

RENATO DE MELLO RUIZ

**PAPEL DA PROTEINA HFQ NA REGULAÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA
DE *Escherichia coli* ENTEROPATOGÊNICA (EPEC)**

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

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Dr. Marcelo Palma Sircili

Versão original

São Paulo
2014

RESUMO

RUIZ, R. M. **Papel de Hfq na regulação dos fatores de virulência de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)** 2014. 84 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Amostras de *Escherichia coli* Enteropatogênica fazem parte de um importante grupo de patógenos capazes de causar diarreia. As EPEC podem ser classificadas em típica e atípica, com base na presença do plasmídeo EAF. As amostras de EPEC apresentam em seu genoma uma ilha de patogenicidade denominada região LEE, na qual estão contidos os genes relacionados à formação da lesão (A/E). A regulação gênica da região LEE é multifatorial e um dos seus principais reguladores é o gene *ler*. Até o momento, não existem trabalhos analisando a participação de Hfq em EPEC. O presente estudo analisa o papel de Hfq na regulação dos fatores de virulência de EPEC típica (O127:H6) e atípica (O55:H7). A mutagênese do gene *hfq* foi obtida através do sistema λ Red de recombinação alélica. As amostras mutantes apresentaram uma diminuição na capacidade de adesão e formar a lesão A/E. Análise transcricional dos mutantes revelou uma significativa diminuição na transcrição do gene *espA* e do gene *eae*. Foi possível evidenciar uma diminuição da motilidade das amostras mutantes. A análise *in silico* revelou a possibilidade do dobramento natural do mRNA *ler*, bloqueando o sítio de ligação do ribossomo. Aqui demonstramos a necessidade de Hfq para a transcrição dos genes responsáveis pela lesão A/E.

Palavras-chave: *Escherichia coli*. EPEC. Hfq. Regulação.

ABSTRACT

RUIZ, R. M. **Role of Hfq in the regulation of virulence factors in Enteropathogenic *Escherichia coli***. 2014. 84 p. Ph. D. thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Enteropathogenic *Escherichia coli* strains are part of an important group of pathogens responsible for causing diarrhea. EPEC can be classified as typical and atypical, based on the presence of the EAF plasmid. EPEC strains have in their genome a pathogenicity island known as LEE region, where it harbours genes related to the formation of a lesion A/E. LEE regulation is multifactorial, and *ler* gene is the main regulator. Until now there are no studies on the role of Hfq in EPEC, thus, the present study analyzes the function of Hfq on the regulation of virulence factors in typical EPEC (O127:H6) and atypical (O55:H7) strains. *hfq* gene mutagenesis was obtained utilizing the allelic recombination λ Red system. The mutant strains demonstrated a decrease in the capability of adherence and formation of A/E lesion. Transcriptional analysis showed a decrease on the *espA* gene and *eae* gene transcription. It was possible to notice a decrease in motility of the mutant strains. *In silico* analysis revealed the possibility of a natural folding of *ler* mRNA, blocking the ribosome binding site. With this study we could demonstrate the need of Hfq for the transcription of genes responsible for the A/E lesion.

Keywords: *Escherichia coli*. EPEC. Hfq. Regulation.

1 INTRODUÇÃO

As doenças bacterianas infecciosas estão entre as principais causas de morbidade e mortalidade (COHEN, 2000) e, dentre elas, destacam-se as infecções intestinais, responsáveis por cerca de 2 milhões de mortes por ano, principalmente entre crianças de países em desenvolvimento (O'RYAN et al., 2005). A *Escherichia coli* é o agente de uma grande proporção desses processos infecciosos, classificados como diarreia ou disenteria (CLARKE, 2001).

A *Escherichia coli* é uma bactéria facultativa da família Enterobacteriaceae, componente da microbiota intestinal humana e também responsável por importantes processos patológicos. Alguns clones específicos de *E. coli* são causadores de infecções intestinais e não fazem parte da microbiota intestinal residente. Essas amostras são denominadas *E. coli* diarreiogênicas ou DEC (NATARO; KAPER, 1998).

As amostras de DEC são de grande importância para a saúde pública e podem ser classificadas em seis patótipos ou categorias, considerando os seus mecanismos de virulência específicos, as síndromes clínicas causadas, os sorotipos O:H, os aspectos epidemiológicos e/ou os tipos de interação com linhagens celulares *in vitro* (NATARO; KAPER, 1998). Esses patótipos de DEC são: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* que adere difusamente às células epiteliais (DAEC) (NATARO; KAPER, 1998).

1.1 *Escherichia coli* Enteropatogênica

Escherichia coli Enteropatogênica foi descrita em 1955 por Neter durante um surto de diarreia no Reino Unido, sendo considerada uma importante categoria de DEC que tem sido associada a casos de diarreia em países desenvolvidos e em desenvolvimento (AFSET et al., 2004, TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002). Em 1978, Levine realizou estudos com voluntários humanos utilizando a amostra O127:H6 e demonstrou o potencial patogênico das EPEC. Baseado nesse estudo, a amostra O127:H6 (E2348/69) se tornou a amostra protótipo de EPEC (LEVINE et al., 1985; SCHMIDT, 2010)

O diagnóstico das EPEC pode ser realizado através de métodos sorológicos, com base na detecção de um dos antígenos O definidos para essa categoria pela Organização Mundial da Saúde. São esses sorogrupos: O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 e O158 (TRABULSI et al., 1996; WHO, 1987). Entretanto, essa metodologia pode levar à detecção de outros patótipos de DEC, uma vez que alguns desses sorogrupos são constituídos por sorotipos O:H que correspondem a outros patótipos (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002). A detecção por métodos moleculares ou imunológicos dos genes de virulência ou dos seus produtos, que estão envolvidos no estabelecimento da lesão A/E, também pode ser empregada (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

As EPEC foram subdivididas nos grupos EPEC típica e atípica. O termo EPEC atípica foi sugerido durante o Simpósio Internacional de *Escherichia coli* Enteropatogênica, realizado na cidade de São Paulo em 1995, para denominar amostras de EPEC que possuem a região LEE (*locus of enterocyte effacement*) e que não transportam o plasmídeo EAF (KAPER, 1996).

Enquadra-se na definição de EPEC atípica uma vasta série de amostras de *E. coli*, que aparentemente emergiram recentemente e já estão entre os principais agentes de diarreia em nosso meio e em outros países (AFSET et al., 2003; BUERIS et al., 2007; COHEN et al., FRANZOLIN et al., 2005; 2005; SMITH et al., 1996; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002). Estudos epidemiológicos realizados nos últimos dez anos têm demonstrado uma sobreposição do número de EPEC atípicas em relação às EPEC típicas em números de casos (AFSET et al., 2003; AFSET et al., ARAUJO et al., 2007; 2004; BUERIS et al., 2007; FRANZOLIN et al., 2005; MORENO et al., 2008, SCALETSKY et al., 2009), posicionando as EPEC atípicas como patógenos emergentes.

