

Fernanda Batista de Andrade

**Interação da Serino Protease SepA de *Escherichia coli*
Enteroaggregativa com Células Epiteliais *in vitro*.**

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

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Dr. Waldir Pereira Elias Junior

Coorientadora: Dra. Roxane Maria Fontes Piazza

Versão Corrigida

**São Paulo
2019**

RESUMO

ANDRADE, F. B. **Interação da serino protease SepA de *Escherichia coli* enteroaggregativa com células epiteliais *in vitro*.** 2019. 201 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Escherichia coli enteroaggregativa (EAEC) é definida como o patótipo de *E. coli* diarreogênica que apresenta o padrão de adesão agregativo em células epiteliais. Após a colonização na mucosa intestinal, EAEC secreta diversas enterotoxinas e citotoxinas, dentre elas as proteínas denominadas serino proteases autotransportadoras de Enterobacteriaceae (SPATEs), classificadas em classe-1 (citotóxicas) e classe-2 (imunomoduladoras). SepA (*Shigella extracelular protein A*) é uma SPATE de 110 kDa de classe-2, que foi originalmente descrita em *Shigella flexneri* 5a e posteriormente em EAEC. A presença do gene *sepA* é um marcador associado à diarreia causada por EAEC, indicando que esta toxina tem um importante papel na sua patogênese. Entretanto, estudos caracterizando SepA como fator de virulência são restritos a *S. flexneri*. Nessa espécie, SepA participa da destruição e invasão do tecido epitelial, mas não apresenta efeito citotóxico em células HEp-2. No entanto, desestabiliza a integridade das junções oclusivas em células T84 polarizadas, através da ativação da cofilina. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivos avaliar a prevalência de *sepA* em uma coleção de EAEC isolada no Brasil, purificar SepA e analisar sua interação com as linhagens Caco-2, HEp-2, HeLa, HT-29, MDCK, Vero e Y-1, bem como a sua capacidade de induzir interleucinas em células HT-29. O gene *sepA* foi detectado em 13,5% das 193 cepas de EAEC e foi significativamente associado ao subgrupo de EAEC atípicas. SepA foi purificada em sua forma nativa a partir da cepa de *S. flexneri* 5a M90T, mostrando atividade biológica de serino protease. SepA causou alterações morfológicas nas células HeLa e HT-29, induzidas pela sua ligação à membrana dessas células, sem que ocorresse internalização. Os mesmos efeitos foram causados pela interação da cepa de EAEC produtora de SepA (BA732::pic) e a secreção dessa SPATE foi observada no foco de adesão das bactérias às células epiteliais. As alterações morfológicas em HeLa e HT-29 não levou à morte celular. SepA também foi capaz de induzir a produção de IL-8 nas células HT-29. Nossos dados indicam que, tal como em *Shigella*, SepA é um importante fator de virulência de EAEC, uma vez que induz efeito citopático e pró-inflamatório em células de origem intestinal humana, alterações sabidamente promovidas por EAEC em modelos experimentais.

Palavras-chave: *Escherichia coli*. *Shigella*. Citotoxina. Proteinases. Células epiteliais.

ABSTRACT

ANDRADE, F. B. **Interaction of the serine protease SepA of enteroaggregative *Escherichia coli* with epithelial cells *in vitro*.** 2019. 201 f. Ph.D. Thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) is defined as the pathotype of diarrheagenic *E. coli* that presents the aggregative adherence pattern on epithelial cells. After colonization of the intestinal mucosa, EAEC secretes several enterotoxins and cytotoxins, among them the proteins called serine proteases autotransporters of Enterobacteriaceae (SPATEs), classified in class-1 (cytotoxic) and class-2 (immunomodulatory). SepA (*Shigella* extracellular protein A) is a SPATE of 110 kDa class-2, which was originally described in *Shigella flexneri* 5a and later in EAEC. The presence of the *sepA* gene is a marker associated with diarrhea caused by EAEC, indicating that this toxin plays an important role in its pathogenesis. However, studies characterizing SepA as a virulence factor are restricted to *S. flexneri*. In this species, SepA participates in the destruction and invasion of epithelial tissue but has no cytotoxic effect on HEp-2 cells. However, it destabilizes the integrity of the tight junctions in polarized T84 cells, through the activation of the cofilin. Thus, the present study aimed to evaluate the prevalence of the *sepA* in a collection of EAEC isolated in Brazil, to purify SepA and to analyze its interaction with the Caco-2, HEp-2, HeLa, HT-29, MDCK, Vero and Y-1, as well as their ability to induce interleukins in HT-29 cells. The *sepA* gene was detected in 13.5% of the 193 EAEC strains and was significantly associated with the atypical EAEC subgroup. SepA was purified from *S. flexneri* M90T in its native form, showing biological activity of serine protease. SepA caused morphological changes in HeLa and HT-29 cells, induced by its binding to the membrane of these cells, without its internalization. The same effects were caused by the interaction of the SepA-producing EAEC strain (BA732:: pic) and the secretion of this SPATE was observed in the focus of bacterial adhesion on epithelial cells. The morphological changes in HeLa and HT-29 did not lead to cell death. SepA was also able to induce IL-8 production in HT-29 cells. Our data indicate that, as in *Shigella*, SepA is an important virulence factor of EAEC, since it induces cytopathic and proinflammatory effect in cells of human intestinal origin, changes known to be promoted by EAEC in experimental models.

Key words: *Escherichia coli*. *Shigella*. Cytotoxin. Proteinases. Epithelial cells.

1 INTRODUÇÃO

A diarreia é considerada um problema de saúde pública em todo o mundo, sendo a causa estimada de 1,3 milhões de mortes por ano (GBD, 2015; WHO, 2018). É a segunda maior causa de mortalidade infantil no mundo. No ano de 2017 causou 424 mil mortes em crianças de até 5 anos (WHO, 2018). Em regiões onde as gastroenterites são endêmicas, como em países da África e do sudoeste asiático, 25% das mortes na infância são causadas por gastroenterites virais agudas (SIDOTI et al., 2015).

Devido à alta mortalidade causada pela diarreia, existem iniciativas governamentais estipuladas pela *United Nations Children's* (UNICEF) e *World Health Organization* (WHO) para prevenir a doença, como por exemplo as políticas de combate à desnutrição crônica, à falta de saneamento básico e à falta de acesso à água potável (FISCHER et al., 2012).

Até o ano de 2011, 71,8% dos municípios brasileiros não possuíam uma política municipal de saneamento básico (IBGE, 2011). No ano de 2017, 41,5% dos 5.570 municípios brasileiros afirmaram possuir Plano Municipal de Saneamento Básico (IBGE, 2018). A situação do saneamento básico precário no país está melhorando a cada ano, porém nos municípios do norte os números ainda são preocupantes, onde apenas 450 municípios dessa região apresentam um Plano Municipal de Saneamento Básico (IBGE, 2018), o que impacta no risco de casos da doença.

A diarreia pode ser causada por vírus, bactérias e protozoários. Dentre os agentes bacterianos causadores da diarreia os principais são *Escherichia coli*, *Shigella* spp., *Campylobacter* spp., *Vibrio* spp. e *Salmonella* spp. (HODGES; GILL, 2010; PODEWILS et al., 2004).

Escherichia coli é um bacilo Gram negativo, anaeróbio facultativo, pertencente à família Enterobacteriaceae, que faz parte da microbiota intestinal de mamíferos e aves (BOOP et al., 2003). Ao longo da evolução alguns clones dessa espécie adquiriram fatores de virulência que conferiram adaptação a novos nichos e a capacidade de causar um amplo espectro de doenças (CLEMENTS et al., 2012).

Os patótipos de *E. coli* podem causar principalmente as seguintes patologias: doença diarreica, infecção do trato urinário, meningite e sepse

(CLEMENTS et al., 2012; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Desta forma as cepas patogênicas de *E. coli* podem ser classificadas em diarreiogênicas ou extraintestinais (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; RUSSO; JOHNSON, 2000).

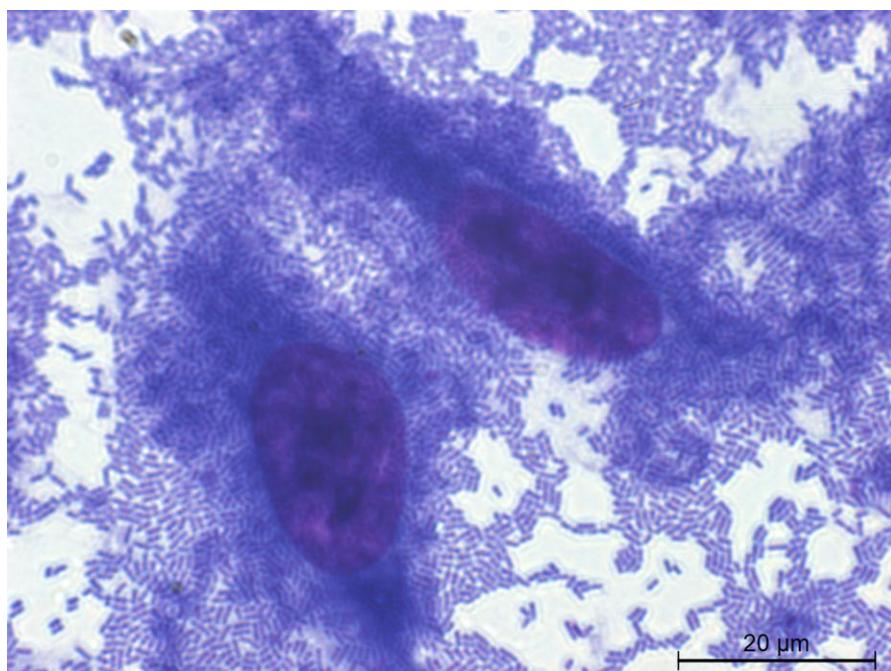
As *E. coli* diarreiogênicas (DEC) são divididas em seis categorias de acordo com os fatores de virulência que apresentam, as manifestações clínicas que causam e/ou padrões distintos de adesão que apresentam em células epiteliais *in vitro*. A classificação de DEC define os seguintes patótipos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroaggregativa (EAEC), *E. coli* produtora da toxina Shiga (STEC) e sua subcategoria *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC) e *E. coli* que adere difusamente à células epiteliais (DAEC) (CLEMENTS et al., 2012; CROXEN; FINLAY, 2010; GOMES et al., 2016).

1.1 *Escherichia coli* enteroaggregativa (EAEC)

Escherichia coli enteroaggregativa (EAEC) é definida como o patótipo de DEC que apresenta o padrão de adesão agregativo (AA) em células epiteliais cultivadas (NATARO et al., 1987; NATARO; STEINER; GUERRANT, 1998). No padrão AA (**Figura 1**) as bactérias formam agregados que se assemelham a tijolos empilhados, aderindo à superfície das células eucarióticas e também à superfície da lamínula, em arranjos análogos a favos de colmeia (GOMES et al., 2016).

Esse padrão foi descrito durante a análise da aderência em células HEp-2 de cepas de *E. coli* isoladas em um estudo epidemiológico sobre a etiologia da diarreia aguda na infância, conduzido no Chile (NATARO et al., 1987). Nesse estudo, os autores foram capazes de subdividir o fenótipo anteriormente descrito como aderente-difuso (SCALETSKY; SILVA; TRABULSI, 1984) em duas classificações: aderência agregativa (AA) e a aderência difusa (AD) propriamente dita. A alta prevalência do padrão AA em cepas de *E. coli* isoladas de crianças com diarreia, levou à proposição do novo patótipo de DEC, denominado *E. coli* enteroaggregativa ou EAggEC (NATARO et al., 1987). Posteriormente a literatura da área adotou a abreviatura EAEC (HEBBELSTRUP JENSEN, 2014; NATARO; KAPER, 1998).

Figura 1 – Padrão de adesão agregativo de EAEC.



Fonte: Este estudo

Padrão AA em células HEp-2 após 6 h de incubação do inóculo bacteriano da cepa de EAEC BA732 com as células epiteliais em confluência de ~80%. Pode-se observar o padrão AA, evidenciado pela presença de bactérias agrupadas e aderidas na superfície da lamínula e também das células. Coloração com May-Grünwald e Giemsa. Aumento: 1.000 x.

Dentre os agentes etiológicos bacterianos da diarreia, EAEC se destaca como um dos principais enteropatógenos ao redor do mundo, incluindo países com altos e baixos índices de desenvolvimento socioeconômico (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006; HEBBELSTRUP JENSEN, 2014).

EAEC está associada à diarreia aguda, diarreia persistente e diarreia do viajante, tanto em adultos como em crianças, na forma endêmica e epidêmica.

A associação epidemiológica entre EAEC e diarreia aguda na infância tem sido descrita em países em desenvolvimento (ARAUJO et al., 2007; BENEVIDES-MATOS et al., 2015; BUERIS et al., 2007; IKUMAPAYI et al., 2017; LIMA et al., 2013; SPANO et al., 2017) e em países desenvolvidos (COHEN et al., 2005; HEBBELSTRUP JENSEN et al., 2017; NATARO et al., 2005; ROBINS-BROWNE et al., 2004).

EAEC é o patógeno de DEC mais prevalente nos casos de diarreia do viajante, que é aquela que afeta indivíduos residentes de países desenvolvidos que visitam países em desenvolvimento (ADACHI et al., 2001; JIANG et al., 2002; MOHAMED et al., 2007). Alguns autores verificaram a prevalência de EAEC em casos de diarreia em adultos (HEBBELSTRUP JENSEN, 2018; SPANO et al., 2017), não sendo caracterizada como diarreia do viajante.

A prevalência de EAEC foi verificada também na diarreia crônica em pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, ou SIDA (BERNIER; GOUNON; LE BOUGUÉNEC, 2002; HUANG et al., 2006; MATHEWSON et al., 1995; NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011; SAMIE et al., 2007).

Além dos quadros clínicos de diarreia aguda, EAEC está fortemente associada à diarreia persistente, ou seja, com duração maior que 14 dias (BHAN et al., 1993; BOLL et al., 2013; CRAVITO et al., 1991; FANG et al., 1995; GREENBERG et al., 2002; LIMA et al., 1992; PEREIRA et al., 2007; SHAZBERG et al., 2003), o que pode levar a má nutrição, problemas de crescimento e de desenvolvimento cognitivo (GUERRANT et al., 2008; LIMA et al., 2018; NAVARRO-GARCIA et al., 2010).

No Brasil, vários estudos epidemiológicos sobre a etiologia da diarreia aguda têm apontado EAEC como o patótipo de DEC mais prevalente (ARAUJO et al., 2007; BUERIS et al., 2007; GARCIA; SILVA; DINIZ, 2011; MORENO et al., 2010; PEREIRA et al., 2007; REGUA-MANGIA et al., 2004; RODRIGUES et al., 2002; SCALETSKY et al., 2002; SPANO et al., 2017).

A ingestão de alimentos contaminados talvez seja uma forma de infecção por EAEC, pois já houve relatos em países desenvolvidos da ocorrência de diversos surtos provocados por essa via (ITOH et al., 1997; HARADA et al., 2007; SMITH; CHEASTY; ROWE, 1997). No Brasil EAEC foi detectada em leite de mamadeiras de lactantes que haviam sido atendidos em ambulatórios de hospitais públicos, outro dado que favorece a possibilidade de infecção por EAEC a partir de alimentos contaminados (MORAIS; GOMES; SIGULEM, 1997).

