

**Danielle Dias Munhoz**

**Papel da fímbria ECP na patogênese de *Escherichia coli* enteropatogênica atípica**

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

São Paulo  
2020

**Danielle Dias Munhoz**

**Papel da fímbria ECP na patogênese de *Escherichia coli* enteropatogênica atípica**

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

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Profa Dra Roxane Maria Fontes Piazza

Versão original

São Paulo  
2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidata: Danielle Dias Munhoz

Título: Papel da fímbria ECP na patogênese de *Escherichia coli* enteropatogênica atípica

Orientadora: Roxane Maria Fontes Piazza

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a     /     /     , considerou

**Aprovada**

**Reprovada**

Examinador (a)                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador (a)                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador (a)                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente                              Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

**CERTIFICADO ISENÇÃO USO DE ANIMAIS USP**

UNIVERSITY OF UTAH

Centralized Zebrafish Animal Resource (CZAR)

Transcript For: Danielle Munhoz (danimunho )



Course	Course Initiation	Course Completion	Lessons Remaining	Score	Exam Passed	CEUs Earned
Common Compliance Issues	09/18/2018	09/18/2018		100	09/18/2018	0.5
Common Compliance Issues	09/18/2018	09/18/2018				
Introduction to Fish	09/18/2018	09/19/2018		92	09/19/2018	1.5
Occupational Health and Safety	09/18/2018	09/18/2018		50	09/18/2018	0
University of Utah Core	09/18/2018	09/18/2018		100	09/18/2018	0
Working with Laboratory Zebrafish	09/18/2018	09/20/2018		84	09/20/2018	2

Dedico este trabalho à minha avó Walkyria,  
que sempre me incentivou a buscar o  
“Dr” na frente do meu nome.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra Roxane Piazza, pela oportunidade de me desenvolver como profissional, pela liberdade e incentivo para superar os grandes desafios enfrentados durante todos esses anos. Muito obrigada Chefe!

Ao Dr Matthew Mulvey, por ter me recebido em seu laboratório na Universidade de Utah, pela constante atenção aos meus resultados, e por todas as trilhas e risadas ao longo dos meses de convívio.

Ao Dr Enéas De Carvalho, pelos experimentos com sequenciamento total, pela paciência nas suas explicações e por estar sempre disponível a me ajudar.

À Dra Fernanda dos Santos, pelo auxílio com os ensaios *in silico* e por me auxiliar com todas as minhas dúvidas.

Às minhas queridas amigas Daniela, Thaís e Camila pela inexplicável colaboração diária, por todas as risadas de alegria e desespero, por estarem sempre por perto e por fazerem os meus dias melhores. Muito obrigada!

Aos queridos amigos do Lab Rox por todo o convívio, auxílio com todos os problemas e todas as inúmeras conversas.

A todos os amigos, pesquisadores e funcionários do laboratório de Bacteriologia, por contribuírem para este trabalho.

À Amanda Richards, por toda imensa contribuição com os meus experimentos com *zebrafish* e por tornar o período nos Estados Unidos tão engraçado.

Ao meu marido Pedro, por estar comigo durante todo este trabalho, por acreditar em mim e sempre me lembrar do que sou capaz.

À minha mãe e ao meu irmão, que são meu alicerce e que me incentivam a ir cada vez mais longe. Sem vocês nada seria possível. Muito obrigada!!!

À toda minha família, por estar sempre presente e acreditarem em mim.

Aos meus sogros e cunhadas, por comemorarem comigo todas as pequenas conquistas.

MUITO OBRIGADA!!!

## **AGRADECIMENTO ÀS AGÊNCIAS DE FOMENTO**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil, com o auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Processo nº 140088/2016-4 e na Universidade de Utah, Salt Lake City, Estados Unidos, com o auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de financiamento 001, Processo nº 88881.186835/2018-01.



## RESUMO

Munhoz, D.D. **Papel da fímbria ECP na patogênese de *Escherichia coli* enteropatogênica atípica.** 2020. 122 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Um passo essencial na colonização do trato gastrointestinal por um patógeno é a adesão à superfície da célula hospedeira e é uma fase crítica nas infecções causadas por *Escherichia coli* enteropatogênica. Algumas adesinas estão envolvidas no processo multifatorial que é a adesão bacteriana. Entre elas, estruturas denominadas fímbrias compreendem um grupo de adesinas que permite a ligação inicial de bactérias a células epiteliais e subsequente colonização. *E. coli* enteropatogênica atípica (aEPEC) é um patótipo heterogêneo e nenhum marcador de adesão representativo foi identificado até o momento. A maioria das cepas patogênicas e não patogênicas de *E. coli* apresentam a fímbria *E. coli common pilus* (ECP) e, apesar da importância *in vitro*, não há relatos de sua função na infecção *in vivo* por aEPEC. Nesse contexto, o *zebrafish* foi selecionado como modelo de infecção por apresentar as seguintes vantagens: pequeno tamanho, tempo de geração curto, similaridade genômica com mamíferos e sistema imunológico bem desenvolvido. A sua transparência durante o desenvolvimento permite acompanhar a colonização intestinal por patógenos e interações micróbio-hospedeiro, em tempo real, durante todo o curso da infecção. Além disso, o intestino deste animal apresenta microbiota, anatomia e células semelhantes ao intestino de mamíferos, sendo um excelente modelo para a caracterização de adesinas de aEPEC. No presente estudo, avaliamos o papel de ECP na patogênese da aEPEC em um modelo *in vivo*. Nossos resultados mostraram que 96% das cepas de aEPEC possuem *operon ecp* completo e 55% são produtores de ECP. A deleção em *ecpA* ou *ecpRABCDE* não afetou a capacidade de crescimento, motilidade ou alterou o padrão de biofilme. A BA1250 colonizou efetivamente o *zebrafish* ao longo do ensaio de colonização intestinal. Como esperado, o  $\Delta ecpA$  teve uma redução significativa na adesão comparado com WT. Surpreendentemente, o  $\Delta ecpRABCDE$  não reduziu a adesão e colonizou consistentemente por 72 hpi.  $\Delta ecpRABCDE::mCherry$  mostrou modificação do local de colonização em comparação com o WT apenas nas 24 hpi iniciais, revertida para o mesmo padrão observado no WT após 72 hpi. Para estudar o papel da ECP em diferentes locais de infecção, os embriões foram infectados na cavidade pericárdica. Nas infecções por WT e  $\Delta ecpRABCDE$ , apenas 25 e 32% dos embriões sobreviveram, respectivamente. Por outro lado, 100% dos embriões sobreviveram na infecção por  $\Delta ecpA$ . Em uma infecção sistêmica, observou-se um padrão de sobrevivência semelhante, onde 86% dos embriões infectados com  $\Delta ecpA$  sobreviveram, em comparação com 52 e 41% de sobrevivência nas infecções por WT e  $\Delta ecpRABCDE$ , respectivamente. Este estudo estabeleceu um modelo *in vivo* que permite uma triagem rápida de quais estruturas de adesão são essenciais para infecções por aEPEC. Também revelou que a ECP é realmente importante não apenas para a adesão intestinal, mas pode ser uma estrutura crucial para outros grupos de *E. coli* colonizarem locais diferentes.

