; SAKKEJHA et al., 2013), sendo até mesmo descritos surtos de doença diarreica associados a este patotipo (PARK et al., 2014; VIEIRA et al., 2016). Já a prevalência de tEPEC diminuiu significativamente nestas regiões, com exceção de áreas sub-desenvolvidas, onde este patotipo parece ser ainda uma importante causa de diarreia infantil (IFEANYI et al., 2015; SANTONA et al., 2013; SINGH et al., 2017).

Embora aEPEC seja mais comumente associada com diarreia aguda, casos de diarreia persistente (AFSET et al., 2004; NGUYEN et al., 2006) e até mesmo diarreia com sangue (BIELASZEWSKA et al., 2007) têm sido descritos.

Diferentemente de tEPEC, quase que exclusivamente isoladas de humanos (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002), cepas de aEPEC têm sido frequentemente detectadas em diferentes espécies de animais e seus ambientes (ÁLVAREZ-SUARÉZ et al., 2016; BERALDO et al., 2014; BOLTON; ENNIS; McDOWELL, 2014; COMERY et al., 2013; MARTINS et al., 2013; MARTINS et al., 2016; MONAGHAN et al., 2013; MOURA et al., 2009; OTERO et al., 2013; SANCHES et al., 2017; WATSON et al., 2017), bem como em alimentos (ALONSO et al., 2016; GONZÁLEZ et al., 2017; ZHANG et al., 2016).

Cepas de aEPEC podem apresentar um repertório de virulência bastante heterogêneo, especialmente devido à plasticidade de seus genomas que permitem a

aquisição de genes de virulência derivados de outros patótipos de *E. coli* diarréiogênicas ou que causam doenças extra-intestinais (ExPEC) (BANDO et al., 2009; HERNANDES et al., 2009). Deste modo, aEPEC pode carregar genes que codificam adesinas fimbriais e afimbriais (AFSET et al., 2006; GOMES et al., 2011; HERNANDES et al., 2011; SCALETSKY et al., 2009), enterotoxinas (DUTTA et al., 2015; HAZEN et al., 2017a; SILVA et al., 2014), hemolisinas (MAGALHÃES et al., 2011; MURASE et al., 2012; PIAZZA et al., 2013) e uma série de proteínas autotransportadoras (ABREU et al., 2013; ABREU et al., 2016; RUIZ et al., 2014). Adicionalmente, algumas cepas apresentam a capacidade de invadir células epiteliais (PACHECO et al., 2014) ou formar biofilmes em superfícies abióticas (CULLER et al., 2014; NASCIMENTO et al., 2014).

1.2 Lesão A/E e *locus of enterocyte effacement* (LEE)

O mecanismo central da patogenicidade de EPEC, tanto típicas quanto atípicas, é a habilidade de utilizar proteínas efetoras para a subversão de vias de sinalização na célula hospedeira, especialmente aquelas relacionadas à dinâmica do citoesqueleto de actina, o que permite a adesão aos enterócitos e colonização do trato intestinal por estas bactérias (FRANKEL; PHILLIPS, 2008). A reorganização do citoesqueleto promovido por aEPEC resulta em lesões histopatológicas denominadas *attaching and effacing* (A/E) (**Figura 1**), caracterizadas pela destruição das microvilosidades, polimerização dos filamentos de actina e formação de estruturas semelhantes a pedestais, sobre as quais as bactérias permanecem intimamente aderidas (MOON et al., 1983). A capacidade de causar lesões A/E *in vitro* pode ser verificada pelo teste de FAS (*fluorescent actin staining*), que detecta o acúmulo de actina polimerizada nos sítios de adesão bacteriana (KNUTTON et al., 1989).

Figura 1 – Lesão histopatológica *attaching and effacing* (A/E).

(A) Fotomicrografia eletrônica de varredura e (B) eletrônica de transmissão dos pedestais induzidos sob as bactérias aderidas (seta branca) e do apagamento das microvilosidades intestinais (seta preta). Fonte: WONG et al. (2011).

A capacidade em promover lesões A/E no epitélio intestinal é crítica para a patogênese de EPEC, estando este fenótipo associado à expressão de genes contidos em uma ilha de patogenicidade (PAI) cromossômica conhecida como *locus of enterocyte effacement*, ou região LEE (MCDANIEL et al., 1995). A regulação da expressão de LEE é um processo complexo que envolve condições ambientais, *quorum sensing*, além de uma rede de fatores transcricionais e pós-transcricionais (BHATT et al., 2016; FRANZIN; SIRCILI, 2015).

A região LEE é composta por pelo menos 41 genes, divididos em sete *operons* (**Figura 2**): LEE1, LEE2, LEE3, LEE4, LEE5, LEE6 e LEE7 (GAYTÁN et al., 2016; MELLIES et al., 1999; SÁNCHEZ-SANMARTIN et al., 2001; YERUSHALMI et al., 2014). De um modo geral, os *operons* LEE1, LEE2 e LEE3 codificam os componentes de um sistema de secreção do tipo III (SST3), além do regulador Ler (*LEE-encoded regulator*), que controla a expressão dos demais *operons* de LEE e alguns genes contidos fora dessa região (ELLIOTT et al., 2000; MELLIES et al., 1999). LEE4 codifica as proteínas secretadas EspA, EspB, EspD e EspF, entre outras (ELLIOTT et al., 1998). LEE5 codifica a proteína de membrana externa intimina e seu receptor translocado Tir (DONNENBERG; YU; KAPER, 1993; JERSE; KAPER, 1991; KENNY et al., 1997a). Intimina desempenha um importante papel na adesão íntima à célula epitelial (KENNY et al., 1997a) e diferentes subtipos desta adesina têm sido descritos em aEPEC (FRANCO et al., 2012; XU et al., 2016). LEE6

contém os genes *espG* e *orf1* (DENG et al., 2001) e LEE7 codifica os reguladores GrIA (*global regulator of LEE-activator*) e GrIR (*global regulator of LEE-regulator*) (DENG et al., 2004).

Figura 2 - Estrutura genética da ilha de patogenicidade *locus of enterocyte effacement* (LEE) de EPEC.

Fonte: GAYTÁN et al. (2016).

O SST3 de EPEC, ou injetossomo, é formado por mais de 20 proteínas (**Figura 3**) que, de um modo geral, compõe o complexo fornecedor de energia com atividade de ATPase (EscN, EscL e EscO), o corpo basal (EscC, EscR, EscS, EscT, EscU, EscV e EscJ), a agulha EscF onde ocorre a polimerização dos filamentos de EspA, formando um canal para a secreção de proteínas, além de EspB e EspD, que formam o poro translocador (GAYTÁN et al., 2016).

Análises filogenômicas demonstraram que EPEC compreende diversas linhagens clonais, as quais têm evoluído em múltiplas ocasiões por meio da aquisição de diferentes subtipos de LEE e efetores (HAZEN et al., 2013; INGLE et al., 2016b). O repertório de efetores de EPEC é composto por cerca de 20 a 30 proteínas (DEAN; KENNY, 2009), algumas codificadas por LEE (EspF, EspG, EspH, EspZ, Map e Tir) e outras cujos genes não estão contidos nesta região (*Non-Lee encoded effectors*), como Cif, EspJ, EspM, EspT, NleA, NleB, NleC, NleD, NleE, NleF, NleG e NleH (GOMES et al., 2016b; PEARSON et al., 2016; SALVADOR et al., 2014; WONG et al., 2011; XU et al., 2017). Interessantemente, a maioria destas proteínas está envolvida na modulação da resposta imune por patógenos A/E (SANTOS; FINLAY, 2015; PEARSON; HARTLAND, 2014; PEARSON et al., 2016).

Figura 3 – Representação esquemática do sistema de secreção do tipo III de patógenos A/E.

O SST3 é dividido em três partes: componentes citoplasmáticos, corpo basal e apêndice extracelular (agulha, filamento e poro translocador). Fonte: GAYTÁN et al. (2016).

1.3 Modulação da resposta imune por EPEC

A infecção por patógenos A/E geralmente resulta na ativação de uma resposta inflamatória decorrente do reconhecimento de produtos microbianos, como flagelina (KHAN et al., 2008; SAMPAIO et al., 2009; SCHULLER et al., 2009) ou SST3 (LITVAK et al., 2017), pelos receptores de superfície e intracelulares e até mesmo como resultado da adesão íntima (SALAZAR-GONZALEZ; NAVARRO-GARCIA, 2010). Consequentemente, ocorre a ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B), desencadeando a sinalização para a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-8, IL-6, TNF- α e IL-1 β , que culmina na infiltração de neutrófilos (NEURATH et al., 1998).

No entanto, a infecção por EPEC induz pouca inflamação quando comparada a outros enteropatógenos como *Salmonella* e *Shigella* (RUCHAUD-SPARAGANO; MARESCA; KENNY, 2007), indicando a presença de uma resposta atenuante. De fato, diversos estudos têm demonstrado que a ativação de NF- κ B é diminuída durante o curso da infecção (NOBE et al., 2009; RUCHAUD-SPARAGANO; MARESCA; KENNY, 2007; SAVKOVIC et al., 1997; SHARMA et al., 2006). Estudos posteriores reportaram que a atividade anti-inflamatória era dependente de um SST3 funcional (HAUF; CHARKRABORTY, 2003) e da translocação de efetores para a célula hospedeira, especialmente aqueles codificados fora de LEE, que podem atuar em diferentes etapas da resposta inflamatória (**Figura 4**) (BARUCH et al., 2011; MUHLEN et al., 2011; NADLER et al., 2010; NEWTON et al., 2010; PEARSON et al., 2011; PEARSON; HARTLAND, 2014; PEARSON et al., 2016; VOSENKAMPER et al., 2010). Estes efetores não-LEE são altamente conservados entre os patógenos A/E e geralmente codificados por profagos ou ilhas de patogenicidade, sugerindo que a aquisição destes elementos foi necessária em algum ponto da evolução para atenuar a resposta inflamatória ativada pela interação com a célula hospedeira. De fato, uma cepa de EPEC E2348/69 mutante em duas ilhas genômicas (PP4 e IE6) que codificam sete efetores, induziu uma maior resposta inflamatória que a cepa selvagem (NEWTON et al., 2010; PEARSON et al., 2011). Em conjunto, estes estudos indicam que a inflamação produzida por EPEC resultaria do balanço entre as respostas pró- e anti-inflamatórias (SHARMA et al., 2006).

Além da inflamação, os efetores translocados por EPEC também podem modular as vias de sinalização de morte celular (GIOGHA et al., 2014). Estes efetores atuam em conjunto, em diferentes pontos da via, para prevenir a apoptose e promover a sobrevivência da célula hospedeira a fim de manter o nicho de infecção (PEARSON et al., 2016).

The diagram illustrates the signaling pathways involved in EPEC infection-induced inflammation and apoptosis. The EPEC bacterium is shown at the top, with its T3SS (Type III Secretion System) needle and effectors entering the host cell. The pathways are divided into several main sections:

- Inflammation:** T3SS effectors activate RhoGEF and EspH, leading to NleA and NleH1-mediated inhibition of RPS3. NleH1 also promotes the NF-κB pathway (IκBα, IκBβ, NF-κB, AP-1, ERK, MAPK, JNK, p38, NleD, Iκκ). NleC and NleE are also involved in inflammation.
- Apoptosis:** T3SS effectors activate Casp-3 and Casp-9. Casp-9 is activated by NleF and tBID. Casp-3 is activated by Casp-9 and Active caspase-8. Active caspase-8 is formed from Pro-Casp-8 (FADD, RIPK1) and is also involved in the TNF pathway.
- Other pathways:** NLRP3 inflammasome (NLRP3, ASC, Pro-Casp-1) leads to Active caspase-1 and Active IL-1β. Src (FcrγIIa, FcγRIIa) is involved in ADP-ribose and Src. TIR (TIR, TRAF2, RIPK1, TRADD, TNFR1) is involved in TNF. TLR4 (MAL, MYD88, TLR4) is involved in LPS.

The diagram uses various colored boxes and arrows to represent different proteins and their interactions, with a legend at the bottom identifying the components.

