KEYDE CRISTINA MARTINS DE MELO

**Interação de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)
atípica com fagócito profissional**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Rita de Cássia Ruiz

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo
2015

RESUMO

MELO, K. C. M. **Interação de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) atípica com fagócito profissional**. 2015. 163 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Escherichia coli enteropatogênica atípica (EPECa), importante causador da diarreia em crianças e adultos, apresenta alta heterogeneidade de fatores de virulência o que pode justificar o seu crescente encontro nos estudos epidemiológicos. O aumento dos casos de diarreia causados por EPECa evoca a sua capacidade de adaptação e patogenicidade, não havendo registros sobre a ação em fagócitos profissionais. O objetivo deste estudo foi investigar o comportamento de EPECa na interação com macrófagos. Dois aspectos desta interação foram estudados: a fagocitose e a antifagocitose. O estudo da fagocitose foi realizado com as cepas LB7 (O55:H7), LB13 (O111:abH9) e BA487 (O55:H7). Ensaio de fagocitose com J774A1 possibilitaram analisar a sobrevivência bacteriana intracelular, a produção dos mediadores imunes, a localização intracelular e o papel de alguns receptores. EPECa sobrevive dentro de J774A1. A produção de óxido nítrico (NO) difere entre as cepas. LB7 e BA487 induziram NO enquanto a LB13, menos fagocitada, não induziu, muito provavelmente por utilizar a via da arginase. A sobrevivência de EPECa em J774A1 pode ser também devido ao impedimento da maturação dos vacúolos parasitóforos, visto que, nem Rab5 nem Rab7, marcadores de vacúolos recente e tardio respectivamente, não colocalizaram nos vacúolos contendo as bactérias. O receptor Fc γ não está envolvido na fagocitose de EPECa. Não houve aumento da fagocitose de bactérias opsonizadas, tampouco houve a redução da fagocitose quando o receptor Fc γ foi bloqueado. A análise do envolvimento do TLR4 foi realizada em C3H/HeJ, mutante espontâneo do gene *tlr4*. LB7 e BA487 apresentaram uma pequena redução na sobrevivência, após 24h de infecção. No entanto, não houve sobrevivência de nenhuma das cepas de EPECa em C57BL/6, que apresentam TLR4, após 24h de infecção. EPECa não induz a produção de NO em C3H/HeJ e C57BL/6, apenas níveis elevados de TNF α foram detectados. A sobrevivência intra-macrofágica é dependente da origem do macrófago. Diferentemente de C57BL/6, EPECa sobrevive em J774A1. A sobrevivência ocorre mesmo em presença de NO e, aparentemente, há interferência na maturação do vacúolo, o que poderia impedir a fusão dos lisossomos, justificando a sobrevivência. No estudo da antifagocitose a proposta foi avançar na caracterização do fator antifagocítico (Fa), secretado pela LB7, já descrito pelo grupo. Os resultados mostraram que a natureza do Fa é peptídica e que a ação antifagocítica não é específica, já que macrófagos pré-incubados com Fa inibiram a fagocitose de *Shigella flexneri* e partículas de látex. Fa é secretado tanto à 20°C como a 37°C. A secreção do Fa em TSB impediu a sua identificação, por isso a secreção em meios definidos como M9, M9 suplementado, DMEM e DMEM sem fenol foram avaliadas. O Fa foi detectado no fracionamento por SPE do sobrenadante do cultivo, em todos os meios testados. No entanto, a secreção em M9 foi baixa, o que impossibilitou a sua detecção por HPLC. Por outro lado, as frações obtidas por HPLC a partir dos meios DMEM mostraram-se citotóxicas impossibilitando o avanço na identificação. Para a identificação do Fa novos meios de cultivo deverão ser estudados.

Palavras-chave: EPEC atípica. Macrófago. Fagocitose. Antifagocitose. Óxido nítrico. Rab5. Rab7

ABSTRACT

MELO, K. C. M. **Interaction atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with professional phagocytes.** 2015. 163 p. Ph. D. thesis (Doctorate in Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Atypical enteropathogenic *Escherichia coli*, an important cause of diarrhea in both children and adults is highly heterogenic regarding its virulence factors, which may explain its increasing findings in epidemiologic studies. The increase in the numbers of diarrhea cases caused by aEPEC denotes its adaptability and pathogenicity, though no reports exist regarding its actions on professional phagocytes. The objective of this study was to investigate the behavior of aEPEC during interaction with macrophages. The study of phagocytosis was performed with the strains LB7 (O55:H7), LB13 (O111:abH9) and BA487 (O55:H7). Phagocytosis assays with J774A1 enabled the analysis of intracellular bacterial survival, the production of immune mediators, intracellular location and the role of some surface receptors. aEPEC survives inside J774A1. The induction of nitric oxide (NO) production differs between strains. LB7 and BA487 induced NO, while LB13, which is less phagocytosed, did not, probably because it uses the arginase pathway. Survival of aEPEC within J774A1 may result from the prevention of the maturation of parasitophorous vacuoles, as neither Rab5 nor Rab7, which are markers of early and late vacuoles, respectively, are not detected in vacuoles containing bacteria. Fc γ receptor is not involved in the phagocytosis of aEPEC. Phagocytosis of opsonized bacteria did not increase, nor did phagocytosis decrease when Fc γ receptor was blocked. The analysis of the participation of TLR4 was performed using primary culture C3H/HeJ, a spontaneous mutant for the gene *tlr4*. Survival of LB7 and BA487 slightly decreased after 24h of infection. However, there was no survival of any of the strains EPECa in C57BL/6, which present TLR4, after 24h of infection. aEPEC do not induce NO in C3H/HeJ and C57BL/6, only elevated levels of TNF α were detected. Survival within macrophages depends on the origin of the macrophage. As opposed to C57BL/6, aEPEC survives in J774A1, even in the presence of NO and appears to interfere with vacuole maturation, which might prevent lysosome fusion, explain survival of the bacteria. In the study of anti-phagocytosis, our goal was to advance in the characterization of the anti-phagocytic factor (AF) secreted by LB7 and previously described by our group. The results show that AF is of a peptidic nature and that its anti-phagocytic activity is not specific, since, after pre-incubation with the macrophages, it inhibited phagocytosis of *Shigella flexneri* and of latex particles. AF is secreted at 20°C as well as at 37°C. Due to the complexity of the TSB medium, AF could not be identified. For that reason, its secretion was evaluated in defined media, such as M9, supplemented M9, DMEM and DMEM without phenol. AF was detected after fractionation through SPE of the culture supernatants, in all tested media. However, secretion in M9 was low, which prevented detection and isolation by HPLC. On the other hand, HPLC fractions from DMEM media were cytotoxic, hindering isolation and identification of AF. For the identification of AF, new culture media will be studied.

Key words: atypical EPEC. Macrophage. Phagocytosis. Anti-phagocytosis. Nitric Oxide. Rab5. Rab7.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Impacto da diarreia infantil

A diarreia infantil é um dos maiores problemas de saúde pública acarretando um enorme impacto econômico nos países em desenvolvimento. A diarreia aguda e pneumonia são as doenças que mais matam crianças em todo o mundo, sendo as responsáveis por aproximadamente 30% de todas as mortes infantis (LIU et al., 2012; WALKER et al., 2013). Uma em cada cinco mortes de crianças, cerca de 1,5 milhões a cada ano ocorre devido à diarreia, sendo que crianças menores de 5 anos são as maiores vítimas (Figura 1) (CROXEN et al., 2013; UNICEF, 2012).

A presença de saneamento básico e água potável são importantes metas para a obtenção do controle da diarreia. Segundo a UNICEF (2012), 783 milhões de pessoas ainda não usam a melhor fonte de água potável e 2,5 bilhões não possuem um serviço de saneamento adequado, principalmente famílias mais pobres e em áreas rurais (UNICEF, 2012).

Figura 1– Mortalidade Global de diarreia em crianças abaixo de 5 anos em 2010.

Fonte: Croxen et al., 2013.

Embora esteja bem estabelecido que o saneamento básico e a distribuição de água potável possam reduzir significativamente os casos de diarreia, estudos epidemiológicos demonstraram que cerca de 90% das mortes por diarreia no mundo têm sido atribuídos à água não potável, saneamento inadequado e falta de higiene (UNICEF, 2012). O alto custo na implantação de sistemas de saneamento tem dificultado a melhoria significativa da saúde nos países em desenvolvimento. A alta circulação de patógenos entéricos e o impacto universal à saúde pública decorrente da diarreia tem impulsionado o avanço no entendimento da patogenia causada por microrganismos potencialmente diarreiogênicos.

Há diferentes agentes etiológicos responsáveis por causar a diarreia, entre estes encontram-se vírus, parasitas e bactérias (HODGES; GILL, 2010). Um importante grupo de bactérias causadoras da diarreia é *Escherichia coli* diarreiogênica.

1.2 *Escherichia coli* diarreiogênica (DEC)

E. coli coloniza tipicamente o trato gastrointestinal humano infantil a partir de poucas horas após o nascimento. Normalmente, *E. coli* faz parte da microbiota e por isso encontra-se em equilíbrio no hospedeiro (KAPER; NATARO; MOBLEY et al., 2004; NATARO; KAPER, 1998). As cepas ditas comensais raramente causam doenças, exceto no caso de indivíduos imunocomprometidos ou com dano na barreira gastrointestinal (KAPER; NATARO; MOBLEY et al., 2004; NATARO; KAPER, 1998).

Há várias cepas de *E. coli* altamente adaptadas que são resultantes da aquisição de atributos de virulência específicos, os quais tem conferido o aumento na capacidade de adaptação a novos nichos. Estes fatores de virulência são frequentemente codificados por elementos genéticos que podem ser mobilizados para dentro de diferentes cepas criando novas combinações (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Somente uma combinação de fatores de virulência bem sucedida tem garantido a *E. coli* a capacidade de causar doenças em indivíduos saudáveis.

E. coli diarreiogênicas (DEC) associam-se às gastroenterites e são classificadas em seis patótipos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC); *E. coli* produtora da toxina de Shiga (Stx) (STEC); *E. coli* enteroagregativa (EAEC); *E. coli* enterotoxigênica (ETEC); *E. coli* enteroinvasora (EIEC) e *E. coli* que apresentam

padrão de adesão difusa às células epiteliais (DAEC). Cada patótipo é determinado de acordo com o mecanismo de patogenicidade, a síndrome clínica, as características epidemiológicas e/ou fenótipo de adesão a linhagens celulares (NATARO; KAPER, 1998).

Dois novos patótipos tem recentemente emergido, *E. coli* aderente invasora (AIEC) que está associada a doença de Crohn e não causa infecções diarreio gênicas e *E. coli* enteroagregativa produtora da toxina de Shiga (Stx) (STEAEC) responsável pelo surto de *E. coli* na Alemanha em 2011 (CLEMENTS et al., 2012).

Em um mesmo patótipo pode haver cepas com diferentes perfis de virulência, sendo assim, STEC apresenta uma subcategoria conhecida como *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) enquanto EAEC e EPEC foram subdivididas em típicas e atípicas (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

1.2.1 EPEC

EPEC foi o primeiro patótipo a ser identificado e atualmente está entre as bactérias melhor estudadas devido ao sequenciamento genômico da cepa protótipo E2348/69 (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

O mecanismo central da patogenia da EPEC é a capacidade de induzir a lesão histopatológica, conhecida como lesão A/E (*attaching and effacing*) nas células epiteliais intestinais (WONG et al., 2011). A formação da lesão A/E é caracterizada pelo apagamento das microvilosidades, aderência íntima da bactéria ao epitélio intestinal, polimerização da actina e outros componentes do citoesqueleto, logo abaixo do sítio de ligação da bactéria, resultando na formação de uma estrutura em forma de pedestal (Figura 2) (FRANKEL et al., 1998; MOON et al., 1983; WONG et al., 2011).

As alterações nos enterócitos resultam na redução da capacidade de absorção da mucosa intestinal, o que desencadeia a interrupção do balanço eletrolítico nas células epiteliais do intestino, levando à diarreia. Outros patógenos capazes de induzir a lesão A/E são EHEC, *E. coli* diarreio gênicas de coelho (RDEC), *Citrobacter rodentium* e *Escherichia albertii*, um patógeno associado a diarreia humana (CROXEN; FINLAY, 2010; FRANKEL et al., 1998).

Os determinantes genéticos importantes na produção da lesão A/E estão localizados em uma ilha de patogenicidade, denominada LEE (*Locus of enterocyte effacement*) (Figura 2) (McDANIEL et al., 1995). A região LEE foi primeiramente descrita em EPEC, porém está presente em todos os patógenos capazes de induzir a lesão A/E (FRANKEL et al., 1998).

A região LEE de EPEC contém 5 operons que foram denominados LEE 1, LEE 2, LEE 3, LEE 4 e LEE 5 (Figura 2). Esta região é altamente regulada, os operons LEE 1, LEE 2 e LEE 3 apresentam os genes que codificam os componentes do Sistema de Secreção Tipo III (SST3) (genes *esc* e *sep*) (ELLIOTT et al., 2000), LEE 4 codifica as proteínas secretadas Esp (*EPEC secreted protein*) como EspA, EspB, EspD, EspF entre outras (ELLIOTT et al., 1998) e a LEE 5 codifica as proteínas intimina e a proteína Tir (*Translocated intimin receptor*) (SÁNCHEZ-SANMARTÍN et al., 2001). A Intimina está localizada na membrana externa da bactéria e é a responsável pela adesão íntima da bactéria à célula hospedeira cujo receptor é a proteína Tir (DONNENBERG; YU; KAPER, 1993; JERSE; KAPER, 1991). Há várias moléculas efetoras codificadas na região LEE, no entanto, há também outras não codificadas nesta região (Nle), muitas destas, ainda com função desconhecidas (CROXEN; FINLAY, 2010).

Figura 2- Distinta lesão histopatológica induzida por patógenos *attaching and effacing* (A/E). (A) Microscopia eletrônica de indução de pedestais induzido por bactérias aderentes. (B) Microscopia eletrônica de transmissão mostrando lesão intestinal A/E. (C) Diagrama ilustrando a organização genética da região LEE de EPEC (cepa E2348/69).
Fonte: Modificado de Wong et al. (2011).

Em EPEC o SST3 é composto por cerca de 20 proteínas diferentes (Figura 3), incluindo as proteínas efetoras, regulatórias, estruturais e as chaperoninas (BLATTNER; BONAS, 2002; HUECK, 1998). Para as proteínas efetoras alcançarem o citoplasma da célula hospedeira, há a formação de uma estrutura complexa denominada translocon, que se estende desde a membrana interna até a membrana externa da bactéria (GARMENDIA; FRANKEL; CREPIN, 2005). O canal transmembrânico que liga a bactéria à célula ocorre pela extensão da proteína EspA por onde passam as proteínas EspB e EspD, responsáveis por formar o poro na membrana do enterócito (Figura 3) (HARTLAND et al., 2000; KENNY et al., 1997; KNUTTON et al., 1998).

Figura 3- Esquema representando o Sistema de Secreção do Tipo 3 (SST3) de EPEC.

Fonte: Modificado de Garmendia, Frankel e Crepin (2005).

Após a formação completa deste aparato, a bactéria injeta para dentro da célula hospedeira várias proteínas efetoras, entre elas, a proteína Tir que é inserida na membrana do enterócito e atua como receptor para intimina, garantindo a adesão íntima da bactéria à célula hospedeira (KENNY et al., 1997). Em seguida, Tir é fosforilado por várias tirosinas quinases do hospedeiro dando início a polimerização da actina e formação do pedestal (CAMPELLONE et al., 2002; KENNY et al., 1999). A fosforilação de Tir recruta a proteína adaptadora Nck do hospedeiro para o sítio da ligação, a qual ativa a proteína neuronal da síndrome Wiskott-Aldrich (N-WASP) e o complexo de proteína relacionado à actina 2/3 (ARP 2/3), ambos responsáveis por mediar o rearranjo de actina e formação do pedestal (KALMAN et al., 1999).

Além de Tir, mais 6 proteínas efetoras são codificadas por LEE (EspB, EspF, Map, EspH, EspG e EspZ). EspB além de se associar à EspD para formar o poro na

membrana da célula (FRANKEL et al., 1998), também é secretada para o interior da célula, participando do rearranjo do citoesqueleto, polimerização da actina e consequentemente da formação do pedestal (TAYLOR; LUTHER; DONNENBERG, 1999). Além disso, EspB também se associa a outras proteínas do hospedeiro como a miosina que se liga a actina-F (IIZUMI et al., 2007).

EspF é um efector multifuncional, com funções em vários processos celulares, incluindo destruição das barreiras epiteliais, antifagocitose, apagamento das microvilosidades, remodelamento da membrana do hospedeiro, modulação do citoesqueleto, rompimento dos filamentos intermediários, invasão celular, disfunção mitocondrial, apoptose e inibição de uma série de transportadores epiteliais (NAVARRO-GARCIA et al., 2013). EspF e EspG afetam a localização da aquaporina, conduzindo à diarreia (GUTTMAN et al., 2006). Além disso, EspG é responsável por alterar componentes do citoesqueleto do hospedeiro através de sua interação com tubulina (HARDWIDGE et al., 2005).

A proteína Map (*mitochondrion-associated protein*) primeira proteína efetora descrita em EPEC é responsável por alterar a morfologia e o potencial de membrana mitocondrial (KENNY; JEPSON, 2000; NAVARRO-GARCIA et al., 2013). No estágio inicial da infecção, Map parece ser a responsável pela formação de um filopódio no local da interação (KENNY et al., 2002). Além disso, a proteína Map também é capaz de desestabilizar a barreira intestinal, por alterar a permeabilidade das junções oclusivas, porém, através de um mecanismo independente de EspF (DEAN; KENNY, 2004).