Em 2011 um grande surto de diarreia que acometeu alguns países da Europa foi causado por uma cepa de *E. coli* produtora de toxina Shiga do subtipo Stx2 e pertencente ao sorotípico O104:H4 (BIELASZEWSKA et al.,

2011). O sequenciamento do genoma dessa cepa revelou que se tratava de uma EAEC que recebeu genes do fago que codifica Stx2, característica de STEC (RASKO et al., 2011). Esse surto foi associado ao consumo de alimento contaminado e teve graves consequências médicas, devido ao grande número de pacientes hospitalizados e que desenvolveram a síndrome hemolítica urêmica, patologia comumente decorrente da infecção por STEC (MUNIESA et al., 2012).

Os sintomas mais comuns relatados na infecção por EAEC são diarreia aquosa com ou sem sangue e muco, dor abdominal, náusea, vômito e pouca febre. A diversidade de sintomas clínicos na infecção por esse patótipo pode ser devido à heterogeneidade entre os isolados de EAEC, à dose infecciosa e a fatores de susceptibilidade genética do hospedeiro, assim como, à resposta imune (HARRINGTON, DUDLEY; NATARO, 2006; HUANG et al., 2006).

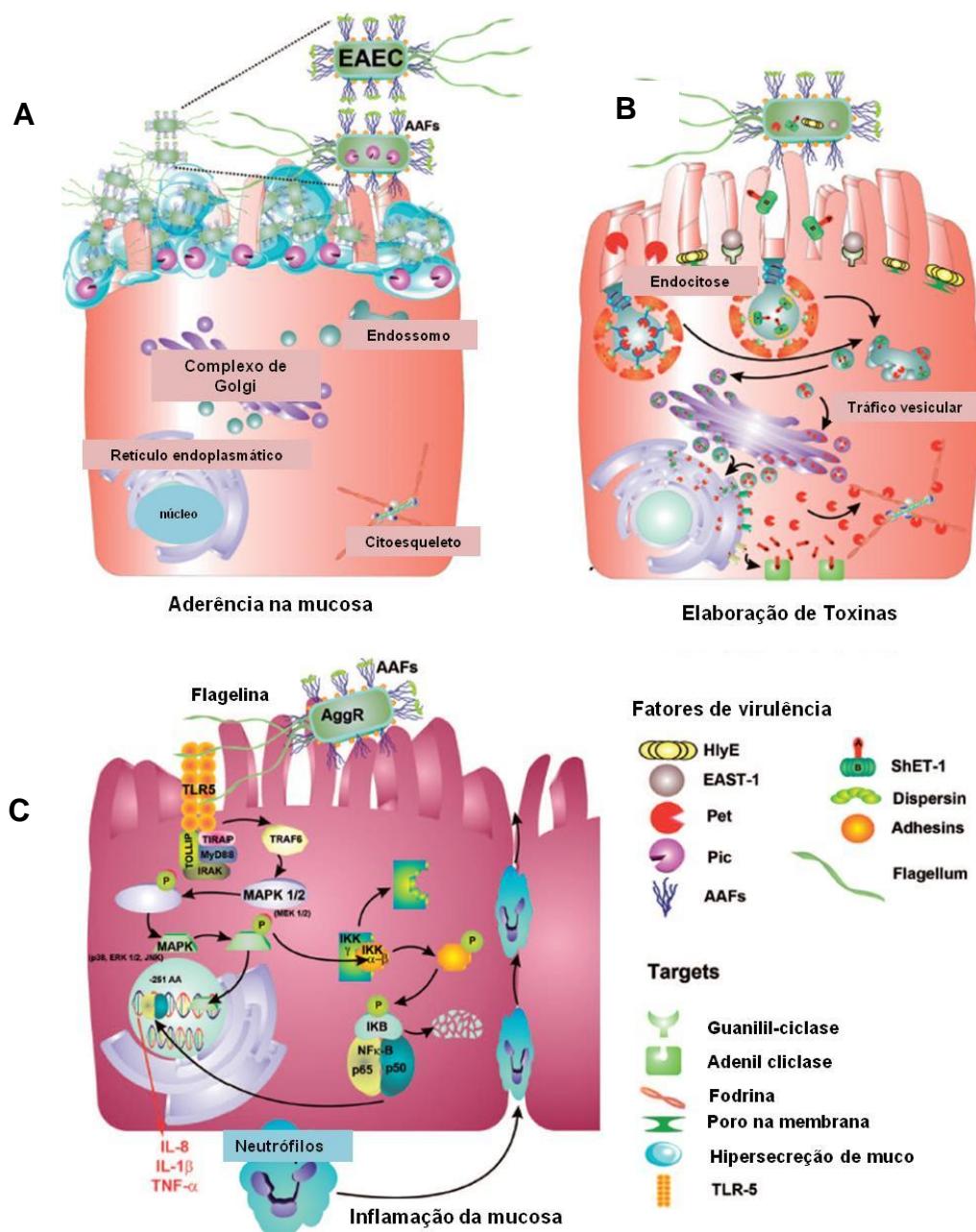
Essa heterogeneidade ficou bastante evidente em um estudo com voluntários humanos que receberam inóculo por via oral de quatro cepas de EAEC (17-2, 042, JM221 e 34b), sendo que apenas a cepa 042 foi capaz de causar diarreia (NATARO et al., 1995). A cepa EAEC 042 (sorotipo O44:H18) passou então a ser considerada como protótipo e amplamente caracterizada genetica e fenotipicamente (NAVARRO-GARCIA; ELIAS 2011).

Várias adesinas, toxinas, proteínas secretadas e mecanismos envolvidos em processos de patogenicidade têm sido identificados em EAEC, mas a prevalência dos genes que codificam esses marcadores é bastante variável e nenhum deles foi encontrado em todas as cepas (BOUZARI; JAFARI; ZAREPOUR, 2005; CZECZULIN et al., 1999; ELIAS et al., 2002; GIOPPO et al., 2000; JENKINS et al., 2006; MOHAMED et al., 2007; OKEKE et al., 2003; PIVA et al., 2003; ZAMBONI et al., 2004). Essa complexidade não permitiu que a patogênese da diarreia causada por esse patótipo fosse totalmente esclarecida (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006), porém um modelo com três estágios tem sido proposto para explicar a patogênese da diarreia causada por essas bactérias, tomando por base os fatores de virulência identificados na cepa 042.

Conforme esquematizado na **Figura 2**, o primeiro estágio envolve a aderência na mucosa intestinal e na camada de muco, através de adesinas fimbriais e/ou afimbríais; no segundo estágio há a formação de abundante

biofilme e aumento da produção de muco pelos enterócitos, o que pode promover uma colonização persistente e má absorção de nutrientes; por último há a secreção de toxinas e proteínas autotransportadoras levando à indução de resposta inflamatória, havendo alteração na mucosa e na secreção intestinal (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006; HUANG; DUPONT, 2004; NAVARRO-GARCIA et al., 2010).

Figura 2 – Esquema do modelo proposto para patogênese da infecção intestinal por EAEC.



Adaptado de: Navarro-Garcia e Elias (2011).

Modelo de 3 estágios para a infecção por EAEC na mucosa intestinal. (A) No primeiro estágio ocorre a aderência da bactéria à mucosa do hospedeiro com participação das fímbrias AAF (linhas azuis), dispersina (pequenas esferas verdes) e proteína Pic (esfera rosa), uma proteína que degrada muco. (B) No segundo estágio ocorre a elaboração de toxinas que agem principalmente no citoesqueleto da célula, como as toxinas Pet (esfera vermelha), EAST-1 (esfera cinza), ShET-1 (complexo A-B verde e vermelho) e enterohemolisina (esferas amarelas). (C) No terceiro estágio ocorre a indução da resposta inflamatória, mediada pela flagelina (linhas verdes), fímbrias AAF e outras estruturas não conhecidas.

Diversos potenciais fatores de virulência identificados em EAEC são codificados por genes localizados no plasmídeo ou no cromossomo da cepa 042, cujo genoma completo já foi sequenciado. Dentre esses fatores estão diversas adesinas, toxinas, proteínas secretadas e sideróforos (CHAUDHURI et al., 2010; NAVARRO-GARCIA et al., 2010).

A cepa 042 alberga um plasmídeo de ~100 kb denominado pAA2 (CZECZULIN et al., 1999). Nesse plasmídeo estão presentes diversos genes de virulência que têm a expressão regulada por AggR (CHAUDHURI et al., 2010; NAVARRO-GARCIA et al., 2010).

O gene *aggR* codifica um regulador transcracional global de EAEC envolvido na ativação de genes cromossômicos e plasmideais (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006). Morin et al. (2012) confirmaram a existência de ao menos 44 genes regulados por AggR utilizando a técnica de *microarray* e qRT-PCR (*Real Time Quantitative Reverse Transcription PCR*). Destes genes, 16 codificam proteínas hipotéticas e somente cinco mostram homologia com outras proteínas conhecidas, incluindo os genes da biogênese da fímbria AAF/II, Pet, dispersina e uma ilha de patogenicidade cromossônica.

Dentre os genes regulados por AggR na cepa 042 estão os que codificam as proteínas Pet e EAST-1, a fímbria de aderência agregativa AAF/II, a proteína dispersina, seu sistema de secreção do tipo ABC, as proteínas Shf, VirK e CapU, além da auto regulação de *aggR* (CHAUDHURI et al., 2010; CZECZULIN et al., 1999).

Conforme mencionado anteriormente, durante os anos subsequentes à descrição de EAEC, um grande número de estudos foi publicado sobre a epidemiologia desse patótipo. Em seguida, os estudos caracterizando potenciais fatores de virulência que eram identificados em cepas de EAEC, mostraram a grande heterogeneidade em termos da prevalência desses

fatores em coleções de EAEC. Esse fato levou à proposição da subclassificação do patótipo EAEC nos grupos de EAEC típica e atípica. As cepas de EAEC são classificadas como típicas ou atípicas de acordo com a presença ou ausência do gene *aggR*, respectivamente (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO 2006; SARANTUYA et al., 2004).

Essa classificação definiria dois grupos de cepas: o primeiro constituído por cepas típicas, que apresentaria maior potencial patogênico pelo fato de albergarem o regulon AggR e o plasmídeo de virulência pAA e o segundo por cepas atípicas, com menor potencial patogênico devido à ausência desses fatores de virulência (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; SARANTUYA et al., 2004). Contrapondo esta conclusão de que EAEC atípica tem menor potencial patogênico, existe o relato de dois surtos de diarreia causados por cepas atípicas, sendo que em um deles houve o acometimento de mais de mais de 2.000 pessoas (ITOH et al., 1997; COBELJIĆ et al., 1996), demonstrando assim, o potencial patogênico dessas cepas.

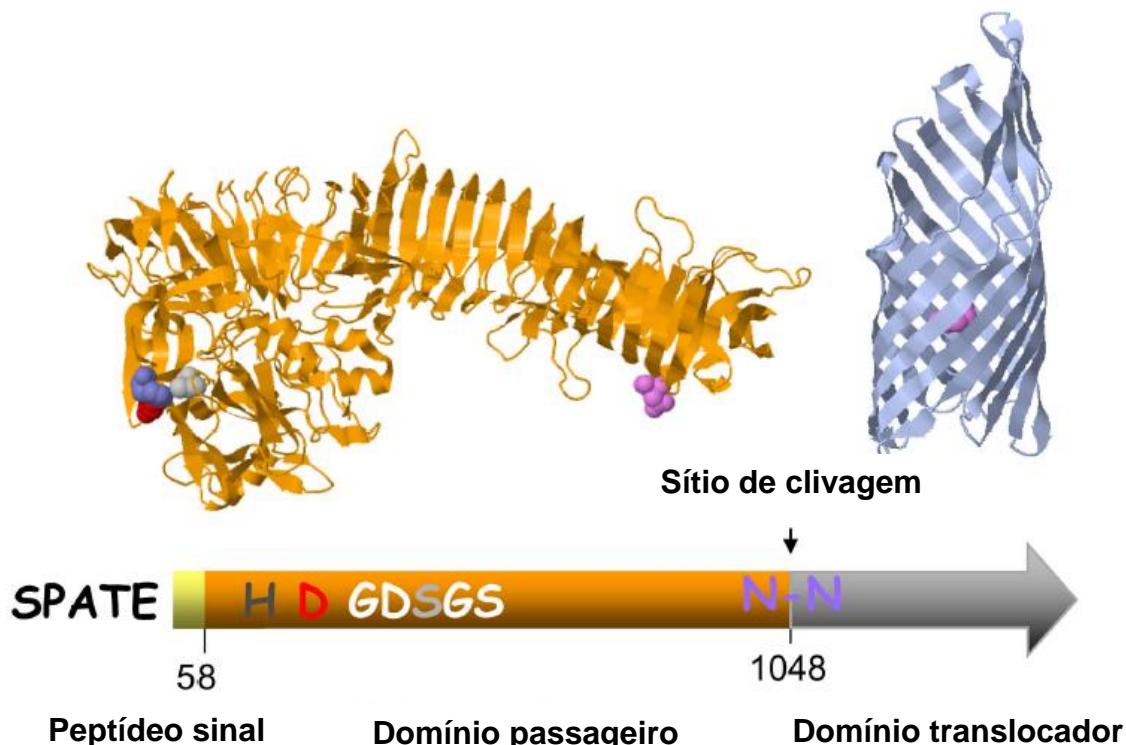
Dentre os diversos fatores de virulência presentes em cepas de EAEC estão as proteínas denominadas de serino proteases autotransportadoras ou SPATEs (*Serine Proteases Autotransporters of Enterobacteriaceae*) (HENDERSON, NAVARRO-GARCIA; NATARO, 1998; RUIZ-PEREZ; NATARO, 2014). Sendo que, a maioria das cepas de EAEC albergam pelo menos três genes que codificam proteínas dessa classe (BOISEN et al., 2009).

Serino proteases são enzimas cujo sítio ativo contém a tríade catalítica Ser/His/Asp, no qual o resíduo de serina realiza um ataque nucleofílico das ligações peptídicas (DAUTIN, 2010). As SPATEs são proteínas secretadas para o meio externo através do sistema de secreção do tipo V (SST5), sistema também conhecido como autotransportador (DESVAUX et al., 2009). Membros dessa família de proteínas são definidos como importantes fatores de virulência em muitos patógenos (HENDERSON, NAVARRO-GARCIA; NATARO, 1998).

As proteínas autotransportadoras (AT) apresentam uma estrutura comum (**Figura 3**). Todas as ATs têm em sua estrutura um peptídeo sinal, um domínio passageiro ou domínio α, que codifica a função biológica da proteína, e um domínio translocador ou β-barril, de sequência conservada dentre as

SPATEs (DAUTIN; BERNSTEIN, 2007; HENDERSON; NAVARRO-GARCIA; NATARO, 1998; LEO; GRIN; LINKE, 2012).

Figura 3 – Estrutura geral das proteínas que compõem as SPATEs.