1.4 Mecanismos de indução da polimerização de actina por patógenos A/E

1.4.1 Fosforilação de Tir (via Nck)

Embora seja um efetor absolutamente requerido para a formação de pedestais, o Tir das cepas canônicas de EPEC (E2348/69) e EHEC (EDL933)

apresentam apenas 40% de similaridade em seus domínios carboxi-terminais e são, portanto, funcionalmente distintos, o que reflete os diferentes mecanismos moleculares empregados por estes patógenos para promover o fenótipo A/E (DE VINNEY et al., 2001). Após translocação e inserção na membrana citoplasmática, o Tir de EPEC é fosforilado por quinases celulares no resíduo de tirosina (Y) 474, localizado dentro de um polipeptídeo de 12 aminoácidos presente no domínio carboxi-terminal desta proteína (CAMPELLONE et al., 2002; KENNY, 1999). Em isolados clínicos, a posição deste resíduo de tirosina pode ser sutilmente modificada devido a pequenas inserções ou deleções. A fosforilação de Y474 propicia a ligação do motivo consenso YPPDEP/D/V com o domínio SH2 (*Src homology 2*) da proteína adaptadora Nck (*non-catalytic region of tyrosine kinase*), que por sua vez utiliza seus domínios SH3 (*Src homology 3*) para ligar aos resíduos ricos de prolina e ativar N-WASP (*Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein*). A ativação desta proteína estimula a polimerização de actina mediada pelo complexo Arp2/3 (*actin-related protein*), culminando na formação de pedestais sob os sítios de adesão bacteriana (CAMPELLONE et al., 2002).

1.4.2 *EspFU*

Em contraste, o Tir de EHEC não possui um resíduo equivalente à tirosina 474, não é fosforilado e, portanto, não se liga a Nck para iniciar a polimerização de actina (DE VINNEY et al., 1999; DE VINNEY et al., 2001). Além disso, o fato de que apenas a região LEE de EPEC poderia conferir o fenótipo A/E quando clonada em uma *E. coli* K-12 indicava que algum outro fator além de Tir era necessário para a formação de pedestais por EHEC (ELLIOTT et al., 1999). De fato, dois estudos independentes, conduzidos quase que simultaneamente, descreveram o elo que faltava entre Tir e a polimerização de actina em EHEC, uma proteína efetora codificada fora de LEE denominada EspFU (CAMPELLONE; ROBBINS; LEONG, 2004; GARMENDIA et al., 2004).

O primeiro estudo baseou-se no fato que muitos determinantes de virulência são codificados por elementos genéticos móveis presentes em bactérias patogênicas e ausentes em comensais (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). A deleção de regiões específicas do genoma de EHEC EDL933 resultou na identificação da ORF Z3072 (PERNA et al., 2001) contida no profago CP-933U

(**Figura 5A**), que foi associada com polimerização de actina. Estes autores a identificaram como *espFU*, devido à similaridade com a proteína EspF (CAMPELLONE; ROBBINS; LEONG, 2004). O segundo estudo utilizou dados de transcriptoma, onde a expressão da ORF Z3072 foi reprimida durante o curso da infecção por EHEC EDL933, assim como *eae* e *tir*, indicando um possível papel na patogênese (DAHAN et al., 2004). Análises funcionais de Z3072 confirmou o papel da proteína correspondente, denominada TccP (*Tir-cytoskeleton coupling protein*), na formação de pedestais (GARMENDIA et al., 2004). Deste modo, EspFU e TccP correspondem a duas diferentes nomenclaturas para a mesma proteína. Em EHEC, a expressão de *espFU* é regulada pelo sistema de dois-componentes QseEF (READING et al., 2007) e de maneira pós-transcricional pelos *small* RNAs (sRNAs) GImY e GImZ (GRUBER; SPERANDIO, 2014).

EspFU é composta por uma região amino-terminal que promove sua translocação para a célula hospedeira via SST3 (GARMENDIA et al., 2006), seguida por seis quase idênticos resíduos conservados de 47 aminoácidos, ricos em prolina, que se repetem pela sequência da proteína. Diferentemente de Nck, EspFU não liga-se diretamente a Tir; a ligação entre estes efetores é mediada por proteínas da família I-BAR, como IRSp53 (*Insulin receptor substrate protein of 53 kDa*) e IRTKS (*Insulin receptor tyrosine kinase substrate*) (VINGADASSALOM et al., 2009; WEISS et al., 2009). A porção carboxi-terminal dos resíduos repetitivos ricos em prolina (PRRs) de EspFU liga-se ao domínio SH3 de IRSp53 e IRTKS (**Figura 5B**), que por sua vez ligam-se ao motivo conservado asparagina-prolina-tirosina (NPY₄₅₈) da região carboxi-terminal de Tir (VINGADASSALOM et al., 2009; WEISS et al., 2009). O motivo NPY, assim como Y474, encontra-se dentro de um polipeptídeo de 12 aminoácidos, indicando que estas pequenas regiões contêm a informação necessária para a formação de pedestais por EPEC e EHEC, respectivamente (ALLEN-VERCOE et al., 2006; CAMPELLONE et al., 2002). A interação entre EspFU e as proteínas I-BAR recruta N-WASP, a qual se liga à porção amino-terminal dos resíduos repetidos de EspFU, promovendo sua ativação, que por sua vez recruta e ativa o complexo Arp2/3, culminando na polimerização local de actina (CAMPELLONE; ROBBINS; LEONG, 2004).

Interessantemente, EspFU desempenha suas funções por mimetizar ativadores endógenos, competindo pelos sítios de ligação. Especificamente, EspFU liga-se com maior afinidade ao domínio SH3 de IRTKS do que seus ligantes naturais

devido à presença de um resíduo de triptofano entre as repetições em sequência PxxP (AITIO et al., 2012). Similarmente, EspFU desativa o estado autoinibitório de N-WASP ao se ligar com maior afinidade ao domínio GBD (*GTPase-binding*) desta proteína em relação a ativadores endógenos como Cdc42 (*cell division control*) (CHENG et al., 2008). Outra característica importante da atividade de EspFU é a multivalência (**Figura 5B e C**). A presença do domínio amino-terminal e dois PRRs são suficientes para EspFU desencadear polimerização de actina (GARMENDIA et al., 2005). No entanto, um maior número de PRRs é correlacionado com uma atividade potencializada (SALLEE et al., 2008). Portanto, o fato de EspFU apresentar múltiplos PRRs indica que pode se ligar a vários domínios GBD de N-WASP, potencializando o sinal e culminando em maior ativação do complexo Arp2/3 (CAMPELLONE et al., 2008; SALLEE et al., 2008).

Figura 5 – Papel de EspFU na polimerização de actina.

(A) Os genes que codificam *EspFU* (*TccP/TccP2*) em EHEC (EDL933) estão contidos na extremidade 5' e 3' dos profagos CP-933U e CP-933M. (B) Após translocação para a célula hospedeira, a interação de *EspFU* com IRTKS/IRSp53 e N-WASP desencadeia a polimerização de actina mediada pelo complexo Arp2/3. A multivalência de *EspFU* resulta na ativação de muitas moléculas de N-WASP e potencialização do sinal. (C) Representação de um resíduo repetitivo rico em prolina. As regiões destacadas representam os sítios de ligação à N-WASP e ao domínio SH3 de IRTKS/IRSp53. Fonte: GARMENDIA et al. (2004); CAMPELLONE (2010).

Recentemente, foi mostrado que EspFU pode contribuir para a expansão da bactéria pelo epitélio (**Figura 6**), em um mecanismo de motilidade mediado por actina (VELLE; CAMPELLONE, 2017). De acordo com esse modelo, as bactérias aderidas utilizariam os pedestais para o deslocamento até uma célula vizinha, translocando efetores, promovendo a polimerização de um segundo pedestal e, desta forma, expandindo a área de colonização, mantendo-se intimamente aderida ao epitélio. Outra atividade também atribuída a EspFU é a capacidade de romper a barreira *trans* epitelial de células polarizadas, muito devidamente à similaridade com EspF (VISWANATHAN et al., 2004).

Figura 6 – Transmissão célula-a-célula mediada por EspFU.

Após a adesão inicial (1), patógenos AE translocam uma série de efetores (2), dentre os quais EspFU, que resulta na formação de pedestais (3). Por meio da motilidade mediada por actina, o patógeno pode atingir uma célula vizinha, translocando novamente efetores (4) e formando um novo pedestal (5), após o qual ocorre a multiplicação (6) e separação das bactérias (7). Fonte: VELLE e CAMPELLONE (2017).

As cepas EHEC O157:H7 EDL933 e Sakai também apresentam um pseudogene (Z1385 e ECs2715, respectivamente) contido no profago CP-933M/Sp4 (**Figura 5A**), que apresenta uma deleção na posição 28, tornando-o inativo. Interessantemente, formas intactas deste gene foram encontradas em cepas de EHEC O157 que não fermentam sorbitol (OGURA et al., 2007). A proteína correspondente apresentou uma porção amino-terminal com 80 aminoácidos 69,5% similar ao respectivo domínio de EspFU, além de PRRs praticamente idênticos. Análises funcionais demonstraram que essa proteína, denominada EspFM ou

TccP2, também foi translocada via SST3 para a célula hospedeira e induziu a polimerização de actina em células epiteliais (OGURA et al., 2007).

Posteriormente, os genes *espFU/tccP* e *tccP2* foram detectados em outras cepas de *E. coli* formadoras de lesões A/E (AEEC) isoladas de humanos e animais, como EHEC não pertencente ao sorogrupo O157 e EPEC, típicas e atípicas, (GARMENDIA et al., 2005; OGURA et al., 2007; OOKA et al., 2007; WHALE et al., 2006; WHALE et al., 2007). Estes genes apresentaram polimorfismos de tamanho, que correspondiam à presença de um número variável (2 a 9) de PRRs (GARMENDIA et al., 2005; OOKA et al., 2007). Interessantemente, os genes *tccP* e *tccP2* foram associados com EPEC das linhagens 2 (WHALE et al., 2006) e 4 (WHALE et al., 2007), respectivamente, sobretudo em cepas que apresentavam Tir contendo Y474 (similar ao de E2348/69), sugerindo a presença de mecanismos redundantes (Tir:Nck e Tir:EspFU) de polimerização de actina. No entanto, não é certo se a habilidade de utilizar ambos os mecanismos para formação de pedestais poderia conferir alguma vantagem competitiva para estas cepas de EPEC.

1.4.3 Vias alternativas

Embora a fosforilação de TirY474 e EspFU sejam mecanismos mais potentes, cepas AEEC também podem empregar vias alternativas de polimerização de actina (**Figura 7**), porém menos eficientes (LAI et al., 2013). Os resíduos Y454 e Y458 são conservados em moléculas de Tir de EPEC e EHEC. A fosforilação destes resíduos pode iniciar a polimerização de actina independentemente de Nck, muito possivelmente mediado pela ligação de proteínas I-BAR ao receptor Tir, embora esse mecanismo não esteja completamente elucidado (BRADY et al., 2007; CAMPELLONE; LEONG, 2005). Isso sugere que a ocorrência de uma via comum de polimerização de actina, que foi potencializada durante a evolução pela aquisição do sítio contendo Y474 no Tir de EPEC e pelo profago codificando EspFU em EHEC. Essa via canônica poderia explicar o fato de uma cepa de aEPEC O125:H6, cujo Tir não é fosforilado e não expressa EspFU, ser capaz de induzir a formação de lesões A/E na mucosa intestinal (BAI et al., 2008). Um mecanismo independente de N-WASP relacionado com a atividade multivalente dos resíduos repetitivos de EspFU também tem sido reportado (VINGADASSALOM et al., 2010).

Figura 7 – Diferentes vias para formação de lesões A/E.

A fosforilação do resíduo de tirosina 474 de Tir é crítico para cepas de EPEC da linhagem 1 (E2348/69) induzirem polimerização de actina mediante o recrutamento de Nck (1). Em EHEC O157, os resíduos NPY₄₅₈ são necessários para o recrutamento de EspFU (2). As duas vias culminam na ativação de N-WASP e polimerização de actina mediada pelo complexo Arp2/3. O Tir de algumas cepas de EPEC e EHEC não-O157 contém ambos os resíduos, Y₄₇₄ e NPY₄₅₈, podendo gerar pedestais por ambas as vias. Outros mecanismos alternativos, independentes de Nck (a e b) e/ou N-WASP (c) têm sido descritos. Fonte: LAI et al. (2013).