EspZ promove a sobrevivência celular do hospedeiro (SHAMES et al., 2010) enquanto EspH reprime a formação de filapódios aumentando a formação dos pedestais de actina. Além disso, EspH induz a desmontagem das adesões focais, concomitantemente com a destruição de actina (WONG et al., 2012).

Outros efetores não codificados pela região LEE também são translocados pelo SST3, como por exemplo, a proteína NleA é necessária para a destruição das junções oclusivas intestinais por EPEC, em adição a EspF e Map (THANABALASURIAR et al., 2010). EspJ inibe a fagocitose de células do sangue opsonizadas (MARCHÈS et al., 2008) enquanto o fator de inibição do ciclo celular (Cif) é uma ciclomodulina que previne progressão do ciclo e induz a apoptose (CROXEN; FINLAY, 2010; SAMBA-LOUAKA et al., 2009).

Outros mecanismos de virulência não secretados pelo SST3 também foram descritos, EPEC codifica várias adesinas fimbriais (pili). O plasmídeo EAF (EPEC adherence factor) (pEAF) codifica a fímbria BFP (Bundle forming pilus), responsável pela formação de microcolônias promovendo a interação bactéria/bactéria, tipicamente observada no padrão de adesão bacteriano, conhecido como adesão localizada (SCALETISKY; SILVA; TRABULSI, 1984).

A fímbria Tipo I que apresenta grande afinidade a oligossacarídeos do tipo manose é outro exemplo de adesina fimbrial, encontrada em *E. coli* uropatogênica (UPEC) e família de Enterobacteriaceae (KROGFELT et al., 1990). Essas fímbricas constituem-se de um filamento proteico de aproximadamente 5 nm de espessura e 1 a 2 µm de comprimento, sendo codificada pelo operon *fim*, o qual é composto pelos genes: *fimA*, *fimB*, *fimC*, *fimD*, *fimE*, *fimF*, *fimG*, *fimH* e *fimI* (MOL; OUDEGA, 1996), responsáveis pela sua expressão e montagem via chaperonina-usher (HULTGREN et al., 1991). FimA corresponde a maior subunidade fimbrial enquanto FimH corresponde à subunidade menor da fímbria, presente na extremidade da estrutura fimbrial e responsável pela sua aderência (KROGFELT et al., 1990).

Atualmente EPEC encontra-se dividida em duas subcategorias denominadas EPEC típica (EPECt) e EPEC atípica (EPECa). Basicamente todas as informações até aqui descritas foram obtidas no estudo da cepa E2348/69, considerada a amostra protótipo de EPECt. No entanto, o estabelecimento do SST3 e a lesão A/E são também comuns à EPECa.

1.2.1.1 EPEC atípica (EPECa)

O termo EPECa foi criado em 1995 para diferenciar das EPECt as cepas que não apresentavam pEAF, o qual codifica a fímbria BFP, e que não produziam a toxina de Shiga (Stx), o que as diferenciavam das EHEC (KAPER, 1996).

No entanto, outras diferenças relacionadas aos fatores de virulência têm sido demonstradas. Em estudos com moléculas efetoras não codificadas pela região LEE mostraram que, em EPECa, a frequência destas moléculas é escassa (AFSET et al., 2006; HERNANDES et al., 2009).

Por outro lado, EPECa são altamente heterogêneas quanto a presença de fatores de virulência e, embora apresente também a região LEE, pode expressar fatores de virulência adicionais (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002). Esta

heterogeneidade pode ser comprovada pelo fato de haver cepas de EPECa que expressam fatores de virulência classicamente descritos em outros patótipos, como por exemplo, a expressão da toxina EAST-1 (toxina termo-estável de EAEC) (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002; VIEIRA et al., 2001); a expressão de enterohemolisinas E-hly (EHEC *hemolysin*) (CAMPOS et al., 1994; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002); a expressão da toxina Pet (*plasmid-encoded toxin* de EAEC) (RUIZ et al., 2014) e a identificação de genes que codificam as toxinas Pic (*protein intestinal colonization* de EAEC), Sat (*secreted autotransporter toxin* de DAEC), EspC (autotransportadora de EPEC) e EspP (autotransportadora de EHEC) (ABREU et al., 2013; ELIAS et al., 2008).

Os sorotipos de EPECa podem ou não pertencer aos chamados sorogrupos (O) clássicos de EPEC (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002). Quando apresentam o mesmo sorogrupo (tipagem do antígeno somático O, que corresponde a porção polissacarídica do LPS), elas se diferem dos sorotipos (O:H) de EPECT, basicamente pelos antígenos H que correspondem as proteínas flagelares (KAPER et al., 2004).

Com relação ao padrão de aderência bactéria – célula epitelial (HEp-2 e HeLa) a EPECa também se comporta de maneira diferente da EPECT. EPECT é conhecida por produzir um padrão de aderência característico, denominado adesão localizada (AL) após 3 h de contato com a célula (SCALETISKY et al., 1984). Este padrão é caracterizado pela adesão bacteriana em áreas localizadas na superfície da célula, formando microcolônias compactas, atribuída à presença da fímbria BFP (GIRÓN; HO; SCHOOLNIK, 1991).

No caso da EPECa os padrões de adesão só são observados após 6 h de contato com as células epiteliais (DULGUER et al., 2003; PELAYO et al., 1999; SCALETISKY et al., 1999; VIEIRA et al., 2001). Embora não apresente BFP, EPECa pode também apresentar o padrão AL (HERNANDES et al., 2006). Além desse, EPECa pode apresentar também os padrões: i) de adesão localizada *like* (ALL), caracterizado pela presença de bactérias também em áreas localizadas, porém dispostas de maneira frouxa; ii) padrão de adesão difusa (AD), onde as bactérias aderem-se de maneira uniforme em toda superfície da célula característico de DAEC; iii) padrão de adesão agregativa (AA), onde as bactérias encontram-se empilhadas na superfície celular ou na lamínula característico de EAEC (ABE et al., 2009; DULGUER et al., 2003; NATARO; KAPER, 1998; NUNES et al., 2003; PELAYO et al., 1999; SCALETISKY et al., 1999; VIEIRA et al., 2001). Além disso,

foram também detectadas cepas de EPECa que apresentam um padrão de adesão indefinido ou até cepas que não se aderem às células, estas, denominadas não aderentes (NA) (ABE et al., 2009).

Na década de 1990, EPECt era o patógeno mais prevalente associado a casos de diarreia em crianças de até 2 anos de idade (NATARO; KAPER, 1998). Nos últimos anos, diferentes estudos epidemiológicos demonstraram uma significativa diminuição da prevalência de EPECt (CHEN; FRANKEL, 2005; OCHOA et al., 2008; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002), juntamente com uma maior prevalência de sorotipos de EPECa (ARAUJO et al., 2007; BUERIS et al., 2007; FRANZOLIN et al., 2005; HERNANDES et al., 2009; MORENO et al., 2010; ORLANDI et al., 2006; SCALETISKY et al., 2009). No entanto, estes dados devem ser analisados com cuidado, já que no início da década de 90, a diferenciação de EPECt e EPECa não estava estabelecida (KAPER, 1996).

Alguns estudos têm demonstrado que EPECa pode estar associada à diarreia aguda infantil (ARAUJO et al., 2007; FRANZOLIN et al., 2005; SCALETISKY et al., 1999) ou à diarreia persistente (AFSET et al., 2004; NGUYEN et al., 2006), podendo ser encontrada também em pacientes adultos e em pacientes imunocomprometidos pelo HIV (GASSAMA-SOW et al., 2004; GOMES et al., 2004).

O estudo e identificação de fatores de virulência de EPECa é um importante aspecto para o entendimento da interação patógeno-hospedeiro, porém, até o momento, nenhum fator de virulência exclusivo para EPECa foi identificado. Estudos tem demonstrado que EPECa apresenta fatores de virulência, muitas vezes, mais semelhantes à EHEC, responsável por causar uma diarreia potencialmente mais grave, do que com a própria EPECt (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002) o que reforça a alta heterogeneidade deste grupo de bactérias (ABE et al., 2009; ABREU et al., 2013; GOMES et al., 2004; VIEIRA et al., 2001).

1.3 A translocação de bactérias intestinais

O epitélio intestinal é conhecido por ser impermeável a macromoléculas e microrganismos, exceto pelas Placas de Peyer's onde o folículo associado ao epitélio (FAE) contém células especializadas, conhecidas como células M (KERNÉIS et al., 1997). Estas células são as grandes responsáveis pela translocação de microrganismos e antígenos presentes no lúmen intestinal para o sitio basolateral do

epitélio, onde são entregues aos macrófagos subjacentes, células dendríticas e linfócitos B e T CD4 (HASE et al., 2009; SANSONETTI, 2004).

A translocação de antígenos e microrganismos pelas células M é um passo essencial para o desenvolvimento da resposta imune da mucosa e da patologia de muitas doenças infecciosas (KERNÉIS et al., 1997). Enquanto estas células estão envolvidas primariamente na amostragem de antígenos intestinal, muitos patógenos invasores, tais como *Salmonella* entérica sorovar Typhimurium (MARTINEZ-ARGUDO; JEPSON, 2008), *E. coli* enteroaderente de coelho (INMAN; CANTEY, 1983) ou *E. coli* aderente-invasora (AIEC) (CHASSAING et al., 2011; ROBERTS et al., 2010) utilizam a característica de transcitose das células M, como porta de saída do lúmen intestinal (Figura 4).

Figura 4 - Translocação de *Salmonella* através de células M.

Fonte: Modificado de Sansonetti (2004).

Embora EHEC e EPEC sejam classificadas como patógenos extracelulares, dados da literatura evidenciaram que cepas de EHEC, incluindo os sorotipos O157:H7 e não O157:H7 foram capazes de translocar através de células M (ETIENNE-MESMIN et al., 2011). Com relação à EPEC há estudos que demonstraram que esta bactéria pode invadir células epiteliais como Caco-2 e HeLa, via molécula efetora EspT que ativa Rac1 promovendo perturbações na membrana as quais facilitam a invasão da bactéria (BULGIN et al., 2009). A invasão das células epiteliais parece não ser exclusiva de EPECt, visto que cepas de EPECa foram demonstradas ser capazes de invadir também as células HeLa e Caco-2 (HERNANDES et al., 2008; PACHECO et al., 2014).

Cada vez mais patógenos bacterianos têm sido descritos com capacidade de translocar através de células M, porém, o destino após a translocação varia de acordo com o patógeno e suas estratégias de evasão da ação das células de defesa. Um bom exemplo é *Salmonella*, esta bactéria sobrevive dentro de macrófagos (Figura 4) e pode se espalhar através do organismo, levando à bacteremia e doenças sistêmicas (MARTINEZ-ARGUDO; JEPSON, 2008).

1.4 Fagocitose

Fagocitose é um processo conservado evolutivamente utilizado pela maioria das células para ingerir microrganismos, células senescentes ou danificadas e antígenos particulados, como poluentes (STOSSEL, 1999). Esta via não constitutiva engloba ligantes com mais de 1 μm e é fundamental no processo de remodelamento de tecido, inflamação e morte de microrganismos patogênicos (ALLEN; ADEREM, 1996).

A partir de 1995, Rabinovitch classificou as células em fagócitos profissionais e não profissionais. Os fagócitos profissionais são células especializadas tais como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, assim denominadas, por apresentarem uma maior diversidade de receptores transmembrânicos e uma maior capacidade microbicida, enquanto os não profissionais incluem diferentes tipos celulares, tais como fibroblastos, células epiteliais e endoteliais que, por apresentarem baixa capacidade microbicida, são altamente exploradas por patógenos intracelulares (RABINOVITCH, 1995).

Da mesma forma que as células dendríticas, os macrófagos também exercem papel duplo na defesa do hospedeiro que se resume na capacidade microbicida, processamento e apresentação de antígenos no contexto do MHC (ADEREM; UNDERHILL, 1999; UNDERHILL; OZINSKY, 2002). No entanto, embora os macrófagos sejam considerados melhores na fagocitose e as células dendríticas sejam mais eficientes na apresentação de antígeno aos linfócitos T, ambas as células são fundamentais na resolução da infecção (GORDON, 2003). Além disso, células dendríticas são consideradas imunoestimuladoras, pois além da apresentação de antígeno estimulam as células T naíve que ainda não entraram em contato com qualquer antígeno. Neste processo de apresentação, as células dendríticas secretam citocinas com efeitos pleiotrópicos (ALLEN; ADEREM, 1996; MARODI, 2006; RABINOVITCH, 1995).

Os macrófagos derivam de monócitos os quais migraram do sangue para os tecidos (ALLEN; ADEREM, 1996). Uma vez ativados, sinais intracelulares importantes na ativação de vias que levam a resolução da infecção são desencadeados.

Em resumo a fagocitose é o processo responsável por direcionar o antígeno, dependendo da sua origem, ao compartimento MHC de classe I ou II, sendo importante não só na imunidade inata, mas também no desencadeamento da imunidade adaptativa (ADEREM; UNDERHILL, 1999).

Várias moléculas sinalizadoras participam do processo de fagocitose dentre as quais podem ser destacadas a fosfatidilinositol-3-quinase (PI3-quinase), a fosfolipase C (PLC), a proteína quinase C (PKC) e as Rho GTPases (reguladores chave do citoesqueleto). As Rho GTPases influenciam sinais de transdução importantes para produção de citocinas e a ativação dos mecanismos de morte celular. Estas moléculas atuam de forma integrada a fim de regular a fagocitose, orquestrando a resposta inflamatória e a morte microbiana (UNDERHILL; OZINSKY, 2002; MA et al; 2003).

A fagocitose de microrganismos patogênicos é resultado da interação do microrganismo com receptores presentes na superfície da célula hospedeira. (JANEWAY, 1992). Esta interação é essencial na proteção do hospedeiro por gerar a eliminação completa do microrganismo ou a restrição da expansão do patógeno, antes mesmo da resposta adaptativa ser acionada.

1.4.1 Receptores fagocíticos

Os receptores descritos para a identificação de patógenos são conhecidos como PRRs (*Pattern Recognition Receptores*), os quais se ligam especificamente aos chamados PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*) que são moléculas conservadas presentes na superfície do microrganismo, por exemplo, os ácidos lipoteicoicos, peptideoglicanas, lipopolissacarídeos (LPS) e flagelina presentes na superfície de bactérias Gram + e Gram - (JANEWAY, 1992).

No entanto, diferentes receptores presentes no fagócito podem ser simultaneamente recrutados. Este reconhecimento pode acontecer tanto pela ligação direta como acontece nos receptores de manose, *scavenger*, TLR (*Toll-like receptor*) como pela ligação indireta a partir do reconhecimento dos receptores Fc γ (Fc γ R) e receptor de complemento (CR), que se ligam a partículas revestidas com as opsoninas IgG, moléculas do complemento ou proteína A (UNDERHILL; OZINSKY, 2002).

O Fc γ R, primeiro a ser caracterizado, reconhece a região Fc das moléculas de IgG e são essenciais na resposta imune dependente de anticorpo (RAVETCH; KINET, 1991). Há dois tipos de classes de Fc γ Rs, aqueles que ativam funções efetoras e aqueles que inibem essas funções. A sinalização é via imunoreceptor com domínios de ativação baseado em tirosina ou domínios inibitórios baseado em tirosina, ITAM e ITIM respectivamente (UNDERHILL; GOODRIDGE, 2007). Os Fc γ R que possuem um domínio ITIM, como Fc γ IIb, exerce um efeito inibitório na fagocitose, enquanto aqueles com um domínio ITAM são estimulatórios. Durante a fagocitose, essas moléculas sinalizadoras iniciam o rearranjo da actina do citoesqueleto, dirigindo o englobamento de partículas (JAUMOUILLE; GRINSTEIN, 2011). A reorganização de filamentos de actina acompanha a extensão de pseudópodos e prolongamentos de membrana, (ADEREM; UNDERHILL, 1999), ativa a queima respiratória (produzindo ROS), produz ácido araquidônico e TNF- α (Fator de *Necrose Tumoral*) (CARON; HALL, 1998).

Os receptores Toll (TRs) foram primeiramente descritos em drosófilas e, posteriormente, foram descritos receptores similares presentes em células de vertebrados, os receptores *Toll-like* (TLRs), os quais estão envolvidos no controle da resposta imune (MESCHER; NEFF, 2005).

A ativação de TLRs presentes em células imunes induz a expressão de vários genes diretamente envolvidos na produção de citocinas inflamatórias em resposta a infecção. Membros da família TLRs são proteínas transmembranas ligadas às vias de transdução de sinal celular (MUZIO et al, 2000; TIPPING, 2006). Vários TLRs estão envolvidos no reconhecimento de uma variedade de PAMPs. O receptor TLR2 juntamente com o receptor TLR6 liga-se às moléculas de peptidoglicano. TLR4 liga-se ao LPS de bactérias gram-negativas, TLR5 reconhece flagelina presente em flagelo bacteriano, TLR3 reconhece a dupla cadeia de RNA viral e TLR9 reconhece sequências CpG não metiladas presentes em DNA bacteriano (AKIRA; TAKEDA; KAISHO, 2001; AKIRA; TAKEDA, 2004).