Adaptado de: Ruiz-Perez e Nataro (2014)

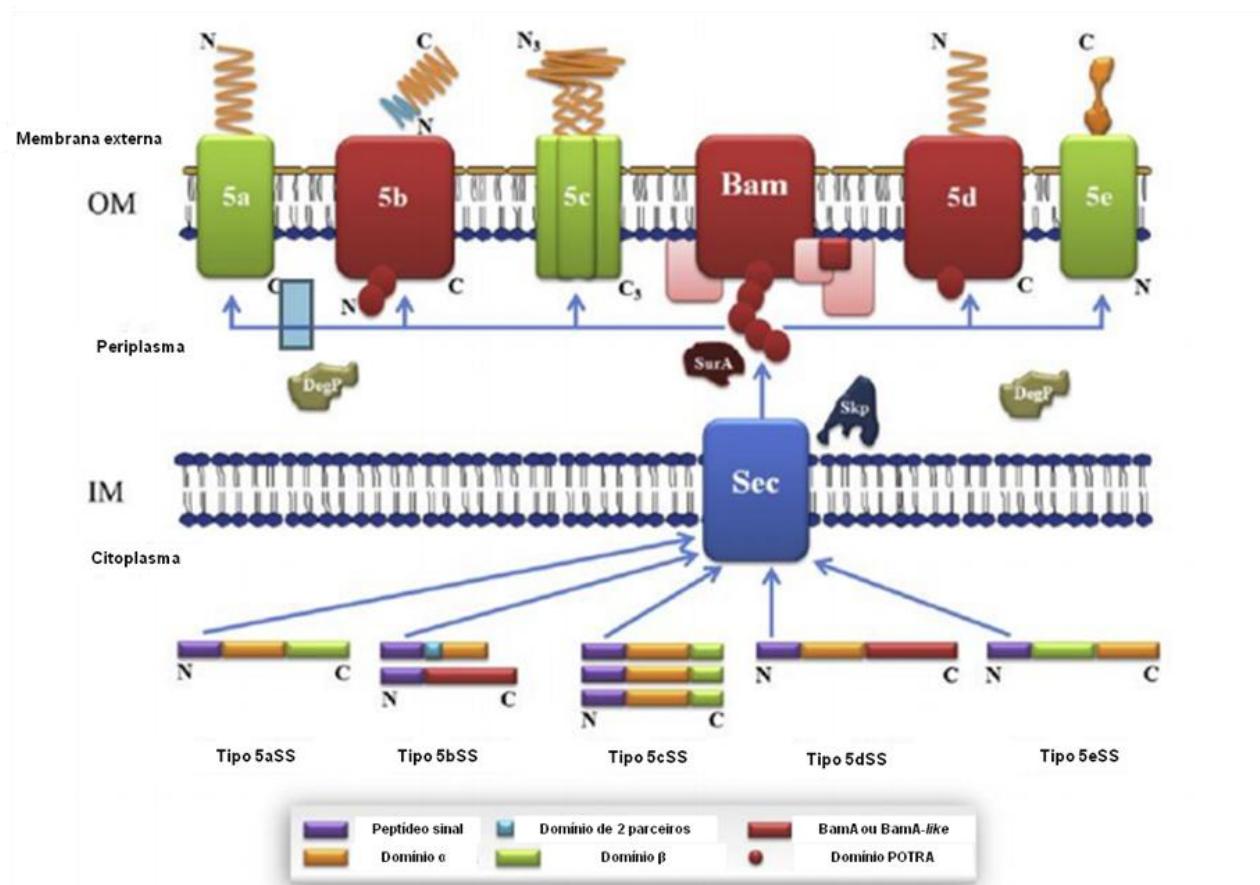
Esquema representativo da estrutura geral das SPATEs contendo um peptídeo sinal (amarelo), um domínio passageiro (laranja) que codifica a função biológica da proteína e um domínio translocador (lilás) que forma um poro na membrana pelo qual o domínio passageiro é translocado.

Essa família de proteína foi denominada como autotransportadora, pois inicialmente acreditava-se que as mesmas eram capazes de se inserir na membrana externa sem envolvimento de nenhum outro fator acessório, e assim seriam secretadas para o meio externo de maneira autônoma (KLAUSER; POHLNER; MEYER, 1993). No entanto, em estudos posteriores foi verificado que o sistema BAM (β -barrel assembly machinery) é essencial para que ocorra a biogênese das proteínas autotranportadoras (KNOWLES et al., 2009).

O SST5 é um dos sistemas mais amplamente distribuídos entre as bactérias Gram negativas (YEN et al., 2002). Esse sistema é subdividido em cinco grupos (Figura 4), que apresentam algumas particularidades durante a

secreção: o sistema 5a, também conhecido como clássico; o 5b ou tipo dois parceiros, que apresenta o domínio passageiro e o translocador em cadeias polipeptídicas separadas; o 5c ou de adesinas triméricas, é o sistema em que o poro translocador é constituído por três cadeias polipeptídicas; o 5d ou o sistema de dois parceiros fusionados, apresenta o domínio passageiro fusionado ao translocador; e por fim o 5e ou sistema clássico invertido, que apresenta o domínio translocador na porção N-terminal (HENDERSON; NAVARRO-GARCIA, NATARO, 1998; JACOB-DUBUISSON; LOCHT; ANTOINE, 2001; LINKE et al., 2006; SALACHA et al., 2010; OBERHETTINGER et al., 2012).

Figura 4 – Esquema de secreção de proteínas autotransportadoras através dos subtipos do SST5.



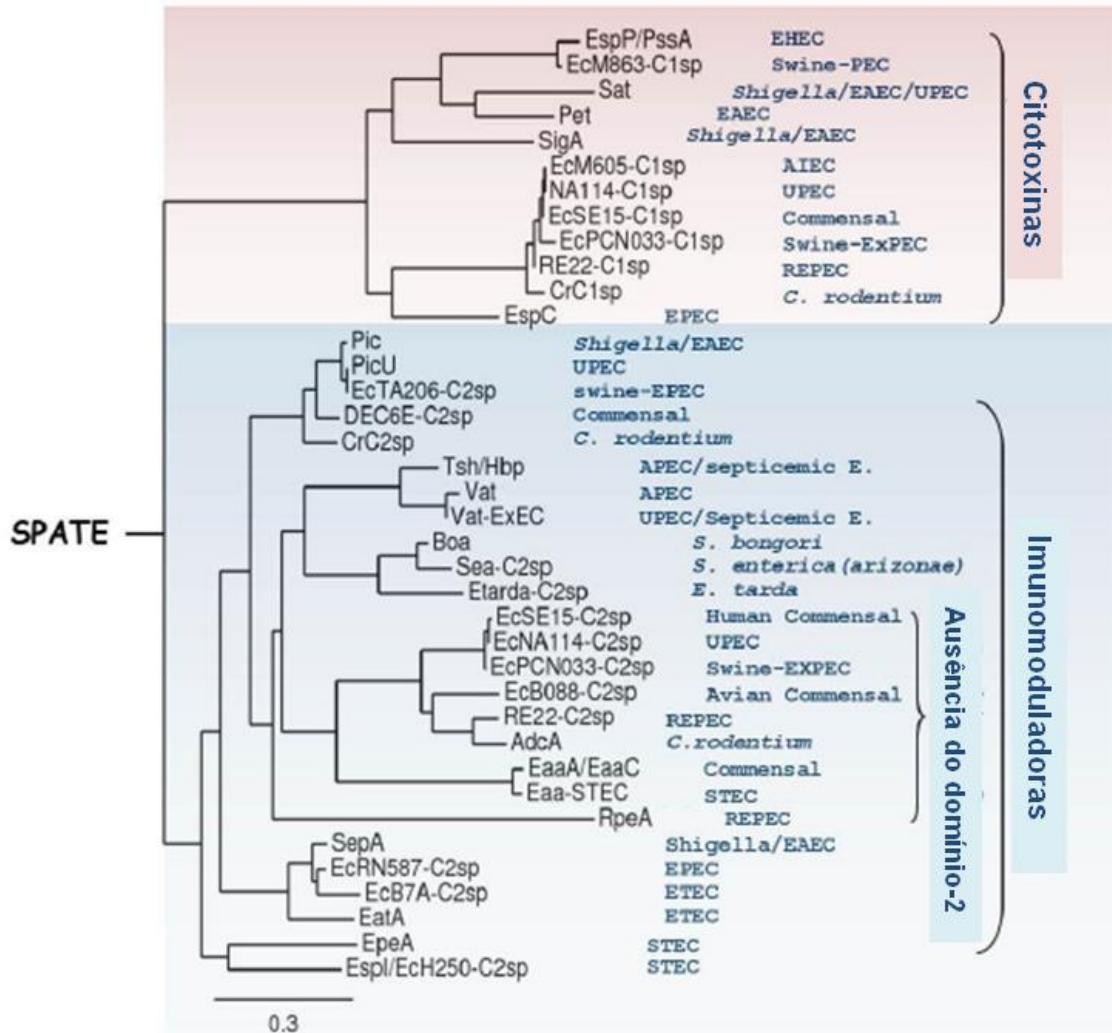
Adaptado de: Grijpstra et al. 2013.

Esquema dos subtipos do SST5 demonstrando as diferenças encontradas em cada um. 5a ou subtipo clássico; 5b ou sistema de dois parceiros; 5c ou sistema de adesinas triméricas; 5d ou sistema de dois parceiros; 5e ou sistema clássico invertido. O esquema apresenta também as proteínas assessorias do complexo Bam e algumas chaperonas identificadas (DegP, SurA e Skp). Em todos os subtipos a secreção se inicia pela clivagem do peptídeo sinal pelo sistema Sec, com o posterior tráfego da proteína pelo periplasma, inserção do domínio translocador na membrana externa e liberação do domínio passageiro no meio extracelular.

Resumidamente, no sistema clássico as SPATEs são secretadas para o meio externo da seguinte maneira: primeiro a proteína se liga ao sistema Sec pelo peptídeo sinal que então é clivado, em seguida o domínio translocador e o passageiro são liberados no periplasma, nesse momento ocorre a ligação de algumas chaperonas à SPATE e então o domínio translocador é inserido na membrana externa com o auxílio das proteínas do complexo BAM, formando um poro pelo qual o domínio passageiro é translocado e liberado para o meio externo na forma da proteína madura (DAUTIN, 2010; HENDERSON; NAVARRO-GARCIA; NATARO, 1998; RUIZ-PEREZ et al., 2009; TAPIA-PESTRANA et al., 2012).

A família das SPATEs inclui mais de 25 proteínas e são divididas filogeneticamente em duas classes, com base na sequência de aminoácidos do domínio passageiro (**Figura 5**). A classe-1 alberga as proteínas com efeito citotóxico (AL-HASANI et al., 2000; AL-HASANI et al., 2009; DJAFARI et al., 1997; ESLAVA et al., 1998; HENDERSON et al., 1999; MARONCLE et al., 2006; MELLIES et al., 2001; TADDEI et al., 2005), enquanto a classe-2 inclui as proteínas imunomoduladoras, que além de modularem o sistema imune, desempenham funções como a degradação de mucina e de glicoproteínas de superfície de leucócitos (GUTIÉRREZ-JIMÉNEZ; ARGINIEGA; NAVARRO-GARCIA, 2008; DUTTA et al., 2002; HARRINGTON et al., 2009; LEYTON et al., 2003; PARHAM, et al., 2004; RUIZ-PEREZ et al., 2011).

Figura 5 – Análise filogenética das sequências de aminoácidos dos domínios passageiros das SPATEs.



Adaptado de: Ruiz-Perez e Nataro (2014)

Árvore filogenética das sequências de aminoácidos das SPATEs. O domínio passageiro revela duas classes distintas: classe-1 (citotoxinas) e classe-2 (imunomoduladoras). EHEC, *E. coli* enterohemorrágica; Swine-PEC, *E. coli* enteropatogênica de suínos; EAEC, *E. coli* enteroaggregativa; UPEC, *E. coli* uropatogênica; AIEC, *E. coli* enteroaderente-invasora; Commensal, *E. coli* comensal; REPEC, *E. coli* enteropatogênica de coelhos; *Citrobacter rodentium*; APEC, *E. coli* patogênica aviária; *Salmonella bongori*; *Salmonella enterica*; *Edwardsiella tarda*; Human comensal, *E. coli* comensal humana; Avian comensal, *E. coli* comensal de aves; STEC, *E. coli* produtora da toxina Shiga; EPEC, *E. coli* enteropatogênica; ETEC, *E. coli* enterotoxigênica.

Dentre as proteínas de classe-1 que são frequentemente encontradas em cepas de EAEC estão as proteínas Sat (GUYER et al., 2000), Pet (ESLAVA et al., 1998) e SigA (AL-HASANI et al, 2000). As de classe-2 frequentemente encontradas em EAEC são Pic (HENDERSON et al., 1999) e SepA (BENJELLOUN-TOUIMI et al., 1998).

1.2 SPATEs de classe-2

As SPATEs de classe-2, ou imunomoduladoras, são classificadas filogeneticamente com base na sequência de aminoácidos de seus domínios passageiros (HENDERSON, NAVARRO-GARCIA, NATARO, 1998; YEN et al., 2008).

A maioria delas apresenta o domínio-2, uma sequência de aminoácidos conservada no domínio translocador. Acreditava-se que esse domínio desempenhava papel no reconhecimento do substrato, mas sua função ainda permanece desconhecida, já que algumas SPATEs de classe-2 não o possuem (NISHIMURA et al., 2010; RUIZ-PEREZ; NATARO, 2014). Além disso, em um estudo com a SPATE Hbp (*hemoglobin binding protein*) o domínio-2 foi removido e a proteína continuou com sua atividade proteolítica, favorecendo a ideia de que o domínio-2 não está envolvido com reconhecimento do substrato (OTTO et al., 2005).

Pouco se sabe do papel de muitas das SPATEs classe-2 quanto ao substrato biológico, função na patogênese e mecanismo de ação (RUIZ-PEREZ; NATARO, 2014). Pic (*protease involved in intestinal colonization*), Tsh (*temperature-sensitive hemagglutinin*) e Hbp são as SPATEs de classe-2 melhor descritas quanto as suas funções (HENDERSON et al., 1999; OTTO et al., 1998; PROVENCE; CURTISS, 1994).

Pic foi originalmente descrito em *Shigella flexneri* 2a e EAEC (HENDERSON et al., 1999). Essa proteína apresenta função mucinolítica, cliva o fator de coagulação V, proteínas do complemento e glicoproteínas de superfície de leucócitos, além de apresentar atividade de hemaglutinina (ABREU et al., 2015; HENDERSON et al., 1999; KOSTAKIOTI; STATHOPOULOS, 2004; PARHAM et al., 2004; PROVENCE; CURTISS, 1994; RUIZ-PEREZ et al., 2011).

Hpb inicialmente identificada em uma cepa extraintestinal de *E. coli*, isolada de um paciente com infecção cirúrgica, difere de Tsh por somente dois aminoácidos (OTTO et al., 1998). A principal função de Hpb é degradar hemoglobulina e se ligar ao Heme exposto, mediando a captação de ferro (OTTO et al., 1998).

Tsh é uma SPATE com atividade de hemaglutinina que foi identificada em cepas de *E. coli* patogênica aviária (APEC) (PROVENCE; CURTISS, 1994). Tem capacidade de se ligar a hemoglobina, assim como Hpb, e também se liga a proteínas de matriz extracelular como fibronectina e colágeno IV, a aglutinação gerada por essa proteína é independente do domínio catalítico de serino protease (KOSTAKIOTI; STATHOPOULOS, 2004; PROVENCE; CURTISS, 1994).

Como se nota, essas três SPATEs de classe-2 resumidamente descritas, apresentam funções semelhantes o que é uma característica das proteínas desta família.

SepA, que também é uma SPATE de classe-2 será descrita com maior detalhes quanto a sua estrutura e funções conhecidas, por se tratar do objeto do presente estudo.