Um estudo previamente conduzido por nosso grupo (ROCHA et al., 2011) demonstrou que a introdução de um plasmídeo expressando EspFU em uma aEPEC O88:H-, não aderente a células epiteliais *in vitro*, restabeleceu a aderência e capacidade de induzir a polimerização de actina desta cepa. Esses dados interessantes indicaram uma possível participação de EspFU na adesão bacteriana, aspecto ainda pouco abordado na literatura, sobretudo em aEPEC. Além disso, a alta prevalência dos genes *espFU* em determinados grupos de aEPEC, em especial cepas pertencentes ao sorotipo O55:H7 (GARMENDIA et al., 2005), indica que EspFU poderia ser importante para a patogênese deste patótipo. Patógenos A/E podem induzir uma resposta transcricional muito divergente nas células hospedeiras (STEKEL et al., 2005), que pode ser associado às diferentes vias de polimerização de actina utilizadas. Deste modo, a comparação de cepas que utilizam diferentes mecanismos para promover o fenótipo A/E seria extremamente importante para melhor compreender a interação de aEPEC com a célula hospedeira.

Diante do exposto, este estudo teve por interesse explorar o papel desempenhado pela proteína EspFU em aEPEC.

6 CONCLUSÕES

Em conjunto, os resultados obtidos neste estudo permite-nos concluir que:

- I. Os genes que codificam EspFU (*tccP* e *tccP2*) são ampla e filogeneticamente distribuídos entre cepas de aEPEC;
- II. Ocorre uma produção *in vitro* diferencial de EspFU (TccP/TccP2) em aEPEC;
- III. EspFU contribui para a patogenicidade de aEPEC, uma vez que desempenha um importante papel na adesão bacteriana, formação de pedestais e colonização intestinal;
- IV. A dinâmica da formação de lesões A/E depende dos mecanismos moleculares empregados para polimerização de actina, podendo afetar tanto a resposta transcricional do patógeno quanto do hospedeiro;
- V. A adesão bacteriana e capacidade de formar pedestais induz a expressão de genes pró-inflamatórios, em especial quando mediada por EspFU.
- VI. EspFU pode estar direta ou indiretamente relacionada com a ativação da resposta inflamatória decorrente da infecção por aEPEC, uma atividade até então desconhecida.

REFERENCIAS*

- ABE, C. M.; BLANCO, M.; DHABI, G.; BLANCO, J. E.; BLANCO, J.; FRANZOLIN, M. R.; TADDEI, C. R.; PIAZZA, R. M. F.; MARTINEZ, M. B.; ELIAS, W. P. Virulence features of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* identified by the *eae*(+) EAF-negative *stx*(-) genetic profile. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 64, p. 357-365, 2009.
- ABREU, A. G.; BUERIS, V.; PORANGABA, T. M.; SIRCILI, M. P.; NAVARRO-GARCIA, F.; ELIAS, W. P. Autotransporter protein-encoding genes of diarrheagenic *Escherichia coli* are found in both typical and atypical enteropathogenic *E. coli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 79, p. 411-414, 2013.
- ABREU, A. G.; ABE, C. M.; NUNES, K. O.; MORAES, C. T.; CHAVEZ-DUENAS, L.; NAVARRO-GARCIA, F.; BARBOSA, A. S.; PIAZZA, R. M.; ELIAS, W. P. The serine protease Pic as a virulence factor of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Gut Microbes.**, v. 7, p. 115-125, 2016.
- AFSET, J. E.; BEVANGER, L.; ROMUNDSTAD, P.; BERGH, K. Association of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with prolonged diarrhoea. **J. Med. Microbiol.**, v. 53, p. 1137-1144, 2004.
- AFSET, J. E.; BRUANT, G. BROUSSEAU, R.; HAREL, J.; ANDERSSSEN, E.; BEVANGER, L.; BERGH, K. Identification of virulence genes linked with diarrhea due to atypical enteropathogenic *Escherichia coli* by DNA microarray analysis and PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, p. 3703-3711, 2006.
- AITIO, O.; HELLMAN, M.; SKEHAN, B.; KESTI, T.; LEONG, J. M.; SAKSELA, K.; PERMI, P. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* exploits a tryptophan switch to hijack host f-actin assembly. **Structure.**, v. 20, p. 1692-1703. 2012.
- ALIPOUR, M.; LOU, Y.; ZIMMERMAN, D.; BORDING-JORGENSEN, M. W.; SERGI, C.; LIU, J. J.; WINE, E. A balanced IL-1 β activity is required for host response to *Citrobacter rodentium* infection. **PLoS One.**, v. 8, p. e80656, 2013.
- ALLAKER, R.P.; KAPAS, S. Adrenomedullin expression by gastric epithelial cells in response to infection. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 10, p. 546-551, 2003.
- ALSHARIF, G.; AHMAD, S.; ISLAM, M. S.; SHAH, R.; BUSBY, S. J.; KRACHLER, A. M. Host attachment and fluid shear are integrated into a mechanical signal regulating virulence in *Escherichia coli* O157:H7. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 112, p. 5503-5508, 2015.
- ALLEN-VERCOE, E.; WADDELL, B.; TOH, M. C.; DEVINNEY, R. Amino acid residues within enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Tir involved in phosphorylation, α -actinin recruitment, and Nck-independent pedestal formation. **Infect. Immun.** v. 74, p. 6196-205, 2006.
- ALONSO, M. Z.; SANZ, M. E.; IRINO, K.; KRUGER, A.; LUCCHESI, P. M.; PADOLA, N. L. Isolation of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* from chicken and chicken-derived products. **Br Poult Sci.**, v. 57, p. 161-164, 2016.
- ALVAREZ-SUAREZ, M. E.; OTERO, A.; GARCIA-LOPEZ, M. L.; DAHBI, G.; BLANCO, M.; MORA, A.; BLANCO, J.; SANTOS, J. A. Genetic characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolates from goat's milk and goat farm environment. **Int J Food Microbiol.**, v. 236, p. 148-154, 2016.
- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Current Protocols in Molecular Biology**, New York: Wiley Interscience, 1987.
- BAI, L.; SCHÜLLER, S.; WHALE, N. A.; MOUSNIER, A.; MARCHES, O.; WANG, L.; OOKA, T.; HEUSCHKEL, R.; TORRENTE, F.; KAPER, J. B.; GOMES, T. A. T.; XU, J.; PHILLIPS, A. D.; FRANKEL, G. Enteropathogenic *Escherichia coli* O125:H6 triggers attaching and effacing lesions on human intestinal biopsy specimens independently of Nck and TccP/TccP2. **Infect. Immun.**, v. 76, p. 361-368, 2008.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14724**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2011.

BANDO, S. Y.; ANDRADE, F. B.; GUTH, B. E. C.; ELIAS, W. P.; MOREIRA-FILHO, C. A.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* genomic background allows the acquisition of non-EPEC virulence factors. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 299, p. 22-30, 2009.

BARUCH, K.; GUR-ARIE, L.; NADLER, C.; KOBAYASHI, S.; YERUSHALMI, G.; BEN-NERIAH, Y.; YOGEV, O.; SHAULIAN, E.; GUTTMAN, C.; ZARIVACH, R.; ROSENSHINE, I. Metalloprotease type III effectors that specifically cleave JNK and NF-kappaB. **Embo J.**, v. 30, p. 221-231, 2011.

BATTLE, S. E.; BRADY, M. J.; VANAHA, S. K.; LEONG, J. M.; HECHT, G. A. Actin pedestal formation by enterohemorrhagic *Escherichia coli* enhances bacterial host cell attachment and concomitant type III translocation. **Infect. Immun.**, v. 82, p. 3713-3722, 2014.

BERALDO, L. G.; BORGES, C. A.; MALUTA, R. P.; CARDOZO, M. V.; RIGOBELLO, E. C.; DE AVILA, F. A. Detection of Shiga toxinogenic (STEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* in dairy buffalo. **Vet. Microbiol.**, v. 170, p. 162-6, 2014.

BHATT, S.; EGAN, M.; JENKINS, V.; MUCHE, S.; EL-FENEJ, J. The Tip of the Iceberg: On the Roles of Regulatory Small RNAs in the Virulence of Enterohemorrhagic and Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, v. 6, p. 105, 2016.

BIELASZEWSKA, M.; PRAGER, R.; KÖCK, R.; MELLMANN, A.; ZHANG, W.; TSCHÄPE, H.; TARR, P. I.; KARCH, H. Shiga toxin gene loss and transfer in vitro and in vivo during enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 infection in humans. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 73, p. 3144-3150, 2007.

BOLTON, D. J.; ENNIS, C.; MCDOWELL, D. Occurrence, virulence genes and antibiotic resistance of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from twelve bovine farms in the north-east of Ireland. **Zoonoses Public Health**, v. 61, p. 149-156, 2014.

BRADY, M. J.; CAMPELLONE, K. G.; GHILDIYAL, M.; LEONG, J. M. Enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* Tir proteins trigger a common Nck-independent actin assembly pathway. **Cell. Microbiol.**, v. 9, p. 2242-2253, 2007.

BUERIS, V.; HUERTA-CANTILLO, J.; NAVARRO-GARCIA, F.; RUIZ, R. M.; CIANCIARULLO, A. M.; ELIAS, W. P. Late establishment of the attaching and effacing lesion caused by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* depends on protein expression regulated by Per. **Infect. Immun.**, v. 83, p. 379-388, 2015.

CAMPELLONE, K. G. Cytoskeleton-modulating effectors of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: Tir, EspFU and actin pedestal assembly. **Febs J.**, v. 277, p. 2390-2402, 2010.

CAMPELLONE, K. G.; GIESE, A.; TIPPER, D. J.; LEONG, J. M. A tyrosine-phosphorylated 12-amino-acid sequence of enteropathogenic *Escherichia coli* Tir binds the host adaptor protein Nck and is required for Nck localization to actin pedestals. **Mol. Microbiol.**, v. 43, p. 1227-1241, 2002.

CAMPELLONE, K. G.; ROBBINS, R.; LEONG, J. M. EspFu is a translocated EHEC effector that interacts with Tir and N/WASP and promotes Nck-independent actin assembly. **Dev. Cell.**, v. 7, p. 217-228, 2004.

CAMPELLONE, K. G.; LEONG, J. M. Nck-independent actin assembly is mediated by two phosphorylated tyrosines within enteropathogenic *Escherichia coli* Tir. **Mol. Microbiol.**, v. 56, n. 2, p. 416-432, 2005.

CAMPELLONE, K. G.; CHENG, H. C.; ROBBINS, D.; SIRIPALA, A. D.; MCGHIE, E. J.; HAYWARD, R. D.; WELCH, M. D.; ROSEN, M. K.; KORONAKIS, V.; LEONG, J. M. Repetitive N-WASP-binding elements of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* effector EspF(U) synergistically activate actin assembly. **PLoS Pathog.**, v. 4, p. e1000191, 2008.

CHANG, A. C.; COHEN, S. N. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. **J. Bacteriol.**, v. 134, p. 1141-1156, 1978.

CHEN, Y. Q.; SU, P. T.; CHEN, Y. H.; WEI, M. T.; HUANG, C. H.; OSTERDAY, K.; DEL ALAMO, J. C.; SYU, W. J.; CHIOU, A. The effect of enterohemorrhagic *E. coli* infection on the cell mechanics of host cells. **PLoS One.**, v. 9, p. e112137, 2014

CHENG, H. C.; SKEHAN, B. M.; CAMPELLONE, K. G.; LEONG, J. M.; ROSEN, M. K. Structural mechanism of WASP activation by the enterohaemorrhagic *E. coli* effector EspF(U). **Nature**, v. 454, p. 1009-1113, 2008.

CLARKE, S. C.; HAIGH, R. D.; FREESTONE, P., P.; WILLIAMS, P. H. Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 16, p. 365-378, 2003.

CLERMONT, O.; CHRISTENSON, J. K.; DENAMUR, E.; GORDON, D. M. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environ. Microbiol. Rep.**, v. 5, p. 58-65, 2013.