As EPEC atípicas descritas em vários estudos epidemiológicos são muito heterogêneas em termos de sorotipos, padrões de adesão e fatores de virulência adicionais (AFSET et al., 2008; ARAUJO et al., 2007; DULGUER et al., 2003; GOMES et al., 2004; NGUYEN et al., 2006; ROBINS-BROWNE et al., 2004; SCALETSKY et al., 2002; VIEIRA et al., 2001), característica bastante distinta das EPEC típicas (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002).

Diversos estudos utilizando a amostra de EPEC atípica O55:H7 foram realizados nos últimos anos, o que levou a escolha desta amostra para este estudo (BUERIS et al., 2007; FRANZIN, 2013; ROCHA, 2010).

1.2 Regiao LEE

As amostras de EPEC típica e atípica têm em comum a capacidade de causar a lesão histopatológica denominada lesão *attaching and effacing* (lesão A/E). Esta lesão é caracterizada pela destruição das microvilosidades intestinais, aderência íntima da bactéria à membrana apical da célula epitelial e formação de estruturas celulares semelhantes a pedestais (figura 1), sendo considerada responsável pela causa da diarreia (MOON et al., 1983). Além de EPEC, outros patógenos possuem a região LEE funcional como: *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC) do sorotipo 0157:H7, que causa diarreia sanguinolenta e Síndrome Hemolítica Urêmica (HUS); *Hafnia alvei*, que causa diarreia em crianças; *Citrobacter rodentium*, patógeno de ratos; e REPEC (“Rabbit Enteropathogenic *E. coli*”), que causa diarreia em coelhos (MELLIES et al., 1999).

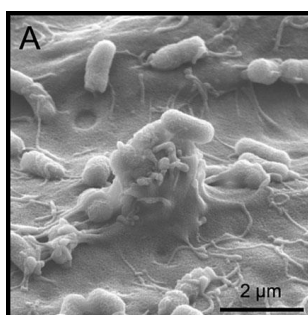


Figura 1 – Microscopia eletrônica de varredura da lesão A/E (SCHMIDT, 2010)

As proteínas envolvidas na formação da lesão A/E são codificadas pelos genes presentes em uma ilha de patogenicidade de 35,6 kb, denominada região LEE (*locus of enterocyte effacement*) (CHEN; FRANKEL, 2005). Os genes que fazem parte da região LEE estão organizados em cinco operons de funções conhecidas: LEE 1, LEE 2, LEE 3, LEE 4 e LEE 5 (MELLIES et al., 1999; SANCHES-SANMARTIN et al., 2001).

A região LEE 5 contém os genes *eae* (*E. coli attaching and effacing*), que codifica a adesina intimina que medeia a aderência íntima da bactéria ao epitélio intestinal; *tir* (*translocated intimin receptor*), que codifica o receptor da intimina (Tir), o qual é translocado para a célula hospedeira através do sistema de secreção do tipo III e inserido na membrana da célula hospedeira; *map* (*mitochondrial associated protein*), que atua na membrana da mitocôndria causando uma disfunção no

potencial de membrana; e *cesT* que é a chaperonina de Tir e Map (SANCHES-SANMARTIN et al., 2001).

As regiões LEE 1, LEE 2 e LEE 3 contêm os genes que codificam as proteínas necessárias para o sistema de secreção do tipo III, chamadas Esc (*EPEC secretion*) e Sep (*secretion of EPEC proteins*), além do regulador *Ier* (*LEE-encoded regulator*) (MELLIES et al., 1999a). As EPEC utilizam o sistema de secreção do tipo III para injetar proteínas efetoras na membrana plasmática e no citoplasma da célula hospedeira (HUECK, 1998). Um complexo protéico formado pelas EscD, R, S, T e U são responsáveis por formar um poro na membrana interna da bactéria; EscJ forma uma estrutura no espaço periplasmático conectando a membrana externa à membrana interna; EscF se projeta pela membrana externa, formando uma estrutura à qual EspA liga-se diretamente, formando um canal até a célula hospedeira; EscN está relacionada com a conversão da energia para a secreção (GAUTHIER; FINLAY, 2002). A maioria dos genes que codificam o sistema de secreção tipo III de *E. coli* tem homologia com os genes do aparato de secreção de *Yersinia* spp, *Shigella* spp e *Salmonella* spp (FRANKEL et al., 1998).

A região LEE 4 contém os genes que codificam as proteínas Esp (*EPEC-secreted proteins*), que são produzidas durante o curso da infecção (NATARO; KAPER, 1998) e são secretadas pelo sistema de secreção do tipo III. EspA é uma proteína estrutural filamentosa de 25 kDa localizada na superfície bacteriana, que interage com o epitélio celular nos primeiros estágios da lesão A/E, formando um canal para translocação de efetores para a célula hospedeira (FRANKEL et al., 1998). EspB (38 kDa) e EspD (40 kDa) formam um complexo poroso no epitélio celular através do qual as proteínas serão translocadas (MAIRENA et al., 2003). EspF, que é secretada para o interior da célula hospedeira, atua na destruição das junções oclusivas do epitélio intestinal (McNAMARA, et al., 2001). Essas proteínas podem ser separadas em dois grupos funcionais: efetores translocados (Tir, EspF, EspG) e componentes do aparato de translocação (EspA, EspB, EspD).

Recentemente, Yerushalmi et al. (2014) descreveram que a região LEE possui 12 regiões intergênicas e que cada região contém seu próprio promotor. Essas regiões foram, então, classificadas da seguinte forma: LEE6 (*espG* e *rorf1*), LEE1, *rorf3*, LEE7 (operon *grlA*), LEE2, LEE3, *cesF*, *map*, LEE5, *cesT*, *escD* e LEE4. A figura 2 mostra o esquema representativo da região LEE com seus promotores.