O receptor TLR4 desempenha um papel importante durante a infecção por bactérias Gram negativas. Durante o reconhecimento, LPS se liga com alta afinidade a uma proteína plasmática, denominada LBP (proteína de ligação ao LPS) (POLTORAK et al., 1998; SHIMAZU et al., 1999). Esta interação facilita a desagregação de LPS e sua apresentação para o CD14 (receptor específico para LPS, mas ineficiente na transdução de sinal). O complexo formado por TLR4/CD14/LBP se liga a uma proteína denominada MD-2, a qual está associada com a porção extracelular de TLR4, garantindo a sua ativação (POLTORAK et al., 1998; SHIMAZU et al., 1999).

LBP pode também ligar ao ácido lipoteicoico, peptidoglicano e lipopeptídeos e transferi-los para CD14, sugerindo que LBP não seja exclusivo de TLR4, mas que também possa auxiliar na função de TLR1, TLR2 e TLR6 (LEE; AVALOS; PLOEGH, 2012).

O TLR4 possui uma porção intracitoplasmática que ativa a transdução de sinais, recrutando várias proteínas intracelulares tais como: MyD88, IRAK e TRAF-6 (BOCHUD; CALANDRA, 2003). Estas vão desencadear a ativação das vias JNK e ERK da cascata das MAPKs (Proteínas quinases ativadas por mitógeno) que estão envolvidas na ativação dos fatores de transcrição AP-1 (ativador protéico-1) e NF- κ B (fator nuclear kappa B), favorecendo a expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória e microbicida (BOCHUD; CALANDRA, 2003).

O NF- κ B, quando ativado em resposta à sinais mediados via TLR4, pode controlar a síntese de citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-1 e IL-12, moléculas de adesão endoteliais e proteínas envolvidas nos mecanismos de morte microbiana,

dentre elas, a regulação da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (HIGGINS et al., 2003).

1.4.2 Ativação dos Macrófagos

A ativação de mecanismos antimicrobianos e a produção de sinais pró-inflamatórios gerados em decorrência da fagocitose é regulada tanto pelos PAMPs como por citocinas.

Desta forma, a ativação dos macrófagos pode acontecer por duas vias, definidas como via clássica e alternativa. A via clássica ou do tipo 1 (M1), se dá na presença de citocinas produzidas por células T CD4+, do subgrupo Th1. Nesta via, os macrófagos são ativados e transformados em células efectoras, com potencial de eliminar patógenos intracelulares, devido a presença de citocinas (IL-2, IL-1) e IFN- γ que pode sinergizar com TNF- α , levando à ativação da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (MAHIDA, 2000; MANTOVANI; SICA; LOCATI, 2007; POLLOCK et al., 2003).

O TNF- α , mediador pró-inflamatório produzido em minutos após o estímulo (BARNES; KARIN, 1997), tem como função estimular o recrutamento de monócitos e neutrófilos para o sítio da infecção e ativar estas células para a eliminação de patógenos (BRITTON et al, 1998). TNF- α sozinho é insuficiente para a ativação da morte microbiana por macrófago, porém estimula a fagocitose por macrófagos e, sinergicamente com IFN- γ , estimula a máxima indução de moléculas microbidas efectoras (KAISER; O'GARRA, 2009).

A outra via de ativação, denominada alternativa ou do tipo 2 (M2), é mediada por citocinas produzidas pelos linfócitos T CD4+ do subgrupo Th2 que incluem IL-4, IL-10 e IL-13. Esta via está mais associada à resposta humoral e atividade anti-inflamatória, estando envolvida no combate a patógenos de natureza extracelular (GORDON, 2003).

Outras subpopulações de células T que podem influenciar a ativação de macrófagos são as células T regulatórias (Treg 1) e Th3 que produzem IL-10 e TGF- β e, assim, regulam negativamente as funções de IFN- γ , podendo inibir parcialmente a produção de espécies reativas de oxigênio e de citocinas pró-inflamatórias.

A presença do fator de transformação e crescimento beta (TGF- β) pode aumentar a atividade da enzima arginase (ARG), produzida pelos macrófagos e, como consequência, reduzir a atividade da iNOS, uma vez que ambas enzimas compartilham o mesmo substrato, L-Arginina, contribuindo desta forma para a regulação do processo inflamatório (BARKSDALE et al., 2004).

O IFN- γ é um dos principais ativadores dos mecanismos microbicidas de macrófagos infectados, já que promove o aumento da produção de óxido nítrico (NO). Esta citocina é produzida, inicialmente, por células do sistema imune inato como células NK e posteriormente por células T CD4+, do tipo Th1, podendo também regular positivamente a produção de outras citocinas, como a IL-1, IL-6, IL-12 e TNF- α (CANTHABOO et al., 2002; MAHON, 1999).

1.4.3 Óxido Nítrico (NO)

Normalmente a fagocitose induz a produção de metabólitos derivados do nitrogênio que são conhecidos como espécies reativas de nitrogênio (RNS) e derivados do oxigênio que são conhecidos como espécies reativas de oxigênio (ROS).

Uma das substâncias derivadas de RNS é o NO, um radical livre envolvido na regulação de vários processos fisiológicos, atuando na modulação dos sistemas cardiovascular, nervoso central, digestório e regulação da resposta imune. NO está envolvido na patogênese e no controle de doenças infecciosas e de tumores, além dos processos autoimunes e de doenças degenerativas. Além disso, sua alta atividade oxidativa contribui para a morte de microrganismos (BECKMAN et al., 1990), caracterizando também um papel antimicrobiano.

Neutrófilos, macrófagos e células epiteliais podem produzir NO em resposta a citocinas ou componentes bacterianos (GOBERT et al.; 2002; LYONS; ORLOFF; CUNNINGHAM, 1992). A molécula de NO é sintetizada a partir da conversão do aminoácido L-Arginina em L-Citrulina por um grupo de isoenzimas denominadas óxido nítrico sintase (NOS). A tetrahidrobiopterina (BH₄) é o principal co-fator para NOS, na sua ausência, esta enzima pode produzir superóxido ao invés de NO (GUZIK et al., 2003). Além deste co-fator, o oxigênio e o fosfato dinucleotídeo adenina nicotinamida (NADPH) também foram descritos como importantes (BOGDAN; ROLLINGHOFF; DIEFENBACH, 2000).

Existem três isoformas de NOS, sendo duas constitutivas (cNOS), a neuronal (NOS1 ou nNOS) e endotelial (NOS3 ou eNOS) e uma isoforma induzida, denominada induzível (NOS2 ou iNOS) (ELLIOTT; WALLACE, 1998).

A eNOS é produzida por células endoteliais, enquanto que a nNOS é sintetizada por neurônios, ambas expressam constitutivamente liberando pequenas quantidades de NO durante um curto período de tempo. Além disso, elas são ativadas e reguladas através das mudanças nas concentrações dos íons de cálcio livre no interior das células, o que é dependente da calmodulina que está envolvida na sinalização celular (FEELISCH; STAMLER, 1996).

Em contrapartida, a isoforma iNOS, cuja transcrição é regulada, propicia a produção elevada de NO durante um período mais prolongado, independente do aumento dos níveis de cálcio intracelular (XIE et al., 1992). Além disso, iNOS é produzida principalmente por macrófagos, em quantidades superiores a cNOS. Entretanto, iNOS não é expressa sob condições normais sendo regulada positivamente ou negativamente pelo contato célula-célula (mediante a adesão e moléculas co-estimulatórias), pelas citocinas IL-1, TNF- α , IFN- γ , pelos produtos microbianos (LPS) e virais, dentre outros. Embora IFN- γ e LPS sejam os ativadores clássicos de iNOS, novos reguladores continuam a serem descobertos. A IL-12 ativa a iNOS em macrófagos, embora seja por um mecanismo mediado por produção autócrina de IFN- γ (BORGAN, 2001; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991).

A alta concentração de NO produzida pela iNOS tem sido associada à injúria, enquanto pequenas quantidades de NO produzida por cNOS tem sido considerada benéfica (BECKMAN et al., 1990; ROTHE; KOLB, 1999; VANT'T HOF; RALSTON, 2001). Uma vez que a ativação da iNOS depende da transcrição gerada por um estímulo externo, essa produção não é tão rápida quanto a via eNOS (horas e segundos) (VANT'T HOF; RALSTON, 2001). A expressão de iNOS requer algumas horas, mas uma vez sintetizada, a sua ação é contínua até que a L-Arginina ou os co-fatores necessários para sua síntese sejam depletados ou que ocorra à morte celular (KAWAMURA et al., 1998).

NO é um gás capaz de percorrer livremente o meio intracelular, através da membrana celular, e entre outras células (KENDAL; MARSHALL; BARTOLD, 2001). Em contraste às citocinas, a interação de NO não é restrita a um único receptor definido, ela pode reagir com outras moléculas inorgânicas (como oxigênio,

superóxidos, ou metais de transição), estruturas de DNA (bases pirimidinas), grupos postéticos (tal como heme) ou proteínas (principalmente para S-nitrosilação de grupos tiol, nitração de resíduos de tirosinas ou ruptura de grupamentos metal- sulfureis como domínios de anéis de zinco ou ferro-sulfur) (MARSHALL; MERCHANT; STAMLER, 2000).

O principal mecanismo de transdução de sinal pelo qual o NO determina seus efeitos fisiológicos é mediado pela sua ação sobre ativação de guanilato ciclase e elevação da concentração de GMPc (guanosina monofosfato cíclico) (BOGDAN; ROLLINGHOFF; DIEFENBACH, 2000). O NO pode induzir reações tóxicas contra outros tecidos do hospedeiro, no caso de doenças autoimunes e situações de sobrecarga exageradas do organismo (ROTHER; KOLB, 1999), como por exemplo, na asma (BARNES; LIEW, 1995). Esta molécula também pode atuar como agente anti-inflamatório ou imunossupressor através de seus efeitos inibitórios ou apoptóticos em células (LI; BILLIAR, 2000; MACIEJEWSKI et al., 1995).

O NO controla uma série patógenos intracelulares como *Leishmania* (INIESTA et al., 2001), *Plasmodium* (CHIWAKATA et al., 2000), *Trypanosoma* (SAEFTEL et al., 2001), alguns vírus (REISS; KOMATSU, 1998) e fungos (LIRK et al., 2002), porém o papel do NO em infecções bacterianas não está totalmente definido.

Os mecanismos potenciais do NO incluem efeito microbicida direto através da reação com grupos do ferro ou do tiolato formando um complexo que inativa as enzimas fundamentais na respiração mitocondrial ou na replicação do DNA. Outros mecanismos desenvolvidos pelo NO é a sua capacidade de reagir com superóxidos formando reativos oxidantes capazes de danificar as células alvo (NATHAN; SHILOH, 2000; TRIPATHI et al., 2007).

Dentre as várias funções descritas para o NO podem ser destacadas os efeitos antiviral, antimicrobiano, imunoestimulador (pró-inflamatório) e imunossupressor (anti-inflamatório), além das ações citotóxicas e citostáticas que promovem a destruição de microrganismos. A citotoxicidade do NO resulta da sua ação direta ou da sua reação com outros compostos liberados durante o processo inflamatório. O NO exerce efeitos variados nas funções desenvolvidas por células leucocitárias, incluindo a indução de apoptose do macrófago, a modulação da adesão do neutrófilo, além da regulação diferenciada na síntese de citocinas pelos leucócitos (BOGDAN, 1997).

1.4.3.1 Detoxificação de NO por bactérias

A importância do NO para imunidade foi demonstrada para diferentes patógenos, incluindo *Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria meningitides*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Pseudomonas aeruginosa* e EHEC, cuja virulência depende de sistemas de desintoxicação e de reparação de NO (DARWIN et al., 2003; KAKISHIMA et al., 2007; KARLINSEY et al., 2012; POIRIER et al., 2008; SHIMIZU et al., 2012; STERN et al., 2012; STEVANIN et al., 2005).

Várias enzimas que estão envolvidas na detoxificação de RNS tem sido identificada, incluindo flavohemoglobinas (POOLE et al., 2000; STEVANIN et al., 2007), NO redutase (GARDNER; GARDNER, 2002), S-nitrosoglutathione redutase (LIU et al., 2001) e peroxinitrito redutase (BRYK; GRIFFIN; NATHAN, 2000). Estas enzimas podem auxiliar na patogênese de alguns microrganismos, como por exemplo, a flavohemoglobina (Hmp) promove a sobrevivência de *Salmonella* em macrófagos produtores de NO (BANG et al., 2006), Hmp e S-nitrosoglutathione são importantes para a virulência também do *Cryptococcus neoformans* (SEYLER; OLSON; MAIER, 2001).

Até o momento foram identificadas três enzimas importantes na detoxificação de NO na infecção por *E. coli*. Em condições aeróbias, a flavohemoglobina (Hmp) detoxifica NO através da oxidação para nitrato (NO_3^-), enquanto em condições anaeróbias Hmp é capaz de reduzir NO para óxido nitroso (N_2O) (CRUZ-RAMOS et al., 2002; GARDNER; GARDNER, 2002). O citocromo c periplasmático nitrito redutase (NrfA), é capaz de reduzir hidroxilamina e NO para amônia, em adição à sua função primária na redução respiratória de nitrito (POOCK et al., 2002; VAN WONDEREN et al., 2008). Tem sido proposto que NrfA pode ser efetivo, no periplasma, na manutenção de baixos níveis de NO, assim qualquer NO que se difunda para o citoplasma pode ser eficazmente removido por flavorubredoxina (NorV), codificada pelo gene *norV* (VAN WONDEREN et al., 2008).

Por outro lado, NorR é um fator de transcrição que é responsivo para NO (D'AUTRE'AUX et al., 2005). Em condições anaeróbias NorR alto regula a flavorubredoxina, NorV, e seu associado oxidoredutase, NorW, apresentam funções para reduzir NO para N_2O (TUCKER et al., 2005). Claramente há várias vias de

detoxificação de NO que habilita *E. coli* persistir na presença de NO em várias condições ambientais (VINE; COLE, 2011).

Hmp é a maior fonte de atividade de detoxificação de NO em procariotos e eucariotos simples como leveduras, devido a ação semelhante a NO dioxigenase (dioxigenação de NO para NO_3^-), denitrosilase (nitroxilação de O_2 para NO_3^-) e NO redutase (redução de NO para N_2O na ausência de O_2). É descrito que a principal atividade de Hmp é de dioxigenação de NO (FORRESTER; FOSTER, 2012). Bactérias podem expressar Hmp tanto em condições aeróbias como anaeróbias, mas a expressão em condições aeróbias é dependente da presença de NO (FORRESTER; FOSTER, 2012).

1.4.4 Arginase

Além da iNOS, os macrófagos expressam também a arginase, enzima descrita como anti-inflamatória, que regula negativamente a síntese de NO. A arginase catalisa a hidrólise de L-Arginina para formar ureia e L-Ornitina (BRONTE; ZANOVELLO, 2005; DAS et al., 2010).

A arginase apresenta duas isoformas, definidas como arginase I e II. A arginase I, também conhecida como arginase do fígado, está localizada no citosol de hepatócitos e é um importante componente no ciclo da ureia. Sua expressão ocorre em células mielóides de camundongos devido a exposição a citocinas Th2 (IL-4 ou IL-13), bem como TGF- β (BOUTARD et al., 1995; MUNDER; EICHMANN; MODOLELL, 1998; MUNDER et al., 1999). Já a arginase II, conhecida como arginase do Rim, está localizada na mitocôndria de vários tipos celulares, incluindo células renais, neurônios, macrófagos e enterócitos. Esta é constitutivamente expressa, a indução de expressão em vários sistemas biológicos está restritamente ligada a autoregulação de transportes de membrana de L-Arginina (MORRIS, 2002; WU; MORRIS; 1998).

L- Ornitina é um precursor para a síntese de L-Glutamina, L-Prolina e poliaminas dependente da via ornitina descarboxilase (ODC). Poliaminas tem múltiplas funções na estabilização de ácidos nucleicos e membranas, bem como regulação do crescimento celular e diferenciação. A produção de poliaminas pela via da arginase regula negativamente a liberação de citocinas pró-inflamatórias (DAS et al., 2010; IGARASHI; KASHIWAGI, 2000).

Tanto o LPS como as citocinas pró-inflamatórias tais como IFN- γ e IL-12 regulam positivamente a produção de NO através da ativação da iNOS e suprimem a expressão da arginase. Entretanto, citocinas anti-inflamatórias podem induzir a produção de arginase suprimindo a iNOS, o que consequentemente leva a redução de NO (MUNDER et al., 1999).

A depleção de L-Arginina pela ativação da iNOS pode inibir o crescimento do microrganismo levando-os à morte, enquanto a depleção do substrato devido a produção de arginase pelos macrófagos pode garantir a sobrevivência do patógeno. *Leishmania* é um exemplo de parasita que subverte a resposta de NO. Recentemente sugeriu-se que a N-hidroxi-L-Arginina, um intermediário da reação L-Arginina-iNOS-NO, contribuiu para a morte intracelular de *Leishmania*, de forma independente de NO, bloqueando a atividade da arginase dentro do parasita e/ou do macrófago (BOGDAN, 2001).

1.4.5 Espécies reativas de oxigênio (ROS)

Dois dos mais importantes sistemas antimicrobianos de células fagocíticas são a NADPH oxidase e iNOS, responsáveis pela geração de superóxidos e NO respectivamente. Embora nesses sistemas ambas dependam de NADPH e oxigênio molecular, NADPH oxidase e iNOS são enzimas com regulações independentes, mas que algumas vezes podem atuar conjuntamente. Superóxido (O_2^-) e outros intermediários derivados de oxigênio são referidos como ROS, enquanto NO e seus derivados são conhecidos como RNS (FANG et al., 2004).