COMERY, R.; THANABALASURIAR, A.; GARNEAU, P.; PORTT, A.; BOERLIN, P.; REID-SMITH, R. J.; HAREL, J.; MANGES, A. R.; GRUENHEID, S. Identification of potentially diarrheagenic atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains present in Canadian food animals at slaughter and in retail meats. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 79, p. 3892-3896, 2013.

CRAVIOTO, A.; GROSS, R. J.; SCOTLAND, S.; ROWE, B. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional enteropathogenic serotypes. **Curr. Microbiol.**, v. 3, p. 95-99, 1979.

CREPIN, V. F.; HABIBZAY, M.; GLEGOLA-MADEJSKA, I.; GUENOT, M.; COLLINS, J. W.; FRANKEL, G. Tir Triggers Expression of CXCL1 in Enterocytes and Neutrophil Recruitment during *Citrobacter rodentium* Infection. **Infect. Immun.**, v. 83, p. 3342-3354, 2015.

CULLER, H. F.; MOTA, C. M.; ABE, C. M.; ELIAS, W. P.; SIRCILI, M. P.; FRANZOLIN, M. R. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains form biofilm on abiotic surfaces regardless of their adherence pattern of cultured epithelial cells. **Biomed. Res. Int.**, v. 2014, 845147, 2014.

CURTIS, M. M.; HU, Z.; KLIMKO, C.; NARAYANAN, S.; DEBERARDINIS, R.; SPERANDIO, V. The gut commensal *Bacteroides thetaiotaomicron* exacerbates enteric infection through modification of the metabolic landscape. **Cell Host Microbe**, v. 16, p. 759-769, 2014.

DAHAN, S.; KNUTTON, S.; SHAW, R. K.; CREPIN, V. F.; DOUGAN, G.; FRANKEL, G. Transcriptome of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 adhering to eukaryotic plasma membranes. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 5452-5459, 2004.

DANN, S. M.; SPEHLMANN, M. E.; HAMMOND, D. C.; IIMURA, M.; HASE, K.; CHOI, L. J.; HANSON, E.; ECKMANN, L. IL-6-dependent mucosal protection prevents establishment of a microbial niche for attaching/effacing lesion-forming enteric bacterial pathogens. **J. Immunol.**, v. 180, p. 6816-6826, 2008.

DATSENKO, K. A.; WANNER, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 97, p. 6640-6645, 2000.

DE BOER, R. F.; FERDOUS, M.; OTT, A.; SCHEPER, H. R.; WISSELINK, G. J.; HECK, M. E.; ROSSEN, J. W.; KOOISTRA-SMID, A. M. Assessing the public health risk of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by use of a rapid diagnostic screening algorithm. **J. Clin. Microbiol.**, v. 53, p. 1588-1598, 2015.

DE GRADO, M.; ROSENBERGER, C. M.; GAUTHIER, A.; VALLANCE, B. A.; FINLAY, B. B. Enteropathogenic *Escherichia coli* infection induces expression of the early growth response factor by activating mitogen-activated protein kinase cascades in epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 6217-6224, 2001.

DE VINNEY, R.; STEIN, M.; REINSCHIED, D.; ABE, A.; RUSCHOWSKI, S.; FINLAY, B. B. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 produces Tir, which is translocated to the host cell membrane but is not tyrosine phosphorylated. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 2389-2398, 1999.

DE VINNEY, R.; PUENTE, J. L.; GAUTHIER, A.; GOOSNEY, D.; FINLAY, B. B. Enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* use a different Tir-based mechanism for pedestal formation. **Mol. Microbiol.**, v. 41, p. 1445-1458, 2001.

DEAN, P.; KENNY, B. The effector repertoire of enteropathogenic *E. coli*: ganging up on the host cell. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 12, p. 101-109, 2009.

DENG, W.; PUENTE, J. L.; GRUENHEID, S.; LI, Y.; VALLANCE, B. A.; VÁZQUEZ, A.; BARBA, J.; IBARRA, J. A.; O'DONNELL, P.; METALNIKOV, P.; ASHMAN, K.; LEE, S.; GOODE, D.;

PAWSON, T.; FINLAY, B. B. Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 101, p. 3597-3602, 2004.

DONNENBERG, M. S.; YU, J.; KAPER, J. B. A second chromosomal gene necessary for intimate attachment of enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells. **J. Bacteriol.**, v. 175, p. 4670-4680, 1993.

DULGUER, M. V.; FABBRICOTTI, S. H.; BANDO S. Y.; MOREIRA-FILHO, C. A.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I. C. A. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains: phenotypic and genetic profiling reveals a strong association between enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin and diarrhea. **J. Infect. Dis.**, v. 188, p. 1685-1694, 2003.

DUPONT, A.; SOMMER, F.; ZHANG, K.; REPNIK, U.; BASIC, M.; BLEICH, A.; KUHNEL, M.; BACKHED, F.; LITVAK, Y.; FULDE, M.; ROSENSHINE, I.; HORNEF, M. W. Age-Dependent Susceptibility to Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Infection in Mice. **PLoS Pathog.**, v. 12, p. e1005616, 2016.

DUTTA, S.; PAZHANI, G. P.; NATARO, J. P.; RAMAMURTHY, T. Heterogenic virulence in a diarrheagenic *Escherichia coli*: evidence for an EPEC expressing heat-labile toxin of ETEC. **Int J Med. Microbiol.**, v. 305, p. 47-54, 2015.

ELLIOTT, S. J.; WAINWRIGHT, L.; McDANIEL, T. K.; McNAMARA, B. P.; DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B. The complete sequence of locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. **Mol. Microbiol.**, v. 28, p. 1-4, 1998.

ELLIOTT, S. J.; YU, J.; KAPER, J. B. The cloned locus of enterocyte effacement from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is unable to confer the attaching and effacing phenotype upon *E. coli* K-12. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 4260-4263, 1999.

ELLIOTT, S. J.; SPERANDIO, V.; GIRÓN, J. A.; SHIN, S.; MELLIES, J. L.; WAINWRIGHT, L.; HUTCHESON, S. W.; McDANIEL, T. K.; KAPER, J. B. The locus of enterocyte effacement (LEE) – encoded regulator controls expression of both LEE- and- non LEE- encoded virulence factor in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 6115-6126, 2000.

ENGVALL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, v. 8, p. 871-874, 1971.

ERIKSSON, S.; LUCCHINI, S.; THOMPSON, A.; RHEN, M.; HINTON, J. C. Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. **Mol Microbiol.**, v. 47, p. 103-118. 2003.

FERNANDES, M. R.; IGNACIO, A.; MARTINS, F. H.; ROCHA, L. B.; PIAZZA, R. M. F.; VAZ, T. M. I.; AVILA-CAMPOS, M. J.; NAKANO, V. Presence of Shiga toxin 2e-producing *Escherichia coli* and atypical enteropathogenic *E. coli* in an asymptomatic child. **JMM Case Rep.**, v. 1, p. e000001, 2014.

FINN, R. D.; COGGILL, P.; EBERHARDT, R. Y.; EDDY, S. R.; MISTRY, J.; MITCHELL, A. L.; POTTER, S. C.; PUNTA, M.; QURESHI, M.; SANGRADOR-VEGAS, A.; SALAZAR, G. A.; TATE, J.; BATEMAN, A. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. **Nucleic Acids Res.**, v. 44, p. D279-285, 2016.

FRANCO, R. T.; ARAUJO, L. D.; PENNA, F. J.; MAGALHAES, P. P.; MENDES, E. N. Intimin subtyping of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from children with and without diarrhea: a possible temporal shift in the distribution of intimin alleles. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 74, p. 81-83, 2012.

FRANKEL, G.; PHILLIPS, A. D. Attaching effacing *Escherichia coli* and paradigms of Tir-triggered actin polymerization: getting off the pedestal. **Cell. Microbiol.**, v. 10, p. 549-556, 2008.

FRANZIN, F. M.; SIRCILI, M. P. Locus of enterocyte effacement: a pathogenicity island involved in the virulence of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* subjected to a complex network of gene regulation. **Biomed. Res. Int.**, v. 2015:534738 , 2015.

GARMENDIA, J.; PHILLIPS, A. D.; CARLIER, M. F.; CHONG, Y.; SCHULLER, S.; MARCHES, O.; DAHAN, S.; OSWALD, E.; SHAW, R. K.; KNUTTON, S.; FRANKEL, G. TccP is an enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 type III effector protein that couples Tir to the actin-

cytoskeleton. **Cell. Microbiol.**, v. 6, p. 1167-1183., 2004.

GARMENDIA, J.; FRANKEL, G. Operon structure and gene expression of the espJ--tccP locus of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 247, p. 137-145., 2005.

GARMENDIA, J.; FRANKEL, G.; CREPIN, V. F. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 2573-2585, 2005.

GARMENDIA, J.; REN, Z.; TENNANT, S.; MIDOLLI VIERA, M. A.; CHONG, Y.; WHALE, A.; AZZOPARDI, K.; DAHAN, S.; SIRCILI, M. P.; FRANZOLIN, M. R.; TRABULSI, L. R.; PHILLIPS, A.; GOMES, T. A.; XU, J.; ROBINS-BROWNE, R.; FRANKEL, G. Distribution of tccP in clinical enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 5715-5720, 2005.

GARMENDIA, J.; CARLIER, M. F.; EGILE, C.; DIDRY, D.; FRANKEL, G. Characterization of TccP-mediated N-WASP activation during enterohaemorrhagic *Escherichia coli* infection. **Cell. Microbiol.**, v. 8, p. 1444-1455, 2006.

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S.; WILKINS, M. R.; APPEL, R. D.; BAIROCH, A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: WALKER, J. M. **The Proteomics Protocols Handbook**, Humana Press. p. 571-607, 2005.

GAYTÁN, M. O.; MARTINEZ-SANTOS, V. I.; SOTO, E.; GONZALEZ-PEDRAJO, B. Type Three Secretion System in Attaching and Effacing Pathogens. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, v. 6, p. 129, 2016.

GIOGHA, C.; LUNG, T. W.; PEARSON, J. S.; HARTLAND, E. L. Inhibition of death receptor signaling by bacterial gut pathogens. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 25, p. 235-243, 2014.

GIRARD, F.; OSWALD, I. P.; TARANU, I.; HELIE, P.; APPLEYARD, G. D.; HAREL, J.; FAIRBROTHER, J. M. Host immune status influences the development of attaching and effacing lesions in weaned pigs. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 5514-5523, 2005.

GIRARD, F.; CREPIN, V. F.; FRANKEL, G. Modelling of infection by enteropathogenic *Escherichia coli* strains in lineages 2 and 4 ex vivo and in vivo by using *Citrobacter rodentium* expressing TccP. **Infect. Immun.**, v. 77, p. 1304-1314, 2009.

GIRÓN, J. A.; HO, A. S.; SCHOOLNIK, G. K. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Science**, v. 254, p. 710-713, 1991.

GOMES, T. A.; IRINO, K.; GIRÃO, D. M.; GIRÃO, V. B.; GUTH, B. E.; VAZ, T. M.; MOREIRA, F. C.; CHINARELLI, S. H.; VIEIRA, M. A. Emerging enteropathogenic *Escherichia coli* strains? **Emerg. Infect. Dis.**, v. 10, p. 1851-1855, 2004.

GOMES, T. A.; HERNANDES, R. T.; TORRES, A. G.; SALVADOR, F. A.; GUTH, B. E.; VAZ, T. M.; IRINO, K.; SILVA, R. M.; VIEIRA, M. A. Adhesin-encoding genes from shiga toxin-producing *Escherichia coli* are more prevalent in atypical than in typical enteropathogenic *E. coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 49, p. 3334-3337, 2011.

GOMES, T. A.; ELIAS, W. P.; SCALETSKY, I. C.; GUTH, B. E.; RODRIGUES, J. F.; PIAZZA, R. M.; FERREIRA, L. C.; MARTINEZ, M. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Braz. J. Microbiol.**, v. 47, n. Supl 1, p. 3-30, 2016a.

GOMES, T. A. T.; YAMAMOTO, D.; VIEIRA, M. A. M.; HERNANDES, R. T. Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. In: TORRES, A. G. **Escherichia coli in the Americas**. Cham: Springer International Publishing, p.77-96, 2016b.