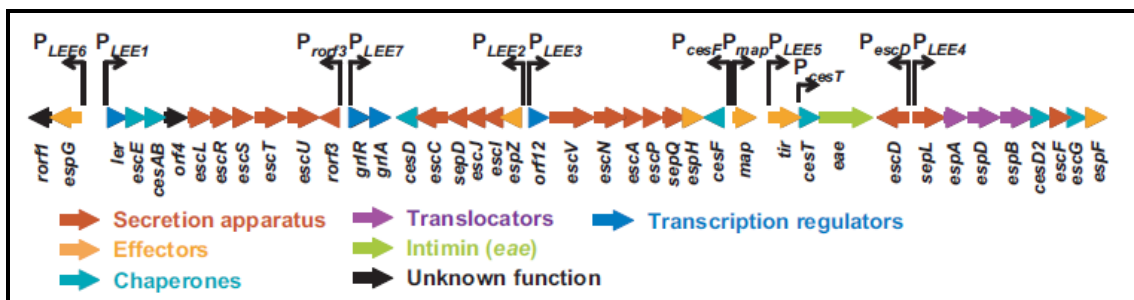


Figura 2 – Representação esquemática da região LEE, indicando seus operons e promotores (YERUSHALMI et al., 2014)

A proteína Ler (*LEE Encoded Regulator*), codificada pelo gene *ler* presente na região LEE1, é considerada o principal regulador da região LEE. É uma proteína da família H-NS de 15 kDa, que contém em sua região carboxi um domínio de ligação ao DNA. Os reguladores globais H-NS reprimem a expressão dos genes LEE e Ler atua na expressão dos mesmos, competindo pela disponibilidade dos promotores (BARBA et al., 2005; WINARDHI et al., 2014).

Os genes *grlAR* tem papel importante na regulação de *ler* e estão inseridos na região LEE, no operon recentemente denominado LEE7 (YERUSHALMI et al., 2014). Esses genes atuam de maneira positiva sobre *ler* através de GrlA (*Global Regulator LEE Activator*), e negativamente através de GrlR (*Global Regulator LEE Repressor*). GrlA e GrlR são co-expressos e GrlR atua inibindo GrlA (BARBA et al., 2005; BUSTAMANTE et al., 2011; PADAVANNIL et al., 2013).

Além da região LEE, as EPEC típicas apresentam um plasmídeo denominado EPEC *adherence factor* (EAF), cujo tamanho varia entre 50 a 70 MDa (BALDINI et al., 1983), e que contém os genes envolvidos com a biogênese da fímbria *bundle-forming pilus* (BFP) e do operon *plasmid encoded regulator* (*per*), o qual codifica um complexo regulador dos genes de virulência de EPEC (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002).

A adesina BFP é uma fímbria do tipo IV organizada na forma de feixes, relacionada à adesão localizada das EPEC à célula hospedeira (GIRÓN et al., 1991), que participa da formação de microcolônias bacterianas em pontos

específicos da superfície celular *in vitro* e *in vivo* (KNUTTON et al., 1987; SCALETISKY et al., 1984).

O complexo regulador PerABC, homólogo da família AraC de ativadores transcricionais, ativa a transcrição do operon *bfp* e da região LEE, através da ativação de LEE1 (MELLIES et al., 1999). Sua importância é discutida, devido sua ausência em amostras de EHEC, EPEC atípica e *Citrobacter rodentium*, que são capazes de formar a lesão A/E (BUSTAMANTE et al., 2011). Entretanto, foi demonstrado que amostras de EPEC atípica complementadas com *perABC*, estabelecem a lesão A/E mais rapidamente (BUERIS, 2008).

O mecanismo de *quorum sensing* também está envolvido na regulação da região LEE de EPEC típica e atípica. *Quorum sensing* é um processo de sinalização celular baseado na produção e detecção de moléculas denominadas autoindutores (AI), capazes de sincronizar a expressão de genes relacionados à virulência e à resistência a antibióticos (LENZ et al., 2005; NOVAK et al., 2010; SPERANDIO; TORRES; KAPER, 2002a). Em EHEC, *quorum sensing* está relacionado com a formação da lesão A/E, produção da toxina Stx, crescimento celular, produção do flagelo e motilidade (SPERANDIO; TORRES; KAPER, 2002). Recentes estudos descreveram a existência de sistemas de dois componentes relacionados ao *quorum sensing*; AI-1/*luxI*R, *luxS*/AI-2 e AI-3/adrenalina/noradrenalina, sendo que, até o momento, os sistemas AI-1 e AI-3 foram descritos em bactérias Gram-negativas, e AI-2 foi encontrado em ambas (PARKER; SPERANDIO, 2009).

As acil homoserina lactonas sintetizadas por *luxI* são secretadas para o meio extracelular e reconhecidas por *luxR*, que ativa a transcrição gênica (PARKER; SPERANDIO, 2009). AI-2 é secretado para o meio extracelular e seu reconhecimento pode ocorrer através de 2 vias, LsrR e LuxQ, que ativam LsrK e LuxO respectivamente, disparando uma cascata de sinalização que envolve genes relacionados com a síntese, captura e catabolismo de aminoácidos para a geração de piruvato e succinato, e fatores de virulência (BACA-DELANCEY et al., 1999; WALTER; SPERANDIO, 2006). O sistema AI-3, além de reconhecer moléculas secretadas pelas próprias bactérias, é capaz de reconhecer e desencadear a transcrição de genes através de moléculas secretadas pelas células hospedeiras, como adrenalina e noradrenalina. Essas moléculas são reconhecidas pelo sistema de dois componentes QseBC. O gene *qseC* codifica um sensor histidina quinase responsável por ativar a transcrição do regulador *qseB*, cujo produto está envolvido

na ativação do flagelo e da motilidade (CLARKE et al., 2006; SPERANDIO; TORRES; KAPER, 2002a).

As EPEC típicas e atípicas também diferem com relação ao padrão de adesão em células epiteliais *in vitro*. As EPEC típicas apresentam o padrão de adesão localizada (AL), caracterizado pela adesão bacteriana em pontos localizados da célula formando grupos compactos (SCALETSKY et al., 1984). As EPEC atípicas podem aderir ou não às células HEp-2. As amostras aderentes expressam predominantemente o padrão localizado-*like* (AL-L), caracterizado pela adesão bacteriana em pontos isolados da célula epitelial formando microcolônias frouxas (PELAYO et al., 1999; RODRIGUES et al., 1996; SCALETSKY et al., 1999), podem também apresentar o padrão agregativo e difuso (ABE et al., 2009).

1.3 Flagelo

A colonização bacteriana é um processo multifatorial que envolve diversas adesinas. O flagelo contribui não só com a motilidade, mas também na formação de biofilme, ligação à proteínas do hospedeiro, aderência, invasão e colonização (ERDEM et al., 2007).

Amostras de *E. coli* possuem flagelo peritríquio que podem ser classificados em diferentes tipos H, com base na variabilidade do domínio antigênico de FliC (HAIKO; WESTERLUND-WIKSTRÖM, 2013).