**Palavras-chave:** *Escherichia coli*. *E. coli common pilus*. Patogênese. *Zebrafish*

## ABSTRACT

Munhoz, D.D. **ECP pili function in atypical enteropathogenic *Escherichia coli* pathogenesis**. 2020. 122 p. Ph. D thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

An essential step in gastrointestinal tract colonization by a pathogen is the adhesion to host cell surface and is a critical point in infections caused by enteropathogenic *Escherichia coli*. Bacterial adhesion is a multifactorial process in which some adhesins are involved. Among them, structures called pili comprise a group of adhesins that allows the initial binding of bacteria to epithelial cells and subsequent colonization. Atypical enteropathogenic *E. coli* (aEPEC) is a heterogeneous pathotype and no representative adhesion marker was identified so far. The *E. coli* common pilus (ECP) is found in most pathogenic and non-pathogenic strains of *E. coli*, and despite the importance of ECP *in vitro*, there are no reports of its function in *in vivo* infection by aEPEC. In this context, zebrafish was selected as infection model due to advantages as its small size, short generation time, genomic similarity with mammals and well-developed immune system. Due to its transparency during development, we may follow pathogen intestinal colonization and microbe-host interactions within a live vertebrate host, in real time, throughout the course of infection. Moreover, zebrafish intestine presents microbiota, an intestinal anatomy and cell elements closely related to mammalian intestine, thus an excellent model for aEPEC adhesins characterization. In the present study we evaluated the role of ECP in aEPEC pathogenesis in an *in vivo* model. Our results showed that 96% of aEPEC strains presented *ecp* complete operon, and 55% were ECP producers. Deletion of either *ecpA* or *ecpRABCDE* had no effect in growth capacity, motility or biofilm pattern. BA1250 was able to effectively colonize zebrafish with a regular CFU/embryo rate over the course of intestinal colonization assay. As expected,  $\Delta$ *ecpA* had a significant reduction in adhesion compared to WT. Surprisingly,  $\Delta$ *ecpRABCDE* had no decrease of adhesion and also a regular CFU/embryo rate for 72 hpi.  $\Delta$ *ecpRABCDE::mCherry* showed modification of colonization site compared to WT only in the initial 24 hpi, reverted to the same WT pattern seen after 72 hpi. To study ECP role in different infection sites, embryos were infected in pericardial cavity. In WT and  $\Delta$ *ecpRABCDE* infection only 25 and 32% of embryos survived, respectively. Conversely, 100% of embryos survived in  $\Delta$ *ecpA* infection. In a systemic infection similar survival pattern was observed, where 86% of embryos infected with  $\Delta$ *ecpA* survived, compared to 52 and 41% of survival in WT and  $\Delta$ *ecpRABCDE* infections, respectively. This study has established an *in vivo* model that allows a fast screening of which adhesion structures are essential to aEPEC infections. It also revealed that ECP is really important not only for intestinal adherence, but it may be a crucial structure for others *E. coli* groups to colonize different sites.

**Keywords:** *Escherichia coli*. *E. coli* common pilus. Pathogenesis. Zebrafish

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação esquemática do sistema de secreção tipo III presente em EPEC e EHEC.....	23
Figura 2 - Lesão histopatológica <i>attaching and effacing</i> (A/E).....	24
Figura 3 - Padrões de adesão às células epiteliais <i>in vitro</i> encontrados em cepas de aEPEC.....	27
Figura 4 - Representação esquemática do <i>operon ecp</i> , formado pelo gene <i>ecpR</i> e <i>ecpA</i> ao <i>ecpE</i> . ....	31
Figura 5 - Demonstração esquemática da montagem de fímbrias pelo sistema <i>chaperona/usher</i> . ....	33
Figura 6 - Representação e comparação da camada epitelial intestinal de <i>zebrafish</i> e mamíferos. ....	38
Figura 7 - Ensaio de interação bacteriana com células epiteliais HeLa, com período de 6 h de incubação (3 h + 3 h). ....	57
Figura 8 - Eletroforese representativa em gel de agarose (1%) corado com <i>GelRed</i> das reações de PCR para detecção de <i>ecpR-E</i> . ....	58
Figura 9 - Ensaio de imunofluorescência com as 22 cepas de aEPEC.....	60
Figura 10 - Sequência completa do <i>operon ecp</i> da cepa BA1250.....	62
Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose (1%) corado com <i>GelRed</i> para confirmação da mutação em <i>ecpA</i> . ....	64
Figura 12 - Confirmação da mutação do gene <i>ecpA</i> por sequenciamento. ....	65
Figura 13 - Análise da produção de ECP para confirmação da mutação em <i>ecpA</i> . .	65
Figura 14 - Esquema ilustrativo do plasmídeo pACYC184 contendo os sítios de restrição BamHI e EagI. ....	66
Figura 15 - Perfil eletroforético da reação de PCR para confirmação da retirada do cassete de resistência ao cloranfenicol.....	67
Figura 16 - Perfil eletroforético da reação de PCR para obtenção do inserto para complementação do $\Delta ecpA+pEcpA$ . ....	68
Figura 17 - Perfil eletroforético da reação de PCR para confirmação da complementação do $\Delta ecpA+pEcpA$ . ....	68
Figura 18 - Confirmação da complementação de $\Delta ecpA+pEcpA$ . ....	69
Figura 19 - Análise da produção de ECP para confirmação da complementação por ELISA indireto com soro de coelho anti-ECP.....	70

Figura 20 - Mutação em <i>ecpRABCDE</i> da cepa BA1250.....	71
Figura 21 - Confirmação das deleções em <i>ecpA</i> e <i>ecpRABCDE</i> . ....	72
Figura 22 - Curva de crescimento das cepas BA1250, $\Delta$ <i>ecpA</i> e $\Delta$ <i>ecpRABCDE</i> cultivadas em LB e meio M9 a 37 �C e M9 e meio E3 a 28,5 �C por 24 h.....	73
Figura 23 - Motilidade das cepas BA1250, $\Delta$ <i>ecpA</i> e $\Delta$ <i>ecpRABCDE</i> em meio LB semissólido.....	74
Figura 24 - Perfil de crescimento das cepas em placas de meio YESCA.....	75
Figura 25 - Formação de biofilme em placas de cultivo celular de poliestireno e sobre lamínulas de vidro após cultivo por 24 e 48 h a 37 �C. ....	77
Figura 26 - Colonização intestinal de larvas de <i>zebrafish</i> com 96 hpf por BA1250, $\Delta$ <i>ecpA</i> , $\Delta$ <i>ecpRABCDE</i> . ....	79
Figura 27 - Colonizaç�o intestinal de larvas de <i>zebrafish</i> com 96 hpf por BA1250::mCherry.....	80
Figura 28 - Colonizaç�o intestinal de larvas de <i>zebrafish</i> com 96 hpf por $\Delta$ <i>ecpA</i> ::mCherry. ....	81
Figura 29 - Colonizaç�o intestinal de larvas de <i>zebrafish</i> com 96 hpf por $\Delta$ <i>ecpRABCDE</i> ::mCherry.....	82
Figura 30 - Infecç�o da cavidade pericárdica de larvas de <i>zebrafish</i> com 48 hpf por BA1250, $\Delta$ <i>ecpA</i> , $\Delta$ <i>ecpRABCDE</i> . ....	83
Figura 31 - Infecção sistêmica de larvas de <i>zebrafish</i> com 48 hpf por BA1250, $\Delta$ <i>ecpA</i> , $\Delta$ <i>ecpRABCDE</i> . ....	84
Figura 32 - Análise da produção de EspA, T1P, Hcp, Curli, YcbQ, intimina e ECP por ELISA indireto pelas cepas BA1250, $\Delta$ <i>ecpA</i> e $\Delta$ <i>ecpRABCDE</i> cultivadas em DMEM a 28,5 �C. ....	85
Figura 33 - Análise da produção de EspA, T1P, Hcp, Curli, YcbQ, intimina e ECP por ELISA indireto pelas cepas BA1250, $\Delta$ <i>ecpA</i> e $\Delta$ <i>ecpRABCDE</i> cultivadas em DMEM a 37 �C. ....	86
Figura 34 - Análise da produção de EspA, T1P, Hcp, Curli, YcbQ, intimina e ECP por ELISA indireto pelas cepas BA1250, $\Delta$ <i>ecpA</i> e $\Delta$ <i>ecpRABCDE</i> cultivadas em M9 a 37 �C. ....	87

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características das cepas bacterianas e plasmídeos utilizados neste estudo.....	42
Tabela 2 - Perfil fimbrial das 22 cepas de aEPEC utilizadas. ....	43
Tabela 3 - Condições de amplificação dos genes do <i>operon ecp</i> para ensaio de PCR.....	46
Tabela 4 - Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para mutação. ....	49
Tabela 5 - Prevalência dos genes do <i>operon ecp</i> em cepas de aEPEC. ....	58
Tabela 6 - Frequência de cepas de aEPEC produtoras da fímbria ECP. ....	59
Tabela 7 - Proteínas com características de adesinas identificadas no genoma de BA1250 pelo programa SPAAN. ....	88
Tabela 8 - Adesinas fimbriais identificadas no genoma de BA1250 pelo programa SPAAN ainda não estudadas neste trabalho. ....	89

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA: Adesão agregativa

AD: Adesão difusa

A/E: *attaching and effacing*

aEPEC: *Escherichia coli* enteropatogênica atípica

AL: Adesão localizada

ALL: Adesão localizada-*like*

APEC: *E. coli* patogênica aviária

ATV: Associação tripsina versene

BFP: *Bundle-forming pilus*

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

BSA: Albumina sérica bovina

DAEC: *Escherichia coli* difusamente aderente

DEC: *Escherichia coli* diarreiogênica

DMEM: Meio essencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTP: Desoxirribonucleotídeos trifosfato