Embora o produto de reações catalisadas por complexos oxidases seja O_2^- e o produto da catalise por iNOS seja NO, reações envolvendo O_2^- ou NO podem resultar na formação de intermediários adicionais, tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), OH, ácido hipocloroso (HClO), dióxido de nitrogênio (NO_2), peroxinitrito ($ONOO^-$), dióxido dinitrogênio (N_2O_3), complexos de ferro dinitrosil, nitrosotiol ou nitroxil (HNO). Cada uma dessas espécies tem reatividade, estabilidade, compartimentalização e atividades biológicas diferentes (FANG et al., 2004).

Durante os processos infecciosos, macrófagos ativados podem secretar simultaneamente NO e ROS e a formação peroxinitrito ($ONOO^-$) um poderoso oxidante de proteínas, pode exercer ação citotóxica (BECKMAN; KOPPENOL, 1996).

Alguns microrganismos desenvolveram estratégias de supressão da RNS. *Salmonella enterica* é fagocitada, mas injeta proteínas efetoras no citosol dos macrófagos, as quais interferem na entrega de RNS ao vacúolo fagocítico (VAZQUEZ-TORRES et al., 2000). *Bordetella pertussis* inibe a queima respiratória por produzir uma toxina adenilato ciclase e aumentar níveis cAMP (PEARSON et al., 1987).

A detoxificação por enzimas que converte ROS para espécies menos tóxicas tem sido documentada para catalases microbianas, superóxido dismutases e peroxidases. Essas enzimas auxiliam na virulência, contribuindo para o sucesso da infecção (BISHAI et al., 1994; BRYK; GRIFFIN; NATHAN, 2000; SEYLER; OLSON; MAIER, 2001).

As atividades dos mecanismos antimicrobianos de L-Arginina, iNOS, arginase e ROS estão ilustradas na figura 5. A atividade antimicrobiana de iNOS, a qual é encontrada tanto no citosol como no compartimento endossomal (nitro exossomos) de macrófagos, podem resultar em radicais de NO ($\cdot\text{NO}$), como indicado na figura 5 (A), ou S-nitrosotiois (SNO) ou peroxinitrito (ONOO^-) formado pela reação de $\cdot\text{NO}$ com O_2^- gerados pela NADPH oxidase da célula hospedeira (Figura 5 (B)). Além disso, pode ser produzido dentro do vacúolo pelo próprio micróbio como indicado na figura 5 em C.

Outra alternativa de morte em macrófagos, demonstrada em parasitas, e dependente de iNOS, pode ser consequência da depleção de L-Arginina, como mostra a figura 5 em D-G. Para algumas cepas de *Leishmania* foi demonstrado que L-hidroxiarginina (LOHA) pode inibir a atividade da arginase nos macrófagos, com isso promove a morte do parasita (Figura 5 (D)). L-Arginina é requerida para a síntese das poliaminas via ornitina descarboxilase (ODC) (em infecções por *Leishmania*) (Figura 5 E) ou via arginina descarboxilase (ADC) (em infecções com *T. cruzi*) (Figura 5 F). *T. cruzi* apresenta sua própria NOS constitutiva, usada também para a síntese de NO, a qual atua como inibidor de apoptose e um fator adicional para a sobrevivência do parasita (Figura 5 G) (BOGDAN, 2001).

Figura 5- Mecanismo de atividade antimicrobiana. L-Arginina degradada ou pela via iNOS ou pela via Arginase. Morte ou sobrevivência de parasitas.
Fonte: Modificado de Bogdan (2001).

1.4.6 Maturação do fagossoma

Após o reconhecimento da partícula estranha pelo receptor específico, o processo fagocítico inicia-se através do rearranjo do citoesqueleto, polimerização da actina e consequentemente a formação de pseudópodes logo abaixo da região de contato ligante – receptor (GREENBERG, 1999). A partícula aderida é englobada dentro de um fagossoma, independente de clatrina. Logo após a internalização, a actina F é despolimerizada e o fagossoma é completamente internalizado (SWANSON; BAER, 1995).

A maturação do fagossoma depende de uma série de fusões complexas de vesículas intracelulares. O processo de maturação é extremamente rápido, embora haja vários estágios decorrentes de fusões que depende de um sistema de transporte intracelular. Este transporte é realizado por estruturas de membranas distintas, conhecidas como endossomas iniciais e tardios, os quais antecedem a fusão com o lisossoma (LIMPENS et al., 2009).

Aos fagossomas internalizados são endereçados os endossomas chamados de iniciais ou recentes. O processo de maturação é continuado ao receber a fusão com diferentes endossomas tardios, etapa importante na organização do conteúdo a ser degradado. Apenas após uma maturação bem sucedida, que resulta na gradativa acidificação do fagossoma é que possibilitará a fusão com os lisossomas (GELDNER; JURGENS, 2006; PERRET et al., 2005).

Os diferentes compartimentos do endossoma podem ser distinguidos pela presença de marcadores de membranas específicos, tais como pequenas GTPases da família Rab e proteínas SNARE (Receptor de proteína de ligação fator sensível - N- etilmaleimide). Essas proteínas controlam a especificidade dos eventos da fusão da membrana no compartimento onde elas residem (FLANNAGAN; JAUMOUILLÉ; GRINSTEIN, 2012).

Rab GTPases alternam entre um GTP ativo e um GDP que é inativo e são controladas por GEFs (fator de troca de nucleotídeo guanina), GDI (inibidor de dissociação de guanina) e GAPs (proteínas de ativação de GTPase) (FLANNAGAN; JAUMOUILLÉ; GRINSTEIN, 2012). Uma vez ativadas, as proteínas Rab se associam a várias moléculas efetoras apresentando várias funções, incluindo tráfico vesicular, fusão vesicular e fissão e que podem promover a ativação de outras Rab GTPases através do processo conhecido como conversão de Rab. Rab GTPases controlam o transporte e o acoplamento de vesículas, em seguida, uma proteína SNARE associada a vesícula forma um complexo com proteínas complementares SNARE no compartimento permitindo a fusão (FLANNAGAN; JAUMOUILLÉ; GRINSTEIN, 2012).

A família Rab apresenta diversas proteínas localizadas na membrana citoplasmática. Toda organela apresenta pelo menos um tipo de Rab, Rab1a, Rab1b e Rab2 são componentes de regulação de transporte de vesículas entre compartimentos iniciais e via de secreção (TISDALE et al., 1992). Rab6 controla o transporte ao longo da via de secreção por ativar o transporte intra-Golgi retrogrado (ativação positiva) ou transporte anterógrado (ativação negativa) (MARTINEZ et al., 1994). Rab4 e Rab5 estão ambos localizados em endossomas iniciais. Rab5 regula a endocitose da membrana plasmática dependente de clatrina e fusão do endossoma inicial (Figura 6) (FLANNAGAN; JAUMOUILLÉ; GRINSTEIN, 2012), coordena o tráfego endocítico e a biogênese do fagossoma. Além disso, regula a ligação de endossomas, bem como a sua motilidade através dos microtúbulos

(NILSEN et al., 1999). Rab4 controla a reciclagem do endossoma para a superfície celular (VAN DER SLUIJIS et al., 1992).

Eventualmente, as transições para fagossomas mais maduros são definidos por aquisições de marcadores bioquímicos distintos, incluindo pequenas GTPase como Rab7, com concomitante perda do marcador inicial Rab5 (Figura 6). Além de Rab7, Rab9 também está associado a compartimentos de endossomas tardios (LOMBARDI et al., 1993; RIEDERER et al., 1994). Comparado com o fagossoma inicial, o fagossoma tardio é mais ácido (pH 5.5-6.0) devido a aquisição de bombas de prótons. O bombeamento de prótons é catalisado pela ATPase vacuolar (V-ATPase), um complexo de proteína multimérica que transloca H^+ . Rab7 e seus efetores são vitais para a complementação do fagossoma (FLANNAGAN; JAUMOUILLE; GRINSTEIN, 2012). A degradação de Rab7 bloqueia a ativação da fusão de fagossoma com lisossomo e efetiva acidificação (HARRISON et al., 2003).

Durante o curso da maturação o endossoma tardio adquire marcas lisossomais, tais como proteínas de membrana associadas aos lisossomos 1 (LAMP 1) e ácidos hidrolases tais como catepsina D através da fusão com vesículas lisossomais (CLEMENS; HORWITZ, 1995).

Figura 6- Maturação do fagossomo. GTPases Rab5 e Rab7.
 Fonte: Modificado de Koul et al. (2004).

O fagossoma torna-se rapidamente um compartimento ácido enriquecido de proteases adquiridas de vesículas ao longo da via endocítica. Em adição, a NADPH oxidase e NOS, as quais são importantes para a destruição dos patógenos, estão

associadas com fagossomas (FLANNAGAN; JAUMOUILLÉ; GRINSTEIN, 2012). Assim o fagossoma é um compartimento especializado para a destruição do material internalizado.

A proporção da fusão lisossomo-fagossoma varia drasticamente dependendo da natureza do conteúdo ingerido (PITT et al., 1992), bem como do receptor envolvido. Enquanto fagossomas contendo partículas de látex possam demorar horas até a formação do fagolisossoma, ligantes englobados via receptor Fc ou manose podem, após 30 min, já serem encontrados em fagolisossomas (CHASTELLIER; THILO, 1997).

1.5 Mecanismo antifagocítico

Um aspecto que contribui para a virulência de diversos patógenos são as diferentes estratégias, desenvolvidas ao longo da evolução, de evadir a imunidade inata, visando prevenir ou retardar a fagocitose, o que contribuiria para a sobrevivência do patógeno. Tem-se descrito diferentes estratégias utilizadas por diversos patógenos a fim de burlar a interação com os fagócitos profissionais visando prevenir ou retardar a imunidade inata.

A capacidade de interferir no processo de fagocitose já foi descrita para *Yersinia sp* (ROSQVIST; BOLIN; WOLF-WATZ, 1988; WIEDERMANN et al., 2001); *Pseudomonas aeruginosa* (GARRITY-RYAN et al., 2000); *Klebsiella pneumoniae* (ÁLVAREZ et al., 2000); *Staphylococcus aureus* (THAKKER et al., 1998); *Streptococcus pneumoniae* (CLAVERYS et al., 2000); *Neisseria meningitidis* (VOEGEL et al., 1997); *Helicobacter pylori* (ALLEN et al., 2000; RAMARAO et al., 2000); *Mycobacterium tuberculosis* (FLYNN; CHAN, 2003) e EPEC típica (GOOSNEY et al., 1999). Embora o resultado final da interação por estes patógenos seja o retardamento ou a prevenção da fagocitose, as estratégias utilizadas para desencadear o mecanismo antifagocítico são diversas (CELLI; FINLAY, 2002; COOMBES; VALDEZ; FINLAY, 2004).

Em geral, os patógenos mostram-se capazes de subverter a fagocitose por: 1º) inibir a adesão aos macrófagos como é o caso do *Staphylococcus aureus* (ROOIJAKKERS; KESSEL; STRIJP, 2005) e *Streptococcus pyogenes* (FISCHETTI, 1989); 2º) aderirem-se aos macrófagos, interferindo na internalização como é o caso da *Yersinia* (ROSQVIST et al., 1990), *Pseudomonas aeruginosa* (GARRITY-RYAN,

et al., 2000) e EPEC típica (CELLI; OLIVIER; FINLAY, 2001); 3º) uma vez fagocitados subvertem os mecanismos de destruição intracelular por: i) escapar do fagossoma como é o caso da *Listeria monocytogenes* (DRAMSI; COSSART, 2002) e *Trypanosoma cruzi* (NOGUEIRA; COHN, 1976); ii) impedir a formação do fagolisossomo classicamente descrito para *Mycobacterium tuberculosis* (DERETIC; FRATTI, 1999) e *Toxoplasma gondii* (CHARRON; SIBLEY, 2002); iii) sobreviver dentro de um ambiente inóspito como o fagolisossomo observado tanto nos macrófagos infectados por *Coxiella burnetii* (BACA; LI; KUMAR, 1994) e *Leishmania* sp (ALEXANDER; VICKERMAN, 1975).

Uma das estratégias antifagocíticas mais bem conhecida é a utilizada pela *Yersinia* sp. Estudos demonstraram que após a adesão ao macrófago, o SST3 é estabelecido e diferentes proteínas efetoras conhecidas como Yops (*Yersinia outer membrane proteins*) são injetadas na célula. Pelo menos 4 proteínas efetoras já foram descritas como importantes no bloqueio do englobamento por fagócitos profissionais (Figura 7).

YopH é uma proteína tirosina fosfatase (PTPase) que interrompe os sinais fagocíticos por desfosforilar proteínas sinalizadoras importantes na fagocitose via receptor Fcγ (ANDERSSON et al., 1996; FALLMAN et al., 1995; ROSQVIST; BOLIN; WOLF-WATZ, 1988), YopE ativa as GTP-ases da família Rho (RhoA, Rac e Cdc42) (BLACK; BLISKA, 2000), que induz a despolimerização do citoesqueleto da célula hospedeira, impedindo o englobamento da bactéria (ROSQVIST et al., 1990; ROSQVIST; FORSBERG; WOLF-WATZ, 1991), Yop T é uma cisteína protease que depolimeriza filamentos de actina, por clivar as Rho GTPase (RhoA, Rac e Cdc42) diretamente na cisteína da porção C-terminal, liberando-as da membrana (SHAO et al., 2003) e Yop P que foi demonstrada como importante na inibição da fagocitose de células dendríticas e que também é capaz de inibir a apresentação de antígeno no contexto do MHC de classe I, para as células T CD8+ (ADKINS et al., 2007; TRÜLZSCH et al., 2005).

Pseudomonas aeruginosa também utiliza o SST3 para secretar as proteínas efetoras (ExoS e ExoT) dentro do macrófago. Muito semelhante a YopE de *Yersinia*, ExoS e ExoT também tem atividade GAP e portanto, afeta RhoA, Rac1 e Cdc42, impedindo sua internalização (Figura 7) (COWELL et al., 2000; GOEHRING et al., 1999).

Figura 7- Mecanismos pelo qual patógenos bacterianos inibem a fagocitose

Fonte: Modificado de Knodler, Celli e Finlay (2001).

A estratégia de interferir na polimerização de actina sob o sítio de adesão da bactéria foi também descrita como estratégia de prevenção da fagocitose para EPECt (Figura 7). Goosney et al. (1999) mostraram que o efeito antifagocítico é dependente do SST3 e das proteínas EspA, EspB, EspD, apresentando dependência intermediária de intimina e Tir. Este mecanismo ocorre a partir de 2 h de contato com a célula hospedeira e parece ser maior, quanto maior for o número de bactérias aderidas ao macrófago (GOOSNEY et al., 1999).

Anos depois se demonstrou que a diminuição do englobamento era devido à inibição da fosfatidilinositol 3 quinase (PI3-K), importante para a polimerização da actina, via receptor Fc (CELLI; OLIVIER; FINLAY, 2001). A ativação da PI3-K é essencial para a formação do fagossomo, devido seu envolvimento no rearranjo da actina-F e consequentemente o englobamento pelo macrófago (COX et al., 1999).

Em seus estudos Celli, Olivier e Finlay (2001) demonstraram que macrófagos J774A.1 infectados com EPEC não fagocitavam zimosam opsonizados com IgG, enquanto a fagocitose de zimosam opsonizado com C3bi permanecia inalterada, comprovando que o receptor CR3 continuava funcional. Entretanto, Marcheès et al. (2008), mostraram que EspJ, outra proteína secretada por EPECt, é importante na inibição da fagocitose de glóbulos vermelhos de carneiro opsonizados, tanto com IgG como com C3bi, mostrando o envolvimento dos receptores Fc e CR3. Interessantemente, EHEC também bloqueia a internalização de partículas opsonizadas, igualmente como descrito para EPEC (MARCHEÈS et al. 2008).

Quitard et al. (2006) demonstraram que a proteína efetora EspF, inicialmente descrita como responsável pela destruição da barreira epitelial (DEAN; KENNY, 2004) bem como morte celular através da mitocôndria (NAGAI; ABE; SASAKAWA, 2005) é também responsável pela inibição da PI3-K em macrófagos J774.A1, por vias independentes desses processos.

Um mecanismo não dependente de PI3-K também foi descrito como importante no impedimento do englobamento de EPECt. Neste trabalho os autores mostraram que a proteína EspB, também injetada pelo SST3, liga-se à miosina impedindo a ligação à actina- F e conseqüentemente a formação de pseudópodes (IIZUMI et al., 2007).

Recentemente, Dong et al. (2010) demonstrou que EspH inativa vias de sinais de Rho GTPases do hospedeiro, a nível de RhoGEF. EspF se liga diretamente ao domínio DH-PH de múltiplos RhoGEFs, o que previne sua ligação a Rho inibindo a dinâmica da actina do citoesqueleto.

Com relação à EPECa, Melo (2011) identificou uma cepa do sorotipo O55:H7 (LB7) capaz de inibir a fagocitose por macrófagos. O fator antifagocítico (Fa) é secretado no sobrenadante do cultivo bacteriano, já que macrófagos previamente incubados com o sobrenadante da cepa LB7 apresentaram redução na fagocitose de bactéria, sugerindo que o fator responsável pelo efeito antifagocítico estava sendo secretado.