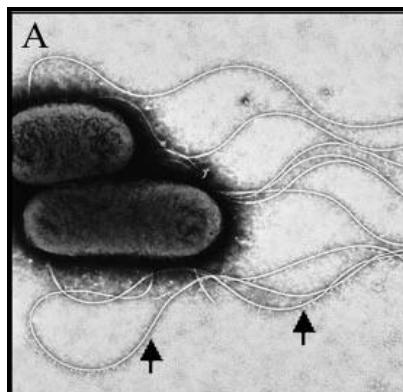


Figura 3 – Microscopia eletrônica de transmissão do flagelo (ERDEM et al., 2007)

A síntese flagelar é um sistema complexo que envolve mais de 60 genes localizados em diversos operons, responsáveis pela motilidade e quimiotaxia. A regulação destes genes ocorre em níveis transcricionais e pós transcricionais (LAY; GOTTESMAN, 2012). Na base da hierarquia flagelar está o operon *flhDC*. FlhD e FlhC são proteínas regulatórias necessárias para a transcrição dos demais operons flagelares, participando da regulação do fator sigma flagelar (σ^{28} ou FliA). Mutantes em *flhDC* perderam a atividade do fator transcricional σ^{28} (ARNOSTI, 1990; LIU; MATSUMURA, 1994).

A formação do flagelo se dá através de uma estrutura semelhante ao anel nas membranas interna e externa do sistema de secreção do tipo III, formado por 26 cópias da proteína FliF. A haste próxima ao anel é formada por subunidades de FlgB, FlgC e FlgF e a região distal formada por 26 subunidades de FlgG. A proteína FliE é necessária para a eficiente secreção dessas subunidades. As proteínas integradas MotA e MotB formam o complexo necessário para a rotação do flagelo. A rotação do motor pode ter seu sentido alterado (horário ou anti-horário) através da fosforilação do sistema quimiosensor (CheY) e da participação de três proteínas: FliG, FliN e FliM. FliG está diretamente relacionada com a rotação do motor e interage com MotA e FliF (anel transmembrânico); FliM tem importante papel na troca do sentido da rotação por se ligar em CheY fosfatado; e FliN desempenha um papel na rotação e motilidade do tipo *switching*, além disso, parece contribuir para a exportação de energia após sua interação com a proteína ATPase FliH. O gancho é formado por cerca de 120 cópias de FlgE e o seu tamanho é controlado pelas proteínas FlhB e FliK. O filamento flagelar é constituído por cerca de 20.000 subunidades, formando um tubo oco, constituído por uma única proteína, a flagelina FliC. A ponta do flagelo é recoberta por 5 moléculas de FliD, em forma de uma estrutura anelar pentamérica, constituindo o *cap* flagelar (CHEVANCE; HUGHES, 2008; CHILCOTT; HUGHES, 2000).

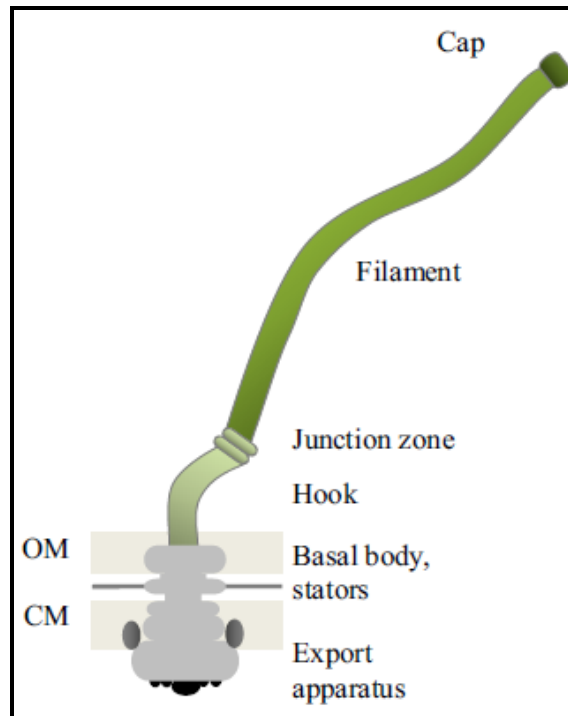


Figura 4 – Esquema representativo dos componentes do flagelo (HAIKO; WESTERLUND-WIKSTRÖM, 2013)

A participação do flagelo na patogenicidade, incluindo os processos de adesão, invasão e resposta pró-inflamatória, tem sido relatada em diversos patógenos como: *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (GEWIRTZ et al., 2001), *Vibrio cholerae* (CORREA et al., 2000) e *Proteus mirabilis* (MOBLEY et al., 1996). Em amostras de EPEC do sorotipo O127:H6, o flagelo participa do processo de adesão. Mutantes em *fliC* foram deficientes na adesão e amostras deletadas em genes do sistema de secreção do tipo III (*escN*, *espA*, *espB* e *escN*) e no regulador *perA* apresentaram a adesão mediada pelo flagelo (GIRÓN et al., 2002). Erdem et al. (2007) demonstraram a capacidade de flagelinas do sorotipo H6 e H7 se ligarem a componentes de matriz extracelular. Amostras de STEC do sorotipo O113:H21 mutantes em *fliC*, apresentaram redução da invasão (HAIKO; WESTERLUND-WIKSTRÖM, 2013)

1.4 HFQ

Hfq é uma proteína 11 kDa que tem participação na regulação gênica, foi primeiramente descrita como fator para a transcrição do fago Q β e a sua ausência

acarreta em diversos impactos nos processos celulares, tais como: redução do crescimento, resposta ao estresse, diminuição da virulência e *quorum sensing* (CHIANG et al., 2011; MØLLER et al., 2002). Esse papel desempenhado por Hfq na regulação pós transcricional está relacionado ao pareamento imperfeito de moléculas de *small RNA* (sRNA - pequenos fragmentos de RNA não codificadores) ao RNA mensageiro (mRNA) alvo (CHIANG et al., 2011; FRÖHLICH; VÖGEL, 2009; MØLLER et al., 2002; VÖGEL; LUISI, 2011). Estima-se que micro-organismos como a *Salmonella sp* e *Escherichia coli* possuam aproximadamente 100 diferentes sRNAs, com tamanhos que podem variar entre 50 a 400 nucleotídeos (FRÖHLICH; VOGEL, 2009; VOGEL; LUISI, 2011).

Os sRNAs podem atuar de duas maneiras: em *cis*, quando o sRNA encontra-se na fita oposta ao mRNA que será regulado; e em *trans*, quando o sRNA encontra-se em um *loci* diferente do mRNA regulado. A maioria dos sRNAs que atuam em *trans* necessitam da associação à proteína Hfq (SALIM et al., 2012; WAGNER, 2013).

Hfq é um hexâmero cuja porção proximal possui afinidade a regiões ricas em Adenina e Uracila e se liga ao sRNA; a porção distal se liga a regiões ricas em Adenina, como o mRNA (FANER; FEIG, 2013).