DO: Densidade ótica

*eae: E. coli attaching and effacing*

EAEC: *Escherichia coli* enteroagregativa

EAF: EPEC *adherence factor*

*E. coli: Escherichia coli*

ECP: *E. coli common pilus*

EHEC: *Escherichia coli* enterohemorrágica

EIEC: *Escherichia coli* enteroinvasora

ELISA: *Enzyme Lynked Immuno Sorbent Assay*

EPEC: *Escherichia coli* enteropatogênica

Esp: Proteínas secretadas por EPEC

ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigênica

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

hpf: Horas pós fertilização

hpi: Horas pós infecção

H-NF: Proteína estruturadora de núcleo do tipo histona

IgG: Imunoglobulina G  
IHF: Fator de integração do hospedeiro  
IL: Interleucina  
kb: Kilobases  
kV: Kilovolts  
LB: Luria-Bertani  
LEE: *Locus of enterocyte effacement*  
LT: Toxina termolábil  
Nle: *Non-LEE encoded factor*  
NMEC: *Escherichia coli* causadora de meningite  
pb: Pares de bases  
PBS: Tampão salina-fosfato  
PCR: Reação em cadeia da polimerase  
rpm: Rotação por minutos  
SFB: Soro fetal bovino  
SST3: Sistema de secreção do tipo 3  
ST: Toxina termoestável  
STEC: *Escherichia coli* produtora da toxina Shiga  
Stx: Toxina Shiga  
tEPEC: *Escherichia coli* enteropatogênica típica  
Tir: Receptor translocado de intimina  
TNF: Fator de necrose tumoral  
TSB: Caldo tríptico de soja  
UFC: Unidades formadoras de colônias  
UPEC: *Escherichia coli* uropatogênicas

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>1.1. Diarreia</b> .....	<b>18</b>
<b>1.2. <i>Escherichia coli</i> diarreiogênica</b> .....	<b>19</b>
<b>1.3. <i>E. coli</i> enteropatogênica</b> .....	<b>21</b>
1.3.1. <i>E. coli</i> enteropatogênica atípica .....	25
<b>1.4. Adesinas fimbriais</b> .....	<b>28</b>
<b>1.5. <i>E. coli</i> common pilus</b> .....	<b>30</b>
<b>1.6. Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)</b> .....	<b>34</b>
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>41</b>
<b>3. Materiais e métodos</b> .....	<b>42</b>
<b>3.1. Cepas bacterianas e plasmídeos</b> .....	<b>42</b>
<b>3.2. Ensaio de interação com células epiteliais <i>in vitro</i></b> .....	<b>44</b>
3.2.1. Cultivo celular .....	44
3.2.2. Teste de adesão.....	44
<b>3.3. Pesquisa dos genes <i>ecpRABCDE</i> em cepas de aEPEC</b> .....	<b>45</b>
<b>3.4. Ensaio de imunofluorescência</b> .....	<b>47</b>
<b>3.5. Sequenciamento total</b> .....	<b>47</b>
<b>3.6. Mutação em <i>ecpA</i> e <i>ecpRABCDE</i> por recombinação homóloga</b> .....	<b>48</b>
3.6.1. Amplificação dos fragmentos <i>ecpAcat</i> e <i>ecpRABCDEkan</i> .....	48
3.6.2. Eletrocompetência.....	49
3.6.3. Transformação por eletroporação .....	50
<b>3.7. Construção do plasmídeo de complementação</b> .....	<b>50</b>
<b>3.8. Curva de crescimento</b> .....	<b>51</b>
<b>3.9. Ensaio de motilidade</b> .....	<b>51</b>
<b>3.10. Ensaio de biofilme</b> .....	<b>52</b>
3.10.1. Método YESCA.....	52
3.10.2. Método com Cristal Violeta.....	52



<b>3.11. Modelo de infecção <i>in vivo</i> com <i>zebrafish</i></b> .....	<b>52</b>
3.11.1. Acasalamento e obtenção dos embriões de <i>zebrafish</i> .....	53
3.11.2. Ensaio de colonização intestinal.....	53
3.11.3. Ensaio de infecção da cavidade cardíaca e via sistêmica.....	54
<b>3.12. Detecção da produção de adesinas por ELISA</b> .....	<b>54</b>
<b>3.13. Análise de bioinformática para potenciais adesinas</b> .....	<b>55</b>
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>56</b>
<b>4.1. Caracterização cepas de aEPEC</b> .....	<b>56</b>
4.1.1. Ensaio de interação com células epiteliais <i>in vitro</i> .....	56
4.1.2. Prevalência do <i>operon ecp</i> nas cepas de aEPEC .....	57
4.1.3. Análise da produção de ECP por cepas de aEPEC.....	59
<b>4.2. Sequenciamento do genoma da BA1250</b> .....	<b>61</b>
<b>4.3. Papel de ECP na patogênese de aEPEC</b> .....	<b>63</b>
4.3.1. Construção e caracterização das deleções genéticas .....	63
4.3.1.1. Mutagênese sítio dirigida do gene <i>ecpA</i> .....	63
4.3.1.2. Mutagênese sítio dirigida do <i>operon ecp</i> completo.....	70
4.3.1.3. Curva de crescimento .....	72
4.3.1.4. Motilidade .....	73
4.3.1.5. Formação de biofilme.....	74
4.3.2. Modelo de infecção <i>in vivo</i> em <i>zebrafish</i> .....	78
4.3.2.1. Ensaio de colonização intestinal .....	78
4.3.2.2. Ensaio de infecção cavidade pericárdica.....	82
4.3.2.3. Ensaio de infecção sistêmica.....	83
<b>4.4. Análise da produção adesinas em diferentes condições de cultivo</b> ...	<b>84</b>
<b>4.5. Determinação <i>in silico</i> da presença de adesinas na cepa BA1250</b> .....	<b>87</b>
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>90</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>105</b>
<b>REFERÊNCIAS*</b> .....	<b>106</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Diarreia

O esforço global realizado nas últimas duas décadas levou a um significativo declínio na taxa de mortalidade infantil. Porém, apesar disso, no ano de 2017 aproximadamente 6,3 milhões de crianças e adolescentes morreram principalmente por causas evitáveis (WHO, 2018). Globalmente, 780 milhões de pessoas não possuem acesso à água potável e 2,5 bilhões não têm acesso ao saneamento básico. Com isso, a diarreia é citada como uma das principais consequências, onde a infecção por agentes causadores é disseminada em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (WHO, 2017).

Diarreia é a segunda principal causa de morte de crianças com até cinco anos de idade, levando à morte aproximadamente 525 mil anualmente. Em países de baixa renda, crianças menores de três anos passam em média por três episódios de diarreia severa todos os anos, resultando em casos graves de desnutrição (WHO, 2017). Casos de diarreia podem durar diversos dias e deixam o corpo sem água, o que reduz a absorção de carboidratos, proteínas, potássio, zinco e outros nutrientes, contribuindo para um estado de desidratação severa e má nutrição (ASHWORTH, 2001). Perdas significativas de água em consequência da diarreia podem levar não apenas à desidratação, mas também à um desequilíbrio eletrolítico, diminuição da capacidade mental e, então, à morte (SUH; HAHN; CHO, 2010). Além da desidratação severa, outras causas de morte incluem infecção bacteriana que levam à sepse e que estão aumentando a proporção de mortes relacionadas à diarreia. Episódios prolongados de diarreia também estão associados com o aumento da morbidade e mortalidade relacionadas a outras doenças (MOORE et al., 2010). Os principais indivíduos afetados são crianças malnutridas e imunocomprometidas, e frequentemente portadores de HIV (WHO, 2017).

Infecções do trato intestinal normalmente possuem como um dos sintomas a diarreia e podem ser causadas por uma grande variedade de bactérias, vírus e parasitas. A transmissão dos organismos se dá por alimentos ou água contaminados

e de pessoa-pessoa, ou seja, intervenções como água potável, acesso a saneamento básico e higiene adequada poderiam prevenir as infecções (ASHWORTH, 2001).