O sobrenadante da cultura da cepa LB7 cultivada em meio TSB, submetido ao fracionamento por Extração em Fase Sólida (SPE) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) mostrou-se capaz de inibir a fagocitose de *E. coli* e *Saccharomyces cerevisiae*. O perfil cromatográfico da fração ativa originária do meio TSB, obtido por HPLC mostrou-se extremamente complexo, impossibilitando a identificação do fator responsável pelo efeito antifagocítico (MELO, 2011). Estudos preliminares de caracterização do Fa secretado pela cepa LB7 de EPECa, sem ação microbicida ou citotóxica, mostrou-se ser solúvel em meio aquoso, termoestável e de baixo peso molecular (menor que 2kDa). Além disso, há indicativos de que possa apresentar uma região glicosídica (MELO, 2011).

Sabe-se que o entendimento da interação de um patógeno com fagócitos profissionais, células importantes na imunidade inata, tem contribuído para a compreensão do estabelecimento da infecção por muitos patógenos, isto porque, o

estudo desta interação tem favorecido a identificação de fatores de virulência importantes na infecção.

Desta forma, considerando-se o aumento da incidência de EPECa constatado por estudos epidemiológicos (ABE et al., 2009; ARAUJO et al., 2007; BUERIS et al., 2007; FERNANDES-FILHO, 2004; FRANZOLIN et al., 2005), a alta heterogeneidade de fatores de virulência (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002), o total desconhecimento da interação de EPECa com fagócitos profissionais e a demonstração da secreção de um fator antifagocítico por uma cepa de EPECa (MELO 2011) subsidiaram o interesse em explorar o comportamento de diferentes cepas de EPECa na interação com macrófagos.

6 CONCLUSÃO

O estudo da interação patógeno-célula hospedeira é complexo visto que há fatores envolvidos, de ambos os lados, que contribuem no estabelecimento deste “diálogo” que pode resultar no controle ou não da infecção. Os resultados aqui obtidos demonstram que as cepas de EPECa LB13, LB7 e BA487 apresentam comportamento heterogêneo na interação com macrófagos tanto na capacidade de ser fagocitada como no escape dos mecanismos microbicidas desta célula.

A sobrevivência intracelular de EPECa foi observada nos macrófagos da linhagem J774A.1, com *background* genético BALB/c considerado mais suscetível à infecções. Por outro lado, macrófagos de cultura primária derivados de C57/BL6 controlam a infecção, enquanto há sobrevida bacteriana nos macrófagos derivados de C3H/HeJ, que apresentam mutação espontânea no TLR4 o que indica o envolvimento do TLR4 na resolução da infecção.

A capacidade de EPECa sobreviver nos macrófagos J774.A1 difere entre as cepas de EPECa. A cepa LB13 sobrevive dentro dos macrófagos sem induzir a produção de NO, provavelmente pela utilização da L-arginina pela via da Arginase, enquanto a cepa LB7 induz a produção de NO e mesmo assim, sobrevive no ambiente inóspito. Em comum, todas as cepas de EPECa estudadas interferem na maturação do fagossoma, o que justificaria a sobrevivência intracelular. Além disso, a cepa LB7 secreta um fator antifagocítico, de natureza peptídica, capaz de inibir a fagocitose de *S. flexneri* como também partículas de látex, provavelmente por atuar em uma via comum da fagocitose. No entanto, até o momento não foi possível identificar este fator. A pesquisa de novos meios de cultura definidos e que facilitem a secreção do Fa suficiente para a purificação deverá ser alvo de novos estudos.

Este trabalho, pioneiro na investigação da interação de EPECa com macrófagos corrobora os achados que apontam a heterogeneidade deste grupo de bactérias. A partir destes resultados um estudo individual das cepas LB13 e LB7 possibilitará a melhor compreensão das estratégias utilizadas na infecção nos diferentes modelos celulares.

REFERÊNCIAS*

- ABE, C. M.; TRABULSI, L. R.; BLANCO, J.; BLANCO, M.; DAHBI, G.; BLANCO, J. E.; MORA, A.; FRANZOLIN, M. R.; TADDEI, C. R.; MARTINEZ, M. B.; PIAZZA, R. M.; 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.
- ADEREM, A.; UNDERHILL, D. M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 17, p. 593-623, 1999.
- ADKINS, I.; KOBERLE, M.; GROBNER, S.; BOHN, E.; AUTENRIETH, I. B.; BORGMANN, S. *Yersinia* outer proteins E, H, P and T differentially target the cytoskeleton and inhibit phagocytic capacity of dendritic cells. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 297, p. 235-244, 2007.
- 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.
- AKIRA, S.; TAKEDA, K.; KAISHO, T. *Toll-like* receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. **Nat. Immunol.**, v. 8, p. 675-680, 2001.
- AKIRA, S.; TAKEDA, K. *Toll-like* receptor signalling. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, p. 499-511, 2004.
- ALEXANDER, J.; VICKERMAN, K. Fusion of host cell secondary lysosomes with the parasitophorous vacuoles of *Leishmania mexicana* infected macrophages. **J. Protozool.** v. 22, p. 502-508, 1975.
- ALLEN, L. A. H.; ADEREM, A. Mechanisms of phagocytosis. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 8, p. 36-40, 1996.
- ALLEN, L. A.; SCHLESINGER, L. S.; KANG, B. Virulent strains of *Helicobacter pylori* demonstrate delayed phagocytosis and stimulate homotypic phagosome fusion in macrophages. **J. Exp. Med.**, v. 191, p. 115-128, 2000.
- ALVAREZ, D.; MERINO, S.; TOMAS, J. M.; BENEDI, V. J.; ALBERTI, S. Capsular polysaccharide is a major complement resistance factor in lipopolysaccharide O

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

side chain-deficient *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. **Infec. Immun.**, v. 68, p. 953–955, 2000.

ANDERSSON, K.; CARBALLEIRA, K.; MAGNUSSON, C.; PERSSON, O.; STENDAHL, H.; WOLF-WATZ; FALLMAN, M. YopH of *Yersinia pseudotuberculosis* interrupts early phosphotyrosine signaling associated with phagocytosis. **Mol. Microbiol.**, v. 20, p. 1057-1069, 1996.

ARAUJO, J. M.; TABARELLI, G. F.; ARANDA, K. R. S.; FABBRICOTTI, S. H.; FAGUNDES-NETO, U.; MENDES, C. M. F.; SCALETSKY, I. C. A. Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among brazilian children. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, p. 3396-3399, 2007.

ASHIDA, H.; OGAWA, M.; KIM, M.; SUZUKI, S.; SANADA, T.; PUNGINELLI, C.; MIMURO, H.; SASAKAWA, C. *Shigella* deploy multiple countermeasures against host innate immune responses. **Curr. Opin. Microbiol.**, v.14, p.16-23, 2011.

BACA, G.; LI, Y. P.; KUMAR, H. Survival of the Q fever agent *Coxiella burnetii* in the phagolysosome. **Trends Microb.**, v. 2, p. 476-480, 1994.

BAORTO, D. M.; GAO, Z.; MALAVIYA, R.; DUSTIN, M. L.; van der MERWE, A.; LUBLIN, D.M.; ABRAHAM, S. N. Survival of FimH-expressing enterobacteria in macrophages relies on glycolipid traffic. **Nature**, v. 389, p. 636-639, 1997.

BANG, I. S.; LIU, L.; VAZQUEZ-TORRES, A.; CROUCH, M. L.; STAMLER, J. S.; FANG, F.C. Maintenance of nitric oxide and redox homeostasis by the *Salmonella* flavohemoglobin hmp. **J. Biol. Chem.**, v. 38, p. 28039-28047, 2006.

BARKSDALE, A. R.; BERNARD, A. C.; MALEY, M. E.; GELLIN, G. L.; KEARNEY, P. A.; BOULANGER, B. R.; TSUEI, B. J.; OCHOA, J. B. Regulation of arginase expression by T- helper II cytokines and isoproterenol. **Surgery**, v. 135, p. 527-535, 2004.

BARNES, P. J.; LIEW, F. Y. Nitric Oxide and asthmatic inflammation. **Immunol. Today**, v. 16, p. 128-130, 1995.

BARNES, P. J.; KARIN, M. Nuclear factor-kappa B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **N. Engl. J. Med.**, v. 10, p. 1066-1071, 1997.

BECKMAN, J. S.; BECKMAN, T. W.; CHEN, J.; MARSHALL, P. A.; FREEMAN, B. A.; Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 87, p. 1620-1624, 1990.

BECKMAN, J. S.; KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. **Am. J. Physiol.**, v. 271, p. 1424-1437, 1996.

BISHAI; W. R., HOWARD; N. S.; WINKELSTEIN; J. A. SMITH; H. O. Characterization and virulence analysis of catalase mutants of *Haemophilus influenzae*. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 4855–4860, 1994.

BLACHIER, F.; MIGNON, A.; SOUBRANE, O. Polyamines inhibit lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase activity in rat liver cytosol. **Nitric Oxide**, v. 1, p. 268-272, 1997.

BLACK, D. S.; BLISKA, J. B. The RhoGAP activity of the *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence. **Mol. Microbiol.**, v. 37, p. 515-527, 2000.

BLATTNER, D.; BONAS, U. Port of entry – the type III secretion translocon. **TRENDS Microbiol.**, v. 4, p. 186-194, 2002.

BOCHUD, P. Y.; CALANDRA, T. Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment. **BMJ.**, v. 326, p. 262-266, 2003.

BOLTZ-NITULESCU, G.; WILTSCHKE, C.; HOLZINGER, C.; FELLINGER, A.; SCHEINER, O.; GESSL, A.; FORSTER, O. Differentiation of Rat Bone Marrow Cells Into Macrophages Under the Influence of Mouse L929 Cell Supernatant. **J. Leukoc. Biolog.**, v. 41, p. 83-91, 1987.

BOGDAN, C. Of microbes, macrophages and nitric oxide. **Behring Inst. Mitt.**, v. 99, p. 58-72, 1997.

BOGDAN, C.T.; ROLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. The role of nitric oxide in innate immunity. **Immunol. Rev.**, v. 173, p.17-26, 2000.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nat Immunol.**, v. 2, p. 907-916, 2001.

BOUTARD, V.; HAVOUIIS, R.; FOUQUERAY, B.; PHILIPPE, C.; MOULINOX, J. P.; BAUD, L. Transforming growth factor-beta stimulates arginase activity in macrophages. Implications for the regulation of macrophage cytotoxicity. **J. Immunol.**, v. 155, p. 2077-2084, 1995.

BOYER, H. W.; ROULLAND-DUSSOIX, D. A complementary analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. **J. Mol. Biol.**, v. 41, p. 459-472, 1969.

BRINGER, M. A.; BARNICH, N.; GLASSER, A. L.; BARDOT, O.; DARFEUILLE-MICHAUD, A. HtrA stress protein is involved in intramacrophagic replication of adherent and invasive *Escherichia coli* strain LF82 isolated from a patient with Crohn's disease. **Infect. Immun.**, v. 73, p.712-721, 2005.

BRINGER, M. A.; GLASSER, A. L.; TUNG, C. H.; MÉRESSE, S.; DARFEUILLE-MICHAUD, A. The Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* strain LF82 replicates in mature phagolysosomes within J774 macrophages. **Cell Microbiol.**, v. 8, p. 471-484, 2006.

BRINGER, M. A.; ROLHION, N.; GLASSER, A. L.; DARFEUILLE-MICHAUD, A. The Oxidoreductase DsbA Plays a Key Role in the Ability of the Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive *Escherichia coli* Strain LF82 to Resist Macrophage Killing. **J. Bacteriol.**, v. 189, p. 4860-4871, 2007.

BRITTON, W. J., N. MEADOWS, D. A. RATHJEN, D. R. ROACH, AND H. BRISCOE. A tumor necrosis factor mimetic peptide activates a murine macrophage cell line to inhibit mycobacterial growth in a nitric oxide-dependent fashion. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 2122-2127, 1998.

BRONTE, V.; ZANOVELLO, P. Regulation of immune responses by L-Arginine metabolism. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 8, p. 641-654, 2005.

BRYK, R.; GRIFFIN, P.; NATHAN, C. Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. **Nature**, v. 407, p. 211–215, 2000.

BUERIS, V.; SIRCILI, M. P.; TADDEI, C. R.; SANTOS, M. F.; FRANZOLIN, M. R.; MARTINEZ, M. B.; FERRER, S. R.; BARRETO, M. R.; TRABULSI, L. R. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 839-844, 2007.

BUSSIÈRE, F. I.; CHATURVEDI, R.; CHENG, Y.; GOBERT, A. P.; ASIM, M.; BLUMBERG, D. R.; XU, H.; KIM, P. Y.; HACKER, A.; CASERO, R. A. Jr.; WILSON, K. T. Spermine causes loss of innate immune response to *Helicobacter pylori* by inhibition of inducible nitric-oxide synthase translation. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 2409-2412, 2005.

BULGIN, R.; ARBELOA, A.; GOULDING, D.; DOUGAN, G.; CREPIN, V.F.; RAYMOND, B.; FRANKEL, G. The T3SS effector EspT defines a new category of invasive enteropathogenic *E. coli* (EPEC) which form intracellular actin pedestals. **PLoS Pathog.**, v. 5, p. 1-15. 2009.

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.

CAMPOS, L. C.; WHITTAM, T. S.; GOMES, T. A.; ANDRADE, J. R.; TRABULSI, L. R. *Escherichia coli* serogroup O111 includes several clones of diarrheagenic strains with different virulence properties. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 3282-3288, 1994.

CANTHABOO, C.; XING, D.; WEI, X. Q.; CORBEL, M. J. Investigation of Role of Nitric oxide in protection from *Bordetella pertussis* respiratory challenge. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 679-684, 2002.

CARON, E.; HALL, A. Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. **Science**, v. 5394, p. 1717-1721, 1998.

CELLI, J.; OLIVIER, M.; FINLAY, B. Enteropathogenic *Escherichia coli* mediates antiphagocytosis through the inhibition of PI 3-kinase-dependent pathways. **EMBO J.**, v. 20, p.1245–1258, 2001.

CELLI, J.; FINLAY, B. Bacterial avoidance of phagocytosis. **TRENDS Microbiol.**, v. 10, p. 232-237, 2002.

CHARRON, A. J.; SIBLEY, L. D. Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. **J. Cell Sci.**, v. 115, p. 3049-3059, 2002.

CHASSAING, B.; ROLHION, N.; DE VALLÉE, A.; SALIM, S. Y.; PROROK-HAMON, M.; NEUT C.; CAMPBELL, B. J.; SÖDERHOLM, J.D.; HUGOT, J.P.; COLOMBEL, J. F.; DARFEUILLE-MICHAUD, A. Crohn disease-associated adherent-invasive *E. coli* bacteria target mouse and human Peyer's patches via long polar fimbriae. **J. Clin. Invest.**, v. 121, p. 966-975, 2011.

CHASTELLIER, C.; THILO, L. Phagosome maturation and fusion with lysosomes in relation to surface property and size of the phagocytic particle. **Eur. J. Cell Biol.**, v. 74, p. 49-62, 1997.

CHATURVEDI, R.; ASIM, M.; LEWIS, N. D.; ALGOOD, H. M.; COVER, T. L.; KIM.; P. Y.; WILSON, K. T. L-arginine availability regulates inducible nitric oxide synthase-dependent host defense against *Helicobacter pylori*. **Infect. Immun.**, v. 75, 4305-4315, 2007.

CHATURVEDI, R.; ASIM, M.; HOGE, S.; LEWIS, N. D.; SINGH, K.; BARRY, D. P.; DE SABLET, T.; PIAZUELO, M. B.; SARVARIA, A. R.; CHENG, Y.; CLOSS, E. I.; CASERO, R. A. JR.; GOBERT, A. P.; WILSON, K.T. Polyamines Impair Immunity to *Helicobacter pylori* by Inhibiting L-Arginine Uptake Required for Nitric Oxide Production. **Gastroenterology**, v. 139, p. 1686-1698, 2010.

CHAVRIER, P.; PARTON, R. G.; HAURI, H. P.; SIMONS, K.; ZERIAL, M. Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. **Cell**, v. 62, p. 317-329, 1990.

CHEN, C. H.; SEGUIN-DEVAUX, C.; BURKE, N. A.; ORISS, T. B.; WATKINS, S. C.; CLIPSTONE, N.; RAY, A. Transforming Growth Factor Blocks Tec Kinase Phosphorylation, Ca Influx, and NFATc Translocation Causing Inhibition of T cell differentiation. **J. Exp. Med.**, v. 197, p. 1689-1699, 2003.

CHEN, H. D.; FRANKEL, G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 29, p. 83-98, 2005.

CHIWAKATA, C. B.; HEMMER, C. J.; DIETRICH, M. High levels of inducible nitric oxide synthase mRNA are associated with increased monocyte counts in blood and have a beneficial role in *Plasmodium falciparum* malaria. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 394-399, 2000.

CHOI, C. Y.; PARK, K. R.; LEE, J. H.; JEON, Y. J.; LIU, K. H.; OH, S.; KIM, D. E.; YEA, S. S. Isoeugenol suppression of inducible nitric oxide synthase expression is

mediated by down-regulation of NF-kappaB, ERK1/2, and p38 kinase. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 576, n. 1-3, p. 151-159, 2007.

CIAPETTI, G.; GRANCHI, D.; VERRI, E.; SAVARINO, L.; CAVEGAGNA, D.; PIZZOFERRATO, A. Application of a combination of neutral red and amido black staining for rapid, reliable cytotoxicity testing of biomaterials. **Biomaterials**, v. 17, p. 1259-1284, 1996.

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.

CLAVERYS, J. P.; PRUDHOMME, M.; MORTIER-BARRIERE, I.; MARTIN, B. Adaptation to the environment: *Streptococcus pneumoniae*, a paradigm for recombination-mediated genetic plasticity? **Mol. Microbiol.**, v. 35, p. 251–259, 2000.