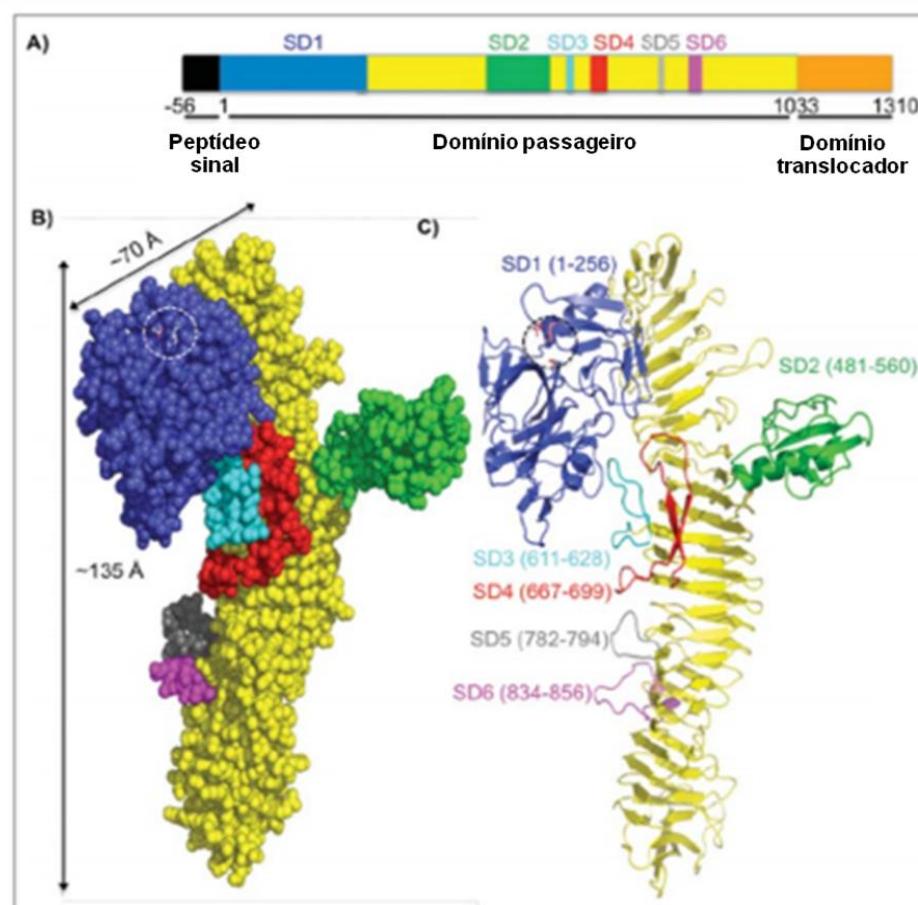
1.3 *Shigella extracelular protein A (SepA)*

SepA (*Shigella extracelular protein A*) foi originalmente descrita em *Shigella flexneri* 5a (BENJELLOUN-TOUMI et al., 1995) e posteriormente em isolados clínicos de EAEC (BOISEN et al., 2009; NATARO, 2011).

Essa SPATE é codificada por um gene plasmideal (*sepA*) em *Shigella flexneri*, e sintetizada como uma proteína precursora de 146 kDa que é convertida em sua forma madura extracelular de 110 kDa (BENJELLOUN-TOUMI et al., 1998). A sua expressão é termorregulada, havendo máxima expressão a 37°C, quando comparada com a expressão em baixas (20-30°C) ou altas (40-42°C) temperaturas (BENJELLOUN-TOUMI et al., 1995).

A estrutura do domínio passageiro de SepA foi resolvida por cristalografia, conforme apresentado na **Figura 6**.

Figura 6 – Cristalografia do domínio passageiro de SepA



Adaptado de: Maldonado-Contreras et al. (2017)
 Estrutura do domínio passageiro de SepA em cristalografia. (A) Esquema linear do gene *sepA*, indicando o peptídeo sinal (preto); SD1 a SD6 indica o domínio passageiro. (B) Representação tridimensional do domínio passageiro. (C) Representação em fita do domínio passageiro.

SepA é a proteína majoritária secretada por *S. flexneri*. Nessas bactérias, participa da destruição do tecido epitelial (BENJELLOUN-TOUMI et al., 1998), não apresenta efeito citotóxico em células HEp-2, não está envolvida na formação de placas em células Caco-2, ou disseminação de *S. flexneri*, entre as células hospedeiras. Há indícios de sua participação nos danos na mucosa nos eventos iniciais da shigelose, desempenhando assim um papel na invasão de tecidos a partir da participação na ruptura da barreira epitelial do intestino (BENJELLOUN-TOUMI et al., 1998; DUTTA et al., 2002; MALDONADO-CONTRERAS et al., 2017).

No modelo de alça ligada de intestino de coelho, a infecção por *S. flexneri* mutante em *sepA* é caracterizada pela diminuição de acúmulo de

fluidos e da inflamação em curto período de infecção (8 h), indicando que SepA é necessária para o estabelecimento, mas não para a progressão da shigelose (DAUTIN, 2010).

SepA participa da ruptura da barreira epitelial do intestino na infecção por *S. flexneri*, facilitando o trânsito dessas bactérias para a porção basolateral do epitélio do hospedeiro (MALDONADO-CONTRERAS et al., 2017). Nesse mesmo estudo foi verificado que SepA age na dinâmica de actina por meio da diminuição dos níveis de LIM quinase I (LIMKI) que por sua vez inativa a cofilina, que age diretamente nos filamentos de actina, causando a despolimerização dessas estruturas do citoesqueleto. SepA diminui os níveis de LIMKI pela ação do domínio catalítico de serino protease, uma vez que os níveis de LIMKI permanecem inalterados na infecção por cepa de *S. flexneri* com SepA mutada neste domínio (MALDONADO-CONTRERAS et al., 2017).

O substrato biológico da proteína é desconhecido (RUIZ-PEREZ; NATARO, 2014). SepA hidrolisa diversos peptídeos sintéticos, semelhantes àqueles hidrolisados pela catepsina G, uma serino protease produzida por leucócitos polimorfonucleares, mas surpreendentemente não cliva os substratos naturais da catepsina G, como as fibronectinas, colágenos e angiotensinas (BENJELLOUN-TOUMI et al., 1998). Além disso, SepA não cliva nenhum dos substratos clivados por outras SPATEs de ambas as classes, como a mucina, glicoproteínas de leucócitos, α-espectrina, fator V ou pepsina (DUTTA et al., 2002; RUIZ-PEREZ et al., 2011).

Mesmo apresentando homologia de 67% com as SPATEs Pic e Tsh, ambas SPATES da classe-2 que tem predileção aos mesmos substratos, SepA parece não compartilhar dos mesmos substratos destas proteínas (RUIZ-PEREZ et al., 2014).

Aparentemente SepA tem papel importante na patogênese de EAEC, já que está presente em um grande número de cepas isoladas de pacientes com diarreia (BOISEN et al., 2012). A presença do gene *sepA* foi fortemente associada com casos da doença (BOISEN et al., 2012) e também com a formação de biolfilme (NEZARIEH et al., 2015).

Porém, na cepa de EAEC produtora da toxina de Shiga (O104:H4), causadora do surto de EAEC na Europa (BIELASZEWSKA et al., 2011), Munera et al. (2014) demonstraram *in vivo* que SepA não está envolvida com a

patogênese desta cepa. Neste híbrido, SepA está presente no plasmídeo pAA, que segundo esses autores tem papel somente na adesão agregativa da cepa.

Apesar disso, em um estudo posterior foi demonstrado que além de mediar o fenótipo agregativo, o plasmídeo pAA também aumenta a translocação de Stx2, aumentando a citotoxicidade da cepa (BOISEN et al., 2014), mas ainda assim a proteína SepA permaneceu sem um papel definido na virulência de EAEC produtora de Stx, pois o mutante em SepA não demonstrou alteração nos efeitos citotóxicos, o que pelo contrário ocorreu com os mutantes em *aggA* e *aggR* (genes também presentes no plasmídeo pAA) que tiveram a citotoxicidade significativamente diminuída (BOISEN et al., 2014).

Tendo em vista que SepA é um potencial fator de virulência em EAEC, sendo encontrada fortemente associada à diarreia (BOISEN et al., 2012), torna-se necessário determinar qual o papel dessa serina protease na patogenicidade destas bactérias.

6. CONCLUSÕES

Em resumo, no presente estudo verificou-se que:

- (a) *sepA* foi detectado nas cepas de EAEC isoladas do Brasil como sendo um dos genes mais frequentes entre as SPATEs estudadas e sua presença foi significantemente associada às EAEC atípicas.
- (b) SepA de EAEC BA732 mostrou identidade de 98% com SepA da cepa M90T de *Shigella flexneri* 5a.
- (c) SepA foi purificada na sua forma nativa e funcional, a partir de sobrenadante de cultura da cepa M90T, e provocou alterações morfológicas em células HeLa e HT-29, sugerindo efeito citopático, o qual foi neutralizado por inibidor de serino protease e antissoro específico.
- (d) SepA ligou-se à membrana citoplasmática das células HeLa e HT-29, mas não foi internalizada. Esse tipo de interação ocorreu quando utilizou-se SepA purificada ou quando a mesma foi secretada por EAEC BA732 no momento da adesão bacteriana.
- (e) SepA purificada mostrou atividade pró-inflamatória ao induzir a produção de IL-8 em células HT-29.

Dessa forma, conclui-se que SepA é um potencial fator de virulência em EAEC, que poderia atuar na mucosa intestinal causando efeitos citopáticos e pró-inflamatórios, aqui evidenciados em células HT-29, uma linhagem epitelial de origem intestinal. Estes efeitos estão associados à patogênese da diarreia causada por EAEC

REFERÊNCIAS¹

- ABBAS, A. K.; LICHTMAM, A. H.; PILLAI, S. **Imunidade Inata:** Resposta Inflamatória. In: ABBAS, A. K.; LICHTMAM, A. H.; PILLAI, S. Imunologia Celular e Molecular. Tradução da 8^a Ed. Elsivier Inc: Amsterdam. 2015, p. 1262.
- 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* strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 79 p. 411-414. 2013.
- ABREU, A.G.; FRAGA, T.R.; GRANADOS-MARTÍNEZ, A.P.; KONDO, M.Y.; JULIANO, M.A.; JULIANO, L. et al. The Serine Protease Pic From Enteroaggregative *Escherichia coli* Mediates Immune Evasion by the Direct Cleavage of Complement Proteins. **J. Infect. Dis.**, v. 212, p.106-115, 2015.
- ABREU, A.G.; ABE, C.M.; NUNES, K.O.; MORAES, C.T.; CHAVEZ-DUEÑAS, L.; NAVARRO-GARCIA, F.; et al. The serine protease Pic as a virulence factor of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Gut. Microbes**, v. 7, p.115-125, 2016.
- ADACHI, J.A.; JIANG, Z.D.; MATHEWSON, J.J.; VERENKAR, M.P.; THOMPSON, S.; MARTINEZ-SANDOVAL, F.; STEFFEN, R.; ERICSSON, C.D.; DUPONT, H.L. Enteroaggregative *Escherichia coli* as a major etiologic agent in traveler's diarrhea in 3 regions of the world. **Clin. Infect. Dis.**, v. 32, p. 1706-1709, 2001.
- AL-HASANI, K.; RAJAKUMAR, K.; BULACH, D.; ROBINS-BROWNE, R.; ADLER, B.; SAKELLARIS, H. Genetic organization of the *she* pathogenicity island in *Shigella flexneri* 2a. **Microb. Pathog.**, v. 30 p. 1-8, 2000.
- AL-HASANI, K.; NAVARRO-GARCIA, F.; HUERTA, J.; SAKELLARIS, H.; ADLER, B. The immunogenic SigA enterotoxin *Shigella flexneri* 2a binds HEp-2 cells and induces fodrin redistribution in intoxicated epithelial cells. **PLoS One**, v. 4, p. 1-5, 2009.
- ALI, M. M.; AHMED, S. F.; KLENA, J. D.; MAHAMED, Z. K.; MOUSSA, T. A.; GHENGHESH, K.S. Enteroaggregative *Escherichia coli* in diarrheic children in Egypt: molecular characterization and antimicrobial susceptibility. **J. Infect. Dev. Ctries.**, v. 14, p. 589-596, 2014.

¹ De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2018.

ANDRADE, F. B.; GOMES, T. A. T. ; ELIAS, W. P. A sensitive and specific molecular tool for detection of both typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Microbiol. Methods.**, v. 106, p.16-18., 2014.

ANDRADE, F.B.; ABREU, A. G.; NUNES, K. O.; GOMES, T. A. T.; PIAZZA, R. M. F.; ELIAS, W. P. Distribution of serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae in typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Genet. Evol.**, v. 50, p. 83-86, 2017.

ARAUJO, J. M.; TABARELLI, G. F.; ARANDA, K. R.; FABBRICOTTI, S. H.; FAGUNDES-NETO, U.; MENDES, C. M.; SCALETSKY, I. C. 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.

BAGGIOLINI, M.; WALZ, A.; KUNKEL, S.L. Neutrophil-activating peptide1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. **J. Clin. Invest.**, v. 84, p. 1045 1049, 1989.

BÂRZU, S.; BENJELLOUN-TOUIMI, Z.; PHALIPON A, SANSONETTI P, PARROT C. Functional analysis of the *Shigella flexneri* IpaC invasin by insertional mutagenesis. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 1599-1605, 1997.

BHAN, M. K.; BHATNAGAR, S. Persistent diarrhea in infants and young children. **Indian Pediatr.**, v. 30, p. 147-151, 1993.

BENEVIDES-MATOS, N; PIERI, F.A.; PENATTI, M.; ORLANDI, P.P. Adherence and virulence genes of *Escherichia coli* from children diarrhoea in the Brazilian Amazon. **Braz. J. Microbiol.**, v. 46, p. 131-137, 2015.

BENJELLOUN-TOUIMI, Z.; SANSONETTI, P.J.; PARROT, C. SepA, the major extracellular protein of *Shigella flexneri*: autonomous secretion and involvement in tissue invasion. **Mol. Microbiol.**, v. 17, p.123–135, 1995.

BENJELLOUN-TOUIMI, Z.; SI TAHAR, M.; MONTECUCCO, C.; SANSONETTI, P.J.; PARROT, C. SepA, the 110 kDa protein secreted by *Shigella flexneri*: two-domain structure and proteolytic activity. **Microbiology** , v. 144, p. 1815-1822, 1998.

BENT, R.; MOLL, L.; GRABBE, S.; BROS, M. Interleukin-1 Beta-A Friend or Foe in Malignancies? **Int. J. Mol. Sci.**, v. 19, p. pii: E2155, 2018.

BERRILL, A.; BIDDLECOMBE, J.; BRACEWELL, D. **Peptide and Protein Delivery Product Quality During Manufacture and Supply**. Amsterdam: Elsevier Inc., 2011.

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

BERTANI, G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 62, p. 293-300, 1951.

BETANCOURT-SANCHEZ, M.; NAVARRO-GARCIA, F. Peptide secretion, internalization and induction of cell death during infection of epithelial cells by enteroaggregative *Escherichia coli*. **Microbiology**, v. 155, p. 2895-2906, 2009.

BIELASZEWSKA, M.; MELLMANN, A.; ZHANG, W.; KÖCH, R.; FRUTH, A.; BAUWENS, A.; PETERS, G.; KARCH, H. Characterisation of the enteroaggregative *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. **Lancet Infect. Dis.**, v. 11, p. 671-676, 2011.

