DANIELLE DIAS MUNHOZ

EXPRESSÃO E PRODUÇÃO DA FÍMBRIA ECP POR *Escherichia coli* ENTEROPATOGÊNICA ATÍPICA

Dissertação apresentada ao Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração:
Microbiologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Roxane Fontes Piazza

Versão original

São Paulo
2015

RESUMO

MUNHOZ, D.D. **Expressão e produção da fímbria ECP por *Escherichia coli* enteropatogênica atípica**. 2015. 93f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Escherichia coli enteropatogênica atípica (aEPEC) é um dos principais agentes causadores de diarreia em crianças. Ao contrário das cepas de EPEC típica, aEPEC não produzem a fímbria BFP (*bundle-forming pilus*). A ausência de BFP sugere que outras adesinas fimbriais e afimbriais devem estar envolvidas na adesão de aEPEC à célula hospedeira, o que poderia explicar os diferentes padrões de interação que apresentam em ensaios de aderência in vitro com células epiteliais. A fímbria *E. coli common pilus* (ECP) é encontrada na maioria das cepas patogênicas e não patogênicas de *E. coli*, e, provavelmente, desempenha um papel importante na aderência bacteriana. O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão e produção de ECP em cepas de aEPEC isoladas de casos de diarreia com diferentes perfis genéticos fimbriais. As cepas BA2103, BA3378, BA4132 e BA4147 foram investigadas quanto à presença do operon *ecp*, composto por cinco genes (*ecpA*, *ecpB*, *ecpC*, *ecpD* e *ecpE*) e o seu gene regulador (*ecpR*) por PCR. A expressão deste operon foi avaliada por PCR utilizando cDNA obtidos a partir de extração de RNA das cepas bacterianas cultivadas em caldo Luria Bertani (LB), DMEM e DMEM pré-condicionado (presença de componentes de sinalização celular da cultura de células HeLa). A produção de ECP foi avaliada por imunofluorescência utilizando soro de coelho anti-EcpA. Foi observado que os genes do operon *ecp* estão presentes em todas as cepas estudadas, mas a expressão destes cinco genes, por todas as cepas, ocorreu apenas quando foram cultivadas em DMEM pré-condicionado. Houve expressão diferencial do operon *ecp* quando o cultivo foi realizado em LB ou DMEM. Apenas a cepa BA2103 produziu ECP quando o cultivo foi realizado em meio LB. Já em DMEM, três das quatro cepas estudadas produziram esta fímbria. Houve um aumento do número de bactérias produtoras de ECP quando as cepas foram cultivadas em DMEM pré-condicionado. Esses resultados sugerem que a sinalização celular pode interferir na expressão e produção da ECP.

Palavras-chave: Diarreia. aEPEC. fímbria. ECP.

ABSTRACT

MUNHOZ, D.D **Expression and production of ECP by atypical enteropathogenic *Escherichia coli***. 2015. 93 p. Masters thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) are one of the most frequent pathotypes that causes diarrhea in infants. Unlike typical EPEC, aEPEC does not produce Bundle Forming Pilus (BFP). The absence of BFP strongly suggests that other fimbrial and non-fimbrial adhesins must be involved in aEPEC adhesion to the host cell, which could explain the different interaction patterns they present on adherence assays with HeLa cells. *E. coli* common pilus (ECP) is found in most pathogenic and non-pathogenic *E. coli* and probably has an important role in bacterial adhesion. The objective of this study was to evaluate the expression and production of ECP in aEPEC strains isolated from diarrhea cases with different genetic pili profiles. For that purpose, the following strains were selected: BA2103, BA3378, BA4132 and BA4147. The presence of *ecp* operon, composed by five genes (*ecpA*, *ecpB*, *ecpC*, *ecpD* and *ecpE*) and its regulatory gene (*ecpR*), was assessed by PCR. The expression of this operon was evaluated by PCR using cDNA obtained from RNA extraction of bacterial strains grown in Luria Bertani broth (LB), DMEM and preconditioned DMEM (presence of cell signaling components from HeLa cell culture). ECP production was evaluated by immunofluorescence with rabbit serum against EcpA. It was observed that the genes comprising *ecp* operon are present in all strains tested, but expression of these five genes by all strains only occurred when they were grown in preconditioned DMEM. There was differential expression of *ecp* operon when strains were grown in LB or DMEM. ECP production was observed only by BA2103, when strains were grown in LB medium. Three of the tested strains produced ECP grown in DMEM, but there was a higher production of the pili when strains were grown in DMEM preconditionated medium. These results suggest that cellular signaling may interfere with the expression and production of ECP.

Keywords:Diarrhea.aEPEC.Fimbriae.ECP.

1 INTRODUÇÃO

1 1 Diarreia

Anualmente, são registradas cerca de 6,5 milhões de mortes de crianças menores de cinco anos de idade (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014). Mais da metade destas mortes está relacionada a condições que podem ser prevenidas ou tratadas com acesso a intervenções simples e com preços acessíveis, como saneamento básico, acesso a água tratada, conscientização de higiene pessoal, entre outros. Dados alarmantes mostram que 780 milhões de pessoas não têm acesso a água potável e 2,5 bilhões de pessoas não têm acesso a saneamento básico (WHO, 2013). Mesmo com esforços globais para reduzir a mortalidade causada pela diarreia nos últimos 30 anos, essa ainda é a segunda principal causa de morte. A diarreia pode acometer aproximadamente 2 bilhões de pessoas a cada ano, sendo que 36 milhões progridem para casos mais severos. O grupo mais suscetível são as crianças menores de cinco anos de idade, com estimativa de 800 mil mortes a cada ano (WHO, 2013). Outras consequências diretas da diarreia infantil em países mais pobres incluem desnutrição, retardo do crescimento e atraso no desenvolvimento cognitivo (WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANIZATION, 2012).

Os casos de diarreia levam a redução da absorção de carboidratos, proteínas, potássio, zinco e outros nutrientes, contribuindo para um estado de desidratação severa e má nutrição (ASHWORTH, 2001). A relação entre diarreia e má nutrição é bidirecional, já que a má nutrição predispõe a criança a uma maior incidência e duração de diarreia, enquanto que a diarreia pode levar ou agravar a má nutrição (LIMA et al., 1992). Perdas significativas de água em consequência da diarreia podem levar não apenas a desidratação, mas também a um desequilíbrio eletrolítico, diminuição da capacidade mental e, então, à morte (SUH et al., 2010). Episódios prolongados de diarreia também estão associados com o aumento da morbidade e mortalidade relacionadas a outras doenças (MOORE et al., 2010). Nos países em desenvolvimento, crianças menores de três anos sofrem em média três episódios de diarreia a cada ano, sendo uma das principais causas da desnutrição, (WHO, 2009) o que torna as crianças 9,5 vezes mais vulneráveis à morte por diarreia quando comparadas a

crianças nutridas (UNICEF, 2012).

O mais frequente agente causador da diarreia é o Rotavírus, seguido pela *Escherichia coli*, que é o principal agente bacteriano. Juntos são responsáveis por 55% dos casos de diarreia registrados, mas este número pode ser maior já que em 34% dos casos, o agente causador da diarreia não é identificado (LANATA et al., 2013)

1 2 *Escherichia coli*

Escherichia coli é um bastonente Gram-negativo, anaeróbio facultativo, pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Trata-se de um microrganismo predominante na microbiota intestinal humana e de inúmeras espécies animais, como mamíferos e até animais de sangue frio, como peixes que habitam determinadas temperaturas (HUGGINS; RAST, 1963). A estimativa é que estejam presentes 10^{21} células bacterianas de *E. coli* no corpo humano, sendo esta uma das primeiras bactérias a colonizar recém-nascidos e permanecem na microbiota (PALMER et al., 2007). Este grupo bacteriano obtém nutrientes da camada mucosa do organismo para a colonização, permanecendo neste local como membro de uma mistura de biofilmes (CONWAY; COHEN, 2015).