GONCALVES, N. S.; GHAEM-MAGHAMI, M.; MONTELEONE, G.; FRANKEL, G.; DOUGAN, G.; LEWIS, D. J.; SIMMONS, C. P.; MACDONALD, T. T. Critical role for tumor necrosis factor alpha in controlling the number of luminal pathogenic bacteria and immunopathology in infectious colitis. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 6651-6659, 2001.

GONZALEZ, J.; CADONA, J. S.; SANZ, M.; BUSTAMANTE, A. V.; SANZO, A. M. Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from vegetables in Argentina. **Int. J. Food. Microbiol.**, v. 261, p. 57-61, 2017.

GOOSNEY, D. L.; DEVINNEY, R.; FINLAY, B. B. Recruitment of cytoskeletal and signaling

proteins to enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* pedestals. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 3315-3322, 2001.

GRUBER, C. C.; SPERANDIO, V. Posttranscriptional control of microbe-induced rearrangement of host cell actin. **MBio**, v. 5, p. e01025-13, 2014.

HARDWIDGE, P. R.; RODRIGUEZ-ESCUADERO, I.; GOODE, D.; DONOHOE, S.; ENG, J.; GOODLETT, D. R.; AEBERSOLD, R.; FINLAY, B. B. Proteomic analysis of the intestinal epithelial cell response to enteropathogenic *Escherichia coli*. **J Biol Chem.**, v. 279, p. 20127-20136, 2004.

HARRINGTON, S. M.; SHEIKH, J.; HENDERSON, I. R.; RUIZ-PEREZ, F.; COHEN, P. S.; NATARO, J. P. The Pic protease of enteroaggregative *Escherichia coli* promotes intestinal colonization and growth in the presence of mucin. **Infect. Immun.**, v. 77, p. 2465-2473, 2009.

HAUF, N.; CHAKRABORTY, T. Suppression of NF-kappa B activation and proinflammatory cytokine expression by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **J. Immunol.**, v. 170, p. 2074-2082, 2003.

HAZEN, T. H.; SAHL, J. W.; FRASER, C. M.; DONNENBERG, M. S.; SCHEUTZ, F.; RASKO, D. A. Refining the pathovar paradigm via phylogenomics of the attaching and effacing *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 110, p. 12810-12815, 2013.

HAZEN, T. H.; DAUGHERTY, S. C.; SHETTY, A.; MAHURKAR, A. A.; WHITE, O.; KAPER, J. B.; RASKO, D. A. RNA-Seq analysis of isolate- and growth phase-specific differences in the global transcriptomes of enteropathogenic *Escherichia coli* prototype isolates. **Front. Microbiol.**, v. 6, p. 569, 2015.

HAZEN, T. H.; DONNENBERG, M. S.; PANCHALINGAM, S.; ANTONIO, M.; HOSSAIN, A.; MANDOMANDO, I.; OCHIENG, J. B.; RAMAMURTHY, T.; TAMBOURA, B.; QURESHI, S.; QUADRI, F.; ZAIDI, A.; KOTLOFF, K. L.; LEVINE, M. M.; BARRY, E. M.; KAPER, J. B.; RASKO, D. A.; NATARO, J. P. Genomic diversity of EPEC associated with clinical presentations of differing severity. **Nat. Microbiol.**, v. 1, p. 15014, 2016.

HAZEN, T. H.; MICHALSKI, J.; LUO, Q.; SHETTY, A. C.; DAUGHERTY, S. C.; FLECKENSTEIN, J. M.; RASKO, D. A. Comparative genomics and transcriptomics of *Escherichia coli* isolates carrying virulence factors of both enteropathogenic and enterotoxigenic *E. coli*. **Sci. Rep.**, v. 7, p. 3513, 2017a.

HAZEN, T. H.; DAUGHERTY, S. C.; SHETTY, A. C.; NATARO, J. P.; RASKO, D. A. Transcriptional variation of diverse enteropathogenic *Escherichia coli* isolates under virulence-inducing conditions. **mSystems**, v. 2:e00024-17, 2017b.

HE, X.; MISHCHUK, D. O.; SHAH, J.; WEIMER, B. C.; SLUPSKY, C. M. Cross-talk between *E. coli* strains and a human colorectal adenocarcinoma-derived cell line. **Sci. Rep.**, v. 3:3416, 2013.

HERNANDES, R. T.; ELIAS, W. P.; VIERA, M. A.; GOMES, T. A. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 297, p. 137-149, 2009.

HERNANDES, R. T.; VELSKO, I.; SAMPAIO, S. C.; ELIAS, W. P.; ROBINS-BROWNE, R. M.; GOMES, T. A.; GIRÓN, J. A. Fimbrial adhesins produced by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 23, p. 8391-8399, 2011.

HICKS, S. W.; GALÁN, J. E. Exploitation of eukaryotic subcellular targeting mechanisms by bacterial effectors. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 11, p. 316-326, 2013.

HORCAJO, P.; DOMINGUEZ-BERNAL, G.; DE LA FUENTE, R.; RUIZ-SANTA-QUITERIA, J. A.; BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; MORA, A.; DAHBI, G.; LOPEZ, C.; PUENTES, B.; ALONSO, M. P.; BLANCO, J.; ORDEN, J. A. Comparison of ruminant and human attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC) strains. **Vet. Microbiol.**, v. 155, p. 341-348, 2012.

HU, J.; TORRES, A. G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: foe or innocent bystander? **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 21, p. 729-734, 2015.

HUMPHRYS, M. S.; CREASY, T.; SUN, Y.; SHETTY, A. C.; CHIBUCOS, M. C.; DRABEK, E. F.; FRASER, C. M.; FAROOQ, U.; SENGAMALAY, N.; OTT, S.; SHOU, H.; BAVOIL, P. M.; MAHURKAR, A.; MYERS, G. S. Simultaneous transcriptional profiling of bacteria and their host cells. **PLoS One.**, v. 8, p. e80597, 2013.

IFEANYI, C. I.; IKENECHE, N. F.; BASSEY, B. E.; AL-GALLAS, N.; BEN AISSA, R.;

BOUDABOUS, A. Diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes isolated from children with diarrhea in the Federal Capital Territory Abuja, Nigeria. **J. Infect. Dev. Ctries.**, v. 9, p. 165-174, 2015.

IGNEY, F. H.; KRAMMER, P. H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 2, p. 277-288, 2002.

INGLE, D. J.; VALCANIS, M.; KUZEVSKI, A.; TAUSCHEK, M.; INOUE, M.; STINEAR, T.; LEVINE, M. M.; ROBINS-BROWNE, R. M.; HOLT, K. E. In silico serotyping of *E. coli* from short read data identifies limited novel O-loci but extensive diversity of O:H serotype combinations within and between pathogenic lineages. **Microb. Genom.**, v. 2, p. e000064, 2016a.

INGLE, D. J.; TAUSCHEK, M.; EDWARDS, D. J.; HOCKING, D. M.; PICKARD, D. J.; AZZOPARDI, K. I.; AMARASENA, T.; BENNETT-WOOD, V.; PEARSON, J. S.; TAMBOURA, B.; ANTONIO, M.; OCHIENG, J. B.; OUNDO, J.; MANDOMANDO, I.; QURESHI, S.; RAMAMURTHY, T.; HOSSAIN, A.; KOTLOFF, K. L.; NATARO, J. P.; DOUGAN, G.; LEVINE, M. M.; ROBINS-BROWNE, R. M.; HOLT, K. E. Evolution of atypical enteropathogenic *E. coli* by repeated acquisition of LEE pathogenicity island variants. **Nat. Microbiol.**, v. 1:15010, 2016b.

IYODA, S.; KOIZUMI, N.; SATOU, H.; LU, Y.; SAITOH, T.; OHNISHI, M.; WATANABE, H. The GrIR-GrIA regulatory system coordinately controls the expression of flagellar and LEE-encoded type III protein secretion systems in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 188, p. 5682-5692, 2006.

JENNER, R. G.; YOUNG, R. A. Insights into host responses against pathogens from transcriptional profiling. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 3, p. 281-294, 2005.

JERSE, A. E.; KAPER, J. B. The *eae* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes a 94-Kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid. **Infect. Immun.**, v. 59, p. 4302-4309, 1991.

KAPER, J. B. Defining EPEC. **Rev. Microbiol.**, v. 27, p. 130-133, 1996.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 123-140, 2004.

KARVE, S. S.; PRADHAN, S.; WARD, D. V.; WEISS, A. A. Intestinal organoids model human responses to infection by commensal and Shiga toxin producing *Escherichia coli*. **PLoS One.**, v. 12, p. e0178966, 2017.

KATSOWICH, N.; ELBAZ, N.; PAL, R. R.; MILLS, E.; KOBİ, S.; KAHAN, T.; ROSENSHINE, I. Host cell attachment elicits posttranscriptional regulation in infecting enteropathogenic bacteria. **Science**, v. 355, p. 735-739, 2017.

KENNY, B.; DEVINNEY, R.; STEIN, M.; REINSCHIED, D. J.; FREY, E. A.; FINLAY, B. B. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) transfer its receptor for intimate adherence into mammalian cells. **Cell**, v. 91, p. 511-520, 1997a.

KENNY, B.; ABE, A.; STEIN, M.; FINLAY, B. B. Enteropathogenic *Escherichia coli* protein secretion is induced in response to conditions similar to those in the gastrointestinal tract. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 2606-2612, 1997b.

KENNY, B. Phosphorylation of tyrosine 474 of the enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule is essential for actin nucleating activity and is preceded by additional host modifications. **Mol. Microbiol.**, v. 31, p. 1229-1241, 1999.

KHAN, M. A.; BOUZARI, S.; MA, C.; ROSENBERGER, C. M.; BERGSTROM, K. S.; GIBSON, D. L.; STEINER, T. S.; VALLANCE, B. A. Flagellin-dependent and -independent inflammatory responses following infection by enteropathogenic *Escherichia coli* and *Citrobacter rodentium*. **Infect. Immun.**, v. 76, p. 1410-1422, 2008.

KIECKENS, E.; RYBARCZYK, J.; LI, R. W.; VANROMPAY, D.; COX, E. Potential immunosuppressive effects of *Escherichia coli* O157:H7 experimental infection on the bovine host. **BMC Genomics.**, v. 17, p. 1049, 2016.

KIM, Y.; OH, S.; PARK, S.; KIM, S. H. Interactive transcriptome analysis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 and intestinal epithelial HT-29 cells after bacterial attachment. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 131, p. 224-232, 2009.

KNUTTON, S.; BALDWIN, T.; WILLIAMS, P. H.; MCNEISH, A. S. Actin accumulation at sites of

bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 57, p. 1290-1298, 1989.

KNUTTON, S. Electron microscopy methods in adhesion. **Methods in Enzimol.**, v.253, p.145-158, 1995.

KNUTTON, S.; SHAW, R.; PHILLIPS, A. D.; SMITH, H. R.; WILLSHAW, G. A.; WATSON, P.; PRICE, E. Phenotypic and genetic analysis of diarrhea-associated *Escherichia coli* isolated from children in the United Kingdom. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 33, p. 32-40, 2001.

KOZUB-WITKOVSKI, E.; KRAUSE, G.; FRANKEL, G.; KRAMER, D.; APPEL, B.; BEUTIN, L. Serotypes and virutypes of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains from stool samples of children with diarrhoea in Germany. **J. Appl. Microbiol.**, v. 104, p. 403-410, 2008.

KYLE, J. L.; CUMMINGS, C. A.; PARKER, C. T.; QUINONES, B.; VATTA, P.; NEWTON, E.; HUYNH, S.; SWIMLEY, M.; DEGORICIJA, L.; BARKER, M.; FONTANOZ, S.; NGUYEN, K.; PATEL, R.; FANG, R.; TEBBS, R.; PETRAUSKENE, O.; FURTADO, M.; MANDRELL, R. E. *Escherichia coli* serotype O55:H7 diversity supports parallel acquisition of bacteriophage at Shiga toxin phage insertion sites during evolution of the O157:H7 lineage. **J. Bacteriol.**, v. 194, p. 1885-1896, 2012.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p.680-685, 1970.

LAI, Y.; ROSENSHINE, I.; LEONG, J. M.; FRANKEL, G. Intimate host attachment: enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. **Cell. Microbiol.**, v. 15, p. 1796-1808, 2013.