BOATMAN, E.; CARTWRIGHT, F.; KENNY, G. Morphology, morphometry and electron microscopy of HeLa cells infected with bovine Mycoplasma. **Cell. Tissue Res.**, v. 170, p. 1-16, 1976.

BOISEN, N.; RUIZ-PEREZ, F.; SCHEUTZ, F.; KROGFELT, K.A.; NATARO, J.P. Short report: high prevalence of serine protease autotransporter cytotoxins among strains of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 80, p. 294-301, 2009.

BOISEN, N.; SCHEUTZ, F.; RASKO, D. A.; REDMAN, J. C.; PERSSON, S.; SIMON, J.; KOTLOFF, K.L.; LEVINE, M.M.; SOW, S.; TAMBOURA, B.; TOURE, A.; MALLE, D.; PANCHALINGAM, S.; KROGFELT, K.A.; NATARO, J.P. Genomic characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* from children in Mali. **J. Infect. Dis.**, v. 205, p. 431-444, 2012.

BOISEN, N.; HANSEN, A.M.; MELTON-CELSA, A.R.; ZANGARI, T.; MORTENSEN, N.P.; KAPER, J.B.; O'BRIEN, A.D.; NATARO, J.P. The presence of the pAA plasmid in the German O104:H4 Shiga toxin (Stx) type 2a-producing enteroaggregative *Escherichia coli* strain promotes the translocation of Stx2a across an epithelial cell monolayer. **J. Infect. Dis.**, v. 210, p. 1909-1919, 2014.

BOLL, E.J.; STRUVE, C.; BOISEN, N.; OLESEN, B.; STAHLHUT, S.G.; KROGFELT, K.A. Role of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in uropathogenesis. **Infect. Immun.**, v. 81, p. 1164-1171, 2013.

BONDOS, S. E.; BICKNELL, A. Detection and prevention of protein aggregation before, during, and after purification. **Anal Biochem.**, v. 316, p. 223-231, 2003.

BOOP, C. A.; BRENNER, F. W.; WELLS, J. G.; STROCKBINE, N. A.; FIELDS, P. I. *Escherichia, Shigella and Salmonella*. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**. 8th ed. Washington, D. C.: ASM Press, 2003. cap. 42, v. 1, p. 654-700.

BOUDJADI, S.; CARRIER, J. C.; GROULX, J. F.; BEAULIEU, J. F. Integrin $\alpha 1\beta 1$ expression is controlled by c-MYC in colorectal cancer cells. **Oncogene.**, v. 31, p. 1671-1678, 2016.

BOUZARI, S.; JAFARI, A.; ZAREPOUR, M. Distribution of virulence related genes among enteroaggregative *Escherichia coli* isolates: using multiplex PCR and hybridization. **Infect. Genet. Evol.**, v. 5, p. 79-83, 2005.

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

CHAUDHURI, R. R.; SEBAIHIA, M.; HOBMAN, J. L.; WEBBER, M. A.; Leyton, D. L.; GOLDBERG, M. D.; CUNNINGHAM, A. F.; SCOTT-TUCKER, A.; FERGUSON, P. R.; THOMAS, C. M.; FRANKEL, G.; TANG, C. M.; DUDLEY, E. G.; ROBERTS, I. S.; RASKO, D. A.; PALLEN, M. J.; PARKHILL, J.; NATARO, J. P.; THOMSON, N. R.; HENDERSON, I. R. Complete genome sequence and comparative metabolic profiling of the prototypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain 042. **PLoS One**, v. 5, e8801, 2010.

CHEN, X.; MACARA, I. G. Par-3 mediates the inhibition of LIM kinase 2 to regulate cofilin phosphorylation and tight junction assembly. **J. Cell Biol.**, v. 172, p. 671-678, 2006.

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

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, p. 4555-4558, 2000.

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

COHEN, M. B.; NATARO, J. P.; BERNSTEIN, D. I.; HAWKINS, J.; ROBERTS, N.; STAAT, M. A. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in acute childhood enteritis: a prospective controlled study. **J. Pediatr.**, v. 146, p. 54-61, 2005.

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

CRAVIOTO, A.; TELLO, A.; NAVARRO, A.; RUIZ, J.; VILLAFÁN, H.; URIBE, F.; ESLAVA, C. Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhea. **Lancet**, v. 337, p. 262-264, 1991.

- CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 8, p. 26-38, 2010.
- CZECZULIN, J. R.; WHITTAM, T. S.; HENDERSON, I. R.; NAVARRO-GARCIA, F.; NATARO, J. P. Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 2692-2699, 1999.
- COBELJIĆ, M.; MILJKOVIĆ-SELIMOVIĆ, B.; PAUNOVIĆ-TODOSIJEVIĆ, D.; VELICKOVIĆ, Z.; LEPSANOVIĆ, Z.; ZEC, N.; SAVIĆ, D.; ILIĆ, R.; KONSTANTINOVIĆ, S.; JOVANOVIĆ, B.; KOSTIĆ, V. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with an outbreak of diarrhoea in a neonatalnursery ward. **Epidemiol. Infect.**, v. 117, p. 11-16, 1996.
- CORKINS, M. R.; MCQUADE, J.; SCHAFFER, B. S.; MACDONALD, R. G. Insulin-like growth factor binding protein-4 expression is dependent on the carbohydrate in the media in HT-29 cells. **Growth. Horm. IGF Res.**, v. 12, p. 184-192, 2002.
- DALLMAN, T. J.; CHATTAWAY, M. A.; COWLEY, L. A.; DOUMITH, M.; TEWOLDE, R.; WOOLDRIDGE, D. J.; UNDERWOOD, A.; READY, D.; WAIN, J.; FOSTER, K.; GRANT, K. A.; JENKINS, C. An investigation of the diversity of strains of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from cases associated with a large multi-pathogen foodborne outbreak in the UK. **PLoS One**, v. 20, p. 9(5):e98103, 2014.
- DATSENKO, K.A.; WANNER, B.L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 6, p. 6640-6645, 2000.
- DAUTIN, N.; BERNSTEIN, H.D. Protein secretion in gram-negative bacteria via the autotrasporter pathway. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 61, p. 89-112, 2007.
- DAUTIN, N. Serine Protease Autotransporters of *Enterobacteriaceae* (SPATEs): Biogenesis and Function. **Toxins**, v. 2, p. 1179-1206, 2010.
- DELICATO, E.R.; DE BRITO, B.G.; KONOPATZKI, A.P.; GAZIRI, L.C.; VIDOTTO, M.C. Occurrence of the temperature-sensitive hemagglutinin among avian *Escherichia coli*. **Avian Dis.**, v.46, p.713-716, 2002.
- DESVAUX, M.; HÉBRAUD, M.; TALON, R.; HENDERSON, I.R. Outer membrane translocation: numerical protein secretion nomenclature in question in mycobacteria. **Trends Microbiol.**, v. 17, p. 338-340, 2009.
- DJAFARI, S.; EBEL, F.; DEIBEL, C.; KRÄMER, S.; HUDEL, M.; CHAKRABORTY, T. Characterization of an exported protease from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 25, p. 771-784, 1997.

DONTA, S. T.; MOON, H. W.; WHIPP, S. C. Detection of heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin with the use of adrenal cells in tissue culture. **Science.**, v. 183, p. 334-336, 1974.

DURAND, D.; CONTRERAS, C. A.; MOSQUITO, S.; RUIZ, F.; CLEARY, T. G.; OCHOA, T. J. *pic* gene of enteroaggregative *Escherichia coli* and its association with diarrhea in Peruvian children. **Pathog. Dis.**, v. 74 : pii:ftw054, 2016.

DUTTA, P. R.; CAPPELLO, R.; NAVARRO-GARCIA, F.; NATARO, J. P. Functional comparison of serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 7105-7113, 2002.

EDWARDS, L. A.; BAJAJ-ELLIOTT, M.; KLEIN, N. J.; MURCH, S. H.; PHILLIPS, A. D. Bacterial-epithelial contact is a key determinant of host innate immune responses to enteropathogenic and enteroaggregative *Escherichia coli*. **PLoS One**, v. 6, p. e27030, 2011.

ELIAS, W. P.; UBER, A. P.; TOMITA, S. K.; TRABULSI, L. R.; GOMES, T. A. T. Combinations of putative virulence markers in typical and variant enteroaggregative *Escherichia coli* strains from children with and without diarrhoea. **Epidemiol. Infect.**, v. 129, p. 49-55, 2002.

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

EVANS, D.G.; SILVER, R.P.; EVANS, D.J. JR.; CHASE, D.G.; GORBACH, S.L. Plasmid-controlled colonization factor associated with virulence in *Escherichia coli* enterotoxigenic for humans. **Infect. Immun.**, v. 12, p.656-667.1987.

ESLAVA, C.; NAVARRO-GARCIA, G.; CZECZULIN, J. R.; HENDERSON, I. R.; CRAVIOTO, A.; NATARO, J. P. Pet, na autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 3155-3163, 1998.

FANG, G. D.; LIMA, A.; MARTINS, C. V; NATARO, J. P.; GUERRANT, R. L. Etiology and epidemiology of persistent diarrhea in northeastern Brazil: a hospital-based, prospective, case-control study. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 21, p. 137-144, 1995.

FANTINI, J.; ABADIE, B.; TIRARD A.; REMY, L.; RIPERT, J. P.; EL BATTARI, A.; MARVALDI, J. Spontaneous and induced dome formation by two clonal cell populations derived from a human adenocarcinoma cell line. HT29. **J. Cell Sci.**, v. S3, p. 235-249, 1986.

FERRARETTO, A.; SIGNORILE, A.; GRAVAGHI, C.; FIORILLI, A.; TETTAMANTI, G. CASEIN. Phosphopeptides Influence Calcium Uptake by Cultured Human Intestinal HT-29 Tumor Cells. **J. Nutr.**, v.131, p. 1655-1661, 2001.

FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic

description of dead and dying eukaryotic cells. **Infect. Immun.** v. 73, p. 1907–1916, 2005.

FINKE, J. M.; ROY, M.; ZIMM, B. H.; JENNINGS, P. A. Aggregation events occur prior to stable intermediate formation during refolding of interleukin 1beta. **Biochemistry**, v. 39, p. 575-583, 2000.

FIUCCI, G.; CZARNY, M.; LAVIE, Y.; ZHAO, D.; BERSE, B.; BLUSZTAJN, K.; LISCOVITCH, M. Changes in phospholipase D isoform~ activity and expression in multidrug-resistant human cancer cells. **Int. J. Cancer**, v. 85, p. 882-888, 2000.

FISCHER WALKER, C.L.; LAMBERTI, L.; ADAIR, L.; GUERRANT, R.L.; LESCANO, A.G.; MARTORELL, R.; PINKERTON, R.C.; BLACK, R.E. Does childhood diarrhea influence cognition beyond the diarrhea-stunting pathway? **PLoS One**, v 10 p. e47908, 2012.

FJELDE, A. Human tumor cells in tissue culture. **Cancer**, v. 8, p. 845–851, 1955.

FOGH, J.; TREMPE, G. New human tumor cell lines. In: **J. Fogh (ed.). Human Tumor Cells in Vitro**, p. 115-141. New York: Plenum Press, 1975.

FRANÇA, F. L.; WELLS, T. J.; BROWNING, D. F.; NOGUEIRA, R. T.; SARGES, F. S. ; PEREIRA, A. C.; CUNNINGHAM, A. F.; LUCHEZE, K.; ROSA, A. C.; HENDERSON, I. R.; DE LUNA, MD. Genotypic and phenotypic characterisation of enteroaggregative *Escherichia coli* from children in Rio de Janeiro, Brazil. **PLoS One**, v. 30, p. 8(7):e69971, 2013.

FU, J.; YU, J.; CHEN, J.; XU, H.; LUO, Y.; LU, H. *In vitro* inhibitory properties of sesquiterpenes from Chloranthus serratus on cell motility via down-regulation of LIMK1 activation in human breast cancer. **Phytomedicine**. v. 49, p. 23-31, 2018.

GARCIA, P. G.; SILVA, V. L.; DINIZ, C. G. Occurrence and antimicrobial drug susceptibility patterns of commensal and diarrheagenic *Escherichia coli* in fecal microbiota from children with and without acute diarrhea. **J. Microbiol.**, v. 49, p. 46-52, 2011.

GARTLER, S. M. Apparent HeLa cell contamination of human heteroploid cell lines. **Nature**, v. 217, p. 750–751, 1968.

GEY, G. O.; COFFMAN, W. D.; KUBICEK, M. T. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. **Cancer Res.**, v. 12, p. 264–265, 1952.

GIOPPO, N. M. R.; ELIAS, W. P.; VIDOTTO, M. C.; LINHARES, R. E.; SARIDAKIS, H. O.; GOMES, T. A. T.; TRABULSI, L. R.; PELAYO, J. S. Prevalence of HEp-2 cell-adherent *Escherichia coli* and characterization of enteroaggregative *E. coli* and chain-like adherent *E. coli* isolated from children

with and without diarrhoea, in Londrina, Brazil. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 190, p. 293-298, 2000.

GLOBAL BURDEN OF DIARRHOEAL DISEASES COLLABORATORS. Estimates of global, regional, national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoeal diseases: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **Lancet. Infect. Dis.**, v. 17, p. 909–948, 2017.

GOMES, T. A.; VIEIRA, M. A.; ABE, C. M.; RODRIGUES, D.; GRIFFIN, P. M.; RAMOS, S. R. Adherence patterns and adherence-related DNA sequences in *Escherichia coli* isolates from children with and without diarrhea in São Paulo city, Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 3609-3613, 1998.

GOMES, T.A.; ELIAS, W.P.; SCALETSKY, I.C.A.; GUTH, B.E.C.; RODRIGUES, J.F.; PIAZZA, R.M.F; FERREIRA, L.C.S.; MARTINEZ, M.B. Diarrheagenic *Esherichia coli*. **Braz. J. Microb.**, v.47, p. 3-30, 2016.

GONZALES, M. F.; BROOKS, T.; PUKATZKI, S. U.; PROVENZANO, D. Rapid protocol for preparation of electrocompetent *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. **J. Vis. Exp.**, v. 80, p. e50684, 2013.

GOUT, S. P.; JACQUIER-SARLIN, M. R.; ROUARD-TALBOT, L.; ROUSSELLE, P.; BLOCK, M. R. Rho-dependent switch between c-2131 and c-3J31 integrins is induced by laminin-5 during early stage of HT-29 cell differentiation. **Mol. Biol. Cell.**, v. 12, p. 3268-3281, 2001.

GOLD, M. **A Conspiracy of Cells. One Woman's Immortal Legacy-And the Medical Scandal It Caused.** New York Press: New York, 1986. p. 170.

GOLDSBY, R. A.; KINTD, T. J.; OSBORNE, B. A. **Citocinas:** Propriedades das citocinas. In: GOLDSBY, R. A.; KINTD, T. J.; OSBORNE, B. A. **Kuby Imonologia.** 4^a ed. Editor Revinter: Rio de Janeiro, 2002. p. 662.

GREENBERG, D.E.; JIANG, Z.D.; STEFFEN, R.; VERENKER, M.P.; DUPONT, H.L. Markers of inflammation in bacterial diarrhea among travelers, with a focus on enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenicity. **J. Infect. Dis.**, v. 185, p.944 –949, 2002.