Ao ser eliminado de um organismo, *E. coli* persiste no ambiente até entrar em contato com seu novo hospedeiro. Um mecanismo de estresse que a bactéria encontra é a acidez estomacal, mas é capaz de sobreviver graças a mecanismos ácido resistentes que são induzidos pela mesma em fase estacionária (FOSTER, 2004). A colonização intestinal bacteriana bem-sucedida depende de inúmeros fatores, como a disponibilidade e classe dos nutrientes disponíveis, a capacidade de superar a competição com uma densa e diversificada microbiota (FRETER et al., 1983), a resistência aos mecanismos de defesa do hospedeiro (BERGSTROM et al., 2012; MCGUCKIN et al., 2011), além do rápido crescimento, que possibilita superar a renovação da camada mucosa (RANG et al., 1999) e, assim, ser incorporada ao lúmen intestinal.

O organismo é colonizado em média por cinco diferentes cepas de *E. coli* comensais, o que sugere que existam diferenças entre estes microrganismos, e que estas cepas utilizem diferentes estratégias nutricionais para favorecer seu crescimento (APPERLOO-RENKEMA, 1990).

Devido a sua grande versatilidade, *E. coli* é amplamente estudada e utilizada em algumas áreas de atuação. É conhecido sua importância na produção de vitamina K (NAKAGAWA, 2013), sua utilização como célula hospedeira em tecnologia de DNA recombinante, como produtora de proteínas de interesse biotecnológico, entre outras aplicações. Porém, essa grande versatilidade pode torna-la um patógeno que pode levar à morte. Distintas cepas de *E. coli* podem causar doenças extra intestinais e intestinais, devido a fatores de virulência que atingem grande variedade de processos celulares (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Dentre as principais *E. coli* que causam doenças extra intestinais estão as *E. coli* uropatogênicas (UPEC) e *E. coli* responsáveis por meningite (NMEC).

1 3 *Escherichia coli* diarreio gênica (DEC)

Cepas de *E. coli* que possuem fatores de virulência e levam a doenças entéricas são denominadas *Escherichia coli* diarreio gênicas (DEC) e compreendem seis grupos (ou patotipos). Esta classificação considera os mecanismos de virulência específicos, as síndromes clínicas e os aspectos epidemiológicos, dividindo as DEC em: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* difusamente aderente (DAEC), *E. coli* produtora da toxina Shiga (STEC) e seu subgrupo *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (NATARO; KAPER, 1998).

A prevalência de enteropatógenos varia entre países e áreas geográficas (AFSET; BERGH; BEVANGER, 2003; COHEN et al., 2005), sendo que as DEC ainda apresentam uma grande relevância em saúde pública, (CROXEN et al., 2013; HERNANDES et al., 2009; NATARO; KAPER; MOBLEY, 2004).

As cepas de *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC) possuem um plasmídeo que contém os genes *elt*, *estIa* e *estIb* que codificam as enterotoxinas termo-lábil (LT) e termoestável (ST) (LEVINE, 1987), as quais podem ser secretadas separadamente ou em conjunto (NATARO; KAPER, 1998). Ao colonizarem a mucosa do intestino delgado, cepas ETEC liberam as enterotoxinas e levam a diarreia aguda e aquosa em crianças, além de ser a principal causa da diarreia do viajante, acometendo adultos visitantes de áreas endêmicas (MARCHOU, 2013). Estudos revelaram que cepas de ETEC originam de diferentes linhagens

evolucionárias, indicando que a aquisição dos genes *elt* e *est* podem ser suficientes para a classificação de cepas como ETEC (TURNER et al., 2006). Corroborando com estes dados, foi observado por Chen, Savarino e Vankatesan (2006) que o cromossomo da cepa protótipo de ETEC H10407 é praticamente idêntico ao cromossomo da *E. coli* laboratorial MG1655, sugerindo que o principal fator que originou este patótipo foi a aquisição do plasmídeo contendo *elt* e *est*. Além das enterotoxinas, as ETEC possuem os fatores de colonização (CF), que são proteína estruturais de superfície (EVANS et al., 1975) e já foram descritos 25 subtipos codificados por genes plasmidiais, como os fatores antigênicos de colonização (CFA) e antígenos de superfície de coli (CS) (GAASTRA; SVENNERHOLM, 1996; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; QADRI, 2005). Estes CFs podem ser classificados em três grupos de acordo com suas características estruturais: fímbrias de filamentos rígidos, fímbrias de filamentos flexíveis (*bundle-forming*) e fibrilas, que são finas e flexíveis (NATARO; KAPER, 1998). A variabilidade dos genes de virulência e fatores de colonização sugerem que ETEC seja um grupo heterogêneo de cepas que tenham adquirido os genes de virulência por transferência horizontal (SAHL et al., 2011).

O grupo das *E. coli* difusamente aderente (DAEC) é caracterizado por seu padrão de adesão difuso em culturas de células epiteliais (SCALETISKY; SILVA; TRABULSI, 1984). Foram caracterizadas duas adesinas capazes de determinar o fenótipo de aderência difusa em cepas de DAEC. A adesina fimbrial F1845 foi caracterizada na cepa protótipo C1845 e medeia a aderência desta cepa às células epiteliais (BILGE et al., 1989; SERVIN, 2005). Esta fimbria é codificada por um operon composto de cinco genes denominado *daaABCDE* e por homologia, pertence à família das adesinas Afa/Dr (BILGE et al., 1993; NOWICKI et al., 1990). Outra adesina envolvida na aderência difusa é a AIDA-I, sendo que a proteína precursora da fimbria é codificada pelo gene *aidA* e sua conformação final medeia a adesão difusa às células HeLa (BENZ; SCHMIDT, 1992). Estudos conduzidos no Espírito Santo, Nordeste brasileiro e em São Paulo observaram que DAEC é mais prevalente em crianças com diarreia aguda (SCALETISKY et al., 2002; SPANO et al., 2008).

As *E. coli* enteroagregativas (EAEC) fazem parte de um grupo heterogêneo associado a diarreia aguda e persistente em crianças e adultos

(FLORES; OKHUYSEN, 2009; HARRINGTON; DUDDLEY; NATARO, 2006). EAEC ganhou atenção nas últimas décadas como causa de diarreia aquosa, responsável por alguns surtos esporádicos, sendo que em um número significativo de pacientes esta diarreia se torna persistente (WEINTRAUB, 2007). Este patotipo é considerado o principal causador de diarreia em várias regiões do Brasil (ARAUJO et al., 2007; BENEVIDES-MATOS et al., 2015; LIMA et al., 2014). Este grupo exibe grande adesão à mucosa intestinal e produz diferentes enterotoxinas e citotoxinas, resultando na indução de inflamação na mucosa (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). A adesão deste patotipo é mediada por adesinas fimbriais agregativas, que levam à formação do padrão de adesão agregativo (AA) às células epiteliais, formando uma “parede de tijolos empilhados” (NATARO et al., 1987).

Este patotipo é dividido em típica e atípica, sendo que as típicas possuem o gene do regulador transcricional *aggR*, membro da família AraC de ativadores (NATARO et al., 1994), enquanto que as atípicas não possuem este gene regulador (DUDDLEY et al., 2006). As EAEC típicas produzem ao menos quatro adesinas fimbriais, denominadas *aggregative adherence fimbriae* (AAF) (BERNIER; GOUDON; LE BOUGUENCE, 2002; BOISEN et al., 2008; CZECHULIN et al., 1997; NATARO et al., 1992). Entre as adesinas fimbriais AAF existem diferenças genotípicas e fenotípicas, o que as classificam como fimbrias distintas. Já as EAEC atípicas, que não possuem o gene regulador *aggR*, possuem um operon plasmidial denominado *pil*, que codifica a fímbria Pil. Esta é uma fímbria tipo IV que aparentemente contribui para a conjugação plasmidial, aderência *in vitro* às células epiteliais e a interação bactéria-bactéria ao biofilme (KIM; KOMANO, 1997).