O principal agente bacteriano da diarreia é a *Escherichia coli* diarreio gênica (DEC). Juntamente com Rotavírus, que lidera as estatísticas, são responsáveis por 55% dos casos registrados. A frequência de infecções causadas por estes microrganismos pode ser ainda maior, já que em 34% dos casos de diarreia o agente causador não é identificado (LANATA et al., 2013)

## 1.2. *Escherichia coli* diarreio gênica

As *E. coli* diarreio gênicas evoluíram adquirindo um conjunto específico de características por transferência horizontal de genes. De acordo com o conjunto de fatores de virulências adquirido, foram formados os patótipos atuais de DEC que diferem quanto ao sítio de colonização preferencial no hospedeiro, mecanismo de virulência e sintomas clínicos (CROXEN et al., 2013; KAPER et al., 2004; NATARO; KAPER, 1998) Os seis grupos são: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* produtora da toxina Shiga (STEC) e seu subgrupo enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC) (NATARO; KAPER, 1998).

Apesar da presença de fatores de virulência específicos em cada grupo, a *E. coli* apresenta grande plasticidade genômica o que levou a identificação de isolados com combinação de características de virulência de diferentes patótipos. Estes isolados são considerados potencialmente mais virulentos e denominados como cepas patogênicas híbridas (CROXEN et al., 2013).

Todas as cepas de *E. coli* produtoras de toxina Shiga (Stx1 e Stx2) (KONOWALCHUK; SPEIRS; STAVRIC, 1977; PATON J; PATON A, 1998) são classificadas como STEC e são assim denominadas pela a homologia estrutural e de atividade biológica com a toxina Shiga (Stx) produzida por *Shigella dysenteriae* tipo 1, responsáveis pelo efeito tóxico no hospedeiro e capazes de produzir diarreia sanguinolenta (O'BRIEN et al., 1982; O'BRIEN; LA VECK, 1983). Neste patótipo, está presente um grande número de estruturas de adesão que contribuem para o estabelecimento, persistência e tropismo no tecido durante a infecção (McWILLIAMS;

TORRES, 2014). Em estágios iniciais da infecção por STEC os indivíduos apresentam diarreia aquosa, que pode avançar em aproximadamente dois dias para diarreia com presença de sangue, colite hemorrágica (O'BRIEN, 1983; RILEY et al., 1983; RILEY, 1987) ou até mesmo síndrome hemolítica urêmica (SHU) (KARMALI et al., 1983, 1985).

Além da produção das toxinas Stx 1 e 2, o subgrupo EHEC possui uma ilha de patogenicidade conhecida como região *Locus of Enterocyte Effacement* (LEE). Nesta região estão presentes genes que codificam proteínas responsáveis pela lesão característica conhecida como Lesão *attaching and effacing* (Lesão A/E) (McDANIEL et al., 1995; MOON et al., 1983).

O grupo de cepas de *E. coli* enteroagregativas (EAEC) é definido de acordo com o padrão de adesão agregativo (AA) característico em ensaios com cultura de células epiteliais (NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011). Os fatores de virulência deste grupo incluem adesinas, toxinas e proteínas secretadas. No entanto, nenhum desses fatores é encontrado em todas as cepas de EAEC. Estas fazem parte de um grupo heterogêneo associado a diarreia aguda e persistente em crianças e adultos (FLORES; OKHUYSEN, 2009; HARRINGTON; DUDDLEY; NATARO, 2006). EAEC foi responsável por surtos esporádicos nas últimas décadas como causa de diarreia aquosa, sendo que em um número significativo de pacientes esta se torna persistente (WEINTRAUB, 2007). Este grupo é dividido em típica e atípica de acordo com a presença nas típicas do gene regulador transcricional *aggR*, membro da família AraC de ativadores (NATARO et al., 1994) e ausência do mesmo nas atípicas (DUDDLEY et al., 2006).

As cepas de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) produzem as enterotoxinas termolábil (LT) e termoestável (ST) que podem ser secretadas separadamente ou em conjunto (NATARO; KAPER, 1998). Estas toxinas são codificadas pelos genes plasmidiais *elt*, *estIa* e *estIb* (LEVINE, 1987). A variabilidade dos genes de virulência e fatores de colonização sugerem que ETEC seja um grupo heterogêneo de cepas que tenham adquirido estes genes por transferência horizontal (SAHL et al., 2011). Este patótipo acomete crianças e adultos visitantes de áreas endêmicas após colonização do intestino delgado e liberação das enterotoxinas que levam à diarreia aguda e aquosa. Este é considerado o principal agente da diarreia do viajante (MARCHOU, 2013).

O complexo processo de colonização e sobrevivência da *E. coli* enteroinvasora (EIEC) na barreira gastrointestinal depende da presença de um grande plasmídeo de cerca de 220 kb denominado *plnv*, que é muito semelhante ao encontrado em *Shigella*. Este grupo é responsável por causar diarreia em humanos, principalmente em países subdesenvolvidos. Estas cepas são capazes de invadir células do cólon, resultando em uma infecção similar a causada por *Shigella sp* (FORMAL; HOMIK, 1978; FORMAL et al., 1983). A doença causada por estes patógenos ocorre pela invasão e penetração bacteriana dos enterócitos, levando a destruição dos mesmos. Estas bactérias se ligam especificamente a mucosa do intestino delgado (LEVINE 1987, SANSONETTI et al., 1982).

A designação de *E. coli* difusamente aderente (DAEC) como um patótipo de DEC requer mais estudos epidemiológicos, de acordo com a grande dificuldade enfrentada na sua identificação (GOMES et al., 2016). Em ensaios de interação com células epiteliais, as cepas de DAEC apresentam um padrão de adesão denominado difuso, característica esta que é utilizada na classificação deste patótipo (SCALETSKY; SILVA; TRABULSI, 1984). Estudos demonstraram que este padrão é formado pela presença de duas adesinas principais, entre elas a F1845 (BILGE et al., 1989; SERVIN, 2005).

As bactérias pertencentes a cada uma dessas categorias causam diarreia por mecanismos distintos, afetam diferentes grupos populacionais e expressam diferentes fatores de virulência (NATARO; KAPER, 1998).

### **1.3. *E. coli* enteropatogênica**

Este grupo foi descrito em 1955 após a detecção de um número significativo de cepas de *E. coli* associadas a surtos de diarreia entre 1940 e 1950 (NETER et al., 1955). EPEC é altamente prevalente em contextos comunitários como escolas e hospitais e é uma das principais causas de diarreia infantil em país em desenvolvimento. Atualmente é estimado que EPEC seja responsável por 5-10% de todos os casos de diarreia pediátrica em países como Brasil, Chile, Peru e Irã (OCHOA et al., 2008). Este patógeno além de colonizar humanos, também é capaz de infectar animais como gado, cachorros, gatos e coelhos (HE et al., 2015; SINGH et al., 2015).

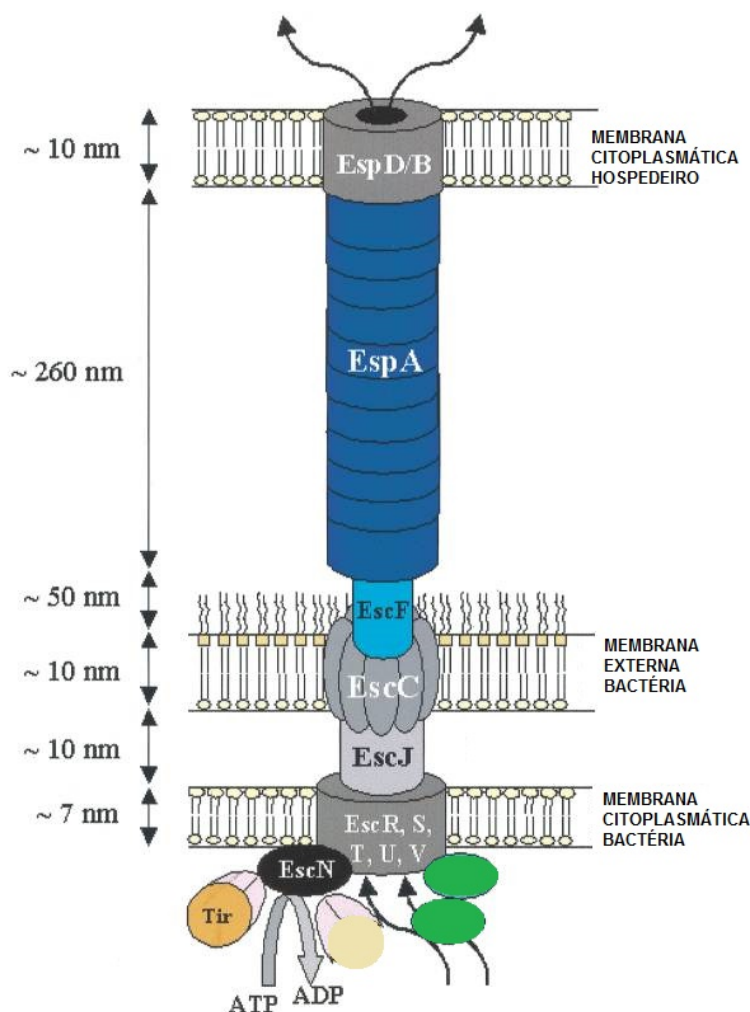
Os casos de infecção por este patótipo variam de subclínicas a infecções fatais (TORRES et al., 2010), nas quais os sintomas mais comuns são diarreia aquosa, dor abdominal, náusea e febre. Além disso, este grupo pode levar a severa mal absorção de nutrientes podendo se agravar para escassez nutricional e diarreia persistente (FAGUNDES-NETO; SCALETSKY, 2000).