CLEMENS, D. L.; HORWITZ, M. A. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. **J. Exp. Med.**, v. 181, p. 257–270, 1995.

CLEMENTS, A.; YOUNG, J. C.; CONSTANTINOU, N.; FRANKEL, G. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Microbes**, v. 3, p. 71-87, 2012.

COOMBES, B. K.; VALDEZ, Y.; FINLAY, B. B. Evasive Maneuvers by Secreted Bacterial Proteins to Avoid Innate Immune Responses. **Curr. Biol.**, v. 14, p. 856-867, 2004.

CORRALIZA, I. M.; CAMPO, M. L.; SOLER, G.; MODOLELL, M. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. **J. Immunol. Methods**, v. 174, p. 231-235, 1994.

COWELL, B. A.; CHEN, D. Y.; FRANK, D. W.; VALLIS, A. J.; FLEISZIG, S. M. ExoT of cytotoxic *Pseudomonas aeruginosa* prevents uptake by corneal epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 403–406, 2000.

COX, D.; TSENG, C. C.; BJEKIC, G.; GREENBERG, S. A requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in pseudopod extension. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 3, p. 1240-1247, 1999.

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

CROXEN, M. A.; LAW, R. J.; SCHOLZ, R.; KEENEY, K. M.; WLODARSKA, M.; FINLAY, B. B. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 26, p. 822-880, 2013.

CRUZ-RAMOS, H.; CRACK, J.; GUANGHUI, Wu.; HUGHES, M. N.; SCOTT, C.; THOMSON, A. J.; GREEN, J.; POOLE, R. K. NO sensing by FNR: regulation of the *Escherichia coli* NO-detoxifying flavohaemoglobin, Hmp. **EMBO J.**, v. 21, 3235-3244, 2002.

DAHER, R. K.; FILION, G.; TAN, S. G.; DALLAIRE-DUFRESNE, S.; PAQUET, V. E.; CHARETTE, S. J. Alteration of virulence factors and rearrangement of pAsa5 plasmid caused by the growth of *Aeromonas salmonicida* in stressful conditions. **Vet. Microbiol.**, v. 3-4, p. 353-360, 2011.

DARWIN, K. H.; EHRT, S.; GUTIERREZ-RAMOS, J. C.; WEICH, N.; NATHAN, C. F. The proteasome of *Mycobacterium tuberculosis* is required for resistance to nitric oxide. **Science**, v. 302, p. 1963-1966, 2003.

DAS, P.; LAHIRI, A.; LAHIRI, A.; CHAKRAVORTTY, D. Modulation of the arginase pathway in the context of microbial pathogenesis: a metabolic enzyme moonlighting as an immune modulator. **PLoS Pathog.**, v. 6, p. e1000899, 2010.

D'AUTRE'AUX, B.; TUCKER, N. P.; DIXON, R.; SPIRO, S. A non-haem iron centre in the transcription factor NorR senses nitric oxide. **Nature**, v. 437, p. 769-772, 2005.

DEAN, P.; KENNY, B. Intestinal barrier dysfunction by enteropathogenic *Escherichia coli* is mediated by two effector molecules and a bacterial surface protein. **Mol. Microbiol.**, v. 54, p. 665-675, 2004.

DERETIC, V.; FRATTI, R. A. *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. **Mol. Microbiol.**, v. 31, p. 1603-1609, 1999.

DING, A. H.; NATHAN, C. F.; STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **J. Immunol.**, v. 120, n. 4, p. 2407-2412, 1988.

DONG, N.; LIU, L.; SHAO, F. A bacterial effector targets host DH-PH domain RhoGEFs and antagonizes macrophage phagocytosis. **Embo J.**, v. 29, p. 1363-1376, 2010.

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.

DRAMSI, S.; COSSART, P. Listeriolysin O: a genuine cytolysin optimized for an intracellular parasite. **J. Cell Biol.**, v. 156, p. 943-946, 2002.

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.

ELHANAFI, D.; LEENANON, B.; BANG, W.; DRAKE, M. A. Impact of cold and cold-acid stress on poststress tolerance and virulence factor expression of *Escherichia coli* O157:H7. **J. Food Prot.**, v. 1, p. 19-26, 2004.

ELIAS, W.; PORANGABA, T.; BUERIS, V.; SIRCILI, M.; NAVARRO-GARCIA, F. Prevalence of autotransporter protein genes of diarrheagenic *Escherichia coli* among atypical enteropathogenic *E. coli* strains. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF BACTERIOLOGY AND APPLIED MICROBIOLOGY, 12., Istanbul. **Abstracts...** Three Divisions of the International Union of Microbiological Societies, 2008. p. 137, res. BP-211.

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.; 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.

ELLIOTT, S. N.; WALLACE, J. L. Nitric oxide: a regulator of mucosal defense and injury. **J. Gastroenterol.**, v. 33, p. 792-803, 1998.

ETIENNE-MESMIN, L.; CHASSAING, B.; SAUVANET, P.; DENIZOT, J.; BLANQUET-DIOT, S.; DARFEUILLE-MICHAUD A.; PRADEL, N.; LIVRELLI, V. Interactions with M cells and macrophages as key steps in the pathogenesis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections. **PLoS One**, v. 6, p. 1-13, 2011.

FALLMAN, M.; ANDERSSON, K.; HAKANSSON, S.; MAGNUSSON, K. E.; STENDAHL, O.; WOLF-WATZ, H. Yersinia pseudotuberculosis inhibits Fc receptor-mediated phagocytosis in J774 cells. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 3117-3124, 1995.

FANG, F. C. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. **Nat Rev Microbiol.**, v. 2, p. 820-832, 2004.

FEELISCH, M; STALMER, J. S. Methods in Nitric Oxide research. **Biochemical Education – Volume 25**, Issue 3, pages 117-188 (July 1997) 17th International congress of biochemistry and molecular biology San Francisco.

FERNANDES-FILHO, A. **Doença diarreica aguda em João Pessoa: Prevalência de enteropatógenos e importância dos potenciais fatores de risco e proteção.** 2004. 119 f. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

FIROOZMAND, L. M. **Microrganismos do solo e de manguezais: Fonte de produtos antimicrobianos.** 2008. 87 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

FISCHETTI, V. A. *Streptococcal* M protein: molecular design and biological behavior. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.2, p. 285-314, 1989.

FLANNAGAN, R. S.; JAUMOUILLÉ, V.; GRINSTEIN, S. The cell biology of phagocytosis. **Annu. Rev. Pathol.**, v. 7; p. 61-98, 2012.

FLYNN, J.; CHAN, J. immune evasion by *Mycobacterium tuberculosis*: living with the enemy. **Curr. Opin. Immunol.**, v.15, n. 4, p. 450-455, 2003.

FORRESTER, M. T.; FOSTER, M. W. Protection from nitrosative stress: a central role for microbial flavohemoglobin. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 52, p. 1620-1633, 2012.

FRANKEL, G.; PHILIPS, A. D.; ROSENSHINE, I.; DOUGAN, G.; KAPER, J. B.; KNUTTON, S. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. **Mol. Microbiol.**, v. 30, p. 911–921, 1998.

FRANZOLIN, M. R.; ALVES, R. C. B.; KELLER, R.; GOMES, T. A. T.; BEUTIN, L.; BARRETO, M. L.; MILROY, C. A.; STRINA, A.; RIBEIRO, H.; TRABULSI, L. R. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 100, p. 359-363, jul. 2005.

FREITAS, N. C. **Pesquisa de adesinas fimbriais em isolados de *ESCHERICHIA coli* enteropatogênica atípica.** 2008. 62 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Biológicas) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras do Centro Universitário Fundação Santo André, Santo André, 2008.

GAO, J.; MORRISON, D. C.; PARMELY, T. J.; RUSSELL, S. W.; MURPHY, W. J. An interferon-gamma-activated site (GAS) is necessary for full expression of the mouse iNOS gene in response to interferon-gamma and lipopolysaccharide. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 1226-1230, 1997.

GARDNER, A. M.; GARDNER, P. R. Flavohemoglobin detoxifies nitric oxide in aerobic, but not anaerobic, *Escherichia coli*. Evidence for a novel inducible anaerobic nitric oxide-scavenging activity. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 8166-8171, 2002.

GARMENDIA, J.; FRANKEL, G.; CREPIN, V. F. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 2573-2385, 2005.

GARRIDO, V. V.; DULGERIAN, L. R.; STEMPIN, C. C.; CERBÁN, F. M. The increase in mannose receptor recycling favors arginase induction and *Trypanosoma cruzi* survival in macrophages. **Int. J. Biol. Sci.**, v. 7, p. 1257-1272, 2011.

GARRITY-RYAN, L.; KAZMIERCZAK, B.; KOWAL, R.; COMOLLI, J.; HAUSER, A.; ENGEL, J. N. The arginine finger domain of ExoT contributes to actin cytoskeleton disruption and inhibition of internalization of *Pseudomonas aeruginosa* by epithelial cells and macrophages. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 7100-7113, 2000.

GASSAMA-SOW, A.; SOW, P. S.; GUÈYE, M.; GUEYE-N'DIAYE, A.; PERRET, J. L.; MBOUP, S.; AIDARA-KANE, A. Characterization of pathogenic *Escherichia coli* in human immunodeficiency virus-related diarrhea in Senegal. **J. Infect. Dis.**, v. 189, p. 75-78, 2004

GELDNER, N.; JURGENS, G. Endocytosis in signalling and development. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v. 9, p. 589–594, 2006.

GERSUK, G.; HIRAOA, A.; MARR, K. A. Human monocytes differentiate into macrophages under the influence of human KPB-M15 conditioned medium. **J. Immunol. Methods.**, v. 299, n. 1-2, p. 99-106, abr. 2005.

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.

GLASSER, A. L.; BOUDEAU, J.; BARNICH, N.; PERRUCHOT, M. H.; COLOMBEL, J. F.; DARFEUILLE-MICHAUD, A. Adherent invasive *Escherichia coli* strains from patients with Crohn's disease survive and replicate within macrophages without inducing host cell death. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 5529-5537, 2001.

GLOTFELTY, L. G.; ZAHS, A.; HODGES, K.; SHAN, K.; ALTO, N. M.; HECHT, G. A. Enteropathogenic *E. coli* effectors EspG1/G2 disrupt microtubules, contribute to tight junction perturbation and inhibit restoration. **Cell. Microbiol.**, v. 16, p. 1767-1783, 2014.

GOBERT, A. P.; MCGEE, D. J.; AKHTAR, M.; MENDZ, G. L.; NEWTON, J. C.; CHENG, Y.; MOBLEY, H. L.; WILSON, K. T. *Helicobacter pylori* arginase inhibits nitric oxide production by eukaryotic cells: a strategy for bacterial survival. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98, p. 13844-13849, 2001.

GOBERT, A. P.; MERSEY B. D.; CHENG, Y.; BLUMBERG, D. R.; NEWTON, J. C.; WILSON, K. T. Cutting edge: urease release by *Helicobacter pylori* stimulates macrophage inducible nitric oxide synthase. **J. Immunol.**, v.168, 6002–6006, 2002.

GOEHRING, U. M., SCHMIDT, G., PEDERSON, K. J., AKTORIES, K.; BARBIERI, J. T. The N-terminal domain of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S is a GTPase-activating protein for Rho GTPases. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 36369–36372, 1999.

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.

GOOSNEY, D.; CELLI, J.; KENNY, B.; FINLAY, B. Enteropathogenic *Escherichia coli* inhibits phagocytosis. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 490-495, 1999.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 3, p. 23-35, 2003.

GORVEL, J. P.; CHAVRIER, P.; ZERIAL, M.; GRUENBERG, J. Rab5 controls early endosome fusion *in vitro*. **Cell**, v. 64, p. 915-925, 1991.

GREENBERG, S. Modular components of phagocytosis. **J. Leuk. Biol.**, v. 66, p. 712-717, 1999.

GUTTMAN, J. A.; SAMJI, F. N.; LI, Y.; DENG, W.; LIN, A.; FINLAY, B. B. Aquaporins contribute to diarrhoea caused by attaching and effacing bacterial pathogens. **Cell Microbiol.**, v. 9, p. 131-141, 2007.

GUZIK, T. J.; KORBUT, R.; ADAMEK-GUZIK, T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. **J Physiol Pharmacol.**, v. 54, p. 469-487, 2003.

HARDWIDGE, P. R.; DENG, W.; VALLANCE, B. A.; RODRIGUEZ-ESCUADERO, I.; CID, V. J.; MOLINA, M.; FINLAY, B. B. Modulation of host cytoskeleton function by the enteropathogenic *Escherichia coli* and *Citrobacter rodentium* effector protein EspG. **Infect Immun.**, v. 73, p. 2586-2594, 2005.

HARRISON, R. E.; BUCCI, C.; VIEIRA, O. V.; SCHROER, T. A.; GRINSTEIN, S. Phagosomes fuse with late endosomes and/or lysosomes by extension of membrane protrusions along microtubules: role of Rab7 and RILP. **Mol. Cell. Biol.**, v. 23, p. 6494-6506, 2003.

HARTLAND, E. L.; DANIELL, S. J.; DELAHAY, R. M.; NEVES, B. C.; WALLIS, T.; SHAW, R. K.; HALE, C.; KNUTTON, S.; FRANKEL, G. The type III protein translocation system of enteropathogenic *Escherichia coli* involves EspA-EspB protein interactions. **Mol. Microbiol.**, v. 35, n. 6, p. 1483-1492, 2000.

HASE, K.; KAWANO, K.; NOCHI, T.; PONTES, G. S.; FUKUDA, S.; EBISAWA, M.; KADOKURA, K.; TOBE, T.; FUJIMURA, Y.; KAWANO, S.; YABASHI, A.; WAGURI, S.; NAKATO, G.; KIMURA, S.; MURAKAMI, T.; IIMURA, M.; HAMURA, K.; FUKUOKA, S.; LOWE, A. W.; ITOH, K.; KIYONO, H.; OHNO, H. Uptake through glycoprotein 2 of FimH(+) bacteria by M cells initiates mucosal immune response. **Nature**, v. 462, p. 226-230, 2009.

HELLWIG, S. M.; VAN OIRSCHOT, H. F.; HAZENBOS, W. L.; VAN SPRIEL, A. B.; MOOI, F. R.; VAN DE WINKEL, J. G. Targeting to Fcγ receptors, but not CR3 (CD11b/CD18), increases clearance of *Bordetella pertussis*. **J. Infect. Dis.**, v. 6, p. 871-879, 2001.

HERNANDES, R. T.; VIEIRA, M. A.; CARNEIRO, S. M.; SALVADOR, F. A.; GOMES, T. A. Characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains that express typical localized adherence in HeLa cells in the absence of the bundle-forming pilus. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, 4214-4217, 2006.

HERNANDES, R. T.; SILVA, R. M.; CARNEIRO, S. M.; SALVADOR, F. A.; FERNANDES, M. C. C.; PADOVAN, A. C. B.; YAMAMOTO, D.; MORTARA, R. A.; ELIAS, W. P.; BRIONES, M. R. S.; GOMES, T. A. T. 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, p. 415-425, 2008.

HERNANDES, R. T.; ELIAS, W. P.; VIERA, M. A.; GOMES, T. A. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 297, n. 2, 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.

HIGGINS, S. C.; LAVELLE, E. C.; MCCANN, C.; KEOGH, B.; MCNEELA, E.; BYRNE, P.; O'GORMAN, B.; JARNICKI, A.; MCGUIRCK, P.; MILLS, K. H. G. *Toll-Like* receptor 4-mediated innate il-10 activates antigen-specific regulatory t cells and confers resistance to *Bordetella pertussis* by inhibiting inflammatory pathology. **J. Immunol.**, v. 171, p. 3119- 3127, 2003.

HODGES, K.; GILL, R. Infectious diarrhea: Cellular and molecular mechanisms. **Gut Microbes.** v. 1, p. 4-21, 2010.

HOLDEN, J. A.; ATTARD, T. J.; LAUGHTON, K. M.; MANSELL, A, O'BRIEN-SIMPSON, N. M, REYNOLDS, E. C. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide weakly activates M1 and M2 polarized mouse macrophages but induces inflammatory cytokines. **Infect. Immun.**, v. 82, p. 4190-4203, 2014.

HUECK, C. J. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. **Mol. Biol. Rev.**, v. 62, p. 379-433, 1998.

HULL, R. A.; GILL, R. E.; HSU, P.; MINSHEW, B. H.; FALKOW, S. Construction and expression of recombinant plasmids encoding type 1 or D-mannose-resistant pili from a urinary tract infection *Escherichia coli* isolate. **Infect. Immun.**, v. 33, p. 933-938, 1981.

HULTGREN, S. J.; NORMARK, S. Biogenesis of the bacterial pilus. **Cur. Opin. Gen. devel.**, v. 1, p. 313–318, 1991.

IGARASHI, K.; KASHIWAGI, K. Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 271, p.559-564, 2000.

IIZUMI, Y.; SAGARA, H.; KABE, Y.; AZUMA, M.; KUME, K.; OGAWA, M.; NAGAI, T.; GILSEPIE, G.; SASAKAWA, C.; HANDA, H. The Enteropathogenic *Escherichia coli* effector EspB facilitates microvillus effacing and antiphagocytosis by myosin function. **Cell Host Microbe**, v. 2, p. 383-392, 2007.