São classificadas como STEC todas as *E. coli* produtoras de toxina Shiga (Stx) (KONOWALCHUK; SPEIRS; STAVRIC, 1977; PATON J; PATON A, 1998). As STEC são conhecidas por conter um grande número de proteínas responsáveis por adesão e contribuir para o estabelecimento, persistência e tropismo no tecido durante a infecção por este patotipo (McWILLIAMS; TORRES, 2014). Este patotipo produz as toxinas Stx1 e Stx2, assim denominadas devido a homologia estrutural e de atividade biológica com a toxina Shiga (Stx) produzida por *Shigella dysenteriae* tipo 1, responsáveis pelo efeito tóxico no hospedeiro, capazes de produzir diarreia sanguinolenta (O'BRIEN et al., 1982;

O'BRIEN; LA VECK, 1983). Muitos indivíduos infectados com STEC inicialmente desenvolvem diarreia aquosa, mas em alguns casos esta diarreia avança em um ou dois dias para diarreia com presença de sangue ou colite hemorrágica (O'BRIEN, 1983; RILEY et al., 1983; RILEY, 1987). A infecção por cepas de STEC também pode evoluir para a denominada síndrome hemolítica urêmica (SHU), caracterizada por falência renal aguda, anemia hemolítica microangiopática trombocitopenia, podendo até levar à morte (KARMALI et al., 1983,1985).

O subgrupo de STEC denominado *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), além de produzir as toxinas Shiga (Stx 1 e/ou 2), possui uma ilha de patogenicidade conhecida como região LEE (*locus of enterocyte effacement*). Na região LEE são encontrados genes que codificam proteínas ligadas à lesão histopatológica característica deste patotipo, denominada lesão *attaching and effacing* (A/E) (McDANIEL et al., 1995; MOON et al., 1983). Dentre este patotipo, o sorogrupo O157:H7 é responsável por casos graves de diarreia, principalmente pelo consumo de carne contaminada malpassada ou vegetais contaminados (BESSER-WIEK et al., 1996; COOKSON; WOODWARD, 2003; MOON et al., 1983).

1 4 *Escherichia coli* enteropatogênica

O termo *E. coli* enteropatogênica (EPEC) foi primeiramente utilizado por Neter et al. (1955) a fim de distinguir sorogrupos (antígeno O) de *E. coli* associados a pacientes com diarreia em virtude de infecções extra intestinais ou das *E. coli* encontradas em indivíduos saudáveis. Cepas de EPEC são responsáveis por diarreia infantil em diversos países em desenvolvimento (ABBA et al., 2009; CHANDRA et al., 2012; CONTRERAS et al., 2012; NAKHJAVANI et al., 2013).

Os estudos com *E. coli* que aderem intimamente às células epiteliais aumentaram nos anos 90, quando foi descrito o gene *eae* em cepas de EPEC e observado que a proteína codificada por este gene é necessária para que seja estabelecida a lesão histopatológica característica deste patótipo e de EHEC, denominada lesão A/E (FRANCIS; COLLINS; DUIMSTRA, 1986). É codificado por este gene uma adesina denominada intimina, que induz a sinalização

transmembranica e transloca seu próprio receptor, denominado Tir (*translocated intimin receptor*). Alguns estudos avaliam as variações nos resíduos de aminoácidos da porção C-terminal de intimina, que é o domínio de ligação ao receptor da proteína, definindo diferentes tipos ou subtipos de intimina em cepas de EPEC e STEC (ADU-BOBIE et al., 1998).

A lesão A/E é caracterizada pela adesão íntima da bactéria pela ligação intimina/Tir ao epitélio intestinal, seguido da destruição das microvilosidades, polimerização de actina e de outros elementos do citoesqueleto, resultando na formação de uma estrutura semelhante a um pedestal (NATARO; KAPER, 1998). Os fatores determinantes para a produção da lesão A/E estão localizados na ilha de patogenicidade denominada LEE. Esta região possui aproximadamente 36 kb e pode ser dividida em cinco segmentos: LEE1, LEE2, LEE3 LEE4 e LEE5 (ELLIOT et al., 1998; MELLIES et al., 1999), onde são encontrados os genes que codificam a intimina, o receptor Tir, as proteínas efetoras Esp (EPEC *secreted protein*) e outros componentes que fazem parte do sistema de secreção do tipo III (SST3) (NATARO; KAPER, 1998) (Figura 1). As proteínas Esp (Esp A, B, D) estão envolvidas na formação de um injetossomo, semelhante a uma agulha, que injeta proteínas efetoras até a célula hospedeira, o que desarranja o citoesqueleto e subverte as funções da célula hospedeira (FRANKEL et al., 1998). As proteínas EscC, proteínas de membrana interna e a lipoproteína EscJ, formam uma estrutura anelada que conecta as membranas interna e externa da bactéria (revisado por GARMENDIA; FRANKEL; KREPIN, 2005). A proteína EscF constitui uma estrutura em forma de agulha (WILSON et al., 2001), a partir da qual ocorre a polimerização da subunidade EspA, que irá formar uma estrutura filamentosa oca denominada canal de translocação (CREPIN et al., 2005; DANIELL et al., 2001, 2003). As proteínas EspB e EspD irão formar um poro na membrana citoplasmática da célula hospedeira (BUTTNER; BONAS, 2002; IDE et al., 2001; KRESSE; ROHDE; GUZMAN, 1999), por onde serão injetadas as proteínas efetoras, além do receptor Tir (FIVAZ; VAN DER GOOT, 1999; KNUTTON et al., 1998).

Figura 1- Representação esquemática do sistema de secreção tipo III presente em EPEC e EHEC.

FONTE: Garmendia, Frankel e Krepin, 2005

A importância do SST3 em EPEC tem sido demonstrada por diversos estudos. Recentemente, Sampaio et al. (2014) verificaram que a mutação nos genes que formam o sistema de secreção em uma cepa de EPEC resultou na perda da capacidade de formar a lesão A/E, assim como de invadir macrófagos.

A colonização de EPEC à célula hospedeira é um processo multifatorial, no qual atuam adesinas fimbriais e afimbriais, que podem agir simultaneamente ou em diferentes estágios da colonização. Esse processo está associado com a presença do plasmídeo pMAR2, conhecido como pEAF (*EPEC adherence factor*), que contém operon bfp (BALDINI et al., 1983; DONNENBERG; ZHANG; STONE, 1997) responsável por codificar uma fímbria tipo IV denominada BFP (Bundle Forming Pilus), que auxilia na adesão bacteriana, conecta as bactérias

com as microcolônias, o que promove a sua estabilização (GIRÓN; HO; SCHOOLNICK, 1991). Alguns autores demonstraram que a ligação inicial entre bactéria e célula hospedeira é mediada por BFP e EspA, sendo esta associação o estímulo necessário para que ocorra a translocação de EspB, Tir e possivelmente outras proteínas efetoras para dentro da célula hospedeira (CLEARLY et al., 2004; KNUTTON et al., 1998).

Algumas cepas de EPEC não possuem o plasmídeo EAF, o gene *bfp* e, portanto, não produzem a fímbria BFP, sendo então conhecidas como EPEC atípicas (ABE et al., 2009; NARA et al., 2010).

1 4 1 *Escherichia coli* enteropatogênica atípica

A classificação de aEPEC foi primeiramente utilizada por Kaper (1996) para distinguir cepas de EPEC que não portavam o plasmídeo EAF. Inúmeros trabalhos foram realizados a fim de melhor determinar as diferenças genotípicas e fenotípicas entre as EPEC típicas e atípicas, sendo atualmente classificadas como as cepas que não apresentam o pEAF, o operon de *bfp*, que não expressam a fímbria BFP, mas que possuem o gene *eae* e, portanto, são capazes de produzir intimina (ABE et al., 2009; BLANCO et al., 2006; DULGUER et al., 2003; NARA et al., 2010; PELAYO et al., 1999; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002; VIEIRA et al., 2001).

Além das diferenças em relação às tEPEC, aEPEC podem ser bastante heterogêneas, compreendendo cepas que produzem apenas os fatores de virulência codificados por genes da região LEE e outras que expressam tanto os fatores codificados por LEE quanto aqueles localizados fora desta região (CAMPOS et al., 1994; GONÇALVES et al., 1997; RODRIGUES et al., 1996).