O fenótipo principal de infecções por EPEC é a indução do efeito histopatológico conhecido como lesão *attaching and effacing* (A/E). Esta lesão é caracterizada pelo apagamento das microvilosidades intestinais e a adesão íntima da bactéria à superfície epitelial do hospedeiro (NATARO; KAPER, 1998). Esta importante característica foi utilizada na definição inicial de EPEC, sendo um grupo de cepas de DEC que têm a capacidade de produzir a lesão A/E sem a presença e produção das toxinas Shiga (KAPER, 1996; JENSEN et al., 2007).

Ao entrar no trato gastrointestinal, cepas de EPEC aderem à mucosa do intestino grosso e delgado onde três etapas principais da patogênese foram descritas até o momento (OCHOA et al., 2008).

A etapa inicial se dá pela adesão bacteriana às células do hospedeiro, seguido da formação do sistema de secreção do tipo III (SST3) (Figura 1) por onde serão injetados fatores de virulência diretamente no hospedeiro, como as proteínas efetoras Esp (EPEC *secreted protein*) (NATARO; KAPER, 1998). Este injetossomo é semelhante a uma agulha, constituído pela proteína EscF (WILSON et al., 2001) a partir da qual ocorre a polimerização da subunidade EspA, que irá formar uma estrutura filamentosa oca denominada canal de translocação (CREPIN et al., 2005; DANIELL et al., 2001, 2003). Após a injeção das proteínas efetoras como EspB e EspD, que irão formar um poro na membrana citoplasmática (BUTTNER; BONAS, 2002; IDE et al., 2001; KRESSE; ROHDE; GUZMAN, 1999) e do receptor Tir (DENG et al., 2004; DEAN; KENNY, 2009; FIVAZ; KNUTTON et al., 1998; Ørskov et al., 1990; SANTOS; FINLAY, 2015; VAN DER GOOT, 1999), há um desarranjo do citoesqueleto e a subversão das funções da célula hospedeira (FRANKEL et al., 1998). A importância do SST3 em EPEC tem sido demonstrada por diversos estudos e Sampaio et al. (2014) verificaram que a mutação nos genes que formam o sistema de secreção em uma cepa de EPEC resultou na perda da capacidade de formar a lesão A/E.

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



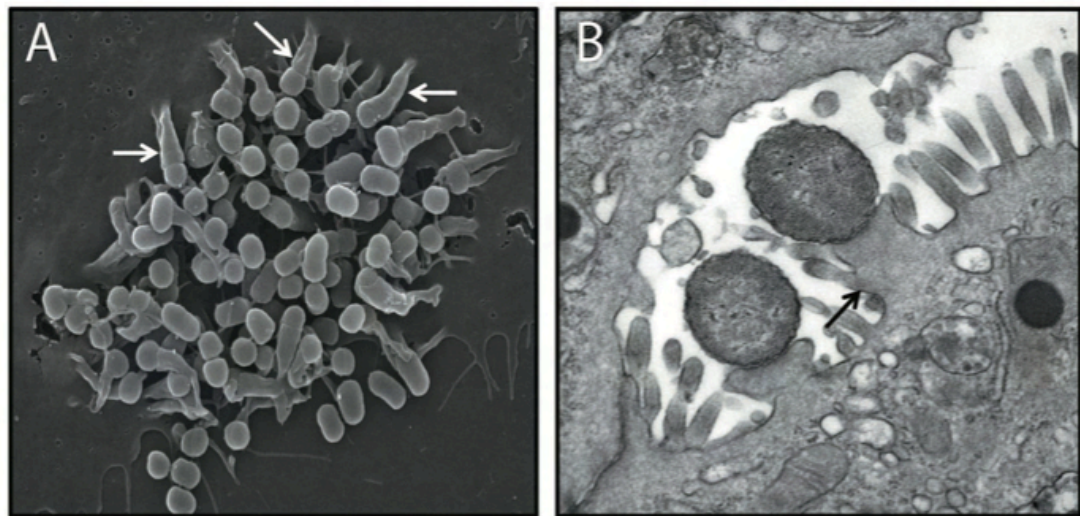
FONTE: Garmendia, Frankel e Krepin, 2005

Por fim, há a adesão íntima da bactéria via intimina e de seu receptor Tir (*Translocated intimin receptor*) que desencadeia uma cascata de sinais transmembrânicos e intracelulares. Em seguida, há a destruição das microvilosidades, o acúmulo de actina polimerizada e de componentes do citoesqueleto no local de contato entre a célula epitelial e a bactéria, e a formação de uma estrutura semelhante a um pedestal (MOON et al., 1983) (Figura 2).

A lesão A/E é resultante da ação de proteínas codificadas por genes localizados em uma ilha de patogenicidade de aproximadamente 35 kb (McDANIEL et al., 1995) denominada Região LEE (DENG et al., 2004; DEAN; KENNY 2009; ELLIOT et al., 2000; McDANIEL et al., 1995). Esta região é organizada em cinco *operons*, designados de LEE1 a LEE5, por onde estão distribuídos os genes que codificam as proteínas que compõem o SST3 (JARVIS et al., 1995; KENNY et al., 1995; NEVES et

al., 2003; SEKIYA et al., 2001) e o gene regulador *ler*, que codifica a proteína *LEE encoded regulator* (Ler) e regula os genes dentro e fora de LEE (BARBA et al., 2005; ELLIOTT et al., 2000; MELLIES et al., 1999). Além destes, estão presentes os genes *eae* e *tir*, os quais codificam, respectivamente, a adesina intimina e o seu receptor Tir (KENNY et al., 1997; SÁNCHEZ-SANMARTÍN et al., 2001).

Figura 2 - Lesão histopatológica *attaching and effacing* (A/E)



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

A intimina é uma proteína de 94 kDa que possui a região N-terminal altamente conservada. Entretanto, a porção C-terminal é extremamente variável (FRANKEL et al., 1994) sendo esta diferença utilizada na classificação da intimina em diversos subtipos distintos, denominados de  $\alpha$  (alpha) a  $\zeta$  (zeta) (LACHER et al., 2006, 2007). A porção N terminal ancora a proteína na membrana externa, enquanto a C-terminal faz a ligação com Tir, o que resultará na adesão íntima e formação do pedestal (KENNY et al., 1997).

Algumas cepas de EPEC aderem às superfícies sólidas ou semissólidas como vidro e poliestireno, bem como às células pré-fixadas, e são envolvidas por uma matriz de exopolissacarídeos (EPS) que são definidas como biofilmes (DONLAN; COSTERTON, 2002). Moreira e colaboradores (2006) demonstraram que a fímbria *Bundle forming pilus* (BFP) e a proteína EspA estão envolvidas no processo de



agregação bacteriana que resulta na formação de microcolônias e de biofilme durante a adesão às células epiteliais.

A BFP é classificada como uma fímbria do tipo IV e sua biogênese é codificada por 14 genes, os quais compõem o operon *bfp* (GIRÓN, et al., 1991; STONE et al., 1996). Este é considerado um importante fator de virulência das EPEC por sua atuação na estabilização da aderência bacteriana dentro das microcolônias e na formação do padrão de adesão característico denominado adesão localizada (AL). Além disso, essa fímbria também está envolvida com o evento de dispersão na mucosa intestinal e na virulência, onde uma cepa mutante em *bfpA*, gene que codifica a pilina, é 200 vezes menos virulenta quando comparada com a cepa protótipo E2348/69 (BIEBER et al., 1998).