INMAN, L. R.; CANTEY, J. R. Specific adherence of *Escherichia coli* (strain RDEC-1) to membranous (M) cells of the Peyer's patch in *Escherichia coli* diarrhea in the rabbit. **J Clin Invest.**, v.71, p. 1-8, 1983.

INIESTA, V.; GOMEZ-NIETO, L. C.; CORRALIZA, I. The inhibition of arginase by N-hydroxy-L-arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages. **J. Exp. Med.**, v. 193, p. 777-783, 2001.

JANEWAY, C. A. JR. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. **Immunol. Today**, v. 13, p. 11–16, 1992.

JANEWAY, C. A. JR; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 20, p. 197-216, 2002.

JAUMOUILLÉ, V.; GRINSTEIN, S. Receptor mobility, the cytoskeleton, and particle binding during phagocytosis. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 23, p. 22-29, 2011.

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.

KAISER, F., O'GARRA, A. Cytokines and macrophages and dendritic cells: key modulators of immune responses. In: RUSSEL, D. G.; GORDON, S. **Phagocyte-pathogen interaction- macrophages and the host response to infection**. ASM Press, 2009. p. 281-299.

KAKISHIMA, K.; SHIRATSUCHI, A.; TAOKA, A.; NAKANISHI, Y.; FUKUMORI, Y. Participation of nitric oxide reductase in survival of *Pseudomonas aeruginosa* in LPS-activated macrophages. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 355, p. 587-591, 2007.

KALMAN, D.; WEINER, O. D.; GOOSNEY, D. L.; SEDAT, J. W.; FINLAY, B. B.; A. B. O, A.; BISHOP, J. M. Enteropathogenic *E. coli* acts through WASP and Arp2/3 complex to form actin pedestals. **Nat. Cell Biol.**, v. 1, p. 389-391, 1999.

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.

KARLINSEY, J. E.; BANG, I. S.; BECKER, L. A.; FRAWLEY, E. R, PORWOLLIK, S.; ROBBINS, H. F.; THOMAS, V. C.; URBANO, R.; McCLELLAND, M.; FANG, F. C. The NsrR regulon in nitrosative stress resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Mol. Microbiol.**, v. 85, 1179-1193, 2012.

KAWAMURA, T.; BLUMENSCHN, W. M.; MATTSON, J.; BASHAM, B.; EDGWICK, J. D.; MCCLANAHAN, T.; KASTELEIN, R. A.; CUA, D. J. Critical role of NK1 T cells in IL-12 induced immune responses in vivo. **J. Immunol.**, v. 160, p. 16-19, 1998.

KENDALL, H.; MARSHALL, R.; BARTOLD, P. M. Nitric Oxide and tissue destruction. **Oral Dis.**, v. 7, p. 2-10, 2001.

KENNY, B.; LAI, L. C.; FINLAY, B. B.; DONNENBERG, M. S. EspA, a protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli*, is required to induce signals in epithelial cells. **Mol Microbiol.**, v. 20, p. 313-323, 1996.

KENNY, B.; DeVINNEY, R.; STEIN, M.; REINSCHN, 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, 1997.

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.

KENNY, B.; JEPSON, M. Targeting of an enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) effector protein to host mitochondria. **Cell. Microbiol.**, v. 2, p.579–590, 2000.

KENNY, B.; ELLIS, S.; LEARD, A. D.; WARAWA, J.; MELLOR, H.; JEPSON, M. A. Co-ordinate regulation of distinct host cell signaling pathways by multifunctional enteropathogenic *Escherichia coli* effector molecules. **Mol. Microbiol.**, v. 44, p. 1095-1107, 2002.

KERNÉIS, S.; BOGDANOVA, A.; KRAEHENBUHL, J. P.; PRINGAULT, E. Conversion by Peyer's patch lymphocytes of human enterocytes into M cells that transport bacteria. **Science**, v. 277, p; 949-952, 1997.

KIM, J. M.; KIM, J. S.; JUNG, H. C.; SONG, I. S.; KIM, C. Y. Up-regulation of inducible nitric oxide synthase and nitric oxide in *Helicobacter pylori*-infected human gastric epithelial cells: possible role of interferon-gamma in polarized nitric oxide secretion. **Helicobacter**., v. 2, p. 116-128, 2002.

KLEMM, P.; CHRISTIANSEN, G.; Three fim genes required for the regulation of length and mediation of adhesion of *escherichia coli* type 1 fimbriae. **Mol. Gen. Genet.**, v. 208, p. 439-445, 1987.

KNODLER, L. A.; CELLI, J.; FINLAY, B. B. Pathogenic trickery: deception of host cell processes. **Nat. Rev. Molec. Cell Biol.**, v. 2, p. 578-588, 2001.

KNUTTON, S.; ROSENSHINE, I.; PALLÉN, M. J.; NISAN, I.; NEVES, B. C.; BAIN, C.; WOLFF, C.; DOUGAN, G.; FRANKEL, G. A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. **EMBO J.**, v. 17, p. 2166-2176, 1998.

KOHEN, R.; NYSKA, A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. **Toxicol Pathol.**, v. 30, p. 620-650, 2002.

KOUL, A.; HERGET, T.; KLEBL, B.; ULLRICH A. Interplay between mycobacteria and host signalling pathways. **Nat. Rev. Microbiol.**, v.2, p.189-202, 2004.

KROGFELT, K. A.; BERGMANS, H.; KLEMM, P. Direct evidence that the FimH protein is the mannose-specific adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae. **Infect. Immun.**, v. 58, p. 1995-1998, 1990.

LAHIRI, A.; DAS, P.; CHAKRAVORTTY, D. Arginase modulates *Salmonella* induced nitric oxide production in RAW264.7 macrophages and is required for *Salmonella* pathogenesis in mice model of infection. **Microbes Infect.**, v. 10, p. 1166-1174, 2008.

LEBEIS, S. L.; SHERMAN, M. A.; KALMAN, D. Protective and destructive innate immune responses to enteropathogenic *Escherichia coli* and related A/E pathogens. **Future Microbiol.**, v. 3, p. 315-328, 2008.

LEE, C. C.; AVALOS, A. M.; PLOEGH, H. L. Accessory molecules for *Toll-like* receptors and their function. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 12, p. 168-179, 2012.

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

LIEW, F. Y.; COX, F. E., Non specific defense mechanism: the role of nitric oxide. **Immunol. Today**, v.12, p. A17–A23. 1991.

LI, J.; BILLIAR, T. R. The role of nitric oxide in apoptosis. **Semin. Perinatol.**, v. 24, p. 46-50, 2000.

LIMPENS, E.; IVANOV, S.; VAN ESSE, W.; VOETS, G.; FEDOROVA, E.; BISSELING, T.; Medicago N2-fixing symbiosomes acquire the endocytic identity marker Rab7 but delay the acquisition of vacuolar identity. **Plant Cell.**, v. 21, p. 2811-2828, 2009.

LIRK, P.; HOFFMANN, G.; RIEDER, J. Inducible nitric oxide synthase – time for reappraisal. **Curr. Drug Targets.**, v. 1, p. 89-108, 2002.

LIU, L. A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. **Nature**, v. 410, p. 490–494, 2001.

LIU, L.; JOHNSON, H. L.; COUSENS, S.; PERIN, J.; SCOTT, S.; LAWN, J. E.; RUDAN, I.; CAMPBELL, H.; CIBULSKIS, R.; LI, M.; MATHERS, C.; BLACK, R. E.; CHILD HEALTH EPIDEMIOLOGY REFERENCE GROUP OF WHO AND UNICEF. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. **Lancet**, v. 379, p. 2151–2161, 2012.

LIU, X.; CHEN, B.; CHEN, L.; REN, W. T.; LIU, J.; WANG, G.; FAN, W.; WANG, X.; WANG, Y. U-shape suppressive effect of phenol red on the epileptiform burst activity via activation of estrogen receptors in primary hippocampal culture. **PLoS One.**, v. 8, e60189, 2013.

LOMBARDI, D.; SOLDATI, T.; RIEDERER, M. A.; GODA, Y.; ZERIAL, M.; PFEFFER, S. R. Rab9 functions in transport between late endosomes and the trans Golgi network. **EMBO J.** v. 12, p. 677-682, 2012.

LYONS, C. R., ORLOFF, G. J.; CUNNINGHAM, J. M. Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. **J. Biol. Chem.**, v. 267, 6370–6374, 1992.

MA, J.; CHEN, T.; MANDELIN, J.; CEPONIS, A.; MILLER, N. E.; HUKKANEN, M.; MA, G. F. Regulation of macrophage activation. **Review. Cell. Mol. Life. Sci.**, v. 60,

p. 2334-2346, 2003.

MACIEJEWSKI, J. P.; SELLERI, C.; SATO, T.; CHO, H. J.; KEEFER, L. K.; NATHAN, C. F.; YOUNG, N. S. Nitric oxide suppression of human hematopoiesis in vitro. Contribution to inhibitory action of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. **J. Clin. Inves.**, v. 96, p. 1085–1092, 1995.

MAHIDA, Y. R. The key role of macrophages in the immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. **Inflamm. Bowel. Dis.**, v. 6, p. 21-33, 2000.

MAHON, B. P.; MILLS, K. H. G. Interferon- γ mediated immune effector mechanisms against *Bordetella pertussis*. **Immunol. Lett.**, v. 68, p. 231-217, 1999.

MAHONEY, J. C.; GERDING, M. J.; JONES, S. H.; WHISTLER, C. A. Comparison of the pathogenic potentials of environmental and clinical *Vibrio parahaemolyticus* strains indicates a role for temperature regulation in virulence. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 22, p. 7459-7465, 2010.

MALAVIYA, R.; GAO, Z.; THANKAVEL, K.; VAN DER MERWE P. A.; ABRAHAM S.N. The mast cell tumor necrosis factor alpha response to FimH-expressing *Escherichia coli* is mediated by the glycosylphosphatidylinositol-anchored molecule CD48. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 14, p. 8110-8115, 1999.

MALLADI, V.; PUTHENEDAM, M.; WILLIAMS, P. H.; BALAKRISHNAN, A. Enteropathogenic *Escherichia coli* outer membrane proteins induce iNOS by activation of NF-kappaB and MAP kinases. **Inflammation.**, v. 6, p. 345-353, 2004.

MANTOVANI, A.; SICA, A.; LOCATI, M. New vistas on macrophage differentiation and activation. **Eur. J. Immunol.**, v. 37, p. 14-16, 2007.

MARCHÈS, O.; COVARELLI, V.; DAHAN, S.; COUGOULE, C.; BHATTA, P.; FRANKEL, G.; CARON, E. EspJ of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* inhibits opsono-phagocytosis. **Cell. Microbiol.**, v. 10, p. 1104-1115, 2008.

MARESCA, M.; MILLER, D.; QUITARD, S.; DEAN, P.; KENNY, B. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) effector-mediated suppression of antimicrobial nitric oxide production in a small intestinal epithelial model system. **Cell Microbiol.**, v. 7, p. 1749-1762, 2005.

MARIM, F. M.; SILVEIRA, T. N.; LIMA, D. S. Jr.; ZAMBONI, D. S. A method for generation of bone marrow-derived macrophages from cryopreserved mouse bone marrow cells. **PLoS One**, v. 5, p. e15263, 2010.

MARTINEZ-ARGUDO, I.; JEPSON, M. A. *Salmonella* translocates across an in vitro M cell model independently of SPI-1 and SPI-2. **Microbiology**, v. 154, p. 3887-3894, 2008.

MARTINEZ, O.; SCHMIDT, A.; SALAMÉRO, J.; HOFLACK, B.; ROA, M.; GOUD, B. The small GTP-binding protein rab6 functions in intra-Golgi transport. **J. Cell Biol.** v. 127, p. 1603-1616, 1994.

MARODI, L. Innate cellular immune responses in newborns. **Clin. Immunol.**, v. 118, p. 137 – 144, 2006.

MARSHALL, H. E.; MERCHANT, K.; STAMLER, J. S. Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression. **FASEB J.**, v. 14, p. 1889-1900, 2000.

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. USA**, v. 92, p. 1664-1668, 1995.

MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; MCCAIG, L. F.; BRESEE, J. S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. Food-related illness and death in the United States. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 5, p.607-25, 1999.

MELO, K. C. M. ***Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) atípica sorotipo O55:H7: descrição da antifagocitose a partir de um fator secretado.** 2010. 112 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

MESCHER, A. L.; NEFF, A. W. Regenerative capacity and the developing immune system. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.**, v. 93, p. 39-66, 2005.

MISHRA, S.; IMLAY, J. Why do bacteria use so many enzymes to scavenge hydrogen peroxide? **Arch. Biochem. Biophys.** v. 525, p. 145-60, 2012.

MIZEL, S. B.; HONKO, A. N.; MOORS, M. A.; SMITH, P. S.; WEST, A. P. Induction of macrophage nitric oxide production by Gram-negative flagellin involves signaling via heteromeric *Toll-like* receptor 5/Toll-like receptor 4 complexes. **J. Immunol.**, v. 12, p. 6217-6223, 2003.

MOL, O.; OUDEGA, B. Molecular and structural aspects of fimbriae biosynthesis and assembly in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 19, p. 25-52, 1996.

MONCADA, S.; PALMER, R.; HIGGS, E. Nitric Oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, v. 43, p.109-142, 1991.

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.

MORENO, A. C. R.; FERNANDES-FILHO, A.; GOMES, T. A. T.; RAMOS, S. T. S.; MONTEMOR, L. P. G.; TAVARES, V. C.; SANTOS-FILHO, L.; IRINO, K.; MARTINEZ, M. B. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 66, p. 50-57, 2010.

MORRIS, S. M. JR. Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. **Annu. Rev. Nutr.**, v.22, p. 87-105, 2002.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods.**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MUNDER, M.; EICHMANN, K.; MODOLELL, M. Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4⁺ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. **J Immunol.**, v.11, p. 5347-54, 1998.

MUNDER, M.; EICHMANN, K.; MORÁN, J. M.; CENTENO, F.; SOLER, G.; MODOLELL, M. Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. **J Immunol.**, v. 7, p. 3771-3777, 1999.

MUZIO, M.; MANTOVANI, A. *Toll Like* receptors. **Microbes Infect.**, v. 3, p. 251-255, 2000.

NAGAI, T.; ABE, A.; SASAKAWA, C. Targeting of enteropathogenic *Escherichia coli* EspF to host mitochondria is essential for bacterial pathogenesis : critical role of the 16th leucine residue in EspF. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 2998-3011, 2005.

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

NATHAN, C.; SHILOH, M. U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 97, p. 8841-8848, 2000.

NAVARRO-GARCIA F, SERAPIO-PALACIOS A, UGALDE-SILVA P, TAPIA-PASTRANA G, CHAVEZ-DUEÑAS L. Actin cytoskeleton manipulation by effector proteins secreted by diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes. **Biomed Res Int.**, p. 1-22, 2013.

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.

NIELSEN, E., SEVERIN, F., BACKER, J. M., HYMAN, A. A. & ZERIAL, M. Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules. **Nat. Cell Biol.**, v. 1, p. 376–382, 1999.

NOGUEIRA, N.; COHN, Z. *Trypanosoma cruzi*: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. **Exp. Med.**, v. 143, p. 1402-1420, 1976.

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.

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.

ORLANDI, P. P.; MAGALHÃES, C. F.; MATOS, N. B.; NOGUEIRA, P. A.; DA SILVA, L. H. P. Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho (Rondônia, Western Amazon region, Brazil). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 39, p. 507-517, 2006.

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.

PEARSON, R. D.; SYMES, P.; CONBOY, M.; WEISS, A. A.; HEWLETT, E. L. Inhibition of monocyte oxidative responses by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. **J. Immunol.**, v. 139, p. 2749-2754, 1987.

PELAYO, J. S.; SCALETSKY, I. C.; PEDROSO, M. Z.; SPERANDIO, V.; GIRON, J. A.; FRANKEL, G.; TRABULSI, L. R. Virulence properties of atypical EPEC strains. **J. Med. Microbiol.**, v. 48, p. 41-49, 1999.

PERRET, E.; LAKKARAJU, A.; DEBORDE, S.; SCHREINER, R.; RODRIGUEZ-BOULAN, E. Evolving endosomes: how many varieties and why? **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 17, p. 423-434 2005.

PITT, A.; MAYORGA, L. S.; STAHL, P. D.; SCHWARTZ, A. L. Alterations in the protein composition of maturing phagosomes. **J. Clin. Invest.**, v. 90, p. 1978-1983, 1992.

POIRIER, K.; FAUCHER, S. P.; BÉLAND, M.; BROUSSEAU, R.; GANNON, V.; MARTIN, C.; HAREL, J.; DAIGLE, F. *Escherichia coli* O157:H7 Survives within Human Macrophages: Global Gene Expression Profile and Involvement of the Shiga Toxins. **Infect. Immunol.**, v. 76, p. 4814-4822, 2008.

POLLOCK, K. G.; CONACHER, M.; WEI, X. G.; ALEXANDER, J.; BREWER, J. M. Interleukin-18 plays a role in both the alum-induced T helper 2 response and the T helper 1 response induced by alum-adsorbed interleukin-12. **Immunology.**, v. 108, p. 137-143, 2003.

POLTORAK, A.; HE, X.; SMIRNOVA, I.; LIU M. Y.; VAN HUFFEL, C.; DU, X.; BIRDWELL, D.; ALEJOS, E.; SILVA, M.; GALANOS, C.; FREUDENBERG, M.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; LAYTON, B.; BEUTLER, B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. **Science** v.282, p. 2085-2088, 1998.