Amostras de tEPEC produzem um padrão de aderência característico em linhagens celulares cultivadas *in vitro*, denominado adesão localizada (AL), sendo visualizado após três horas de contato bactéria-célula (SCALETISKY et al., 1984). No padrão AL as bactérias aderem em áreas localizadas da superfície celular, formando microcolônias compactas (*clusters* bacterianos) em razão da participação da fímbria BFP (GIRÓN et al., 1991). Por outro lado, a maioria das cepas de aEPEC exibem um fenótipo de adesão localizado-*like* (ALL) caracterizado pela formação de microcolônias bacterianas frouxas sobre

determinadas regiões da superfície celular, sendo visualizado após seis horas de contato (RODRIGUES et al., 1996). Este padrão vem sendo descrito como o mais frequente em isolados de aEPEC (GOMES et al., 2004; PELAYO et al., 1999; SCALETISKY et al., 1999). No entanto, algumas cepas de aEPEC também podem apresentar o padrão de adesão localizada, com a ocorrência de variações no padrão AL, sendo visualizados grupos bacterianos menos compactos após seis horas de incubação com células epiteliais (ABE et al., 2009; HERNANDES et al., 2008). Além do padrão AL e ALL, as aEPEC podem apresentar o padrão de adesão difusa (AD), o padrão de adesão agregativa (AA) ou um padrão indeterminado/não característico, além de amostras que apresentam-se não aderentes às células epiteliais *in vitro* (ABE et al., 2009; GOMES et al., 2004; MORA et al., 2009; SCALETISKY et al., 1999). Um estudo realizado por Benevides-Matos et al. (2015) demonstrou que em 90 cepas de aEPEC, isoladas de casos de diarreia, 61,1% apresentavam o padrão ALL, enquanto que nos casos controle 38,9% demonstraram este padrão de adesão.

Figura 2 - Padrões de adesão às células epiteliais encontrados em cepas de aEPEC

FONTE: Trabulsi; Keller; Gomes, 2002.

Por não produzirem BFP, as cepas de aEPEC produzem outras adesinas fimbriais que desempenham um importante papel biológico.

1 4 2 Adesinas fimbriais

Em bactérias patogênicas, as fímbrias, frequentemente, são fatores de adesão cruciais, que medeiam a ligação às células alvo, evasão do sistema imune do hospedeiro e formação de biofilme. Por este motivo, são consideradas importante alvo para drogas, necessitando o melhor entendimento de suas estruturas e mecanismo de montagem (CUSUMANO; HULTGREN, 2009; DURAND et al., 2009).

O genoma de cepas de *E. coli* patogênicas e não patogênicas contém pelo menos 16 diferentes regiões que podem ser operons fimbriais (BLATTNER et al., 1997; PERNA et al., 2001). Trabalhos demonstraram que alguns destes operons fimbriais são expressos por *E. coli* patogênicas e desempenham papel importante na colonização, como os que expressam a fimbria tipo 1 (T1P) e a fimbria curli. O operon cromossomal *fim*, que codifica a T1P, é encontrado na maioria cepas de *E. coli* e em membros da família *Enterobacteriaceae*. Um dos papéis mais conhecidos que esta fimbria desempenha em *E. coli* patogênica é a interação da UPEC com receptores de células epiteliais encontradas no rim, desencadeando a infecção urinária (CONNELL et al., 1996). Outra função desempenhada por T1P é na formação de biofilme pela cepa 042 de EAEC (MOREIRA et al., 2003).

A fimbria longa polar (LPF) é importante na patogênese e virulência de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (BAUMLER; TSOLIS; HEFFRON, 1996; VAN DER VELDEN, 1998). Em *E. coli* O157:H7 estão presentes dois operons *lpf* homólogos ao operon *lpf* encontrado em *Salmonella* serovar Typhimurium (PERNA et al., 2001), com sequência e funções similares (TORRES et al., 2002). Mutações nos dois operons *lpf* diminuíram a capacidade destas cepas de estabelecer e persistir na colonização em ovelhas e porcos por dois meses e reduziu, mas não eliminou a lesão A/E. Como estabelecido para diversas espécies bacterianas, mecanismos redundantes possibilitam que a bactéria sobreviva em diferentes ambientes, sendo assim, mutações em um sistema, como o operon *lpf*, pode não reduzir totalmente a chance de sobrevivência da população bacteriana (JORDAN et al., 2004).

Cepas de *E. coli* e *Salmonella enterica* expressam a adesina fimbrial denominada curli, que promove a agregação bacteriana (COLLINSON et al., 1993). Estudos demonstraram que em cepas de *E. coli* O157:H7, curli age junto com celulose a fim de colonizar o hospedeiro e formar biofilme (SALDAÑA et al., 2009). A fimbria curli também está associada com a formação de biofilme em baixas temperaturas em uma cepa O55:H7 de aEPEC (WEISS-MUSZKAT et al., 2010).

Em um estudo realizado por Hernandes et al. (2011) foi observado que em 98,6% das cepas de aEPEC, isoladas de casos de diarreia, apresentavam o gene *hcpA*, que codifica a pilina da fimbria tipo IV denominada HCP. Em EAEC,

a presença do gene *aggA* (AAF/I) está associada com diarreia, já que foi observada a presença deste gene em 31 cepas de EAEC isoladas de casos de diarreia, enquanto apenas em uma cepa isolada do caso controle (FLORES; OKHUYSEN, 2009). Estudos demonstram resultados similares, observando alta prevalência do gene *aggA* em cepas isoladas de pacientes com diarreia (PIVA et al., 2003). Estes dados demonstram que a prevalência de AAF tem uma provável relação com a região geográfica de onde as cepas são isoladas.

1 4 2 1 *E. coli common pilus* (ECP)

Rendón et al. (2007) observaram em um ensaio de interação da cepa de EHEC EDL933 com células epiteliais em 6 h, um filamento fino e flexível, semelhante a uma fímbria que se prolongava por alguns micrometros da superfície bacteriana. Este filamento tinha a tendência de se agrupar, formando uma estrutura mais grossa que parecia mediar a interação bactéria-bactéria. A fim de caracterizar esta estrutura, foi realizada a purificação e sequenciamento, observando que o tamanho e a sequência do aminoácido N terminal desta estrutura era homologa com ao gene *yagZ* encontrado no genoma de EHEC O157:H7 (HAYASHI et al., 2001; PERNA et al., 2001), *E. coli* K-12 (BLATTNER et al., 1997), UPEC (WELCH et al., 2002) e ao gene *mat* de *E. coli* associada a meningite (NMEC) (POUTTU et al., 2001). A alta semelhança e frequência entre cepas de *E. coli*, levou a denominação desta fímbria de *E. coli common pilus* (ECP).

Uma dificuldade para todos os mecanismos de secreção em bactérias Gram-negativas, é a presença de duas membranas celulares, separadas pelo espaço periplasmático que é desprovido de fonte de energia como ATP e a força próton motora. Esses mecanismos aproveitam a energia intrínseca no dobramento da proteína para iniciar a montagem e, geralmente, necessitam de fatores extrínsecos como chaperonas para prevenir a polimerização no periplasma (ALLEN; PHAN; WAKSMAN, 2009) (Figura 3). Um mecanismo de secreção bastante estudado nas últimas duas décadas é o sistema chaperona/usher (WAKSMAN; HULTGREN, 2009; ZAV'YALOV et al., 2010). As fímbrias por ele secretadas são compostas por subunidades de aproximadamente 8 nm de largura e 2 nm de comprimento, ligadas a uma base

na membrana externa da bactéria. Estas fimbrias são compostas por uma subunidade majoritária, denominada pilina, seguida por uma subunidade menor terminal e flexível, denominada *tip* ou adesina, que possui o domínio de ligação ao receptor. O número de subunidades e a conformação da adesina varia de acordo com a fímbria. Todas as subunidades da pilina possuem a mesma conformação, uma porção estrutural denominada *core*, e uma extensão N-terminal (Nte). Na adesina, ao invés da Nte, há um domínio de lectina que contém o sítio de ligação ao receptor.

Cada subunidade é secretada para o periplasma pela maquinaria do sistema Sec de secreção, sendo depois estabilizadas pela ligação a chaperonas (ALLEN; PHAN; WAKSMAN, 2009), pela interação denominada complementação pela cadeia doadora (CHOUDHURY et al., 1999; SAUER et al., 1999). Além de evitar a polimerização, a ligação com chaperonas também vai evitar a degradação das subunidades no periplasma. A montagem da fímbria ocorre na membrana externa, iniciada pela ligação do usher, formando um poro por onde as subunidades serão transportadas (REMAUT et al., 2008). Durante a polimerização das subunidades a porção Nte da subunidade a ser ligada substitui a chaperona da subunidade anterior, pelo mecanismo denominado substituição da cadeia doadora (SAUER et al., 2002; ZAVIALOV et al., 2003). Cada subunidade é ligada separadamente, e são “empurradas” através do poro formado pelo usher, sendo que a primeira subunidade incorporada é a adesina, assegurando a ligação do domínio lectina com o receptor.