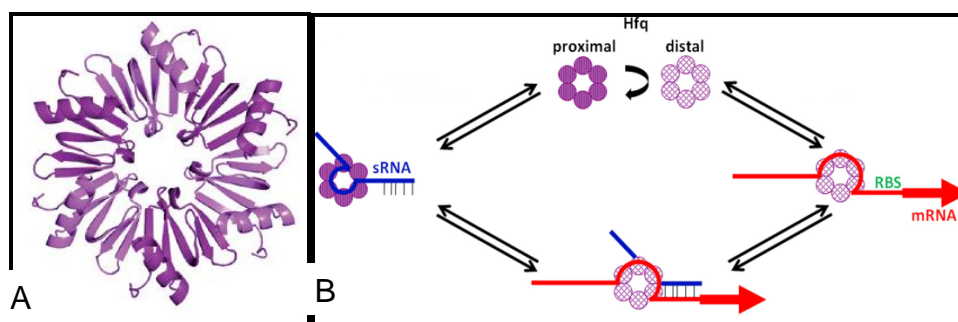


Figura 5 – Estrutura de Hfq (A) (VOGEL; LUISI, 2011), e interação de Hfq ao sRNA e ao mRNA, e consequentemente a formação do complexo regulatório (FANER; FEIG, 2013).

Estima-se que o número de hexâmeros por célula varia de 400 a 10.000. O motivo desta variabilidade permanece desconhecido. A disponibilidade de Hfq pode ser um fator limitante para a regulação por sRNAs e, em certas circunstâncias, o sRNA e o mRNA podem competir por Hfq (HUSSEIN; LIM, 2011).

As formas de atuação da proteína Hfq associada ao sRNA são: liberação ou bloqueio do sítio de ligação do ribossomo (RBS), proteção dos sRNAs da ação da RNaseE e degradação do mRNA pela RNaseE. Hfq ainda pode estar associado ao

mRNA levando à formação de uma cauda poli A pela PAP (Polimerase Poli A) e a subsequente degradação por uma Exonuclease (VOGEL; LUISI, 2011).

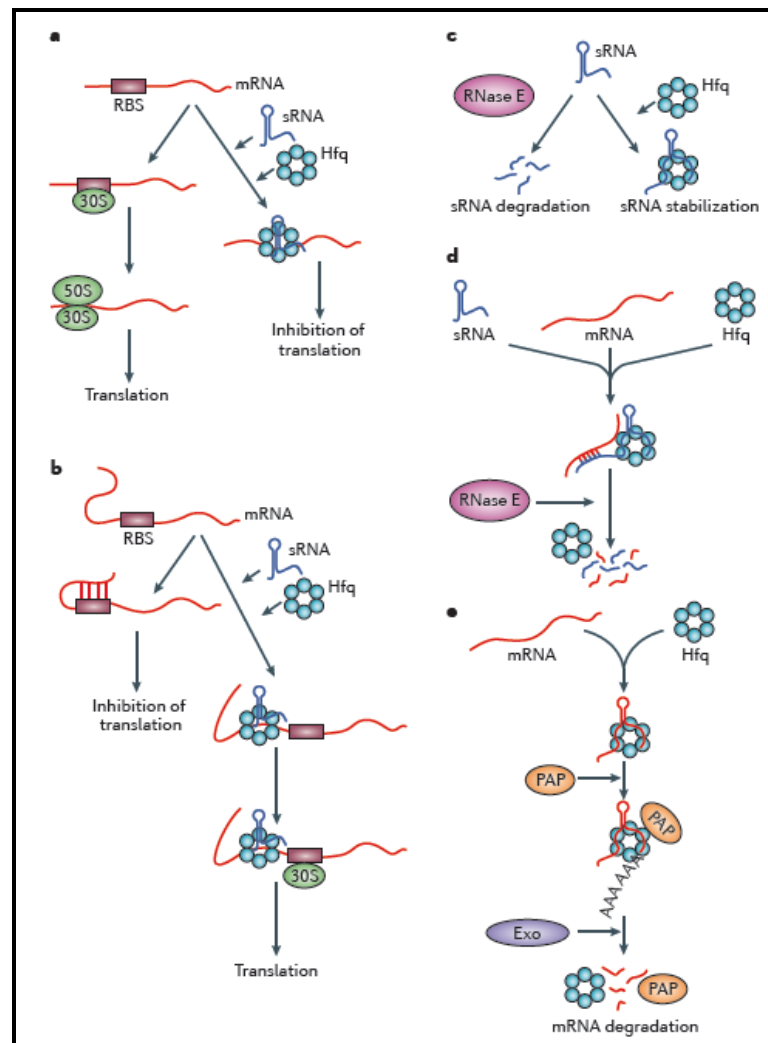


Figura 6 – Esquema de atuação de Hfq (VOGEL; LUISI, 2011)

Diversos processos são regulados por sRNAs. RpoS é o fator sigma (σ^S) associado ao estresse, expresso durante a fase estacionária e que serve como modelo de regulação por sRNA. Estudos têm demonstrado que, direta ou indiretamente, o fator sigma σ^S regula 10% dos genes de *E. coli*. Em baixas temperaturas, o sRNA DsrA junto com a chaperona Hfq, se liga ao mRNA de *rpoS*, impedindo o bloqueio do RBS, favorecendo a tradução (GOTTESMAN, 2004; SOPER; DOXZEN; WOODSON, 2011; VECEREK et al., 2010a). O sRNA OxyS se liga ao mRNA de *rpoS* bloqueando sua tradução (GOTTESMAN, 2004).

A regulação do *quorum sensing* por sRNA está bem estabelecida com relação à *Vibrio cholerae* e *Vibrio harveyi*. A proteína Hfq juntamente com o sRNA, forma um complexo denominado Qrr (*quorum sensing regulatory RNA*). Em baixa densidade, e consequentemente com pouca disponibilidade de AI, LuxO é fosforilado e ativa a transcrição de 5 Qrr. Os Qrr ativam a tradução do regulador global AphA, que controla aproximadamente 300 genes relacionados à baixa densidade bacteriana (fase Lag). Na presença de maior concentração de AI, LuxO não é fosforilado e, consequentemente não ocorre a transcrição de Qrr. Esse fenômeno ocasiona a tradução de LuxR, que regula a transcrição de aproximadamente 700 genes relacionados à alta densidade bacteriana (fase Log) (BASSLER, 2012; LENZ et al., 2004, 2005; SHAO; TU; BASSLER, 2007).