POOCK, S. R.; LEACH, E. R.; MOIR, J. W. B.; COLE, J. A.; RICHARDSON, D. J. Respiratory denitrification of nitric oxide by the cytochrome c nitrite reductase of *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 23664-23669, 2002.

POOLE, R. K.; HUGHES, M. N. New functions for the ancient globin family: bacterial responses to nitric oxide and nitrosative stress. **Mol. Microbiol.**, v. 36, p. 775-783, 2000.

QUITARD, S.; DEAN, M.; MARESCA, M.; KENNY, B. The enteropathogenic *Escherichia coli* EspF effector molecule inhibits PI-3 kinase-mediated uptake independently of mitochondrial targeting. **Cell. Microbiol.**, v. 8, p. 972-981, 2006.

RABINOVITCH, M. Professional and non-professional phagocytes: an introduction. **Trends**. v. 5, p. 85-87, 1995.

RAMARAO, N.; GRAY-OWEN, S. D.; BACKERT, S.; MEYER, T. F. *Helicobacter pylori* inhibits phagocytosis by professional phagocytes involving type IV secretion components. **Mol. Microbiol.**, v. 37, p. 1389–1404, 2000.

RAVETCH, J. V.; KINET, J. P. Fc receptors. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 9, p. 457–492, 1991.

REISS, C. S.; KOMATSU, T. Does nitric oxide play a critical role in viral infections. **J. Virol.**, v. 72, p. 4547-4551, 1998.

RICH, J.; BORTON, A.; WANG, X. Transforming growth factor- β signaling I cancer. **Microsc. Res. Tech.**, v. 52, p. 363-373, 2001.

RIEDERER, M. A.; SOLDATI, T.; SHAPIRO, A. D.; LIN, J.; PFEFFER, S. R. Lysosome biogenesis requires rab9 function and receptor recycling from endosomes to the trans-Golgi network. **J. Cell Biol.**, v. 125, p. 573-582, 1994.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V. **Patologia estrutural e funcional**. 5. ed. Editora Guanabara Koogan, 1996.

ROBERTS, C. L.; KEITA, A. V.; DUNCAN, S. H.; O'KENNEDY, N.; SÖDERHOLM J. D.; RHODES, J. M.; CAMPBELL, B. J. Translocation of Crohn's disease *Escherichia coli* across M-cells: contrasting effects of soluble plant fibres and emulsifiers. **Gut**, v.59, p.1331-1339, 2010.

ROBINSON, J. L.; BRYNILDSEN, M. P. A Kinetic platform to determine the fate of nitric oxide in *Escherichia coli*. **PLoS Comput. Biol.**, v. 9, p. e1003049, 2013.

ROCHA, S. P.; ELIAS, W. P.; CIANCIARULLO, A. M.; MENEZES, M. A.; NARA, J. M.; PIAZZA, R. M.; SILVA, M. R.; MOREIRA, C. G.; PELAYO, J. S. Aggregative adherence of uropathogenic *Proteus mirabilis* to cultured epithelial cells. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 51, p. 319-326, 2007.

RODRIGUES, J.; SCALETSKY, I. C. A.; CAMPOS, L. C.; GOMES, T. A. T.; WHITTAM, T. S.; TRABULSI, L. R. Clonal structure and virulence factors in strains of *Escherichia coli* of the Classic Serogroup O55. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 2680-2686, 1996.

ROOIJAKKERS, S. H.; KESSEL, K. P.; STRIJP, J. A. Staphylococcal innate immune evasion. **Trends Microbiol.**, v. 13, p. 596-601, 2005.

ROSENSHINE, I.; RUSCHKOWSKI, S.; FINLAY, B. B. Expression of attaching/effacing activity by enteropathogenic *Escherichia coli* depends on growth phase, temperature, and protein synthesis upon contact with epithelial cells. **Infect Immun.** v. 64, p. 966-973, 1996.

ROSQVIST, R.; BOLIN, I.; WOLF-WATZ, H. Inhibition of phagocytosis in *Yersinia pseudotuberculosis*: a virulence plasmid-encoded ability involving the Yop2b protein. **Infect. Immun.**, v. 56, p. 2139-2143, 1988.

ROSQVIST, R.; FORSBERG, A.; RIMPILAINEN, M.; BERGMAN, T.; WOLF-WATZ, H. The cytotoxic protein YopE of *Yersinia* obstructs the primary host defence. **Molec. Microbiol.**, v. 4, p. 657-667, 1990.

ROTHER, H.; KOLB, H. Strategies of protection from nitric oxide toxicity in islets inflammation. **J. Mol. Med.**, v. 77, p. 40-44, 1999.

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.

SACKS D1, NOBEN-TRAUTH N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nat Rev Immunol.**, v. 2, p. 845-858, 2002.

SAEFTTEL, M.; FLEISCHER, B.; HOERAUF, A. Stage-dependent role of nitric oxide in control of *Trypanosoma cruzi* infection. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 2252-2259, 2001.

SAMBA-LOUAKA, A.; NOUGAYRÈDE, J. P.; WATRIN, C.; OSWALD, E.; TAIEB, F. The enteropathogenic *Escherichia coli* effector Cif induces delayed apoptosis in epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 77, p. 5471-5477, 2009.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor, 1989.

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.

SANSONETTI, P. J. War and peace at the intestinal epithelial surface. **Nat Rev Immunol.**, v. 4, p. 953-964, 2004.

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.

SEYLER, R. W. JR, OLSON, J. W. MAIER, R. J. Superoxide dismutase-deficient mutants of *Helicobacter pylori* are hypersensitive to oxidative stress and defective in host colonization. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 4034-4040, 2001.

SHAMES S.R.; DENG, W.; GUTTMAN, J.A.; DE HOOG, C.L.; LI, Y.; HARDWIDGE P.R.; SHAM, H.P.; VALLANCE, B.A.; FOSTER, L.J.; FINLAY, B.B. The pathogenic *E. coli* type III effector EspZ interacts with host CD98 and facilitates host cell prosurvival signalling. **Cell Microbiol.** v. 12, p. 1322-1339, 2010.

SHAO, F.; VACRATISIS, P. O.; BAO, Z.; BOWERS, K. E.; FIERKE, C. A.; DIXON, J. E. Biochemical characterization of the *Yersinia* YopT protease: cleavage site and recognition elements in Rho GTPases. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 100, p. 904-909, 2003.

SHIMAZU, R.; AKASHI, S.; OGATA, H.; NAGAI, Y.; FUKUDOME, K.; MIYAKE, K.; KIMOTO, M. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. **J. Exp. Med.**, v. 189, p. 1777-1782, 1999.

SHIMIZU, T.; TSUTSUKI, H.; MATSUMOTO, A.; NAKAYA, H.; NODA, M. The nitric oxide reductase of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* plays an important role for the survival within macrophages. **Mol. Microbiol.**, v. 85, p. 492-512, 2012.

SINAI, A. P.; JOINER, K. A. Safe haven: the cell biology of nonfusogenic pathogen vacuoles. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 51, p. 415-462, 1997.

SMITH, A. C.; HEO, W. D.; BRAUN, V.; JIANG, X.; MACRAE, C.; CASANOVA, J. E.; SCDMORE, M. A.; GRINSTEIN, S.; MEYER, T.; BRUMELL, J. H. A network of Rab GTPases controls phagosome maturation and is modulated by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **J. Cell Biol.**, v. 176, p. 263-268, 2007.

SMITH, H.; SCOTLAND, S.; CHEASTY, T.; WILLSHAW, G.; ROWE, B. Enteropathogenic *Escherichia coli* infections in the United Kingdom. **Rev. Microbiol.**, v. 27, p. 45-49, 1996.

STEMPIN, C.; GIORDANENGO, L.; GEA, S.; CERBÁN, F. Alternative activation and increase of *Trypanosoma cruzi* survival in murine macrophages stimulated by cruzipain, a parasite antigen. **J. Leukoc. Biol.**, v. 72, p. 727-734, 2002.

STERN, A. M.; HAY, A. J.; LIU, Z.; DESLAND, F. A.; ZHANG, J.; ZHONG, Z.; ZHU, J. The NorR regulon is critical for *Vibrio cholerae* resistance to nitric oxide and sustained colonization of the intestines. **M. Bio.**, v. 17, p. 13-12, 2012.

STEVANIN, T. M.; MOIR, J. W.; READ, R. C. Nitric oxide detoxification systems enhance survival of *Neisseria meningitidis* in human macrophages and in nasopharyngeal mucosa. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 3322-3329, 2005.

STEVANIN, T. M.; READ, R. C.; POOLE, R. K. The hmp gene encoding the NO-inducible flavohaemoglobin in *Escherichia coli* confers a protective advantage in resisting killing within macrophages, but not in vitro: links with swarming motility. **Gene**, v. 1-2, p. 62-68, 2007.

STOSSEL, T. P. The early history of phagocytosis. In: **Phagocytosis and pathogens: the host**. Stamford: Ed. Gordon S., 1999. p. 3-18.

SURESH, A.; SODHAI, A. Production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by bone marrow-derived macrophages: effect of cisplatin and lipopolysaccharide. **Immun. Letters**, v. 30, p. 93-100, 1991.

SVENSSON, L.; MARKLUND, B. I.; POLJAKOVIC, M.; PERSSON, K. Uropathogenic *Escherichia coli* and tolerance to nitric oxide: the role of flavohemoglobin. **J. Urol.**, v. 175, p. 749-753, 2006.

SWANSON, J. A.; BAER, S. C. Phagocytosis by zippers and triggers. **Trends Cell Biol.**, v. 5, p. 89-93, 1995.

TACCHINI-COTTIER, F.; WEINKOPFF, T.; LAUNOIS, P. Does T Helper Differentiation Correlate with Resistance or Susceptibility to Infection with *L. major*? Some Insights From the Murine Model. **Front Immunol.**, v. 27; 00032.e, 2012.

TAYLOR, K. A.; LUTHER, P. W.; DONNENBERG, M. S. Expression of the EspB protein of enteropathogenic *Escherichia coli* within HeLa cells affects stress fibers and cellular morphology. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 120-125, 1999.

TEWARI, R.; MACGREGOR, J. I.; IKEDA, T.; LITTLE, J. R.; HULTGREN, S. J.; ABRAHAM, S. N. Neutrophil activation by nascent FimH subunits of type 1 fimbriae purified from the periplasm of *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.**, v. 4, p. 3009-3015, 1993.

THAKKER, M.; PARK, J. S.; CAREY, V.; LEE, J. C. *Staphylococcus aureus* serotype 5 capsular polysaccharide is antiphagocytic and enhances bacterial virulence in a murine bacteremia model. **Infect. Immun.**, v.66, p. 5183-5189, 1998.

THANABALASURIAR, A.; KOUTSOURIS, A.; WEFLEN, A.; MIMEE, M.; HECHT, G.; GRUENHEID, S. The bacterial virulence factor NleA is required for the disruption of intestinal tight junctions by enteropathogenic *Escherichia coli*. **Cell Microbiol.**, v. 12, p. 31-41, 2010.

THAPAR, N.; SANDERSON, I. R. Diarrhoea in children: an interface between developing and developed countries. **Lancet**, v. 363, p. 641-653, 2004.

TIPPING, P. G. Toll-Like receptors: The interface between Innate and Adaptive Immunity. **J Am. Soc. Nephrol.**, v. 17, p. 1769-1771, 2006.

TISDALE, E. J.; BOURNE, J. R.; KHOSRAVI-FAR, R.; DER, C. J.; BALCH, W. E. GTP-binding mutants of rab1 and rab2 are potent inhibitors of the vesicular transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex. **J. Cell Biol.**, v. 119, p. 749-761, 1992.

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

TRIPATHI, P.; TRIPATHI, P.; KASHYAP, L.; SINGH, V. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 51, p. 443-452, 2007.

TRÜLZSCH, K.; GEGINAT, G.; SPORLEDER, T.; RUCKDESCHEL, K.; HOFFMANN, R.; HEESEMANN, J.; RÜSSMANN, H. *Yersinia* outer protein P inhibits CD8 T cell priming in the mouse infection model. **J. Immunol.**, v. 174, p. 4244-4251, 2005.

TUCKER, N. P.; AUTREAU, B. D.; SPIRO, S.; DIXON, R. Mechanism of transcriptional regulation by the *Escherichia coli* nitric oxide sensor NorR. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 34, p.191-194, 2005.

UNDERHILL, D. M.; OZINSKY, A. Phagocytosis of Microbes: Complexity in action. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 20, p. 825-852, 2002.

UNDERHILL, D. M.; GOODRIDGE, H. S. The many faces of ITAMs. **Trends Immunol.**, v. 28, p. 66-73, 2007.

UNICEF (United Nations Children's Fund). Diarrhoea: Why children are still dying and what can be done. New York: UNICEF, 2009.

UNICEF (United Nations Children's Fund). Pneumonia and Diarrhoea: Tackling the deadliest diseases for the world's poorest children. New York: UNICEF, 2012.

VAN DER SLUIJS, P.; HULL, M.; WEBSTER, P.; MÂLE, P.; GOUD, B.; MELLMAN, I. The small GTP-binding protein rab4 controls early sorting event on the endocytic pathway. **Cell**. v. 70, p. 729-740, 1992.

VAN WONDEREN, J. H.; BURLAT, B.; RICHARDSON, D. J.; CHEESMAN, M. R.; BUTT, J. N. The nitric oxide reductase activity of cytochrome c nitrite reductase from *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.**, v. 283, p. 9587-9594, 2008.

VAN'T HOF, R. J.; RALSTON, S. H. Nitric Oxide and bone. **Immunology.**, v.103, p. 255-261, 2001.

VAZQUEZ-TORRES, A. *Salmonella* pathogenicity island 2-dependent evasion of the phagocyte NADPH oxidase. **Science**. v. 287, p. 1655-1658, 2000.

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, O. V.; BUCCI, C.; HARRISON, R. E.; TRIMBLE, W. S.; LANZETTI, L.; GRUENBERG, J.; SCHREIBER, A. D. STAHL, P. D.; GRINSTEIN, S. Modulation of Rab5 and Rab7 recruitment to phagosomes by phosphatidylinositol 3-kinase. **Mol. Cell Biol.**, v. 23, p. 2501-2514, 2003.

VINE, C. E.; COLE, J. A. Nitrosative stress in *Escherichia coli*: reduction of nitric oxide. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 39, p. 213-215, 2011.

VOEGEL, U.; WEINBERGER, A.; FRANK, R.; MULLER, A.; KOHL, J.; ATKINSON, J. P.; FROSCHE, M. Complement factor C3 deposition and serum resistance in isogenic capsule and lipooligosaccharide sialic acid mutants of serogroup B *Neisseria meningitidis*. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 4022–4029, 1997.

WALKER, C. L.; RUDAN, I.; LIU, L.; NAIR, H.; THEODORATOU, E.; BHUTTA, Z. A.; O'BRIEN, K. L.; CAMPBELL, H.; BLACK, R. E. Global burden of childhood pneumonia and diarrhea. **Lancet**, v. 381, p. 1405-1416, 2013.

WIEDERMANN, A.; LINDER, S.; GRASSL, G.; ALBERT, M.; AUTENRIETH, I.; ALPFELBACHER, M. *Yersinia enterocolitica* invasin triggers phagocytosis via 1 integrins, CDC42Hs and WASp in macrophages. **Cell. Microbiol.**, v. 3, p. 693–702, 2001.

WILSON, K. T., RAMANUJAM, K. S.; MOBLEY, H.L.; MUSSELMAN R.F.; JAMES, S.P.; MELTZER, S.J. *Helicobacter pylori* stimulates inducible nitric oxide synthase expression and activity in a murine macrophage cell line. **Gastroenterology.**, v.6, p.1524-1533,1996.

WITTHÖFT, T.; ECKMANN, L.; KIM, J. M.; KAGNOFF M. F. Enteroinvasive bacteria directly activate expression of iNOS and NO production in human colon epithelial cells **Am. J. Physiol.**, v. 3, p. 564-571, 1998.

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, A. R.; CLEMENTS, A.; RAYMOND, B.; CREPIN, V. F.; FRANKEL, G.; The interplay between the *Escherichia coli* Rho guanine nucleotide exchange factor effectors and the mammalian RhoGEF inhibitor EspH. **MBio.**, v. 3, p. 1-10, 2012.

WU, G.; MORRIS, S. M. JR. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. **Biochem J.**, v. 336, p. 1-17, 1998.

XIAO, H.; KALMAN, M.; IKEHARA, K.; ZEMEL, S.; GLASER, G.; CASHEL, M. Residual guanosine 3', 5'- bispyrophosphate synthetic activity of *relA* null mutants can be eliminated by *spoT* null mutations. **J. Biol. Chem.**, v. 266, n.9, p. 5980-5990, 1991.

XIE, Q. W.; CHO, H. J.; CALAYCAY, J.; MUMFORD, R. A.; SWIDEREK, K. M.; LEE, T. D.; DING, A.; TROSO, T.; NATHAN, C. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. **Science**, v. 256, p. 225-228, 1992.

ZAMBONI, D. S.; RABINOVITCH, M. Phagocytosis of Apoptotic Cells Increases the Susceptibility of Macrophages to Infection with *Coxiella burnetii* Phase II through Down-Modulation of Nitric Oxide Production. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 2075-2080, 2004.

ZHU, Y.; ZHANG, X.; ZHU, J.; ZHAO, Q.; LI, Y.; LI, W.; FAN, C.; HUANG, Q. Cytotoxicity of phenol red in toxicity assays for carbon nanoparticles. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 13, p. 12336-12348, 2012.