Figura 3 – Demonstração esquemática da montagem de fímbrias pelo sistema chaperona/usher.

FONTE: Allen, Phan e Waksman, 2012.

A montagem da adesina ECP requer o funcionamento de 6 genes que compõem o operon *ecp* (Figura 4), e possui a organização de operon fimbrial do tipo chaperonina/usher.

Figura 4 - Representação esquemática do operon *ecp*, formado pelo gene *ecpR* e *ecpA* ao *ecpE*.

FONTE: Martínez-Santos, 2012

A fímbria ECP é construída a partir da pilina, codificada pelo segundo gene do operon, *ecpA*. O primeiro gene, *ecpR*, codifica a proteína EcpR, que é classificada como a provável proteína reguladora. Os genes *ecpB* e *ecpE* são descritos como prováveis chaperonas, enquanto que o gene *ecpC* é descrito como o *usher*. A adesina, a subunidade de ligação ao receptor, é codificada pelo gene *ecpD* (MARTÍNEZ-SANTOS, 2012). Análises iniciais da sequência de *ecpR* revelaram homologia com um regulador de *E. coli* denominado NarL, enquanto que análises de EcpB, EcpC e EcpE detectaram baixa, mas significativa similaridade com uma variedade de proteínas chaperonas/usher da família de fímbria CU. A identidade na sequência de tEPEC é de aproximadamente 17% com as proteínas EcpC, EcpB e EcpE já descritas. Interessantemente, tanto EcpB quanto EcpE possuem função de chaperonas, o que é incomum no sistema chaperona-usher, já que usualmente é encontrada apenas uma chaperona.

Mutantes de *ecpA* em cepas de EHEC, EPEC e EAEC são menos aderentes às células HeLa do que as cepas selvagens produtoras de ECP (AVELINO et al., 2010; RENDÓN et al., 2007; SALDAÑA et al., 2009). Scaletsky e colaboradores (2010) demonstraram a presença do gene *ecpA* em 29 cepas de aEPEC de diferentes sorogrupos. Corroborando com estes dados, Hernandez e colaboradores (2011) observaram uma alta prevalência do gene *ecpA* em cepas de aEPEC isoladas de casos de diarreia, sendo este gene o segundo mais prevalente. Estudos recentes sugerem que ECP desempenha um papel mutuo na formação de biofilme e o reconhecimento da célula hospedeira, pela perda da capacidade de cepas de NMEC de aderirem a superfícies hidrofóbicas (LEHTI et al., 2010). No entanto, não existem muitas informações sobre a prevalência e produção da fímbria ECP em aEPEC.

Em um estudo realizado por Blackburn et al. (2009) foi avaliada a prevalência do gene *ecpA* em cepas de ETEC de diferentes regiões geográficas, com ou sem

os genes que codificam os fatores de colonização (CF). Em 80% destas cepas foi identificada a presença do gene que codifica a pilina EcpA, demonstrando que este gene está distribuído entre cepas de ETEC. Também foi avaliada a produção da fímbria e identificado que 58% das cepas produzem ECP.

ECP também vem sendo implicado como um fator de adesão que contribui para o padrão de adesão agregativo (AA) de EAEC às células epiteliais (AVELINO et al., 2010). Em cepas de tEPEC, ECP parece agir sinergicamente a BFP durante a formação do padrão de adesão LA, já que anticorpos contra ECP foram capazes de reduzir significativamente a adesão às células epiteliais de um mutante em *bfpA* (SALDAÑA et al., 2009).

Ainda não está bem estabelecido qual tipo de receptor da célula hospedeira a fímbria ECP se liga. Porém, foi observado que ECP interage com resíduos de arabinose de pectina e outros componentes da parede celular de plantas, facilitando a infecção de plantas por *E. coli* (ROSSEZ et al., 2014).

A alta incidência de cepas de DEC isoladas de crianças e adultos doentes ao redor do mundo, instiga a identificação de fatores de virulência determinantes para esse quadro clínico e melhor entendimento do mecanismo de adesão destes patógenos às células do hospedeiro. A presença do gene *ecpA* em diferentes patótipos de DEC está bem estabelecida, porém a avaliação da presença e transcrição de todos os genes que compõem o operon, assim como a produção da fímbria em aEPEC ainda necessitam ser mais estudados.

6 CONCLUSÃO

Todas as cepas de aEPEC avaliadas possuem os genes que compõem o operon *ecp*, mas a transcrição deste operon é alterada de acordo com o meio de cultivo bacteriano.

O operon *ecp* é comumente encontrado em cepas de aEPEC. No entanto, a transcrição deste operon por aEPEC é influenciada pelas condições de cultivo bacteriano, sendo DMEM contendo sinalização celular o meio que mais favoreceu a produção da fímbria ECP. Estes resultados sugerem que ECP desempenhe um importante papel biológico em aEPEC, devido ao favorecimento de sua produção em condições mais semelhantes com as encontradas fisiologicamente.

REFERÊNCIAS¹

- ABBA, K. et al. Pathogens associated with persistent diarrhoea in children in low and middle income countries: systematic review. **BMC Infect. Dis.**, v. 10, n. 9, p. 88, 2009.
- ABE, C. M. et al. Virulence features of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* identified by the eae⁺ EAF-negative stx-genetic profile. **Diag. Microbiol.Infect. Dis.**, v. 64, n. 4, p. 357-365, 2009.
- ADU-BOBIE, J. et al. Detection of intimins alpha, beta, gamma, and delta, four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. **J. Clin.Microbiol.**, v. 36, p. 662–668, 1998.
- AFSET, J.E.; BERGH, K.; BEVANGER, L. High prevalence of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Norwegian children with diarrhoea. **J. Med. Microbiol.**, v. 52, n. 11, p. 1015–1029, 2003.
- ALLEN W.J.; PHAN, G.; WAKSMAN, G. Structural biology of periplasmic chaperones. **Adv. Protein. Chem. Struct. Biol.**, v. 78, p. 51–97, 2009.
- APPERLOO-RENKEMA, H.Z.; VAN DER WAAIJ, B.D.; VAN DER WAAIJ, D. Determination of colonization resistance of the digestive tract by biotyping of Enterobacteriaceae. **Epidemiol. Infect.**, v. 105, n. 2, p. 355–361, 1990.
- ARAUJO, J. M. et al. Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, n. 10, p. 3396-3399, 2007.
- ASHWORTH, A. Treatment of severe malnutrition. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 32, n. 5, p. 516–518, 2001.
- ATLUNG, T.; INGMER, H.H-NS: a modulator of environmentally regulated gene expression. **Mol. Microbiol.**, v. 24, n. 1, p. 7–17, 1997.
- AVELINO, F. et al. The majority of enteroaggregative *Escherichia coli* strains produce the *E. coli* common pilus when adhering to cultured epithelial cells. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 300, p. 440–448, 2010.
- BADEA, L. et al. Contribution of Efa1/LifA to the adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells. **Microb. Pathog.**, v. 34, n. 5, p. 205–215, 2003.
- BAGA, M. et al. Transcriptional activation of a *pap* pilus virulence operon from uropathogenic *Escherichiacoli*. **EMBO. J.**, v. 4, p. 3887–3893, 1985.
- BALDINI, M. M. et al. Plasmid mediated adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli*. **J. Pediatr. Gastroenterol.Nutr.**, v. 2, p. 534–538, 1983.

¹De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BARTH, M. et al. Role for the histone-like protein H-NS in growth phase-dependent and osmotic regulation of sigma S and many sigma S-dependent genes in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 177, n. 12, p. 3455–3464, 1995.

BAUMLER, A.J.; TSOLIS, R.M.; HEFFRON, F. The *lpf* fimbrial operon mediates adhesion of *Salmonella typhimurium* to murine Peyer's patches. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 93, p. 279–283, 1996.