Em um determinado momento foram observadas cepas de EPEC que não portavam o plasmídeo EAF, onde estão presentes os genes do operon *bfp*, que passaram a ser denominadas EPEC atípicas (aEPEC) (Kaper, 1996). Inúmeros trabalhos foram realizados a fim de melhor determinar as diferenças genotípicas e fenotípicas entre as EPEC típicas (tEPEC) e atípicas, sendo atualmente classificadas como as cepas que não apresentam o pEAF, o operon *bfp*, que não expressam a fímbria BFP, mas que possuem o gene *eae* e, portanto, são capazes de produzir intimina (ABE et al., 2009; BLANCO et al., 2006; DULGUER et al., 2003; NARA et al., 2010; PELAYO et al., 1999; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002; VIEIRA et al., 2001).

### 1.3.1. *E. coli* enteropatogênica atípica

Cepas de aEPEC são descritas como importantes agentes de diarreia desde a década de 1990 e atualmente são frequentemente detectadas em países subdesenvolvidos (LANATA et al., 2013; OCHOA; CONTRERAS, 2011). Casos de infecções por aEPEC levam à diarreia aguda e persistente afetando crianças e adultos (GOMES et al., 2004; HERNANDES et al., 2009; TRABULSI et al., 2002) e em alguns países o número de aEPEC detectado foi superior às infecções causadas por tEPEC. Um estudo realizado em 13 países em desenvolvimento demonstrou que cepas de aEPEC foram responsáveis por 78% de todos os casos de EPEC detectados em crianças abaixo de cinco anos de idade (OCHOA et al., 2008). Em uma análise de amostras de fezes provenientes de pessoas sintomáticas de 2008 a 2011 na Austrália resultou na detecção de 61 cepas de EPEC, das quais 95,1% eram aEPEC (STAPLES

et al., 2013). Em um estudo similar, Sakkejha e colaboradores (2013) avaliaram 109 cepas de EPEC isoladas entre 2010 e 2012 na Inglaterra, onde 93% dos pacientes reportaram casos de diarreia sendo 32% diarreia sanguinolenta, com aEPEC mais frequente e pertencente a grande variedade de sorogrupos comparado com tEPEC. Estes dados corroboras os encontrados por outros grupos quanto à prevalência de aEPEC (FRANZOLIN et al., 2005; SCALETSKY et al., 2009).

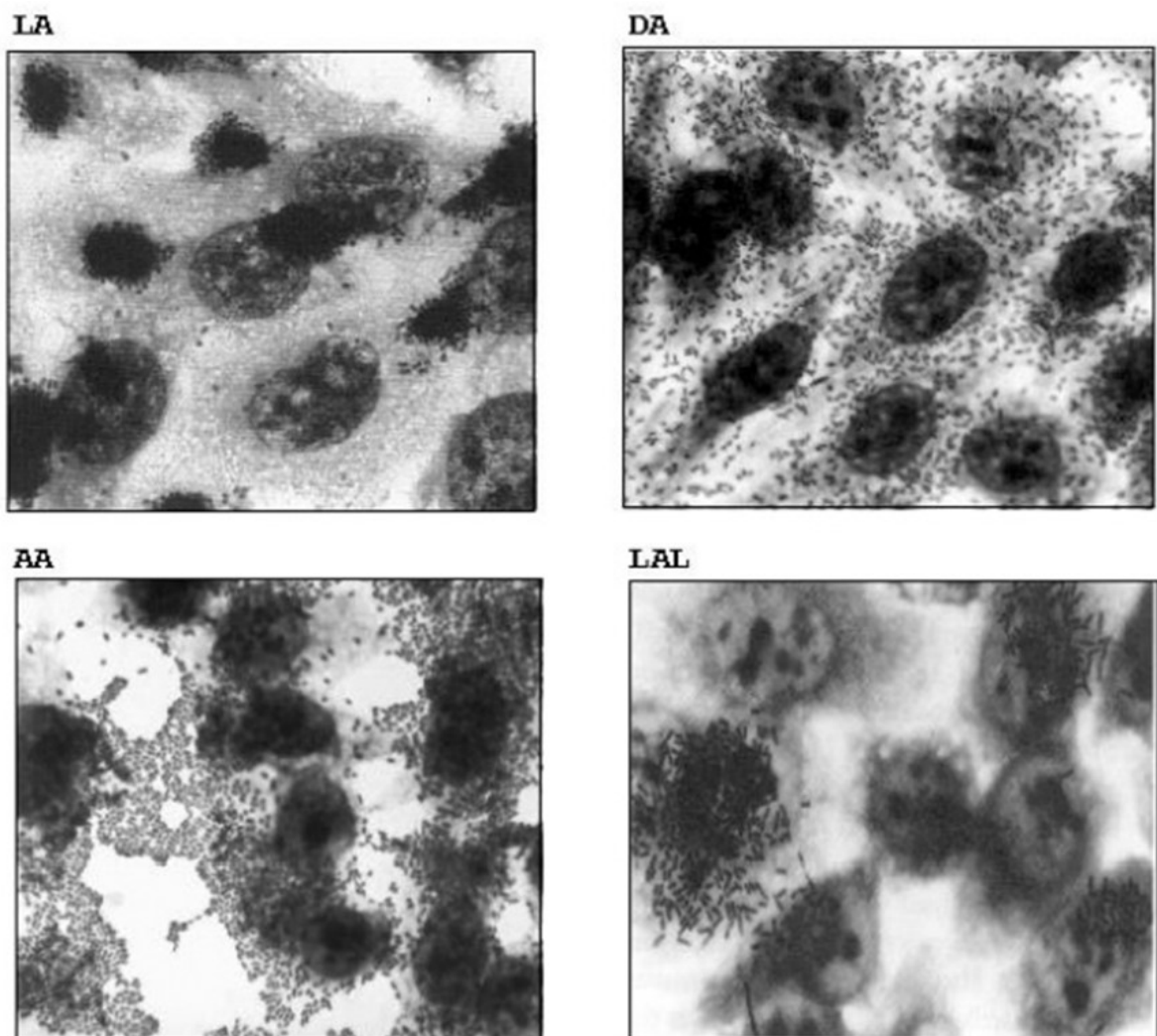
Infecções por tEPEC tendem a diminuir de acordo com a idade, sendo raramente reportada em adultos. A causa desta resistência em adultos e crianças mais velhas foi atribuída a perda de receptores específicos com o envelhecimento e com o desenvolvimento de imunidade. Por outro lado, aEPEC tem sido detectada em pacientes de todas as idades e também em indivíduos que são positivos para HIV (ASSIS et al., 2014; DIAS et al., 2016; GOMES et al., 2004; LOZER et al., 2013)

EPEC atípica é um grupo extremamente heterogêneo quando comparado com tEPEC. Quanto a fatores de virulência, a maior parte de tEPEC utiliza fatores codificados por genes presentes na região LEE e *pEAF*, enquanto aEPEC possui diversos outros fatores não codificados por LEE (TRABULSI et al., 2002). As cepas de EPEC pertencem aos sorotipos O:H clássicos e pelo menos 16 grupos O são representativos como O26, O35, O51, O55, O86, O88, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O138, O142 e O145 (ABE et al., 2009; MORA et al., 2009; TOZZOLI et al., 2014). No entanto, algumas cepas de aEPEC, como O55:H7, são mais relacionadas com cepas de STEC LEE positivas, como a STEC O157:H7, em suas características genéticas e fatores de virulência. Outra distinção é quanto ao reservatório, no qual tEPEC é raramente encontrado em animais, apenas em humanos (TRABULSI et al., 2002), enquanto aEPEC está presente em animais e humanos, tanto doentes quanto saudáveis (HERNANDES et al., 2009).