Recentes estudos associando Hfq e *quorum sensing* em amostras de *Escherichia coli* Enterohemorrágica (EHEC) foram realizados. Na amostra protótipo EDL 933, a regulação da ilha de patogenicidade LEE (*locus of enterocyte effacement*) ocorre de forma negativa, sugerindo que Hfq e possivelmente sRNAs atuam no bloqueio do RBS com participação dos reguladores Ler e GrlA (HANSEN; KAPER, 2009; SHAKHNOVICH; DAVIS; WALDOR, 2009). Entretanto, em outra amostra protótipo de EHEC (86-24), a regulação de LEE por Hfq é positiva, assim como de QseBC. A toxina Stx₂, por sua vez, é regulada negativamente (KENDALL et al., 2011). A participação de Hfq, bem como de sRNAs em *Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC) ainda permanece desconhecida.

6 CONCLUSÃO

As amostras mutantes em *hfq* de *Escherichia coli* Enteropatogênica típica (sorotipo O127:H6) e atípica (sorotipo O55:H7) obtidas neste estudo, apresentaram uma redução na capacidade de adesão e formação da lesão *attaching and effacing* em relação às amostras selvagens.

A análise de transcrição de genes envolvidos na lesão *attaching and effacing* corroborou os resultados obtidos nos ensaios fenotípicos.

Foi observada uma redução de motilidade das amostras mutantes em *hfq*.

Foi proposto um modelo da participação de Hfq na regulação dos fatores de virulência das amostras estudadas.

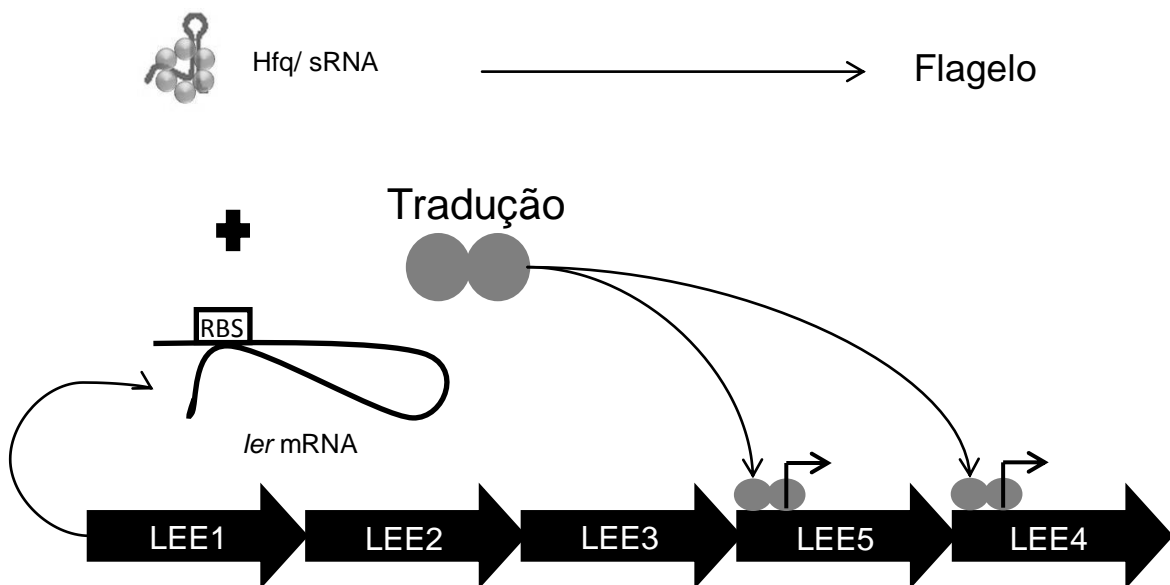


Figura 33 – Papel de Hfq na regulação dos fatores de virulência de *Escherichia coli* Enteropatogênica.

REFERÊNCIAS*

- AFSET, J. E.; BERGH, K.; BEVANGER, L. High prevalence of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Norwegian children with diarrhea. **J. Med. Microbiol.**, v. 52, p. 1015-1019, 2003.
- AFSET, J.E.; BEVANGER, L.; ROMUNDSTAD, P.; BERGH, K. Association of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with prolonged diarrhoea. **J. Med. Microbiol.**, v. 53, p. 1137-1144, 2004.
- AFSET, J. E.; ANDERSSSEN, E.; BRUANT, G.; HAREL, J.; WIELER, L.; BERGH, K. Phylogenetic background and virulence profile of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* from a case control study using multilocus sequence typing and DNA microarray. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, p. 2280-2290, 2008.
- 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. 3396-3999, 2007.
- ARNOSTI, D. N. Regulation of *Escherichia coli* sigma F RNA polymerase by flhD and flhC flagellar regulatory genes. **J. Bacteriol.**, v. 172, n. 7, p. 4106–4108, 1990.
- BACA-DELANCEY, R. R.; SOUTH, M. M. T.; DING, X.; RATHER, P. N. *Escherichia coli* genes regulated by cell-to-cell signaling. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 4610-4614, 1999.
- BALDINI, M. M.; KAPER, J. B.; LEVINE, M. M.; CANDY, D. C.; MOON, H. W. Plasmid-mediated adhesion in enteropathogenic *Escherichia coli*. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 2, p. 534-539, 1983.
- BARBA, J. et al. A Positive Regulatory Loop Controls Expression of the Locus of Enterocyte Effacement-Encoded Regulators Ler and GrlA. **J. Bacteriol.**, v. 187, p. 7918-7930, 2005.
- BARROS, S. F.; ABE, C. M.; ROCHA, S. P. D.; RUIZ, R. M.; BEUTIN, L.; TRABULSI, L. R.; ELIAS, W. P. *Escherichia coli* O125ac:H6 encompasses atypical enteropathogenic *E. coli* spp. that display the aggregative adherence pattern. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, p. 4052-4055, 2008.

* De acordo com:

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

BHATT, S.; EDWARDS, A. N.; NGUYEN, H. T.; MERLIN, D.; ROMEO, T.; KALMAN, D. The RNA binding protein CsrA is a pleiotropic regulator of the locus of enterocyte effacement pathogenicity island of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 77, p. 3552-3568, 2009.

BERDICHEVSKY, T.; FRIEDBERG, D.; NADLER, C.; ROKNEY, A.; OPPENHEIM, A.; ROSENSHINE, I. Ler Is a Negative Autoregulator of the LEE1 Operon in Enteropathogenic *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 187, p. 349-357, 2005.

BOJER, M. S. et al. Lack of the RNA chaperone Hfq attenuates pathogenicity of several *Escherichia coli* pathotypes towards *Caenorhabditis elegans*. **Microbes and Infection / Institut Pasteur**, v. 14, p. 1034–1039, 2012.

BUERIS, V.; SIRCILI, M. P.; TADDEI, C. R.; SANTOS, M. F.; FRANZOLIN, M. R.; MARTINEZ, M. B.; FERRER, S. R.; BARRETO, M. L.; TRABULSI, L. R. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 836-844, 2007.