BENEVIDES-MATOS, N. et al. Adherence and virulence genes of *Escherichia coli* from children diarrhoea in the Brazilian Amazon. **Braz. J. Microbiol.**, v. 46, n. 1, p. 131–137, 2015.

BENZ, I.; SCHMIDT, M.A. Isolation and serologic characterization of AIDA-I, the adhesin mediating the diffuse adherence phenotype of the diarrhea-associated *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27). **Infect. Immun.**, v. 60, p. 13–18, 1992.

BERGSTROM, K.S. et al. Innate host responses to enteric bacterial pathogens: a balancing act between resistance and tolerance. **Cell Microbiol.**, v. 14, n. 4, p. 475–484, 2012.

BERNIER, C.; GOUNON, P.; LE BOUGUÉNEC, C. Identification of an aggregative adhesion fimbria (AAF) type III-encoding operon in enteroaggregative *Escherichia coli* as a sensitive probe for detecting the AAF-encoding operon family. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 8, p. 4302–4311, 2002.

BESSER-WIEK, D. et al. GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, 96., 1996, **Abstracts...** Local: Editora, 1996. abstr. C-364.

BIEBER, D. et al. Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Science**. v. 280, n. 5372, p. 2114–2218, 1998.

BILGE, S.S. et al. Molecular characterization of a fimbrial adhesin, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **J. Bacteriol.**, v. 171, n. 8, p. 4281–4289, 1989.

BILGE, S.S. et al. Transcriptional organization of the F1845 fimbrial adhesin determinant of *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 7, p. 993–1006, 1993.

BLACKBURN, D. et al. Distribution of the *Escherichia coli* common pilus among diverse strains of human enterotoxigenic *E. coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 47, n. 6, p. 1781–1784, 2009.

BLANCO, M. et al. Typing of intimin (*eae*) genes from enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from children with diarrhoea in Montevideo, Uruguay: identification of two novel intimin variants (μ B and ξ R/ β 2B). **J. Med. Microbiol.**, v. 55, p. 1165–1174, 2006.

BLATTNER, F.R. et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. **Science**, v. 277, p. 1453–1462, 1997.

BOISEN, N. et al. New adhesin of enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF family. **Infect. Immun.**, v. 76, p. 3281–3292, 2008.

BUERIS, V. et al. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 7, p. 839-844, 2007.

BÜTTNER, D.; BONAS, U. Port of entry--the type III secretion translocon. **Trends Microbiol.**, v. 10, n. 4, p. 186–192, 2002.

CAMPOS, L.C. et al. *Escherichia coli* serogroup O111 includes several clones of diarrheogenic strains with different virulence properties. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 3282–3288, 1994.

CHANDRA, B.K. et al. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* as a predominant cause of paediatric nosocomial diarrhoea in India. **J. Med. Microbiol.**, v. 61, p. 830–836, 2012.

CHEN, Q.; SAVARINO, S.J.; VENKATESAN, M.M. Subtractive hybridization and optical mapping of the enterotoxigenic *Escherichia coli* H10407 chromosome: isolation of unique sequences and demonstration of significant similarity to the chromosome of *E. coli* K-12. **Microbiology**, v. 152, n. 4, p. 1041–1054, 2006.

CHOUDHURY, D. et al. X-ray structure of the FimC–FimH chaperone–adhesin complex from uropathogenic *Escherichia coli*. **Science**, v.285, p. 1061–1066, 1999.

CLEGG, S.; WILSON, J.; JOHNSON, J. More than one way to control hair growth: regulatory mechanisms in enterobacteria that affect fimbriae assembled by the chaperone/usher pathway. **J. Bacteriol.**, v. 193, n. 9, p. 2081–2088, 2011,

COLLINSON, S.K. et al. Thin, aggregative fimbriae mediate binding of *Salmonella enteritidis* to fibronectin. **J. Bacteriol.**, v. 175, p. 12–18, 1993.

CONNELL, I. et al. Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 93, p. 9827–9832, 1996.

CONTRERAS, C.A. et al. Genetic diversity of locus of enterocyte effacement genes of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from Peruvian children. **J. Med. Microbiol.**, v. 61, p. 1114–1120, 2012.

CONWAY, T.; COHEN, P.S. Commensal and Pathogenic *Escherichia coli* Metabolism in the Gut. **Microbiol. Spectr.**, v. 3, n. 3, p. 1–24, 2015.

COOKSON, A. L.; WOODWARD, M. J. The role of intimin in the adherence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 to HEp-2 tissue culture

cells and to bovine gut explant tissues. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 292, p. 547–553, 2003.

CREPIN, V.F. et al. Polarity of enteropathogenic *Escherichia coli* EspA filament assembly and protein secretion. **J. Bacteriol.**, v. 187, p. 2881–2889, 2005.

CROXEN, M.A.; FINLAY, B.B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 8, n. 1, p. 26–38, 2010.

CROXEN, M.A. et al. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 26, n. 4, p. 822–80, 2013.

CUSUMANO, C.K.; HULTGREN, S.J. Bacterial adhesion - a source of alternate antibiotic targets. **IDrugs.**, v. 12, p. 699–705, 2009.

CZECZULIN J. R. et al. Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect Immun.**, v. 65, p. 4135–4145, 1997.

DAME, R.T.; WYMAN, C.; GOOSEN, N. H-NS mediated compaction of DNA visualized by atomic force microscopy. **Nucleic. Acids. Res.**, v. 28, p. 3504–3510, 2000.

DANIELL, S.J. et al. The filamentous type III secretion translocon of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Cell Microbiol.**, v. 3, p. 865–871, 2001.

DANIELL, S.J. et al. 3D structure of EspA filaments from enteropathogenic *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 49, p. 301–308, 2003.

DONNENBERG, M.S. et al. A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localized adherence. **Mol. Microbiol.**, v. 6, p. 3427–3437, 1992.

DONNENBERG, M.S.; ZHANG, H.Z.; STONE, K.D. Biogenesis of the bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*: reconstitution of fimbriae in recombinant *E. coli* and role of DsbA in pilin stability--a review. **Gene.**, v. 192, n. 1, p. 33–38, 1997.

DOUGHTY, S. et al. Identification of a novel fimbrial gene cluster related to long polar fimbriae in locus of enterocyte effacement-negative strains of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 12, p. 6761–6769, 2002.

DUDLEY, E.G. et al. Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a pheU pathogenicity island in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 61, n. 5, p. 1267–1282, 2006.

DULGUER, M.V. et al. 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, n. 11, p. 1685–1694, 2003.

DURAND, E. et al. Structural biology of bacterial secretion systems in Gram-negative pathogens — potential for new drug targets. **Infect. Disord. Drug.Targets.**,v. 9, p. 518–547, 2009.

ELLIOTT, S.J. et al. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. **Mol. Microbiol.**, v. 28, n. 1, p. 1–4, 1998.

EVANS, D.G. et al. Plasmid-controlled colonization factor associated with virulence in *Escherichia coli* enterotoxigenic for humans. **Infect. Immun.**, v. 12, n. 3, p. 656–667, 1975.

FLORES, J.; OKHUYSEN, P.C. Enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 25, n. 1, p. 8–11, 2009.

FIVAZ, M.; VAN DER GOOT, F.G.The tip of a molecular syringe. **Trends.Microbiol.**, v. 7, n. 9, p. 341–343, 1999.

FOSTER, J.W. *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, n. 11, p. 898–907, 2004.

FRANCIS, D.H.; COLLINS, J.E.; DUIMSTRA, J.R. Infection of gnotobiotic pigs with an *Escherichia coli* O157:H7 strain associated with an outbreak of hemorrhagic colitis. **Infect. Immun.**, v. 51, p. 953–956, 1986.

FRANKEL, G. et al. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. **Mol. Microbiol.**, v. 30, p. 911–921, 1998.

FREITAS, N. C. **Pesquisa de adesinas fimbriais em isolados de *Escherichia coli* enteropatogênica atípica.** Trabalho de conclusão de curso. Centro Universitário Fundação Santo André, Santo André, 2008.

FRETER, R. et al. Survival and implantation of *Escherichia coli* in the intestinal tract **Infect. Immun.**, v. 39, n. 2, p. 686–703, 1983.