A diferença entre os dois grupos também é observada pelo padrão de adesão dessas bactérias às células epiteliais *in vitro* (Figura 3). Cepas de tEPEC apresentam o padrão de adesão característico em linhagens celulares cultivadas *in vitro*, denominada adesão localizada (AL), sendo visualizado após três horas de contato bactéria-célula (SCALETSKY et al., 1984). No padrão AL as bactérias aderem em áreas localizadas da superfície celular, formando microcolônias compactas (*clusters* bacterianos) pela participação de BFP (GIRÓN et al., 1991b). O fenótipo de adesão mais encontrado em ensaios com cepas de aEPEC é a adesão localizada-*like* (ALL) caracterizado pela formação de microcolônias frouxas das bactérias sobre

determinadas regiões da superfície celular, visualizado após seis horas de contato (GOMES et al., 2004; PELAYO et al., 1999; RODRIGUES et al., 1996; SCALETISKY et al., 1999). Além do padrão ALL, cepas de aEPEC também podem apresentar o padrão AL com algumas variações pela ausência de BFP (ABE et al., 2009; HERNANDES et al., 2008), padrão de adesão difuso (AD), onde as bactérias aderem-se de maneira difusa por toda a superfície celular; o padrão de adesão agregativa (AA), caracterizado por bactérias que aderem formando agregados na lamínula e na superfície da célula eucariótica; ou ainda há amostras que aderem em um padrão indeterminado/não característico e muitas apresentam-se não aderentes às células epiteliais *in vitro* (ABE et al., 2009; GOMES et al., 2004; MORA et al., 2009; SCALETISKY et al., 1999).

Figura 3 - Padrões de adesão às células epiteliais *in vitro* encontrados em cepas de aEPEC



FONTE: Trabulsi, Keller e Gomes, 2002.

A adesão bacteriana é o passo inicial da colonização do tecido hospedeiro e desenvolvimento da doença, e geralmente é um processo multifatorial que envolve a participação de adesinas fimbriais e não fimbriais. Este processo é orquestrado e influenciado por diferentes elementos regulatórios de acordo com o ambiente e sinais do hospedeiro em diferentes estágios do processo infeccioso (NOUGAYREDE; FERNANDES; DONNENBERG, 2003). Após deleção de *eae*, diversas cepas de aEPEC mantêm a aderência às culturas epiteliais *in vitro*, o que demonstra a utilização de outros mecanismos de adesão além de BFP e intimina.

#### 1.4. Adesinas fimbriais

A colonização intestinal bacteriana bem-sucedida depende de inúmeros fatores, como a capacidade de superar a competição com uma densa e diversificada microbiota (FRETER et al., 1983) e resistência aos mecanismos de defesa do hospedeiro (BERGSTROM et al., 2012; McGUICKIN et al., 2011) Embora a adesão seja essencial para manter a microbiota no intestino delgado, é também uma fase crítica em todas as infecções causadas por cepas de DEC e, para tanto, são utilizadas estruturas de adesão fimbriais e afimbriais (TORRES; ZHOU; KAPER, 2005).

Fímbrias são estruturas presentes na superfície da membrana externa que medeiam a aderência e colonização de células eucarióticas, evasão extracelular à antibióticos, captura de DNA exógeno ou transporte plasmidial à bactéria receptora (AVALOS-VIZCARRA et al., 2016; ELLISON et al., 2018; THANASSI; BLISKA; CHRISTIE, 2012). As fímbrias em bactérias Gram-negativas podem ser classificadas em quatro grupos de acordo com sua biogênese: (1) montagem pela via chaperona/*usher* (C/U); (2) montagem pela via extracelular de nucleação/precipitação; (3) fimbria conjugativa de fertilização; e (4) fímbrias tipo IV (NUCCIO; BAUMLER, 2007). A maior parte das fímbrias descritas são montadas de acordo com a via C/U, como a bastante estudada Fímbria do tipo 1 T1P.

A fimbria tipo 1 pode ser encontrada na maioria das cepas de *E. coli* e é codificada pelo *operon* cromossomal *fim*, sendo uma das responsáveis pela ligação às células epiteliais da bexiga em infecções urinárias causadas por *E. coli* uropatogênica (UPEC), além da formação de biofilme por EAEC (CONNELL et al., 1996; MOREIRA et al., 2003). Também descrito em UPEC, a fimbria Pap atua na

ligação específica à célula hospedeira e ligação aos receptores encontrados no rim com grande importância na virulência de cepas causadoras de pielonefrite (LINDBERG; LUNG; NORMARK, 1986).

Algumas fímbrias são estruturas usualmente encontradas em adesão mediadas por grupos específicos de DEC. Cepas de ETEC possuem proteínas estruturais de superfície conhecidas como fatores de colonização (CF) (EVANS et al., 1975) dentre os quais já foram descritos 25 subtipos codificados por genes plasmidiais. Entre eles estão os fatores antigênicos de colonização (CFA) e antígenos de superfície de *coli* (CS) (GAASTRA; SVENNERHOLM, 1996; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; QADRI, 2005). Em EAEC foram descritas duas adesinas capazes de levar à formação do fenótipo de aderência difusa como a F1845 e AIDA-I caracterizada na cepa protótipo C1845 (BENZ; SCHMIDT, 1992; BILGE et al., 1989; SERVIN, 2005). A adesão de EAEC é mediada por adesinas fimbriais denominadas agregativas, responsáveis pela formação de adesão em forma de “parede de tijolos empilhados”, padrão característico do grupo (NATARO et al., 1987). As EAEC típicas possuem genes que codificam ao menos quatro adesinas fimbriais, denominadas *aggregative adherence fimbriae* (AAF). Entre as adesinas fimbriais AAF existem diferenças genotípicas e fenotípicas, o que as classificam como fímbrias distintas (BERNIER; GOUDON; BOISEN et al., 2008; CZECZULIN et al., 1997; LE BOUGUENCE, 2002; NATARO et al., 1992).

Assim como a T1P, a *long polar fimbria* (LPF) é montada a partir da via C/U e foi primeiramente identificada em *Salmonella enterica serovar Typhimurium* (*S. Typhimurium*) (BAUMLER; HEFFRON, 1995). Estudos demonstraram que esta fímbria possui um papel importante na adesão de EHEC às células intestinais (FARFAN; TORRES, 2012), e que é muito frequente em STEC nos sorotipos O26, O55, O77, O103, O111, O118, O128, e especialmente em cepas de EHEC O157:H7 (CERGOLE-NOVELLA et al., 2007; TORRES et al., 2002, 2004). Mutações no *operon lpf* diminuíram a capacidade destas cepas de estabelecer e persistir na colonização em ovelhas e porcos por dois meses e reduziu, mas não eliminou a lesão A/E. Como estabelecido para diversas espécies bacterianas, mecanismos redundantes possibilitam que a bactéria sobreviva em diferentes ambientes, sendo assim, mutações em um sistema pode não reduzir totalmente a chance de sobrevivência da população bacteriana (JORDAN et al., 2004).

EPEC atípica também apresenta grande heterogeneidade em relação a presença de adesinas fimbriais identificadas por diferentes pesquisas utilizando PCR com cepas de sorotipos e regiões geográficas distintos (AFSET et al., 2006; GOMES et al., 2004; SCALETSKY et al., 2010; TENNAT et al., 2009). Uma das fímbrias frequentemente detectada é a curli, que teve sua associação descrita na formação de biofilme em baixas temperaturas em uma cepa O55:H7 de aEPEC (WEISS-MUSZKAT et al., 2010). Esta fímbria promove a agregação bacteriana quando expressa por cepas de *E. coli* e *Salmonella enterica* (COLLINSON et al., 1993) e em cepas de *E. coli* O157:H7 atua em conjunto com celulose a fim de colonizar o hospedeiro e formar biofilme (SALDAÑA et al., 2009).

Em um estudo realizado em nosso laboratório foram pesquisados 31 genes fimbriais em uma coleção de 72 amostras de aEPEC (MUNHOZ et al., 2018). Dentre os genes pesquisados foi verificada a total ausência dos genes que codificam os fatores de colonização como CFA/I e CS1 de ETEC e os genes *aggA*, *aafA*, *aag3* e *hdaA* de EAEC típica. As variantes do gene *lpf* foram encontradas em diferentes prevalências, *lpfA1-2* (68,2%), *lpfA2-1* (49,2%), *lpfA<sub>O113</sub>* (14,2%), *lpfA1-1* (22,2%) e *lpfA1-3* (9,5%) nas amostras testadas. Outros genes foram menos detectados, como *pilS* (7,9%) e *pilV* (3,1%) descritas em EAEC atípica. Alguns genes foram bastante prevalentes, como *fimA* (95,2%) e *fimH* (98,4%), que codificam T1P I, e o gene *ecpA* (100%), que codifica a fímbria *E. coli common pilus* (ECP), foi o único encontrado na totalidade das cepas testadas.

Diversos estudos demonstram a prevalência de adesinas fimbriais em amostras de aEPEC, e associam essas estruturas como potenciais fatores de virulência, demonstrando a necessidade de caracterização para melhor entendimento do mecanismo de adesão das aEPEC.