GRIPSTRA, J.; ARENA, J.; RUTTEN, L.; TOMMASSEN, J. Autotransporter secretion varying on a theme. **Res. Microbiol.**, v. 164, p. 562-582, 2013.

GUERRANT, R. L.; ORIÁ, R.B.; MOORE, S. R.; ORIÁ, M. O.; LIMA, A. A. Malnutrition as an enteric infectious disease with long-term effects on child development. **Nutr Rev.**, v. 66, p. 487-505, 2008.

GURI, A.; LI, Y.; CORREDIG, M. Interfacial dilational properties of tea polyphenols and milk proteins with gut epithelia and the role of mucus in nutrient adsorption. **Food Funct.**, v. 6, p.3642-3651, 2015.

GUTIERREZ-JIMENEZ, J.; ARGINIEGA, I.; NAVARRO-GARCIA, F. The serine protease motif of Pic mediates a dose-dependent mucolytic activity after binding to sugar constituents of the mucin substrate. **Microb. Pathog.**, v. 45, p. 115–123, 2008.

GUYER, D. M.; HENDERSON, I. R.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Identification of Sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 38, p. 53-66, 2000.

HARADA, A.; SEKIDO, N.; AKAHOSHI, T.; WADA, T.; MUKAIDA, N.; MATSUSHIMA, K. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. **J. Leukoc. Biol.**, v. 56, p. 559-564, 1994.

HARADA, T.; HIROI, M.; KAWAMORI, F.; FURUSAWA, A.; OHATA, K.; SUGIYAMA, K.; MASUDA, T. A food poisoning diarrhea outbreak caused by enteroaggregative *Escherichia coli* serogroup O126:H27 in Shizuoka, Japan. **Jpn. J. Infect. Dis.**, v. 60, p. 154-155, 2007.

HARRINGTON, S. M.; STRAUMAN, M. C.; ABE, C. M.; NATARO, J. P. Aggregative adherence fimbriae contribute to the inflammatory response of epithelial cells infected with enteroaggregative *Escherichia coli*. **Cell Microbiol.** v. 7, p. 1565–1578, 2005.

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

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

HAVT, A.; LIMA, I. F.; MEDEIROS, P. H.; CLEMENTINO, M. A.; SANTOS, A. K.; AMARAL, M. S.; VERAS, H. N.; PRATA, M. M.; LIMA, N. L.; DI MOURA, A.; LEITE, Á. M.; SOARES, A. M.; FILHO, J. Q.; HOUPP, E. R.; NATARO, J. P.; GUERRANT, R. L.; LIMA, A. A. Prevalence and virulence gene profiling of enteroaggregative *Escherichia coli* in malnourished and nourished Brazilian children. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 89, p. 98-105, 2017.

HEBBELSTRUP JENSEN, B.; OLSEN, K. E.; STRUVE, C.; KROGFELT, K. A.; PETERSEN, A. M. Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 27, p. 614-30, 2014.

HEBBELSTRUP JENSEN B.; POULSEN, A.; HEBBELSTRUP, S.R.R.; CARSTEN, S.; JØRGEN H.E.; FRIIS-MØLLER, A.; BOISEN, N.; RIE JØNSSON RANDI. F. P.; PETERSEN, A.M.; KROGFELT, K. A. Genetic Virulence Profile of Enteroaggregative *Escherichia coli* Strains Isolated from Danish Children with Either Acute or Persistent Diarrhea. **Front. Cell Infect. Microbiol.**, v. 7, p. 1-15, 2017.

HEBBELSTRUP JENSEN, B.; ADLER SØRENSEN, C.; HEBBELSTRUP RYE RASMUSSEN, S.; REJKJÆR HOLM, D.; FRIIS-MØLLER, A.; ENGBERG, J.; MIRSEPASI-LAURIDSEN, H. C.; STRUVE, C.; HAMMERUM, A. M.; PORSBO, L. J.; PETERSEN, R. F.; PETERSEN, A. M.; KROGFELT, K.A. Characterization of diarrheagenic enteroaggregative *Escherichia coli* in danish adults-antibiotic treatment does not reduce duration of diarrhea. **Front. Cell Infect. Microbiol.**, v. 27, p. 306. eCollection, 2018.

HENDERSON, I.R.; NAVARRO-GARCIA, F.; NATARO, J.P. The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. **Trends Microbiol.**, v. 6, p.370-8, 1998.

HENDERSON, I.R.; CZECZULIN, J.; ESLAVA, C.; NORIEGA, F.; NATARO, J. P. Characterization of Pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 5587-5596, 1999.

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

HOFFMANN, E.; DITTRICH-BREIHOLZ, O.; HOLTMANN, H.; KRACHT, M. Multiple control of interleukin-8 gene expression. **J. Leuk. Biol.**, v. 72, p. 847–855, 2002.

HOSSEINI-NAVE, H.; SAMAREH, S. M.; LASHKARI, M.; RAVARI, M. A.; HASHEMIZADEH, Z.; SEYEDI, M. F.; MOHSENI, F. Distribution of genes encoding virulence factors and multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) of entero-aggregative *Escherichia coli* (EAEC) isolated in Iran from patients with diarrhoea. **J. Med. Microbiol.**, v. 67, p. 1334-1339, 2018.

HUANG, D. B.; DUPONT, H. L. Enteroaggregative *Escherichia coli*: an emerging pathogen in children. **Semin. Pediatr. Infect. Dis.**, v. 15, p. 266-271, 2004.

HUANG, D. B.; NATARO, J. P.; DuPONT, H. L.; KAMAT, P. P.; MHATRE, A. D.; OKHUYSEN, P. C.; CHIANG T. Enteroaggregative *Escherichia coli* as a cause of diarrheal illness: a meta-analysis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 43, p. 556-563, 2006.

HUANG, Y.S.; XIE, N.; SU, Q.; SU, J.; HUANG, C.; LIAO, Q. J. Diallyl disulfide inhibits the proliferation of HT-19 human colon cancer cells by inducing differentially expressed genes. **Mol. Med. Rep.**, v. 4, p. 553-559, 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa nacional por amostra de domicílios**. v. 31, p. 1-135, 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Munic: mais da metade dos municípios brasileiros não tinha plano de saneamento básico em 2017. Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/22611-munic-mais-da-metade-dos-municipios-brasileiros-nao-tinha-plano-de-saneamento-basico-em-2017>> Acesso em: 09 dez de 2018.

IOVINE, B.; GUARDIA, F.; IRACE, C.; BEVILACQUA, M. A. I-carnosine dipeptide overcomes acquired resistance to 5-fluorouracil in HT29 human colon cancer cells via downregulation of HIF1-alpha and induction of apoptosis. **Biochimie.**, v. 127, p. 196-204, 2016.

IKUMAPAYI, U.N.; BOISEN, N.; HOSSAIN, M.J.; BETTS, M.; LAMIN, M; SAHA, D.; KWAMBANA-ADAMS, B.; DIONE, M.; ADEGBOLA, R.A.; ROCA, A.; NATARO, J.P.; ANTONIO, M. Identification of Subsets of Enteropathogenic *Escherichia coli* Associated with Diarrheal Disease among Under 5 Years of Age Children from Rural Gambia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 97, p. 997-1004, 2017.

ITOH, Y.; NAGANO, I.; KUNISHIMA, M.; EZAKI, T. Laboratory investigation of enteropathogenic *Escherichia coli* O untypeable:H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, p. 2546-2550, 1997.

IVANOV, A. I.; MCCALL, I. C.; ÁRKOS, C. A.; NUSRAT, A. Role of actin filament turnover and a myosin II motor in cytoskeleton-driven disassembly of the epithelial monolayer by *Shigella flexneri*. **J. Clin. Invest.**, v. 15, p. 2639-2651, 2004.

JACOB-DUBUISSON, F.; LOCHT, C.; ANTOINE, R. Two-partner secretion in Gram-negative bacteria: thrifty, specific pathway for large virulence proteins. **Mol. Microbiol.**, v. 40, p. 306-313, 2001.

JENKINS, C.; CHART, H.; WILLSHAW, A.G.; CHEASTY, T.; SMITH, H.R. Genotyping of enteropathogenic *Escherichia coli* and identification of target genes for the detection of both typical and atypical strains. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 55, p. 13-19, 2006.

JIANG, Z. D.; GREENBERG, D.; NATARO, J. P.; STEFFEN, R.; DUPONT, H. L. Rate of occurrence and pathogenic effect of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in intestinal travelers. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 4185-4190, 2002.

KARMALI, M. A.; STEELE, B. T.; PETRIC, M.; LIM, C. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. **Lancet.**, p. 619-620, 1983.

KLAFKE, K. **Determinação do papel das citocinas inflamatórias e IL-8 na proliferação, resistência quimioterápica e invasão celular em glioblastoma humano.** 2015. 60 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em

Biotecnologia) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

KHALIL, U.; YOUNUS, M.; ASGHAR, N.; SIDDIQUI, F.; GÓMEZ-DUARTE, O. G.; WREN, B. W.; BOKHAR, H. Phenotypic and genotypic characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from pediatric population in Pakistan. **APMIS.**, v. 124, p. 872-880, 2016.

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

KHALEEL, S. A.; AL-ABD, A. M.; ALI, A. A.; ABDEL-NAIM, A. B. Didox and resveratrol sensitize colorectal cancer cells to doxorubicin via activating apoptosis and ameliorating P-glycoprotein activity. **Sci. Rep.**, v. 14, p. 36855, 2016.

KIM, E. J.; KANG, I.; CHO, H. J.; KIM, W. K.; HA, Y.; PARK, J. H. Y. Conjugated linoleic acid downregulates insulin-like growth factor-1 receptor levels in HT-29 human colon cancer cells. **J. Nutr.**, v. 133, p. 2675-2681, 2003.

KIM, I. H.; NAM, T. J. Fucoidan downregulates insulin-like growth factor-I receptor levels in HT-29 human colon cancer cells. **Oncol. Rep.**, v. 39, p. 1516-1522, 2018.

KLAUSER, T.J.; POHLNER, J.; MEYER, T. F. The secretion pathway of IgA protease-type proteins in Gram-negative bacteria. **Bioessays**, v. 15, p. 799-805, 1993.

KOCH, A.E.; POLVERINI, P. J.; KUNKEL, S. L.; HARLOW, L. A.; DIPIETRO, L. A.; ELNER, V. M.; ELNER, S. G.; STRIETER, R. M. Interleukin-8 as a macrophagederived mediator of angiogenesis. **Science**, v. 258, p. 1798–1801, 1992.

KOLIOS, G.; ROBERTSPN D.A.F.; JORDAN, N. J.; MINTY A.; CAPUT, P.F.; WESTWICK, J. Interleukin-8 production by the human colon epithelial cell line HT-29: modulation by interleukin-13. **Br. J. Pharmacol.**, v. p. 351-559, 1996.

KOSTAKIOTI, M.; STATHOPOULOS, C. Functional analysis of the Tsh autotransporter from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 5548-5554, 2004.

KNOWLES, T.J.; SCOTT-TUCKER, A.; OBERDUIN, M.; HENDERSON, I.R. Membrane protein architects: the role of the BAM complex in outer membrane protein assembly. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 7, p. 206-214, 2009.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-85, 1970.

LAVIE, Y.; FIUCCI, G.; LISCOVITCH, M. Up-regulation of caveolae and caveolar constituents in muhidrug-resistant cancer cells. *J. Biol. Chem.*, v. 273, p. 32380-32383, 1998.

LIMA, A. A.; FANG, G.; SHORLING, J. B.; DE ALBUQUERQUE, L.; MCAULIFFE, J. J.; MOTA, S.; LEITE, R.; GUERRANT, R. L. Persistent diarrhea in northeast Brazil: etiologies and interactions with malnutrition. *Acta Pediatr. Suppl.*, v. 381, p. 37-44, 1992.

LIMA, A. A.; MOORE, S. R.; BARBOZA, M. S. JR; SOARES, A. M.; SCHLEUPNER, M. A.; NEWMAN, R. D.; SEARS, C. L.; NATARO, J. P.; FEDORKO, D. P.; WUHIB, T.; SCHORLING, J. B.; GUERRANT, R. L. Persistent diarrhea signals a critical period of increased diarrhea burdens and nutritional shortfalls: a prospective cohort study among children in northeastern Brazil. *J. Infect. Dis.*, v. 181, p.1643–1651, 2000.

LIMA, A. A. M.; MEDEIROS, P. H. Q. S.; HAVT, A. Enteroaggregative *Escherichia coli* subclinical and clinical infections. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, v. 31, p. 433-439, 2018.

LIMA, A. A. M.; SOARES, A. M.; FILHO, J. Q. S.; HAVT, A.; LIMA, I. F. N.; LIMA, N. L.; ABREU, C. B.; JUNIOR, F. S.; MOTA, R. M. S.; PAN, W. K.; TROEGER, C.; MEDEIROS, P. H. Q. S.; VERAS, H. N.; PRATA, M.A.; MCCORMICK, B. J.J.; MCGRATH, M.; ROGAWSKI, E. T.; HOUPP, E. R.; PLATTS-MILLS, J. A.; GRATZ, J.; SAMIE, A.; BESSONG, P.; BABJI, S.; KANG, G.; QURESHI, S.; SHAKOOR, S.; BHUTTA, Z. A.; HAQUE, R.; AHMED, T.; MDUMA, E. R.; SVENSEN, E.; KOSEK, M.; YORI, P. P.; BODHIDATTA, L.; JASMIN, S.; MASON, C. J. ; LANG, D.; GOTTLIEB, M.; GUERRANT, R. L. Enteroaggregative *Escherichia coli* subclinical infection and coinfections and impaired child growth in the MAL-ED cohort study. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, v. 66, p. 325-333, 2018.

LIMA, I. F.; BOISEN, N.; QUETZ, J. S.; HAVT, A.; DE CARVALHO, E. B.; SOARES, A. M.; LIMA, N. L.; MOTA, R. M.; NATARO, J. P.; GUERRANT, R. L.; LIMA, A. A. Prevalence of enteroaggregative *Escherichia coli* and its virulence-related genes in a case-control study among children from north-eastern Brazil. *J. Med. Microbiol.*, v. 62, p. 683-6, 2013.

LINK, D.; RIESS, T.; AUTENRIETH, I. B.; LUPAS, A.; KEMPF, V. A. Trimeric autotransporter adhesins: variable structure, common function. *Trends Microbiol.*, v. 14, p. 264-270, 2006.

LEO, J.C.; FRIN, I.; LINKE, D. Type V secretion: mechanism(s) of autotransport through the bacterial outer membrane. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, v. 367, p. 1088-1101, 2012.

LESUFFLEUR, T.; BARBAT, A.; LUCCIONI, C., BEAUMATIN, J.; CLAIR, M.; KORNOWSKI, A.; DUSSAULX, E.; DUTRILLAUX, B.; ZWEIBAUM, A. Dihydrofolate reductase gene amplification-associated shift of differentiation in methotrexate-adapted HT-29 cells. *J. Cell Biol.*, v. 115, p. 1409-1418, 1991.

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

LEYTON, D. L.; SLOAN, J.; HILL, R. E.; DOUGHTY, S.; HARTLAND, E. L. Transfer region of pO113 from enterohemorrhagic *Escherichia coli*: similarity with R64 and identification of a novel plasmid-encoded autotransporter, EpeA. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 6307-6319, 2003.