GAASTRA, W.; SVENNERHOLM, A. M. Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). **Trends.Microbiol.**, v. 4, n. 11 p. 444–452, 1996.

GARMENDIA, J.; FRANKEL, G.; CREPIN V.F.Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 5, p. 2573–2585, 2005.

GIRÓN, J.A. et al. Diffuse-adhering *Escherichia coli* (DAEC) as a putative cause of diarrhea in Mayan children in Mexico. **J. Infect. Dis.**, v. 163, n. 3, p. 507–513, 1991.

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. et al. Emerging enteropathogenic *Escherichia coli* strains? **Emerg. Infect. Dis.**, v. 10, n. 10, p. 1851–1855, 2004.

GOMES, T.A. et al. 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, n. 9, p. 3334–3337, 2011.

GONÇALVES, A.G. et al. Virulence properties and clonal structures of strains of *Escherichia coli* O119 serotypes. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 2034–2040, 1997.

HARRINGTON, S.M.; DUDLEY, E.G.; NATARO, J.P. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 254, n. 1, p. 12–18, 2006.

HAYASHI, T. et al. Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. **DNA Res.**, v. 8, n. 1, p. 11–22, 2001.

HERNANDES, R.T. **Estudo da aderência localizada de uma amostra de *Escherichia coli* enteropatogênica atípica**. 2006. 109 f. Tese (Doutorado em ciências) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, 2006.

HERNANDES, R. T. et al. The localized adherence pattern of an atypical enteropathogenic *Escherichia coli* is mediated by intimin omicron and unexpectedly promotes HeLa cell invasion. **Cell Microbiol.**, v. 10, n. 2, p. 415–425, 2008.

HERNANDES, R.T. et al. Fimbrial adhesins produced by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 77, n. 23, p. 8391–8399, 2011.

HOMMAIS, F. et al. Large scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression. By prokaryotic nucleoid-associated protein, H-NS. **Mol. Microbiol.**, v. 40, p. 20–36, 2001.

HUGGINS, C.; RAST, H.V. Jr Incidence of coliform bacteria in the intestinal tract of *Gambusia affinis holbrooki* (Girard) and in their habitat water. **J. Bacteriol.**, v. 85, p. 489–490, 1963.

IDE, T. et al. Characterization of translocation pores inserted into plasma membranes by type III-secreted Esp proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Cell Microbiol.**, v. 3, n. 10, p. 669–679, 2001.

JERSE, A.E. et al. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 87, n. 20, p. 7839–7843, 1990.

JORDAN, D.M. et al. Long Polar Fimbriae Contribute to Colonization by *Escherichia coli* O157:H7 in vivo. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 10, p. 6168, 2004.

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, n. 2, p. 123–140, 2004.

KARMALI, M.A. et al. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. **Lancet.**, v. 1, n. 8325, p. 619–620, 1983.

KARMALI, M. A. et al. The association between hemolytic uremic syndrome and infection by Verotoxin-producing *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.**, v. 151, p. 775–782, 1985.

KENNY, B. et al. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. **Cell.**, v. 91, n. 4, p. 511–520, 1997.

KLEMM, P. Two regulatory *fim* genes, *fimB* and *fimE*, control the phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*. **EMBO J.**, v. 5, p. 1389–1393, 1986.

KLINE, K.A. et al. Bacterial adhesins in host-microbe interactions. **Cell Host. Microbe.**, v. 5, n. 6, p. 580–592, 2009.

KIM, S.R.; KOMANO, T. The plasmid R64 thin pilus identified as a type IV pilus. **J. Bacteriol.**, v. 179, n. 11, p. 3594–3603, 1997.

KNUTTON, S. et al. A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. **EMBO J.**, v. 17, n. 8, p. 2166–2176, 1998.

KONOWALCHUK, J.; SPEIRS, J.I.; STAVRIC, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 18, n. 3, p. 775–779, 1977.

KRESSE, A.U.; ROHDE, M.; GUZMÁN, C.A. The EspD protein of enterohemorrhagic *Escherichia coli* is required for the formation of bacterial surface appendages and is incorporated in the cytoplasmic membranes of target cells. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 9, p. 4834–4842, 1999.

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

LAURENT-WINTER, C. et al. Role of *Escherichia coli* histone-like nucleoid-structuring protein in bacterial metabolism and stress response--identification of targets by two-dimensional electrophoresis. **Eur. J. Biochem.**, v. 244, n. 3, p. 767–773, 1997.

LEHTI, T.A. et al. Mat fimbriae promote biofilm formation by meningitis-associated *Escherichia coli*. **Microbiology**, v. 156, p. 2408–2417, 2010.

LEHTI, T.A. et al. The response regulator RcsB activates expression of Mat fimbriae in meningitic *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 194, p. 3475–3485, 2012.

LEVINE, M.M. et al. The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. **J. Infect. Dis.**, v. 152, n. 3, p. 550–559, 1985.

LEVINE, M.M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. **J. Infect. Dis.**, v. 155, n. 3, p. 377–389, 1987.

LIMA, A.A. et al. Persistent diarrhea in northeast Brazil: etiologies and interactions with malnutrition. **Acta. Paediatr. Suppl.**, v. 381, p. 39–44, 1992.

MARCHOU, B. Traveller's diarrhea: epidemiology, clinical practice guideline for the prevention and treatment. **Presse. Med.**, v. 42, n. 1, p. 76–81, 2013.

MARTÍNEZ-SANTOS, V.I. et al. Transcriptional regulation of the *ecp* operon by EcpR, IHF, and H-NS in Attaching and Effacing *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 194, n. 18, p. 5020–5033, 2012.

McDANIEL, T. K. et al. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 92, p. 1664–1668, 1995.

McGUCKIN, M.A. et al. Mucin dynamics and enteric pathogens. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 9, n. 4, p. 265–278, 2011.

McWILLIAMS, B.D.; TORRES, A.G. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Adhesins. **Microbiol. Spectr.**, v. 2, n. 3, 2014.

MELLIES, J.L. et al. Ler of pathogenic *Escherichia coli* forms toroidal protein–DNA complexes. **Microbiol.**, v. 157, n. 4, p. 1123–1133, 2011.

MORA, A. et al. HeLa-cell adherence patterns and actin aggregation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga-toxin-producing *E. coli* (STEC) strains carrying different *eae* and *tir* alleles. **Int. Microbiol.**, v. 12, n. 4, p. 243–251, 2009.

MOON, H. W. et al. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. **Infect. Immun.**, v. 41, p. 1340–1351, 1983.

MOORE, S.R. et al. Prolonged episodes of acute diarrhea reduce growth and increase risk of persistent diarrhea in children. **Gastroenterol.**, v.139, n. 4, p. 1156–1164, 2010.

MOREIRA, C.G. et al. Role of type I fimbriae in the aggregative adhesion pattern of enteroaggregative *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 226, n. 1, p. 79–85, 2003.

NAKAGAWA, K. Biological significance and metabolic activation of vitamin K. **Yakugaku Zasshi.**, v. 133, n. 12, p. 1337–1341, 2013.

NAKHJAVANI, F.A. et al. Molecular analysis of typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from children with diarrhoea. **J. Med. Microbiol.**, v. 62, p. 191–195, 2013.

NARA, J. M. et al. Differentiation of typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* using colony immunoblot for detection of *bundle-forming pilus* expression. **J. App.Microbiol.**, v. 109, n. 1, p. 35-43, 2010.

NARA, J. M. **Adesinas fimbriais em *Escherichia coli* enteropatogênica atípica: prevalência e proteômica.** 2012. 148 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

NATARO, J. P. et al. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 6, p. 829–831, 1987.

NATARO, J. P. et al. Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 2297–2304, 1992.

NATARO, J. P. et al. *AggR*, a transcriptional activator of aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli*. **J.Bacteriol.**, v. 176, p. 4691–4699, 1994.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol.Ver.**, v. 11, n. 1, p. 142–201, 1998.

NETER, E. O. et al. Demonstration of antibodies against enteropathogenic *Escherichia coli* in sera of children of various ages. **Pediatrics.**, v. 16, p. 801–808, 1955.

NOUGAYRÈDE, J.P.; FERNANDES, P.J.; DONNENBERG, M.S. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. **Cell Microbiol.**, v. 5, n. 6, p. 359–372, 2003.