LANATA, C. F.; FISCHER-WALKER, C. L.; OLASCOAGA, A. C.; TORRES, C. X.; ARYEE, M. J.; BLACK, R. E. Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: a systematic review. **PLoS One.**, v. 8, p. e72788, 2013.

LANDRY, J. J.; PYL, P. T.; RAUSCH, T.; ZICHER, T.; TEKKEDIL, M. M.; STUTZ, A. M.; JAUCH, A.; AIYAR, R. S.; PAU, G.; DELHOMME, N.; GAGNEUR, J.; KORBEL, J. O.; HUBER, W.; STEINMETZ, L. M. The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line. **G3 (Bethesda)**, v. 3, p. 1213-1224, 2013.

LAW, H. T.; CHUA, M.; MOON, K. M.; FOSTER, L. J.; GUTTMAN, J. A. Mass Spectrometry-Based Proteomics Identification of Enteropathogenic *Escherichia coli* Pedestal Constituents. **J. Proteome Res.**, v. 14, p. 2520-2527, 2015.

LEVERTON, L. Q.; KAPER, J. B. Temporal expression of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence genes in an *in vitro* model of infection. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 1034-1043, 2005.

LEVINE, M. M.; BERQUIST, E. J.; NALIN, D. R.; WATERMAN, D. H.; HORNICK, R. B.; YOUNG, C. R.; ROWE, B. *Escherichia coli* that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. **Lancet**, v.1, p. 1119-1122, 1978.

LIN, A. E.; BEASLEY, F. C.; OLSON, J.; KELLER, N.; SHALWITZ, R. A.; HANNAN, T. J.; HULTGREN, S. J.; NIZET, V. Role of hypoxia inducible factor-1 α in innate defense against uropathogenic *Escherichia coli* infection. **PLoS Pathog.**, v. 11:e1004818, 2015.

LITVAK, Y.; SHARON, S.; HYAMS, M.; ZHANG, L.; KOBI, S.; KATSOWICH, N.; DISHON, S.; NUSSBAUM, G.; DONG, N.; SHAO, F.; ROSENSHINE, I. Epithelial cells detect functional type III secretion system of enteropathogenic *Escherichia coli* through a novel NF-kappaB signaling pathway. **PLoS Pathog.**, v. 13, p. e1006472, 2017.

MADIC, J.; DE GARAM, C. P.; BRUGERE, H.; LOUKIADIS, E.; FACH, P.; JAMET, E.; AUVRAY, F. Duplex real-time PCR detection of type III effector tccP and tccP2 genes in pathogenic *Escherichia coli* and prevalence in raw milk cheeses. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 52, p. 538-545, 2011.

MAGALHAES, C. A.; ROSSATO, S. S.; BARBOSA, A. S.; SANTOS, T. O.; ELIAS, W. P.; SIRCILI, M. P.; PIAZZA, R. M. The ability of haemolysins expressed by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* to bind to extracellular matrix components. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 106, p. 146-152, 2011.

MALLICK, E. M.; GARBER, J. J.; VANGURI, V. K.; BALASUBRAMANIAN, S.; BLOOD, T.; CLARK,

S.; VINGADASSALOM, D.; LOUISSAINT, C.; MCCORMICK, B.; SNAPPER, S. B.; LEONG, J. M. The ability of an attaching and effacing pathogen to trigger localized actin assembly contributes to virulence by promoting mucosal attachment. **Cell. Microbiol.**, v. 16, p. 1405-1424, 2014.

MARTINS, R. P.; DA SILVA, M. C.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; LEITE DDA, S. Preliminary virulence genotyping and phylogeny of *Escherichia coli* from the gut of pigs at slaughtering stage in Brazil. **Meat Sci.**, v. 93, p. 437-440, 2013.

MARTINS, F. H.; GUTH, B. E.; PIAZZA, R. M.; ELIAS, W. P.; LEO, S. C.; MARZOA, J.; DAHBI, G.; MORA, A.; BLANCO, M.; BLANCO, J.; PELAYO, J. S. Lambs are an important source of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* in southern Brazil. **Vet Microbiol.**, v. 196, p. 72-77, 2016.

MARTINS, F. H.; NEPOMUCENO, R.; PIAZZA, R. M. F.; ELIAS, W. P. Phylogenetic distribution of tir-cytoskeleton coupling protein (tccP and tccP2) genes in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 364, p. 10.1093/femsle/fnx101, 2017.

MCDANIEL, T.K.; JARVIS, K.G.; DONNENBERG, M.S.; KAPER J.B. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 92, p. 1664-1668, 1995.

MELLIES, J. L.; ELLIOT, S. J.; SPERANDIO, V.; DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B. The per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler). **Mol. Microbiol.**, v. 33, p. 296-306, 1999.

MILLS, E.; BARUCH, K.; CHARPENTIER, X.; KOBİ, S.; ROSENSHINE, I. Real-time analysis of effector translocation by the type III secretion system of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Cell Host Microbe**, v. 3, p. 104-113, 2008.

MILLS, E.; BARUCH, K.; AVIV, G.; NITZAN, M.; ROSENSHINE, I. Dynamics of the type III secretion system activity of enteropathogenic *Escherichia coli*. **MBio**, v. 4, p. e00303-13, 2013.

MOHAWK, K. L.; O'BRIEN, A. D. Mouse models of *Escherichia coli* O157:H7 infection and Shiga toxin injection. **J. Biomed. Biotechnol.**, v. 2011:258185, 2011.

MONAGHAN, A.; BYRNE, B.; FANNING, S.; SWEENEY, T.; MCDOWELL, D.; BOLTON, D. J. Serotypes and virulence profiles of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from bovine farms and abattoirs. **J. Appl. Microbiol.**, v. 114, p. 595-603, 2013.

MOON, H. W.; WHIPP, S. C.; ARGENZIO, R. A.; LEVINE, M. M.; GIANELLA, R. A. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. **Infect. Immun.**, v. 41, p. 1340-1351, 1983.

MORA, A.; HERRERA, A.; LÓPEZ, C.; DAHBI, G.; MAMANI, R.; PITA, J. M.; ALONSO, M. P.; LLOVO, J.; BERNÁRDEZ, M. I.; BLANCO, J. E.; BALNCO, M.; BALNCO, J. Characteristics of the Shiga-toxin-producing enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4 German outbreak strain and of STEC strains isolated in Spain. **Int. Microbiol.**, v. 14, p. 121-141, 2011.

MOURA, R. A.; SIRCILI, M. P.; LEOMIL, L.; MATTÉ, M. H.; TRABULSI, L. R.; ELIAS, W. P.; IRINO, K.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Clonal relationship among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from different animal species and humans. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, p. 7399-7408, 2009.

MUHLEN, S.; RUCHAUD-SPARAGANO, M. H.; KENNY, B. Proteasome-independent degradation of canonical NFkappaB complex components by the NleC protein of pathogenic *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.**, v. 286, p. 5100-5107, 2011.

MURASE, K.; OOKA, T.; IGUCHI, A.; OGURA, Y.; NAKAYAMA, K.; ASADULGHANI, M.; ISLAM, M. R.; HIYOSHI, H.; KODAMA, T.; BEUTIN, L.; HAYASHI, T. Haemolysin E- and enterohaemolysin-derived haemolytic activity of O55/O157 strains and other *Escherichia coli* lineages. **Microbiology**, v. 158, p. 746-758, 2012.

NADLER, C.; BARUCH, K.; KOBİ, S.; MILLS, E.; HAVIV, G.; FARAGO, M.; ALKALAY, I.; BARTFELD, S.; MEYER, T. F.; BEN-NERIAH, Y.; ROSENSHINE, I. The type III secretion effector NleE inhibits NF-kappaB activation. **PLoS Pathog.**, v. 6, p. e1000743, 2010.

NARA, J. M.; CIANCIARULLO, A. M.; CULLER, H. F.; BUERIS, V.; HORTON, D. S.; MENEZES,

M. A.; FRANZOLIN, M. R.; ELIAS, W. P.; PIAZZA, R. M. Differentiation of typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* using colony immunoblot for detection of bundle-forming pilus expression. **J. Appl. Microbiol.**, v. 109, n. 1, p. 35-43, 2010.

NASCIMENTO, H. H.; SILVA, L. E.; SOUZA, R. T.; SILVA, N. P.; SCALETISKY, I. C. Phenotypic and genotypic characteristics associated with biofilm formation in clinical isolates of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) strains. **BMC Microbiol.**, v. 14, p. 10.1186/1471-2180-14-184, 2014.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, p. 142-201, 1998.

NETER, E.; WESTPHAL, O.; LUDERITZ, O.; GINO, R. M.; GORZYNSKI, E. A. Demonstration of antibodies against enteropathogenic *Escherichia coli* in sera of children of various ages. **Pediatrics**, v. 16, p. 801-808, 1955.

NEURATH, M. F.; BECKER, C.; BARBULESCU, K. Role of NF-kappaB in immune and inflammatory responses in the gut. **Gut**, v. 43, p. 856-860, 1998.

NEWTON, H. J.; PEARSON, J. S.; BADEA, L.; KELLY, M.; LUCAS, M.; HOLLOWAY, G.; WAGSTAFF, K. M.; DUNSTONE, M. A.; SLOAN, J.; WHISSTOCK, J. C.; KAPER, J. B.; ROBINS-BROWNE, R. M.; JANS, D. A.; FRANKEL, G.; PHILLIPS, A. D.; COULSON, B. S.; HARTLAND, E. L. The type III effectors NleE and NleB from enteropathogenic *E. coli* and OspZ from *Shigella* block nuclear translocation of NF-kappaB p65. **PLoS Pathog.**, v. 6, p. e1000898, 2010.

NGUYEN, R. N.; TAYLOR, L. S.; TAUSCHEK, M.; ROBINS-BROWNE, R. M. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* infection and prolonged diarrhea in children. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 12, p. 597-603, 2006.

NOBE, R.; NOUGAYREDE, J. P.; TAIEB, F.; BARDIAU, M.; CASSART, D.; NAVARRO-GARCIA, F.; MAINIL, J.; HAYASHI, T.; OSWALD, E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* serogroup O111 inhibits NF-(kappa)B-dependent innate responses in a manner independent of a type III secreted OspG orthologue. **Microbiology**, v. 155, p. 3214-3125, 2009.

NUNES, E. B.; SARIDAKIS, H. O.; IRINO, K.; PELAYO, J. S. Genotypic and phenotypic characterization of attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC) isolated from children with and without diarrhoea in Londrina, Brazil. **J. Med. Microbiol.**, v. 52, p. 499-504, 2003.

NUNES MDO, R.; MAGALHAES, P. P.; MACEDO ADA, S.; FRANCO, R. T.; PENNA, F. J.; MENDES, E. N. Attaching and effacing *Escherichia coli* and Shiga toxin-producing *E. coli* in children with acute diarrhoea and controls in Teresina/PI, Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 106, p. 43-47, 2012.

OCHOA, T. J.; BARLETTA, F.; CONTRERAS, C.; MERCADO, E. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 102, n. 9, p. 852-856, 2008.

OGURA, Y.; OOKA, T.; WHALE, A.; GARMENDIA, J.; BEUTIN, L.; TENNANT, S.; KRAUSE, G.; MORABITO, S.; CHINEN, I.; TOBE, T.; ABE, H.; TOZZOLI, R.; CAPRIOLI, A.; RIVAS, M.; ROBINS-BROWNE, R.; HAYASHI, T.; FRANKEL, G. TccP2 of O157:H7 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC): challenging the dogma of EHEC-induced actin polymerization. **Infect. Immun.**, v. 75, p. 604-612, 2007.

OOKA, T.; VIEIRA, M. A.; OGURA, Y.; BEUTIN, L.; LA RAGIONE, R.; VAN DIEMEN, P. M.; STEVENS, M. P.; AKTAN, I.; CAWTHRAW, S.; BEST, A.; HERNANDES, R. T.; KRAUSE, G.; GOMES, T. A.; HAYASHI, T.; FRANKEL, G. Characterization of tccP2 carried by atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 271, p. 126-135, 2007.

OTERO, V.; RODRIGUEZ-CALLEJA, J. M.; OTERO, A.; GARCIA-LOPEZ, M. L.; SANTOS, J. A. Genetic characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* isolates from ewes' milk, sheep farm environments, and humans by multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 79, p. 5864-5869, 2013.