LU, H.; ZHANG, H.; WANG, Q.; YUAN, H.; HE, W.; ZHAO, Z.; LI, Y. Purification, refolding of hybrid hIFNc-Kringle 5 expressed in *Escherichia coli*, **Curr. Microbiol.**, v. 42, p. 211-216, 2011.

MACRINA, F.L.; KOPECKO, D.J.; JONES, K.R.; AYERS, D.J.; MCCOWEN, S.M. A multiple plasmid-containing *Escherichia coli* strain: convenient source of size reference plasmid molecules. **Plasmid.**, v. 1 p. 417-420, 1978.

MADESH, M.; BERNARD, O.; BALASUBRUAMAIAN, K. A. Butyrate-induced alteration in lipid composition of human colon cell line HT-29. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, v. 38, 6 p. 659-664, 1996.

MALDONADO-CONTRERAS, A.; BIRTLEY, J.R.; BOLL, E.; ZHAO, Y.; MUMY, K. L.; TOSCANO, J.; AYEHUNIE, S.; REINECKER, H. C.; STERN, L. J.; MCCORMICK, B. A. Shigella depends on SepA to destabilize the intestinal epithelial integrity via cofilin activation. **Gut. Microbes.**, v. 2, p. 544-560, 2017.

MASTERS, R. J. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 2, p. 315-319, 2002.

MARESCA, M; MAHFoud, R.; GARMY, N.; FANTINI, J. The Mycotoxin Deoxynivalenol Affects Nutrient Absorption in Human Intestinal Epithelial Cells. **J. Nutr.**, v. 139, p. 2723-2731, 2002.

MARONCLE, N. M.; SIVICK, K. E.; BRADY, R.; STOKES, F. E.; MOBLEY, H.L. Protease activity, secretion, cell entry, cytotoxicity, and cellular targets of secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 6124-6134, 2006.

MARTÍNEZ-MAQUEDA, D.; MIRALLES, B.; RECIO, I. **HT29 Cell Line. In: VERHOECKX, K.; COTTER, P.; LÓPEZ-EXPÓSITO, I.; KLEIVELAND, C.; LEA, T.; MACKIE, A.; REQUENA, T., SWIATECKA; D., WICHERS, H. The Impact of Food Bio-Actives on Gut Health.** Springer International Publishing: Switzerland, 2015. p. 338.

MARTINON, F.; BURNS, K.; TSCHOPP, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. **Mol. Cell**, v. 10, p. 417-426, 2002.

MARTINON, F.; MAYOR, A.; TSCHOPP, J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu. Rev. Immunol.* v. 27, p. 229–265, 2009.

MATHEWSON, J. J.; JOHNSON, P. C.; DUPONT, H. L.; MORGAN, D. R.; THORNTON, S. A.; WOOD, L. V.; ERICSSON, C. D. A newly recognized cause of traveler's diarrhea: enteroadherent *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.*, v. 151, p. 471–475, 1985.

MATHEWSON, J. J.; JIANG, Z. D.; ZUMLA, A.; CHINTU, C.; LUO, N.; CALAMARI, S. R.; GENTA, R. M.; STEEPHEN, A.; SCHWARTZ, P.; DUPONT, H. L. HEp-2 cell-adherent *Escherichia coli* in patients with human immunodeficiency virus-associated diarrhea. *J. Infect. Dis.*, v. 171, p. 1636-1639, 1995.

MEDEIROS, P.; LIMA A. A. M.; GUEDES, M. M.; HAVT, A.; BONA M. D.; REY, L. C.; SOARES, A . M.; GUERRANTM R. L.; WEIGL, B. H.; LIMA, I. F. N. molecular characterization of virulence and antimicrobial resistance profile of *Shigella* species isolated from children with moderate to severe diarrhea in northeastern Brazil. *Diagn. Microbio. Infect. Dis.*, v. 90, p. 198-205, 2017.

MELLIES, J. L.; NAVARRO-GARCIA, F.; OKEKE, I.; FREDERICKSON, J.; NATARO, J. P.; KAPER, J. B. espC pathogenicity island of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes an enterotoxin. *Infect. Immun.*, v. 69, p. 315-324, 2001.

MIZUNO, K. Signaling mechanisms and functional roles of cofilin phosphorylation and desphosphorylation. *Cell Signal.*, v. 25, p. 457-469, 2013.

MOHAMED, J. A.; HUANG, D. B.; JIANG, Z. D.; DUPONT, H. L.; NATARO, J. P.; BELKIND-GERSON, J.; OKHUYSEN, P. C. Association of putative enteroaggregative *Escherichia coli* virulence genes and biofilm production in isolates from travelers to developing countries. *J. Clin. Microbiol.*, v. 45, p. 121-126, 2007.

MONFARDINI, M. V. **Caracterização Genotípica e Fenotípica de Amostras de *Escherichia coli* Enteroagregativa (EAEC) e com Padrão *Chain-like adhesion* (CLA) de Crianças com e sem Diarreia.** 2012. 96f. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas). Universidade Federal do Espírito Santo. UFES.

MORIN, N.; SANTIAGO, A. E.; ERNST, R. K.; GUILLOT S. J.; NATARO, J. P. Characterization of the AggR Regulon in enteroaggregative *E. coli*. *Infect. Immun.*, v. 81, p. 122-132, 2012.

MORAIS, T. B.; GOMES, T. A.; SIGULEM, D. M. Enteroaggregative *Escherichia coli* in infant feeding bottles. *Lancet.*, v. 349 p. 1448-1449, 1997.

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. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 66, p. 50-57, 2010.

MUNERA, D.; RITCHIE, J.M.; HATZIOS, S.K.; BRONSON, R.; FANG, G.; SCHADT, E.E.; DAVIS, B.M.; WALDOR, M.K. Autotransporters but not pAA are critical for rabbit colonization by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4. **Nat. Commun.**, v. 5, 3080, 2014.

MUNIESA, M.; HAMMERL, J. A.; HERTWIG, S.; APPEL, B.; BRÜSSOW, H. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: a new challenge for microbiology. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 78, p. 4065-4073, 2012.

NAGUMO, Y.; HAN, J.; BELLILA, A.; ISODA, H.; TANAKA, T. Cofilin mediates tight-junction opening by redistributing actin and tight-junction proteins. **Biochem. Biophys Res. Commun.**, v. 377, p. 921-925, 2008.

NATARO, J. P.; BALDINI, M. M.; KAPER, J. B.; BLACK, R. E.; BRAVO, N.; LEVINE, M. M. Detection of an adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli* with a DNA probe. **J. Infect. Dis.**, v. 152, p. 560-565, 1985.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B.; ROBINS-BROWNE, E.; PRADO, V.; VIAL, P. A.; LEVINE, M. M. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 16, p. 829-831, 1987.

NATARO, J. P.; DENG, Y.; COOKSON, S.; CRAVIOTO, A.; SAVARINO, S. J.; GUERS, L. D.; LEVINE, M. M.; TACKET, C. O. Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated in volunteers. **J. Infect. Dis.**, v. 171, p. 465-468, 1995.

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

NATARO, J. P.; STEINER, T.; GUERRANT, R. L. Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Emerg Infect Dis.**, v. 4, p. 251-261, 1998.

NATARO, J. P. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 21, p. 4-8, 2005.

NATARO, J. P. Outbreak of hemolytic-uremic syndrome linked to Shiga toxin-producing enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4. **Pediatr. Res.**, v. 70, p. 221, 2011.

NAVA-ACOSTA, R.; NAVARRO-GARCIA, F. Cytokeratin 8 is an epithelial cell receptor for a cytotoxic protease autotransporter of Enterobacteriaceae. **mBio**, v. 4, p. e00838-13, 2013.

NAVARRA-GARCIA, F.; GUTIERREZ-JIMENEZ, J.; GARCIA-TOVAR, C.; CASTRO, L.A.; SALAZAR-GONZALEZ, H.; CORDOVA, V. Pic, an autotransporter protein secreted by different pathogens in the

Enterobacteriaceae family, is a potent mucus secretagogue. **Infect. Immun.**, v. 78 p. 4101-4119, 2010.

NAVARRO-GARCIA, F.; ELIAS, W. P. Autotransporters and virulence of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Gut. Microbes**, v. 2, p. 13-24, 2011.

NEZARIEH, R. ; SHAKIBAIE, M. R.; NAVI, H. H.; NOROUZI, A.; SALAJEGHEH, G.; HAYATBAKSH, M. Distribution of Virulence Genes, Enterotoxin and Biofilm Formation Among Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) Strains Isolated From Stools of Children With Diarrhea in South East Iran. **Arch. Pediatr. Infect. Dis.**, v. 3, p. e29745, 2015.

NISHITA, M.; TOMIZAWA, C.; YAMAMOTO, M.; HORITA, Y.; OHASHI, K.; MIZUNO, K. Spatial and temporal regulation of cofilin activity by LIM kinase and Slingshot is critical for directional cell migration . **J. Cell Biol.**, v. 171, p. 349-59, 2015.

NGUYEN, T. V.; VAN, P. L.; HUY, C. L.; NGUYEN-GIA, K.; WEINTRAUB, A. Detection and characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* from young children in Hanoi, Vietnam. **J. Clin. Microbiol.**, v.43, p. 755–760, 2005.

NISHIMURA, K.; YOON, Y. H.; KURIHARA, A.; UNZAI, S.; LUIRINK, J.; PARK, S. Y.; TAME, J. R. Role of domains within the autotransporter Hbp/Tsh. **Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.**, v. 66, p. 1295-1300, 2010.

OBERHETTINGER, P.; SHÜTZ, M.; LEO, J. C.; HEINZ, N.; BERGER, J.; AUTENRIETH, I. B.; LINKE, D. Intimin and Invasin Export Their C-Terminus to the Bacterial Cells Surface Using an Inverse Mechanism Compared to Classical Autotransport. **PLoS One**, v. 7, p. 1-15, 2012.

OKEKE, I. N.; OJO, O.; LAMOKANRA, A.; KAPER, J. B. Etiology of acute diarrhea in adults in southwestern Nigeria. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 4525-4230, 2003.

OPINTAN, J. A.; NEWMAN, M. J.; AYEH-KUMI, P. F.; AFFRIM, R.; GEPI-ATTEE, R.; SEVILLEJA, J. E.; ROCHE, J. K.; NATARO, J. P.; WARREN, C. A.; GUERRANT, R. L. Pediatric diarrhea in southern Ghana: etiology and association with intestinal inflammation and malnutrition. **Am. J. Trop. Med Hyg.**, v. 83, p.936–943, 2010.

OTTO, B. R.; VAN DOOREN, S. J.; NUIJENS, J. H.; LUIRI004EK, J.; OUDEGA, B. Characterization of a hemoglobin protease secreted by the pathogenic *Escherichia coli* strain EB1. **J. Exp. Med.**, v. 188, p.1091-1103, 1998.

- OTTO, B. R.; SIJBRANDI, R.; LUIRINK, J.; OUDEGA, B.; HEDDLE, J. G.; MIZUTANI, K.; PARK, S. Y.; TAME, J. R. Crystal structure of hemoglobin protease, a heme binding autotransporter protein from pathogenic *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 17339-17345, 2005.
- PABALAN, N.; SINGIAN, E.; JARJANAZI, H.; STEINER, T. S. Enteropathogenic *Escherichia coli* and acute diarrhea in children: a meta-analysis of South Asian populations. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 32, p. 597–607, 2013.
- PACHA, J.; LISA, E; MIKSIK, I. Effect of cellular differentiation of 11β-hydroxysteroid dehydrogenase activity in the intestine. **Steroids.**, v. 67, p. 119-126, 2002.
- PALOMINO, D. C.; MARTI, L. C. Chemokines and immunity. **Einstein (São Paulo)**, v. 13, p. 469-473, 2015.
- PARREIRA, V. R.; GYLES, C. L. A novel pathogenicity island integrated adjacent to the *thrW* tRNA gene of avian pathogenic *Escherichia coli* ancondes a vacuating autotransporter toxin. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 5087-5096, 2003.
- PARHAM, N. J.; SRINIVASAN, U.; DESVAUX, M.; FOXMAN, B.; MARRS, C. F.; HENDERSON, I. R. PicU, a second serine protease autotransporter of uropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 230, p. 73-83, 2004.
- PATEL, S. K.; DOTSON, J.; ALLEN, K. P.; FLECKENSTEIN, J. M. Identification and molecular characterization of EatA, an autotransporter protein of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 1786-1794, 2004.
- PATRO, S. Y.; FREUND, E.; CHANG, B. S. Protein formulation and fill-finish operations, **Biotechnol. Annu. Rev.**, v. 8, p. 55-84, 2002.
- PENFOLD, R. J.; PEMBERTON, J. M. Sequencing, chromosomal inactivation, and functional expression in *Escherichia coli* of *ppsR*, a gene which represses carotenoid and bacteriochlorophyll synthesis in *Rhodobacter sphaeroides*. **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 2869-2876, 1992.
- PEREIRA, A.L.; FERRAZ, L.R.; SILVA, R.S.; GIUGLIANO, L.G. Enteropathogenic *Escherichia coli* virulence markers: positive association with distinct clinical characteristics and segregation into 3 enteropathogenic *E. coli* serogroups. **J. Infect. Dis.**, v. 195, p. 366 –374, 2007.
- PIVA, I. C.; PEREIRA, A. L.; FERRAZ, L. R.; SILVA, R. S. N.; VIEIRA, A. C.; BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; BLANCO, J.; GIUGLIANO, L. G. Virulence markers of enteroaggregative *Escherichia coli* from children and adults with diarrhea in Brasília, Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 1827-1832, 2003.

PODEWILS, L. J.; MINTZ, E. D.; NATARO, J.P.; PARASHAR, U. D. Acute, infections diarrhea among children in developing countries. **Semin. Pediatr. Infect.**, v. 15, p 155-168, 2004.

PROTEIN HOMOLOGY/ANALOGY RECOGNITION ENGINE V 2.0 (PHYRE2), disponível em:< <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>>. Acesso em: 20 ago de 2015.

PROVENCE, D. L.; CURTISS, R. 3rd. Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 1369-1380, 1994.

REGUA-MANGIA, A. H.; GOMES, T. A. T.; VIEIRA, M. A. M.; ANDRADE, J. R.; IRINO, K.; TEIXEIRA, L. M. Frequency and characteristics of diarrhoeagenic *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhoea in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Infect.**, v. 48, p. 161–167, 2004.

RESTIERI, C.; GARRISS, G.; LOCAS, M.C.; DOZOIS, C.M. Autotransporter-encoding sequences are phylogenetically distributed among *Escherichia coli* clinical isolates and reference strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 73 p 1553-1562, 2007.

RASKO, D. A.; WEBSTER, D. R; SAHL, J. W.; BASHIR, A.; BOISEN, N.; SCHEUTZ, F.; PAXINOS, E. E.; SEBRA, R.; CHIN, C. S.; ILIOPOULOS, D.; KLAMMER A.; PELUSO, P.; LEE, L.; KISLYUK, A. O.; BULLARD, J.; KASARSKIS, A.; WANG, S.; EID, J.; RANK, D.; REDMAN, J. C.; STEYERT, S. R.; FRIMODT-MØLLER, J.; STRUVE, C.; PETERSEN, A. M.; KROGFELT, K. A.; NATARO, J. P.; SCHADT, E. E.; WALDOR, M. K. Origins of the *Escherichia coli* strain causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany. **N. Engl. J. Med.**, v. 365, p. 709-717, 2011.