NOWICKI, B. et al. The Dr hemagglutinin, afimbrial adhesins AFA-I and AFA-III, and F1845 fimbriae of uropathogenic and diarrhea-associated *Escherichia coli* belong to a family of hemagglutinins with Dr receptor recognition. **Infect. Immun.**, v. 58, n. 1, p. 279–281, 1990.

NOWROUZIAN, F.L. et al. Effect of human milk on type 1 and P-fimbrial mRNA expression in intestinal *Escherichia coli* strains. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 40, n. 1, p. 74–80, 2005.

O'BRIEN, A.D. et al. Production of *Shigella dysenteriae* type 1 -like cytotoxin by *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.**, v. 146, p. 763-769, 1982.

O'BRIEN, A. D. et al. *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga) like cytotoxin. **Lancet.**, v. 26, n. 1, p. 702, 1983.

O'BRIEN, A. D.; LA VECK, G. D. Purification and characterization of a *Shigella dysenteriae* 1-like toxin produced by *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 40, p. 675–683, 1983.

OLSÉN, A.; JONSSON, A.; NORMARK, S. Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. **Nature**, v. 338, n. 6217, p. 652 – 655, 1989.

PALMER, C. et al. Development of the human infant intestinal microbiota. **PLoS Biol.**, v. 5, n. 7, p. e177, 2007.

PATON, J. C.; PATON, A. W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, p.450–479.1998.

PELAYO, J.S. et al. Virulence properties of atypical EPEC strains. **J. Med. Microbiol.**, v. 48, n. 1, p. 41–49, 1999.

PERNA, N.T. et al. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Nature**, v. 409, n. 6819, p. 529–533, 2001.

PIVA, I.C., et al. Virulence markers of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from children and adults with diarrhea in Brasília, Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 5, p. 1827–1832, 2003.

POUTTU, R. et al. matB, a common fimbriin gene of *Escherichia coli*, expressed in a genetically conserved, virulent clonal group. **J. Bacteriol.**, v.183, n. 16, p. 4727–4736, 2001.

PROFT, T.; BAKER, E.N. Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria - structure, assembly and their role in disease. **Cell Mol. Life. Sci.**, v. 66, n. 4, p. 613–635, 2009.

QADRI, F. et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 18, n. 3, p. 465–483, 2005.

REMAUT, H. et al. Fiber formation across the bacterial outer membrane by the chaperone/usher pathway. **Cell**, v. 133, p. 640–652, 2008.

RENDÓN, M.A. et al. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 104, p. 10637–10642, 2007.

RILEY, L. W. et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **N. Engl. J. Med.**, v. 308, p. 681–685, 1983.

RILEY, L. W. The epidemiologic, clinical, and microbiological features of hemorrhagic colitis. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 41, p. 383–407, 1987.

RODRIGUES, J. et al. Clonal structure and virulence factors in strains of *Escherichia coli* of the classic serogroup O55. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 2680–2686, 1996.

ROSSEZ, Y. et al. *Escherichia coli* common pilus (ECP) targets arabinosyl residues in plant cell walls to mediate adhesion to fresh produce plants. **J. Biol. Chem.**, v. 289, n. 49, p. 34349–34365, 2014.

SAHL, J.W. et al. A comparative genomic analysis of diverse clonal types of enterotoxigenic *Escherichia coli* reveals pathovar-specific conservation. **Infect. Immun.**, v. 79, n. 2, p. 950–960, 2011.

SALDAÑA, Z. et al. Synergistic role of curli and cellulose in cell adherence and biofilm formation of attaching and effacing *Escherichia coli* and identification of Fis as a negative regulator of curli. **Environ. Microbiol.**, v. 11, p. 992–1006, 2009.

SAMPAIO, S.C.F., et al. Analysis of the Virulence of an Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Strain In Vitro and In Vivo and the Influence of Type Three Secretion System. **BioMed. Research International.**, v. 2014, p.9, 2014.

SAUER, F.G. et al. Structural basis of chaperone function and pilus biogenesis. **Science**, v. 285, p. 1058–1061, 1999

SAUER, F.G. et al. Chaperone priming of pilus subunits facilitates a topological transition that drives fiber formation. **Cell**, v. 111, p. 543–551, 2002.

SCALETISKY, I. C.; SILVA, M. L.; TRABULSI, L. R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infect. Immun.**, v. 45, n. 2, p. 534–536, 1984.

SCALETISKY, I.C. et al. 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, n. 7, p. 3410–3415, 1999.

SCALETISKY, I.C. et al. Adherence factors in atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains expressing the localized adherence-like pattern in HEp-2 cells. **J. Clin. Microbiol.**, v. 48, n. 1, p. 302–306, 2010.

SCHERER, W.F.; SYVERTON, J.T.; GEY, G.O. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. **J Exp. Med.**, v. 97, n. 5, p. 695–710, 1953.

SCHILLING, J.D.; MULVEY, M.A.; HULTGREN, S.J. Structure and function of *Escherichia coli* type 1 pili: new insight into the pathogenesis of urinary tract infections. **J. Infect. Dis.**, v. 183, p. S36-40, 2001.Suppl. 1.

SERVIN, A.L. Pathogenesis of Afa/Dr Diffusely Adhering *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 18, p. 264–292, 2005.

TOBE, T.; SASAKAWA, C. Role of bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli* in host cell adherence and in microcolony development. **CellMicrobiol.**, v. 3, n. 9, p. 579–585, 2001.

TORRES, A.G. et al. Identification and characterization of *lpfABCC'DE*, a fimbrial operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 5416–5427, 2002.

TORRES, A.G. et al. Genes related to long polar fimbriae of pathogenic *Escherichia coli* strains as reliable markers to identify virulent isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 47, n. 8, p. 2442–2451, 2009.

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

TURNER, S.M. et al. Phylogenetic comparisons reveal multiple acquisitions of the toxin genes by enterotoxigenic *Escherichia coli* strains of different evolutionary lineages. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, p. 4528–4536, 2006.

UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND (UNICEF). **Pneumonia and diarrhoea: tackling the deadliest diseases for the world's poorest children.** 77 p New York: UNICEF, 2012.

VAN DER VELDEN, A.W. et al. Multiple fimbrial adhesins are required for full virulence of *Salmonella typhimurium* in mice. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 2803–2808, 1998.

VASCONCELLOS, F. M. **Estudo do Padrão de adesão agregativa de *Escherichia coli* do sorotipo O142:H34.** Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

VIEIRA, M.A.M., et al. 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.

WAKSMAN, G.; HULTGREN, S.J. Structural biology of the chaperone–usher pathway of pilus biogenesis. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 7, n. 11, p. 765–774, 2009.

WEINTRAUB, A. Enteroaggregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. **J. Med. Microbiol.**, v. 56, n. 1, p. 4–8, 2007.

WEISS-MUSZKAT, M. et al. Biofilm formation by and multicellular behavior of *Escherichia coli* O55:H7, an atypical enteropathogenic strain. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 76, p. 1545–1554, 2010.

WELCH, R.A. et al. Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.99, n. 26, p. 17020–17024, 2002.

WILSON, R.K. et al. Role of EscF, a putative needle complex protein, in the type III protein translocation system of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Cell Microbiol.**, v.3, p. 753–762, 2001.

WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANIZATION (WGO). Diarreia aguda em adultos e crianças: uma perspectiva mundial. **Global guidelines and cascade.**, p. 25, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Children: reducing mortality. **Fact Sheet**, n. 178, Set. 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs178/en/index.html>> Acesso em: 09 Set. 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Diarrhoeal disease the world health.** n. 330, Abr. 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/index.html>> Acesso em: 09 Set. 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO); UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND. **Diarrhoea**: why children are still dying and what can be done. New York: WHO Press, 2009.68 p.

ZAVIALOV, A.V., et al. Structure and biogenesis of the capsular F1 antigen from *Yersinia pestis*: preserved folding energy drives fiber formation. **Cell**, v. 113, p. 587–596, 2003.

ZAV'YALOV, V. et al. Adhesive organelles of Gram-negative pathogens assembled with the classical chaperone/ushe machinery: structure and function from a clinical standpoint. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 34, p. 317–378, 2010.