BUERIS, V. **Interação de *Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC) atípica que apresenta o padrão de adesão localizado-like com a célula epitelial *in vitro***. 2008. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 131, 2008.

BUSTAMANTE, V. H. et al. PerC and GrlA independently regulate Ler expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 82, p. 398–415, 2011.

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

CHEN, Z. et al. Esre: a novel essential non-coding RNA in *Escherichia coli*. **FEBS letters**, v. 586, p. 1195–200, 2012.

CHEVANCE, F. F. V; HUGHES, K. T. Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 6, p. 455–465, 2008.

CHIANG, M.-K. et al. Impact of Hfq on global gene expression and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. **PLoS One**, v. 6, p. e22248, 2011.

CHILCOTT, G. S.; HUGHES, K. T. Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar typhimurium and *Escherichia coli*. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 64, p. 694–708, 2000.

CLARKE, S. C. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* – an emergin problem? **Diagn. Infect. Dis.**, v. 41, p. 93-98, 2001.

CLARKE, M. B. et al. The QseC sensor kinase: a bacterial adrenergic receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 103, p. 10420–10425, 2006.

COHEN, M. L. Changing patterns of infectious diseases. **Nature**, v. 406, p. 762-767, 2000.

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 found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. **Curr. Microbiol.**, v. 3, p. 95-99, 1979.

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

DE LAY, N.; GOTTESMAN, S. A complex network of small non-coding RNAs regulate motility in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 86, p. 524–538, 2012.

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

ERDEM, A. L. et al. Host protein binding and adhesive properties of H6 and H7 flagella of attaching and effacing *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 189, p. 7426–35, 2007.

FANER, M. A; FEIG, A L. Identifying and characterizing Hfq-RNA interactions. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 63, p. 144–159, 2013.

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

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

FRANZIN, F. M. **Papel do sistema AI-3/Epinefrina na regulação da expressão gênica de *Escherichia coli* Enteropatogênica atípica.** 2013. Tese (Doutorado) – Instituto de Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, p. 111, 2013.

FRÖHLICH, K. S.; VOGEL, J. Activation of gene expression by small RNA. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 12, p. 674–682, 2009.

GAUTHIER, A.; FINLAY, B. B. Type III secretion system inhibitors are potential antimicrobials. **ASM News**, v. 68, p. 383-387, 2002.

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

GIRÓN, J. A et al. The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. **Mol. Microbiol.**, v. 44, p. 361–379, 2002.

GOLDBERG, M. D.; JOHNSON, M.; HINTON, J. C.; WILLIAMS, P. H. Role of the nucleoid-associated protein Fis in the regulation of virulence properties of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 41, p. 549-559, 2001.

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

GOTTESMAN, S. The small RNA regulators of *Escherichia coli*: roles and mechanisms*. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 58, p. 303–328, 2004.

GRANT, A. J.; FARRIS, M.; ALEFOUNDER, P.; WILLIAMS, P. H.; WOODWARD, M. J.; O'CONNOR, C. D. Co-ordination of pathogenicity island expression by the BipA GTPase in enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). **Mol. Microbiol.**, v. 48, p. 507–521, 2003.

HAIKO, J.; WESTERLUND-WIKSTRÖM, B. The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence. **Biology**, v. 2, p. 1242–1267, 2013.

HANSEN, A.-M.; KAPER, J. B. Hfq affects the expression of the LEE pathogenicity island in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 73, p. 446–465, 2009.

HENDERSON, C. A et al. Characterization of MicA interactions suggests a potential novel means of gene regulation by small non-coding RNAs. **Nucl. Acids Res.**, v. 41, p. 3386–3397, 2013.

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

HUSSEIN, R.; LIM, H. N. Disruption of small RNA signaling caused by competition for Hfq. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 108, p. 1110–1115, 2011.

IYODA, S. et al. The GrlR-GrlA regulatory system coordinately controls the expression of flagellar and LEE-encoded type III protein secretion systems in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 188, p. 5682–5692, 2006.

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

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

KENDALL, M. M. et al. Hfq virulence regulation in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strain 86-24. **J. Bacteriol.**, v. 193, p. 6843–6851, 2011.

KNUTTON, S.; BALDINI, M. M.; KAPER, J. B.; McNEISH, A. S. Role of plasmid-encoded adherence factors in adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Infect. Immun.*, v. 55, p. 78-85, 1987.

KNUTTON, S.; DALDWIN, T.; WILLIAMS, P. H.; McNEISH, A. S. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 57, p. 1290-1298, 1989.

KULESUS, R. R. et al. Impact of the RNA chaperone Hfq on the fitness and virulence potential of uropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 76, p. 3019–3026, 2008.

LA RAGIONE, R. M. et al. Recombinant anti-EspA antibodies block *Escherichia coli* O157:H7-induced attaching and effacing lesions in vitro. **Microbes and Infection / Institut Pasteur**, v. 8, p. 426–433, 2006.

LAY, N. DE; GOTTESMAN, S. A complex network of small non-coding RNAs regulate motility in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 86, p. 524–538, 2012.

LENZ, D. H. et al. The small RNA chaperone Hfq and multiple small RNAs control quorum sensing in *Vibrio harveyi* and *Vibrio cholerae*. **Cell**, v. 118, n. 1, p. 69–82, 2004.

LENZ, D. H. et al. CsrA and three redundant small RNAs regulate quorum sensing in *Vibrio cholerae*. **Mol. Microbiol.**, v. 58, p. 1186–1202, 2005.

LEVINE, M. M.; NATARO, J. P.; KARCH, H.; BALDINI, M. M.; KAPER, J. B.; BLACK, R. E.; CLEMENTS, M. L.; O'BRIEN, A. D. The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. **J. Infect. Dis.**, v. 152, p. 550-559, 1985.

LIU, X.; MATSUMURA, P. The FlhD/FlhC complex, a transcriptional activator of the *Escherichia coli* flagellar class II operons. **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 7345–7351, 1994.

MAIRENA, E. C.; NEVES, B. C.; TRABULSI, L. R.; ELIAS, W. P. Detection of LEE 4 region-encoded genes from different enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotypes. **Curr. Microbiol.**, v. 48, p. 412-418, 2004.

McNAMARA, B. P.; KOUTSOURIS, A.; O'CONNELL, C. B.; NOUGAYREDE, J. P.; DONNENBERG, M. S.; HECHT, G. Translocated EspF protein from enteropathogenic *Escherichia coli* disrupts host intestinal barrier function. **J. Clin. Invest.**, v. 107, p. 621-629, 2001.

MELLIES, J. L.; ELLIOT, S. J.; SPERANDIO, V.; DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B. The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli* : identification of a

regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler). **Mol. Microbiol.**, v. 33, p. 296-306, 1999.