RIEDEL, T.; ROHLFS, M.; BUCHHOLZ, I.; WAGNER-DÖBLER, I.; RECK, M. Complete sequence of the suicide vector pJP5603. **Plasmid.**, v. 69, p.104-107, 2013.

ROCHE, J. K.; CABEL, A.; SEVILLEJA, J.; NATARO, J. P.; GUERRANT, R. L. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EAEC) impairs growthwhile malnutrition worsens EAEC infection: a novel murine model of the infection malnutrition cycle. **J. Infect. Dis.**, v. 202, p. 506–514, 2010.

ROGAWSKI, E.; GUERRANT, R.; HAVT, A.; LIMA, I. F. N.; MEDEIROS, P. H. Q. S. ; SEIDMAN, J.C.; MCCORMICK, B. J. J.; BABJI, S.; HARIRAJU, D.; BODHIDATTA, L.; SHRESTHA, J.; ANANIA, J.; MARO, A.; SAMIE, A.; YORI, P. P.; QURESHI, S.; MAHFUZ, M.; BESSONG, P. O.; KOSEK, M. N.; AHMED, T.; BHUTTA, Z. A.; LANG, D. R.; GOTTLIEB, M.; HOUPP, E. R.; LIMA, A. A. M.; MAL-ED NETWORK INVESTIGATORS. Epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infections and associated outcomes in the MAL-ED birth cohort. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 11, p. (7):e0005798, 2017.

ROSSELIN, G. Les récepteurs de l'épithélium digestif . **Médecine/Sciences.**, v. 5, p. 287-297, 1989.

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

RODRIGUES, J.; ACOSTA, V. C.; CANDEIAS, J. M.; SOUZA, L. O.; FILHO, F. J. Prevalence of diarrheogenic *Escherichia coli* and rotavirus among children from Botucatu. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 35, p. 1311-1318, 2002.

ROSSI, D.; ZLOTNIK, A. The biology of chemokines and their receptors. **Annu. Rev. Immunol.**, v.18, p. 217-242, 2000.

ROUSSET, M. The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation. **Biochimie.**, v. 68, p. 1035-1040, 1986.

RUIZ-PEREZ, F.; HENDERSON, I. R.; LEYTON, D. L.; ROSSITER, A. E.; ZHANG , Y.; NATARO, J. P. Roles of periplasmic chaperone proteins in the biogenesis of serine protease autotransporter of Enterobacteriaceae. **J. Bacteriol.**, v. 191, p. 6571-6583, 2009.

RUIZ-PEREZ, F.; WAHID, R.; FAHERTY, C. S.; KOLAPPASWAMY, K.; RODRIGUEZ, L.; SANTIAGO, A.; MURPHY, E.; CROSS, A.; SZTEIN, M. B.; NATARO, J. P. Serine protease autotransporters from *Shigella flexneri* and pathogenic *Escherichia coli* target a broad range of leukocyte glycoproteins. **Proc. Natl. Acad. Sci USA.**,v. 108, p. 12881-12886, 2011.

RUIZ-PEREZ, F.; NATARO, J. P. Bacterial serine proteases secreted by the autotransporter pathway: classification, specificity, and role in virulence. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 71, p. 745-770, 2014.

RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **J. Infect. Dis.**, v. 181, p. 1753-1754, 2000.

SALACHA, R.; KOVACIĆ, F.; BRONCHIER-ARMANET, C.; WILHELM, S.; TOMMASSEN, J.; FILLOUX, A.; VOULHOUX, R.; BLEVES, S. The *Pseudomonas aeruginosa* patatin-like protein PlpD is the archetype of a novel Type V secretion system **Environ. Microbiol.**, v. 12, p. 1498-1512, 2010.

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

SAMIE, A.; OBI, C. L.; DILLINGHAM, R.; PINKERTON, R. C.; GUERRANT, R. L. Enteropathogenic *Escherichia coli* in Venda, South Africa: distribution of virulence-related genes by multiplex polymerase chain reaction in stool samples

of human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative individuals and primary school children. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 77, p. 142-150, 2007.

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

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

dos SANTOS, L.R.; IRINO, K.; VAZ, T.M.L.; GUTH, B.E.C. Set of virulence gens and genetic relatedness of O113:H21 *Escherichia coli* strains isolated from the animal reservoir and human infections in Brazil. **J. Med. Microbiol.**, v. 59, p. 634-640, 2010

SARANTUYA, J.; NISHI, J.; WAKIMOTO, N.; ERDENE, S.; NATARO, J. P.; SHEIKH, J.; IWASHITA, M.; MANAGO, K.; TOKUDA, K.; YOSHINAGA, M.; MIYATA, K.; KAWANO, Y. Typical enteroaggregative *Escherichia coli* is the most prevalent pathotype among *E. coli* strains causing diarrhea in Mongolian children. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 133-139, 2004.

SAVKOVIC, S.D.; KOUTSOURIS, A.; HECHT, G. Activation of NF-kappaB in intestinal epithelial cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. **Am. J. Physiol.**, v. 273, p. C1160–C1167, 1997.

SAVKOVIC, S. D.; RAMASWAMY, A.; KOUTSOURIS, A.; HECHT, G. EPEC-activated ERK1/2 participate in inflammatory response but not tight junction barrier disruption. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 281, p. G890–G898, 2001.

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

SCALETSKY, I. C. A.; FABBRICOTI, S. H.; SILVA, S. O.; MORAIS, M. B.; FAGUNDES-NETO, U. HEp-2-adherent *Escherichia coli* strains associated with acute diarrhea, São Paulo, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, p. 855-858, 2002.

SCHMIDT, H.; ZHANG, W.L.; HEMMRICH, U.; JELACIC, S.; BRUNDER, W.; TARR, P.I.; DOBRINDT, U.; HACKER, J.; KARCH, H. Identification and characterization of a novel genomic island integrated at selC in locus of enterocyte effacement-negative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Infect Immun.**, v. 69 p. 6863-6873, 2001.

SHAO, S.; ZHU, Y.; MENG, T.; LIU, Y.; HONG, Y.; YUAN, M.; YUAN, H.; HU, F. Targeting High Expressed $\alpha_5\beta_1$ Integrin in Liver Metastatic Lesions To Resist

Metastasis of Colorectal Cancer by RPM Peptide-Modified Chitosan-Stearic Micelles. **Mol. Pharm.**, v. 2, p. 1653-1663, 2018.

SHAZBERG, G.; WOLK, M.; SCHMIDT, H.; SECHTER, I.; GOTTESMAN, G.; MIRON, D. Enteropathogenic *Escherichia coli* serotype O126:H27, Israel. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 9, p. 1170 –1173, 2003.

SHIOBARA, T.; USUI, T.; HAN, J.; ISODA, H.; NAGUMO, Y. The reversible increase in tight junction permeability induced by capsaicin is mediated via cofilin-actin cytoskeletal dynamics and decreased level of occludin. **PLoS One**, v. 8, p. e79954, 2013.

SCHERER, W. F.; SYVERTON, J. T.; GEY, G. O. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. **J. Exp. Med.**, v. 97, p. 695–709, 1953.

SHAH, N.; DUPONT, H. L.; RAMSEY, D. J. Global etiology of travelers' diarrhea: systematic review from 1973 to the present. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 80, p. 609-614, 2009.

SHIN, J.; OH, S. S.; OH, K. H.; PARK, J. H.; JANG, E. J.; CHUNG, G. T.; YOO, C. K.; BAE, G. R.; CHO, S. H. An Outbreak of Foodborne Illness Caused by Enteropathogenic *Escherichia coli* in a High School in South Korea. **Jpn. J. Infect. Dis.**, v. 68, p. 514-519, 2015.

SIDOTI, F.; RITTÀ, M.; COSTA, C.; CAVALLO, R. Diagnosis of viral gastroenteritis: limits and potential of currently available procedures. **J. Infect. Dev. Ctries.**, v. 6, p. 551-561, 2015.

SILVER, R. P.; AARONSON, W.; SUTTON, A.; SCHNEERSON, R. Comparative analysis of plasmids and some metabolic characteristics of *Escherichia coli* K1 from diseased and healthy individuals. **Infect. Immun.**, v. 29, p. 200 –206, 1980.

SMITH, H. R.; CHEASTY, T.; ROWE, B. Enteropathogenic *Escherichia coli* and outbreaks of gastroenteritis in UK. **Lancet.**, v. 350, p. 814-815, 1997.

SMYTH, M. J.; ZACHARIAE, C.O.; NORIHISA, Y.; ORTALDO, J. R.; HISHINUMA, A.; MATSUSHIMA, K. IL-8 gene expression and production in human peripheral blood lymphocyte subsets. **J. Immunol.**, v. 146, p. 3815-3823, 1991.

SPANO, L.C.; DA CUNHA, K.F.; MONFARDINI, M.V.; DE CÁSSIA, BERGAMASCHI F.R.; SCALETSKY, I.C.A. High prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* carrying toxin-encoding genes isolated from children and adults in southeastern Brazil. **BMC Infect. Dis.**, v. 18, p.17:773, 2017.

SOBIESZCZAŃSKA, B.; DUDA, A.K.; TURNIAK, M.; DUDA-MADEJ, A.; FRANICZEK, R.; KASPRZYKOWSKA, U. Characterization of genes with internalization of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Microb. Pathog.**, v. 50, p. 141-147, 2011.

SOUZA, E. C.; MARTINEZ, M. B.; TADDEI, C. R.; MUKAI, L.; GILIO, A. E.; RACZ, M. L.; SILVA, L.; EJZENBERG, B.; OKAY, Y. Perfil etiológico das diarréias agudas de crianças atendidas em São Paulo. **J. Pediatr.**, v. 78, p. 31-38, 2002.

STEELAND, S.; LIBERT, C.; VANDENBROUCKE, R. E. A New Venue of TNF Targeting. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 11, p: E1442, 2018.

STEINER, T. S.; LIMA, A. A.; NATARO, J. P.; GUERRANT, R. L. Enteroaggregative *Escherichia coli* produce intestinal inflammation and growth impairment and cause interleukin-8 release from intestinal epithelial cells. **J. Infect. Dis.** v. 177, p. 88–96, 1998.

STEINER, T. S.; NATARO, J. P.; POTEET-SMITH, C. E.; SMITH, J. A.; GUERRANT, R. L. Enteroaggregative *Escherichia coli* expresses a novel flagellin that causes IL-8 release from intestinal epithelial cells. **J. Clin. Invest.**, v. 105, p. 1769–1777, 2000.

GUTIÉRREZ-JIMÉNEZ, J.; ARGINIEGA, I.; NAVARRO-GARCIA, F. The serine protease motif of Pic mediates a dose-dependent mucolytic activity after binding to sugar coantituents of the mucin substrate. **Microb. Pathog.**, v. 45, p. 115-123, 2008.

SU, J.; ZHOU, Y.; PAN, Z.; SHI, L.; YANG, J.; LIAO, A.; LIAO, Q.; SU, Q. Downregulation of LIMK1–ADF/cofilin by DADS inhibits the migration and invasion of colon cancer. **Sci. Rep.**, p. 7:45624, 2017.

TADDEI, C.R.; MORENO, A.C.; FERNANDES-FILHO, A.; MONTEMOR, L.P.; MARTINEZ, M.B. Prevalence of secreted autotransporter toxin gene among diffusely adhering *Escherichia coli* isolated from stools of children. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 227, p.249 –253, 2005.

TAO, H.; ZHEN, L.; CHUN-YING, G.; CHI, H. C. Mechanisms of drug resistance in colon cancer and its therapeutic strategies. **World J. Gastroenterol.**, v. 22. p. 6876-6889, 2016.

TAPADER, R.; CHATTERJEE, S.; SINGH, A.K.; DAYMA, P.; HALDAR, S.; PAL A, et al. The high prevalence of serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae (SPATEs) in *Escherichia coli* causing neonatal septicemia. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v 33, p. 2015-2024, 2014.

TAPIA-PASTRANA, G.; CHAVEZ-DUEÑAS, L.; LANZ-MENDOZA, H.; TETER, K.; NAVARRO-GARCI, F. VirL is a periplasm protein required for efficient secretion of plasmid-encoded toxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 80, p. 2276-2285, 2012.

THRELFALL, E.J.; ROWE, B.; FERGUSON, J.L; WARD, L.R. Characterization of plasmids conferring resistance to gentamicin and apramycin in strains of *Salmonella typhimurium* phage type 204c isolated in Britain. **J Hyg.**, v. 97 p. 419-426, 1986.

VERNACCHIO, L.; VEZINA, R. M.; MITCHELL, A. A.; LESKO, S.M.; PLAUNT, A .G.; ACHESON, D. W. Diarrhea in American infants and young children in the community setting. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v 25, p 2-7, 2006

WAMG, W. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. **Int. J. Pharm.**, v. 185, p. 129-188, 1999.

WIREN, M.; MAGNUSSON, K. E.; LARSSON, J. The role of glutamine, serum and energy factors in growth of enterocyte-like cell lines. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 30, p. 1331-1336, 1998.

WORLD HEATH ORGANIZATION disponível em:
https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/ Acesso em: 09 dez. 2018.

YANG, N.; HIGUCHI, O.; OHASHI, K.; NAGATA, K.; WADA, A.; KANGAWA, K.; NISHIDA, E., MIZUNO, K. Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. **Nature**, v. 25, p. 809-812, 1998.

YAP, W. H.; PHANG, S. W.; AHMED, N.; LIM, Y. M. Differential effects of sPLA₂-GV and GX on cellular proliferation and lipid accumulation in HT29colon cancer cells. **Mol. Cell Biochem.**, v. 447, p. 93-101, 2018.

YEN, M. R.; PEABODY, C. R.; PARTOVI, S. M.; ZHAI, Y.; TSENG, Y. H.; SAIER, D. M. H. Protein-translocating outer membrane porins of Gram-negative bacteria. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1562, p. 6-31, 2002.

YEN, Y. T.; KOSTAKIOTI, M.; HENDERSON, I. R.; STATHOPOULOS, C. Common themes and variations in serine protease autotransporters. **Trends Microbiol.**, v. 16, p. 370-390, 2008.

ZAMBONI, A.; FABRICOTTI S. H.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I. C. A. Enteropathogenic *Escherichia coli* virulence factors are found to be associated with infantile diarrhea in Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 1058-1063, 2004.

ZHANG, Q. Y.; WANG, L.; SONG, Z. Y.; QU, X. J. Knockdown of type I insulin-like growth factor receptor inhibits human colorectal cancer cell growth and downstream PI3K/Akt, WNT/β-catenin signal pathways. **Biomed. Pharmacother.**, v. 73, p. 12-8, 2015.

ZHOU, Y.; SU, J.; SHI, L.; LIAO, Q.; SU, Q. DADS downregulates the Rac1-ROCK1/PAK1-LIMK1-ADF/cofilin signaling pathway, inhibiting cell migration and invasion. **Oncol Rep.**,v. 29, p. 605–612, 2013.

ZOUDILOVA, M.; KUMAR, P.; GE, L.; WANG, P.; BOKOCH, G. M.; DEFEA, K.A. Beta-arrestin-dependent regulation fo cofilin pathwy downstream of protease-activated receptor-2. **J. Biol. Chem.**, v. 282, p. 20634-20646, 2007.

ZUDE, I.; LEIMBACH, A.; DOBRINDT, U.; Prevalence of autotransporters in *Escherichia coli*: what is the impact of phylogeny and pathotype? **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 304, p. 243–256, 2014.