PACHECO, V. C.; YAMAMOTO, D.; ABE, C. M.; HERNANDES, R. T.; MORA, A.; BLANCO, J.; GOMES, T. A. Invasion of differentiated intestinal Caco-2 cells is a sporadic property among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains carrying common intimin subtypes. **Pathog. Dis.**, v. 70, p. 167-175, 2014.

PALLET, M. A.; CREPIN, V. F.; SERAFINI, N.; HABIBZAY, M.; KOTIK, O.; SANCHEZ-GARRIDO, J.; DI SANTO, J. P.; SHENOY, A. R.; BERGER, C. N.; FRANKEL, G. Bacterial virulence factor inhibits caspase-4/11 activation in intestinal epithelial cells. **Mucosal Immunol.**, v. 10, p. 602-612, 2017.

PARK, J. H.; OH, S. S.; OH, K. H.; SHIN, J.; JANG, E. J.; JUN, B. Y.; YOUN, S. K.; CHO, S. H. Diarrheal outbreak caused by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* O157:H45 in South Korea. **Foodborne Pathogen Dis.**, v. 11, p. 775-781, 2014.

PEARSON, J. S.; RIEDMAIER, P.; MARCHES, O.; FRANKEL, G.; HARTLAND, E. L. A type III effector protease NleC from enteropathogenic *Escherichia coli* targets NF-kappaB for degradation. **Mol. Microbiol.**, v. 80, p. 219-230, 2011.

PEARSON, J. S.; HARTLAND, E. L. The Inflammatory Response during Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infection. **Microbiol. Spectr.**, v. 2, p. EHEC-0012-2013, 2014.

PEARSON, J. S.; GIOGHA, C.; LUNG, T. W. F.; HARTLAND, E. L. The genetics of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence. **Annu. Rev. Genet.**, v. 50, p. 493-513, 2016.

PERNA, N. T.; PLUNKETT, G., 3RD; BURLAND, V.; MAU, B.; GLASNER, J. D.; ROSE, D. J.; MAYHEW, G. F.; EVANS, P. S.; GREGOR, J.; KIRKPATRICK, H. A.; POSFAI, G.; HACKETT, J.; KLINK, S.; BOUTIN, A.; SHAO, Y.; MILLER, L.; GROTEBECK, E. J.; DAVIS, N. W.; LIM, A.; DIMALANTA, E. T.; POTAMOUSIS, K. D.; APODACA, J.; ANANTHARAMAN, T. S.; LIN, J.; YEN, G.; SCHWARTZ, D. C.; WELCH, R. A.; BLATTNER, F. R. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Nature**, v. 409, p. 529-533, 2001.

PIAZZA, R. M.; DELANNOY, S.; FACH, P.; SARIDAKIS, H. O.; PEDROSO, M. Z.; ROCHA, L. B.; GOMES, T. A.; VIEIRA, M. A.; BEUTIN, L.; GUTH, B. E. Molecular and phenotypic characterization of *Escherichia coli* O26:H8 among diarrheagenic *E. coli* O26 strains isolated in Brazil. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 79, p. 6847-6854, 2013.

PITONDO-SILVA, A.; NAKAZATO, G.; FALCAO, J. P.; IRINO, K.; MARTINEZ, R.; DARINI, A. L.; HERNANDES, R. T. Phenotypic and genetic features of enteropathogenic *Escherichia coli* isolates from diarrheal children in the Ribeirao Preto metropolitan area, Sao Paulo State, Brazil. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 123, p. 128-135, 2015.

POLLOCK, G. L.; OATES, C. V.; GIOGHA, C.; WONG FOK LUNG, T.; ONG, S. Y.; PEARSON, J. S.; HARTLAND, E. L. Distinct Roles of the Antiapoptotic Effectors NleB and NleF from Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 85, p. e01071-16, 2017.

READING, N. C.; TORRES, A. G.; KENDALL, M. M.; HUGHES, D. T.; YAMAMOTO, K.; SPERANDIO, V. 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, p. 2468-2476, 2007.

RIEDL, J.; CREVENNA, A. H.; KESSENBRICK, K.; YU, J. H.; NEUKIRCHEN, D.; BISTA, M.; BRADKE, F.; JENNE, D.; HOLAK, T. A.; WERB, Z.; SIXT, M.; WEDLICH-SOLDNER, R. Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. **Nat. Methods**, v. 5, p. 605-607, 2008.

RITCHIE, J. M.; BRADY, M. J.; RILEY, K. N.; HO, T. D.; CAMPELLONE, K. G.; HERMAN, I.M.; DONOHUE-ROLFE, A.; TZIPORI, S.; WALDOR, M.K.; LEONG, J. M. EspFu, a type III-translocated effector of actin assembly, fosters epithelial association and late-stage intestinal colonization by *E. coli* O157:H7. **Cell. Microbiol.**, v.10, p. 836-847, 2008.

ROBINS-BROWNE, R. M.; TAUSCHEK, M.; BENNETT-WOOD, V. R.; RUSSEL, J.; OPPEDISANO, F.; LISTER, N. A.; BETTELHEIM, K. A.; FARLEY, C. K.; SINCLAIR, M. I.; HELLARD, M. E. *Escherichia coli* and community-acquired gastroenteritis, Melbourne, Australia. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 10, p. 1797-1805, 2004.

ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v. 26, p. 139-140, 2010.

ROCHA, L. B.; SANTOS, A. R.; MUNHOZ, D. D.; CARDOSO, L. T.; LUZ, D. E.; ANDRADE, F. B.; HORTON, D. S.; ELIAS, W. P.; PIAZZA, R. M. Development of a rapid agglutination latex test for diagnosis of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* infection in developing world: defining the biomarker, antibody and method. **Plos Negl. Trop. Dis.**, v. 8, p. e3150, 2014.

ROCHA, S. P. D.; ABE, C. M.; SPERANDIO, V.; BANDO, S. Y.; ELIAS, W. P. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* that contains functional locus of enterocyte effacement genes can be attaching-and-effacing negative in cultured epithelial cells. **Infect. Immun.** v. 79, p. 1833-1841, 2011.

ROYAN, S. V.; JONES, R. M.; KOUTSOURIS, A.; ROXAS, J. L.; FALZARI, K.; WEFLIN, A. W.; KIM, A.; BELLMEYER, A.; TURNER, J. R.; NEISH, A. S.; RHEE, K. J.; VISWANATHAN, V. K.; HECHT, G. A. Enteropathogenic *E. coli* non-LEE encoded effectors NleH1 and NleH2 attenuate NF- κ B activation. **Mol. Microbiol.**, v. 78, p. 1232-1245, 2010.

RUCHAUD-SPARAGANO, M. H.; MARESCA, M.; KENNY, B. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) inactivate innate immune responses prior to compromising epithelial barrier function. **Cell. Microbiol.**, v. 9, p. 1909-1921, 2007.

RUIZ, R. C.; MELO, K. C.; ROSSATO, S. S.; BARBOSA, C. M.; CORRÊA, L. M.; ELIAS, W. P.; PIAZZA, R. M. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* secretes plasmid encoded toxin. **Biomed. Res. Int.** v. 2014, p. 1-8, 2014.

SABHARWAL, H.; CICHON, C.; OLSCHLAGER, T. A.; SONNENBORN, U.; SCHMIDT, M. A. Interleukin-8, CXCL1, and MicroRNA miR-146a Responses to Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 and Enteropathogenic *E. coli* in Human Intestinal Epithelial T84 and Monocytic THP-1 Cells after Apical or Basolateral Infection. **Infect. Immun.**, v. 84, p. 2482-2892, 2016.

SAKKEJHA, H.; BYRNE, L.; LAWSON, A. J.; JENKINS, C. An update on the microbiology and epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* in England 2010-2012. **J. Med. Microbiol.**, v. 62, p. 1531-1534, 2013.

SALAZAR-GONZALEZ, H.; NAVARRO-GARCIA, F. Intimate adherence by enteropathogenic *Escherichia coli* modulates TLR5 localization and proinflammatory host response in intestinal epithelial cells. **Scand. J. Immunol.**, v. 73, p. 268-283, 2011.

SALLEE, N. A.; RIVERA, G. M.; DUEBER, J. E.; VASILESCU, D.; MULLINS, R. D.; MAYER, B. J.; LIM, W. A. The pathogen protein EspF(U) hijacks actin polymerization using mimicry and multivalency. **Nature**, v. 454, p. 1005-1008, 2008.

SALVADOR, F. A.; HERNANDES, R. T.; VIEIRA, M. A.; ROCKSTROH, A. C.; GOMES, T. A. Distribution of non-LEE-encoded type 3 secretion system dependent effectors in enteropathogenic *Escherichia coli*. **Braz. J. Microbiol.**, v. 45, p. 851-855, 2014.

SAMBROCK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning. **A Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor, 1989.

SAMBROCK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning. **A Laboratory Manual**. 2nd edition. New York: Cold Spring Harbor, 2001.

SAMPAIO, S. C.; GOMES, T. A.; PICHON, C.; DU MERLE, L.; GUADAGNINI, S.; ABE, C. M.; SAMPAIO, J. L.; LE BOUGUÉNEC, C. The flagella of an atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strain are required for efficient interaction with and stimulation of interleukin-8 production by enterocytes in vitro. **Infect. Immun.**, v. 77, p. 4406-4413, 2009.

SANCHES, L. A.; GOMES, M. D. S.; TEIXEIRA, R. H. F.; CUNHA, M. P. V.; OLIVEIRA, M. G. X.; VIEIRA, M. A. M.; GOMES, T. A. T.; KNOBL, T. Captive wild birds as reservoirs of enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC). **Braz. J. Microbiol.**, v. 48, p. 760-763, 2017.

SÁNCHEZ-SANMARTÍN, C.; BUSTAMANTE, V. H.; CALVA, E.; PUENTE, J. L. Transcriptional regulation of the orf19 gene and the *tir-cesT-eae* operon of enteropathogenic *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 2823-2833, 2001.

SANCHEZ-VILLAMIL, J.; NAVARRO-GARCIA, F. Role of virulence factors on host inflammatory response induced by diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes. **Future Microbiol.**, v. 10, p. 1009-1033, 2015.

SANTONA, S.; DIAZ, N.; FIORI, P. L.; FRANCISCO, M.; SIDAT, M.; CAPPUCCINELLI, P.; RAPPELLI, P. Genotypic and phenotypic features of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated in industrialized and developing countries. **J. Infect. Dev. Ctries.**, v. 7, p. 214-219, 2013.

SANTOS, A. S.; FINLAY, B. B. Bringing down the host: enteropathogenic and enterohaemorrhagic

Escherichia coli effector-mediated subversion of host innate immune pathways. **Cell. Microbiol.**, v. 17, p. 318-332, 2015.

SAVKOVIC, S. D.; KOUTSOURIS, A.; HECHT, G. Activation of NF-kappaB in intestinal epithelial cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. **Am. J. Physiol.**, v. 273, p. C1160-7, 1997.

SCALETISKY, I. C. A.; SILVA, M. L.; TRABULSI, L. R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infect. Immun.**, v. 45, p. 534-536, 1984.

SCALETISKY, I. C.; PEDROSO, M. Z.; OLIVA, C. A.; CARVALHO, R. L.; MORAIS, M. B.; FAGUNDES-NETO, U. A localized adherence-like pattern as a second pattern of adherence of classic enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells that is associated with infantile diarrhea. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 3410-3415, 1999.

SCALETISKY, I. C.; ARANDA, K. R.; SOUZA, T. B.; SILVA, N. P.; MORAIS, M. B. Evidence of pathogenic subgroups among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. **J. Clin. Microbiol.**, v. 47, p. 3756-3759, 2009.

SCALETISKY, I. C. A.; ARANDA, K. R.; SOUZA, T. B.; SILVA, N. P. Adherence factors in atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains expressing the localized adherence-like pattern in HEp-2 cells. **J. Clin. Microbiol.**, v. 48, p. 302-306, 2010.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nat. Methods.**, v. 9, p. 671-675, 2012.