MIKA, F.; HENGGE, R. Small Regulatory RNAs in the Control of Motility and Biofilm Formation in *E. coli* and Salmonella. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 14, p. 4560–4579, 2013.

MIKA, F.; HENGGE, R. Small RNAs in the control of RpoS, CsgD, and biofilm architecture of *Escherichia coli*. **RNA Biology**, v. 11, p. 1–14, 2014.

MØLLER, T.; FRANCH, T.; HØJRUP, P.; KEENE, D. R.; BÄCHINGER, H. P.; BRENNAN, R. G.; VALENTIN-HANSEN, P. Hfq: A bacterial Sm-like protein that mediates RNA-RNA interaction. **Mol. Cell**, vol. 9, p. 23-30, 2002.

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

MORENO, A. C. R.; FERNANDES-FILHO, A.; GOMES, T. A. T.; RAMOS, S. T. S.; MONTEMOR, L. P. G.; TAVARES, V. C.; DOS SANTOS-FILHO, L. ; IRINO, K.; MARTINEZ, M. B. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, 2008.

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

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

NOVAK, E. A et al. Autoinducer-2 and QseC control biofilm formation and in vivo virulence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **Infect. Immun.**, v. 78, p. 2919–2926, 2010.

O'RYAN, M.; PRADO V.; PICKERING, L. K. A millennium update on pediatric diarrheal illness in the developing world. **Semin. Pediatr. Infect. Dis.**, v. 16, p. 125-136, 2005.

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

PADAVANNIL, A. et al. Structure of GrIR-GrIA complex that prevents GrIA activation of virulence genes. **Nature Communications**, v. 4, p. 2546, 2013.

PAPENFORT, K.; VOGEL, J. Regulatory RNA in bacterial pathogens. **Cell Host & Microbe**, v. 8, p. 116–127, 2010.

PARKER, C. T.; SPERANDIO, V. Cell-to-cell signalling during pathogenesis. **Cell. Microbiol.**, v. 11, p. 363–369, 2009.

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

ROBINS-BROWNE, R. M.; BORDUN, A. M.; TAUSCHEK, M.; BENNETT-WOOD, V. R.; RUSSELL, 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.

ROCHA, S. P. D. **Análise estrutural e funcional da região LEE de *Escherichia coli* Enteropatogênica atípica.** 2010. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 141, 2010.

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

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

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

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

SALIM, N. N. et al. Requirement of upstream Hfq-binding (ARN)_x elements in glmS and the Hfq C-terminal region for GlmS upregulation by sRNAs GlmZ and GlmY. **Nucl. Acids Res.**, v. 40, p. 8021–8032, 2012.

SCALETISKY, 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.

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

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

SCHMIDT, M. A. LEEdways: tales of EPEC, ATEC and EHEC. **Cell. Microbiol.**, v. 12, p. 1544–1552, 2010.

SHAKHNOVICH, E. A; DAVIS, B. M.; WALDOR, M. K. Hfq negatively regulates type III secretion in EHEC and several other pathogens. **Mol. Microbiol.**, v. 74, p. 347–363, 2009.

SHAO, Y.; BASSLER, B. L. Quorum-sensing non-coding small RNAs use unique pairing regions to differentially control mRNA targets. **Mol. Microbiol.**, v. 83, p. 599–611, 2012.

SIMONSEN, K. T. et al. A role for the RNA chaperone Hfq in controlling adherent-invasive *Escherichia coli* colonization and virulence. **PLoS one**, v. 6, p. e16387, 2011.

SITTKA, A. et al. The RNA chaperone Hfq is essential for the virulence of *Salmonella typhimurium*. **Mol. Microbiol.**, v. 63, p. 193–217, 2007.

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

SOPER, T. J.; DOXZEN, K.; WOODSON, S. A. Major role for mRNA binding and restructuring in sRNA recruitment by Hfq. **RNA (New York, N.Y.)**, v. 17, p. 1544–1550, 2011.

SPERANDIO, V.; TORRES, A. G.; KAPER, J. B. Quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QseBC): a novel two-component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by quorum sensing in *E. coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 43, p. 809–821, 2002.

SUDO, N. et al. A novel small regulatory RNA enhances cell motility in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, v. 60, p. 44–50, 2014.

THOMASON, M. K. et al. A small RNA that regulates motility and biofilm formation in response to changes in nutrient availability in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 84, p. 17–35, 2012.

TORRES, A. G.; KAPER, J. B. Multiple elements controlling adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to HeLa cells. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 4985-4995, 2003.

TORRES, A. G.; ZHOU, X.; KAPER, J. B. Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 18-29, 2005.

TRABULSI, L. R.; CAMPOS, L.; WHITTAM, T.; GOMES, T. A. T.; RODRIGUES, J.; GONÇALVES, A. Traditional and non-traditional enteropathogenic *Escherichia coli* serogroups. **Rev. Microbiol.**, v. 27, p. 1–6, 1996.

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

TU, K. C.; BASSLER, B. L. Multiple small RNAs act additively to integrate sensory information and control quorum sensing in *Vibrio harveyi*. **Genes & Develop.**, v. 21, p. 221–233, 2007.

do VALLE, G. R.; GOMES, T. A. T.; IRINO, K.; TRABULSI, L. R. The traditional enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) serogroup O125 comprises serotypes which are mainly associated with the category of enteroaggregative *E. coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 152, p. 95-100, 1997.

VECEREK, B. et al. Translational activation of *rpoS* mRNA by the non-coding RNA DsrA and Hfq does not require ribosome binding. **Nucl. Acids Res.**, v. 38, p. 1284–1293, 2010.

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

VOGEL, J.; LUISI, B. F. Hfq and its constellation of RNA. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 9, p. 578–589, 2011.

VOGT, S. L.; RAIVIO, T. L. Hfq reduces envelope stress by controlling expression of envelope-localized proteins and protein complexes in enteropathogenic *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 92, p. 681–697, 2014.

WAGNER, E. G. H. Cycling of RNAs on Hfq. **RNA Biology**, v. 10, p. 619–626, 2013.

WALTERS, M.; SPERANDIO, V. Autoinducer 3 and epinephrine signaling in the kinetics of locus of enterocyte effacement gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 5445–5455, 2006.

WINARDHI, R. S.; GULVADY, R.; MELLIES, J. L.; YAN, J. Locus of Enterocyte Effacement-Encoded Regulator (Ler) of pathogenic *Escherichia coli* Competes Off Nucleoid Structuring Protein H-NS through Non-Cooperative DNA Binding. **J. Biol. Chem.**, v. 289, p. 13739-13750, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Geneva, Switzerland, 1987.

YERUSHALMI, G. et al. Dynamics of Expression and Maturation of the Type III Secretion System of Enteropathogenic *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 196, p. 2798–2806, 2014.