SCHÜLLER, S.; CHONG, Y.; LEWIN, J.; KENNY, B.; FRANKEL, G.; PHILLIPS, A. D. Tir phosphorylation and Nck/N-WASP recruitment by enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* during ex vivo colonization of human intestinal mucosa is different to cell culture models. **Cell. Microbiol.**, v. 9, p. 1352-1364, 2007.

SCHULLER, S.; LUCAS, M.; KAPER, J. B.; GIRON, J. A.; PHILLIPS, A. D. The ex vivo response of human intestinal mucosa to enteropathogenic *Escherichia coli* infection. **Cell. Microbiol.**, v. 11, p. 521-530, 2009.

SHANER, N. C.; SANGER, J. W.; SANGER, J. M. Actin and alpha-actinin dynamics in the adhesion and motility of EPEC and EHEC on host cells. **Cell. Motil. Cytoskeleton.**, v. 60, p. 104-120, 2005.

SHARMA, R.; TESFAY, S.; TOMSON, F. L.; KANTETI, R. P.; VISWANATHAN, V. K.; HECHT, G. Balance of bacterial pro- and anti-inflammatory mediators dictates net effect of enteropathogenic *Escherichia coli* on intestinal epithelial cells. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 290, p. G685-694, 2006.

SHAULOV, L.; GERSHBERG, J.; DENG, W.; FINLAY, B. B.; SAL-MAN, N. The Ruler Protein EscP of the Enteropathogenic *Escherichia coli* Type III Secretion System Is Involved in Calcium Sensing and Secretion Hierarchy Regulation by Interacting with the Gatekeeper Protein SepL. **MBio**, v. 8, p. e01733-16, 2017.

SIEVERS, F.; WILM, A.; DINEEN, D.; GIBSON, T. J.; KARPLUS, K.; LI, W.; LOPEZ, R.; MCWILLIAM, H.; REMMERT, M.; SODING, J.; THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Mol. Syst. Biol.**, v. 7, p. 10.1038/msb.2011.75, 2011.

SILVA, L. E.; SOUZA, T. B.; SILVA, N. P.; SCALETISKY, I. C. Detection and genetic analysis of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin (EAST1) gene in clinical isolates of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) strains. **BMC Microbiol.**, v. 14, p. 10.1186/1471-2180-14-135, 2014.

SINGH, T.; DAS, S.; RAMACHANDRAN, V. G.; DAR, S. A.; SNEHAA, K.; SAHA, R.; SHAH, D. Spectrum of diarrhoeagenic *Escherichia coli* in paediatric population suffering from diarrhoea and as commensals in healthy children. **Indian J. Med. Microbiol.**, v. 35, p. 204-210, 2017.

STEKEL, D. J.; SARTI, D.; TREVINO, V.; ZHANG, L.; SALMON, M.; BUCKLEY, C. D.; STEVENS, M.; PALLAN, M. J.; PENN, C.; FALCIANI, F. Analysis of host response to bacterial infection using error model based gene expression microarray experiments. **Nucleic Acids Res.**, v. 33, p. e53, 2005.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from

polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; GOMES, T. A. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, p. 508-513, 2002.

TRAPNELL, C.; ROBERTS, A.; GOFF, L.; PERTEA, G.; KIM, D.; KELLEY, D. R.; PIMENTEL, H.; SALZBERG, S. L.; RINN, J. L.; PACHTER, L. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. **Nat. Protoc.**, v. 7, p. 562-578, 2012.

VELLE, K. B.; CAMPELLONE, K. G. Extracellular motility and cell-to-cell transmission of enterohemorrhagic *E. coli* is driven by EspFU-mediated actin assembly. **PLoS Pathog.**, v. 13, p. e1006501, 2017.

VIEIRA, M. A. M.; ANDRADE, J. R.; TRABULSI, L. R.; ROSA, A. C.; DIAS, A. M.; RAMOS, S. R.; FRANKEL, G.; GOMES, T. A. T. Phenotypic and genotypic characteristics of *Escherichia coli* strains of non-enteropathogenic *E. coli* (EPEC) serogroups that carry *eae* and lack the EPEC adherence factor and Shiga toxin DNA probe sequences. **J. Infect. Dis.**, v. 183, p. 762-772, 2001.

VIEIRA, M. A.; DOS SANTOS, L. F.; DIAS, R. C.; CAMARGO, C. H.; PINHEIRO, S. R.; GOMES, T. A.; HERNANDES, R. T. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* as aetiologic agents of sporadic and outbreak-associated diarrhoea in Brazil. **J. Med. Microbiol.**, v. 65, p. 998-1006, 2016.

VINGADASSALOM, D.; KAZLAUSKAS, A.; SKEHAN, B.; CHENG, H.C.; MAGOUN, L.; ROBBINS, D.; ROSEN, M. K.; SAKSELA, K.; LEONG, J. M. Insulin receptor tyrosine kinase substrate links the *E. coli* O157:H7 actin assembly effectors Tir and EspF(U) during pedestal formation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 21, p. 6754-6759, 2009.

VINGADASSALOM, D.; CAMPELLONE, K. G.; BRADY, M. J.; SKEHAN, B.; BATTLE, S. E.; ROBBINS, D.; KAPOOR, A.; HECHT, G.; SNAPPER, S. B.; LEONG, J. M. Enterohemorrhagic *E. coli* requires N-WASP for efficient type III translocation but not for EspFU-mediated actin pedestal formation. **PLoS Pathog.**, v. 6, p. e1001056, 2010.

VISWANATHAN, V. K.; KOUTSOURIS, A.; LUKIC, S.; PILKINTON, M.; SIMONOVIC, I.; SIMONOVIC, M.; HECHT, G. Comparative analysis of EspF from enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* in alteration of epithelial barrier function. **Infect. Immun.**, v. 72, 3218-3227, 2004.

VLISIDOU, I.; DZIVA, F.; LA RAGIONE, R. M.; BEST, A.; GARMENDIA, J.; HAWES, P.; MONAGHAN, P.; CAWTHRAW, S. A.; FRANKEL, G.; WOODWARD, M. J.; STEVENS, M. P. Role of intimin-Tir interactions and the Tir-cytoskeleton coupling protein in the colonization of calves and lambs by *Escherichia coli* O157:H7. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 758-764, 2006.

VOSENKAMPER, A.; MARCHES, O.; FAIRCLOUGH, P. D.; WARNES, G.; STAGG, A. J.; LINDSAY, J. O.; EVANS, P. C.; LUONG LE, A.; CROFT, N. M.; NAIK, S.; FRANKEL, G.; MACDONALD, T. T. Inhibition of NF-kappaB signaling in human dendritic cells by the enteropathogenic *Escherichia coli* effector protein NleE. **J. Immunol.**, v. 185, p. 4118-4127, 2010.

WEISS, S. M.; LADWEIN, M.; SCHMIDT, D.; EHINGER, J.; LOMMEL, S.; STÄDING, K.; BEUTLING, U.; DISANZA, A.; FRANK, R.; JÄNSCH, L.; SCITA, G.; GUNZER, F.; ROTTNER, K.; STRADAL, T. E. IRSp53 links the enterohemorrhagic *E. coli* effectors Tir and EspFU for actin pedestal formation. **Cell Host Microbe**, v. 19, p. 244-258, 2009.

WELLS, J. G.; DAVIS, B. R.; WACHSMUTH, I. K.; RILEY, L. W.; REMIS, R. S.; SOKOLOW, R.; MORRIS, G. K. Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **J. Clin. Microbiol.**, v. 18, p. 512-520, 1983.

WHALE, A. D.; GARMENDIA, J.; GOMES, T. A.; FRANKEL, G. A novel category of enteropathogenic *E. coli* simultaneously utilizes the Nck and TccP pathways to induce actin remodeling. **Cell. Microbiol.**, v. 8, p. 999-1008, 2006.

WHALE, A. D.; HERNANDES, R. T.; OOKA, T.; BEUTIN, L.; SCHULLER, S.; GARMENDIA, J.; CROWTHER, L.; VIEIRA, M. A. M.; OGURA, Y.; KRAUSE, G.; PHILLIPS, A. D.; GOMES, T. A. T.; HAYASHI, T.; FRANKEL, G. TccP2-mediated subversion of actin dynamics by EPEC 2 – a distinct evolutionary lineage of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Microbiol.**, v. 153, p. 1743-1755, 2007.

WONG, A. R.; PEARSON, J. S.; BRIGHT, M. D.; MUNERA, D.; ROBINSON, K. S.; LEE, S. F.;

FRANKEL, G.; HARTLAND, E. L. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: even more subversive elements. **Mol. Microbiol.**, v. 80, p.1420-1438, 2011.

WONG, L. Y.; CHEUNG, B. M. Modulation of cytokine responses by adrenomedullin and adrenomedullin binding protein-1 in macrophages: a novel pathway in sepsis. **Hong Kong Med. J.**, v. 21, p. 39-44, 2015.

XU, Y.; BAI, X.; ZHAO, A.; ZHANG, W.; BA, P.; LIU, K.; JIN, Y.; WANG, H.; GUO, Q.; SUN, H.; XU, J.; XIONG, Y. Genetic Diversity of Intimin Gene of Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Isolated from Human, Animals and Raw Meats in China. **PLoS One.**, v. 11, p. e0152571, 2016.

XU, Y.; BAI, X.; JIN, Y.; HU, B.; WANG, H.; SUN, H.; FAN, R.; FU, S.; XIONG, Y. High Prevalence of Virulence Genes in Specific Genotypes of Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, v. 7, p. 10.3389/fcimb.2017.00109, 2017.

YANG, W. E.; SUCHINDRAN, S.; NICHOLSON, B. P.; MCCLAIN, M. T.; BURKE, T.; GINSBURG, G. S.; HARRO, C. D.; CHAKRABORTY, S.; SACK, D. A.; WOODS, C. W.; TSALIK, E. L. Transcriptomic Analysis of the Host Response and Innate Resilience to Enterotoxigenic *Escherichia coli* Infection in Humans. **J. Infect. Dis.**, v. 213, p. 1495-1504, 2016.

YEN, H.; SUGIMOTO, N.; TOBE, T. Enteropathogenic *Escherichia coli* Uses NleA to Inhibit NLRP3 Inflammasome Activation. **PLoS Pathog.**, v. 11, p. e1005121, 2015.

YEN, H.; KARINO, M.; TOBE, T. Modulation of the Inflammasome Signaling Pathway by Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, v. 6, p. 10.3389/fcimb.2016.00089, 2016.

YERUSHALMI, G.; LITVAK, Y.; GUR-ARIE, L.; ROSENSHINE, I. Dynamics of expression and maturation of the type III secretion system of enteropathogenic *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 196, p. 2798-2806, 2014.

YIN, X.; ZHU, J.; FENG, Y.; CHAMBERS, J. R.; GONG, J.; GYLES, C. L. Differential gene expression and adherence of *Escherichia coli* O157:H7 in vitro and in ligated pig intestines. **Plos One**, v. 6, e17424, 2011.

ZHANG, S.; WU, Q.; ZHANG, J.; ZHU, X. Occurrence and Characterization of Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Retail Ready-to-Eat Foods in China. **Foodborne Pathog. Dis.**, v. 13, p. 49-55, 2016.

ZHOU, X.; GIRON, J. A.; TORRES, A. G.; CRAWFORD, J. A.; NEGRETE, E.; VOGEL, S. N.; KAPER, J. B. Flagellin of enteropathogenic *Escherichia coli* stimulates interleukin-8 production in T84 cells. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 2120-2129, 2003.

ZHOU, Z.; LI, X.; LIU, B.; BEUTIN, L.; XU, J.; REN, Y.; FENG, L.; LAN, R.; REEVES, P. R.; WANG, L. Derivation of *Escherichia coli* O157:H7 from its O55:H7 precursor. **PLoS One.**, v. 5, p. e8700, 2010.

ZHOU, M.; GUO, Z.; DUAN, Q.; HARDWIDGE, P. R.; ZHU, G. *Escherichia coli* type III secretion system 2: a new kind of T3SS? **Vet. Res.**, v. 45, p. 32, 2014.

ZHUANG, X.; CHEN, Z.; HE, C.; WANG, L.; ZHOU, R.; YAN, D.; GE, B. Modulation of host signaling in the inflammatory response by enteropathogenic *Escherichia coli* virulence proteins. **Cell. Mol. Immunol.**, v. 14, p. 237- 244, 2017.