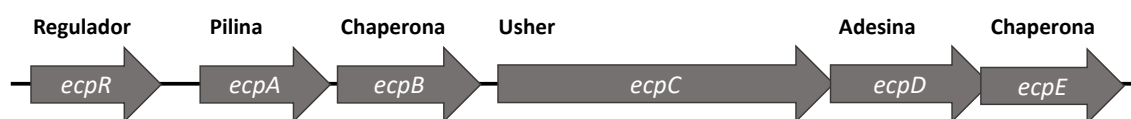
### **1.5. *E. coli common pilus***

Dentre as fímbrias envolvidas nos processos de adesão e colonização destaca-se a *E. coli common pilus* (ECP), que foi inicialmente descrita em *E. coli* causadora de meningite (NMEC) e denominada fímbria dependente de temperatura associada à meningite (MAT) (POUTTU et al., 2001). Acreditava-se que esta seria uma fímbria exclusiva de NMEC, mas posteriormente foi demonstrado que MAT é produzida por diversos grupos de *E. coli*, passando a ser comumente denominada de ECP

(RENDÓN et al., 2007). Neste trabalho, os pesquisadores identificaram um filamento fino e flexível semelhante à uma fímbria que se prolongava por alguns micrometros da superfície bacteriana e que parecia mediar a interação bactéria-bactéria na cepa EHEC EDL933 com células epiteliais. A purificação e sequenciamento desta estrutura demonstrou que o tamanho e a sequência do aminoácido N terminal era homologa à proteína codificada pelo gene *mat* de NMEC (POUTTU et al., 2001) e ao *yagZ* encontrado no genoma de EHEC O157:H7 (HAYASHI et al., 2001; PERNA et al., 2001), *E. coli* K-12 (BLATTNER et al., 1997) e UPEC (WELCH et al., 2002). A alta semelhança e frequência entre cepas de *E. coli*, levou a denominação desta fímbria de *E. coli common pilus* (ECP).

A montagem de ECP requer o funcionamento de seis genes que compõem o operon *ecp* (Figura 4), e é montada a partir da via tipo chaperona/*usher*. O primeiro gene, *ecpR*, codifica a proteína EcpR, que é classificada como a proteína reguladora e apresenta homologia com um regulador de *E. coli* denominado NarL. A pilina é codificada pelo segundo gene do operon, *ecpA* e os genes *ecpB* e *ecpE* são descritos como chaperonas. Interessantemente, tanto EcpB quanto EcpE possuem função de chaperonas, o que é incomum no sistema chaperona/*usher*, já que usualmente é encontrada apenas uma proteína com esta função. A produção da subunidade *usher* fica por conta do gene *ecpC* e a adesina, a subunidade de ligação ao receptor, é codificada pelo gene *ecpD* (MARTÍNEZ-SANTOS, 2012). Ainda não está bem estabelecido qual tipo de receptor da célula hospedeira ECP se liga. Porém, foi observado que esta fímbria interage com resíduos de arabinose de pectina e outros componentes da parede celular de plantas, facilitando a infecção de plantas por *E. coli* (ROSSEZ et al., 2014).

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



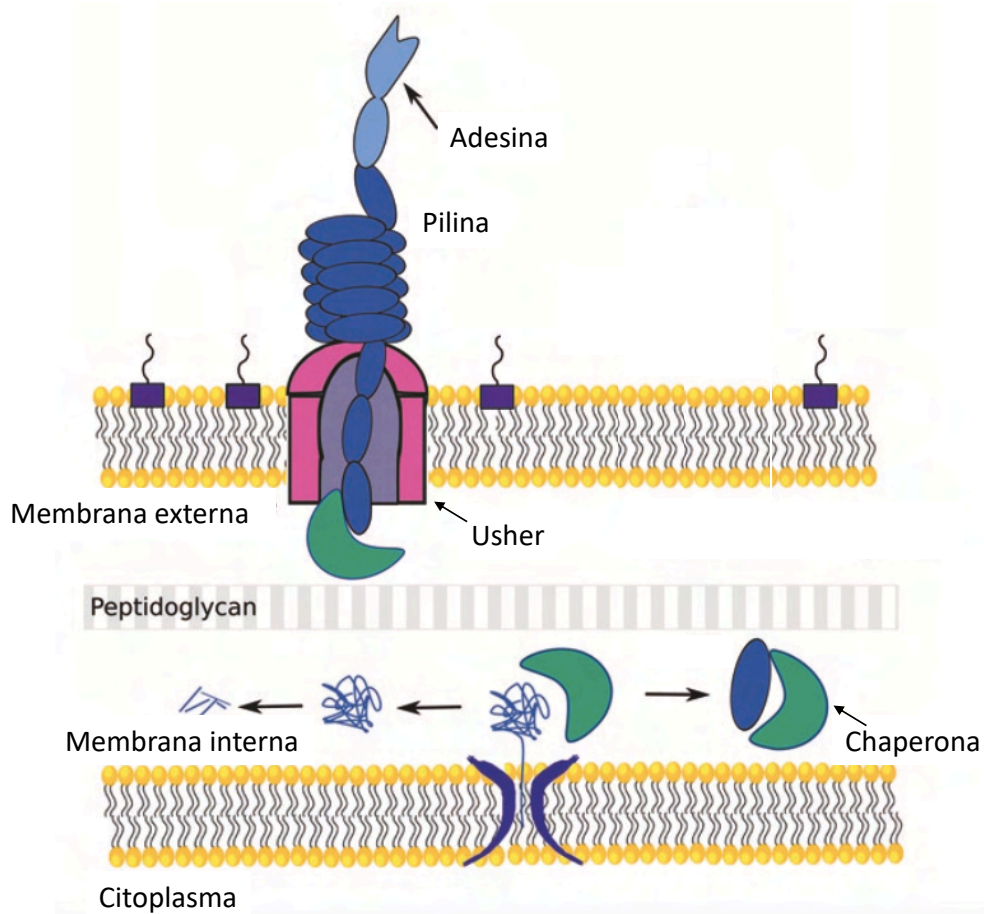
O sistema chaperona/*usher* é uma via de montagem que vem sendo bastante estudada nas últimas décadas (WAKSMAN; HULTGREN, 2009; ZAV'YALOV et al.,

2010). As fímbrias secretadas por este mecanismo são compostas por subunidades de aproximadamente 8 nm de largura e 2 nm de comprimento, ligadas a uma base na membrana externa da bactéria denominada *usher*. Um dos desafios encontrados nos sistemas de secreção em bactérias Gram-negativas é a presença de duas membranas celulares, separadas pelo espaço periplasmático que é desprovido de fonte de energia como ATP e a força próton motora. Esses mecanismos utilizam a energia intrínseca do dobramento da proteína para iniciar a montagem e, geralmente, necessitam de fatores extrínsecos como chaperonas para prevenir sua polimerização no periplasma (ALLEN; PHAN; WAKSMAN, 2009) (Figura 5).

As fímbrias montadas por este sistema são compostas por uma subunidade majoritária, denominada pilina e uma subunidade menor terminal e flexível, denominada adesina, que possui o domínio de ligação ao receptor. O número de subunidades e a conformação da adesina varia de acordo com a fímbria. Todas as subunidades da pilina possuem a mesma conformação, uma porção estrutural denominada *core*, e uma extensão N-terminal (Nte). Na adesina, ao invés da Nte há um domínio de ligação ao receptor. As subunidades são secretadas individualmente para o periplasma pelo sistema Sec de transporte pela interação denominada complementação da cadeia doadora (ALLEN; PHAN; WAKSMAN, 2009; CHOUDHURY et al., 1999; SAUER et al., 1999, 2002; ZAVIALOV et al., 2003). A ligação das subunidades com as chaperonas evita a polimerização da proteína no espaço periplasmático, assim como sua degradação. A montagem da fímbria ocorre na membrana externa, iniciada pela ligação do *usher*, formando um poro por onde as subunidades serão transportadas (REMAUT et al., 2008). Cada subunidade é ligada separadamente e são “empurradas” através do poro formado pelo *usher*, onde a primeira subunidade incorporada é a adesina.



Figura 5 - Demonstração esquemática da montagem de fímbrias pelo sistema *chaperon/usher*.



FONTE: Barbercheck, Bullitt e Andersson, 2018.

Cepas de EHEC, tEPEC e EAEC com mutações pontuais em *ecpA* mostraram-se menos aderentes às células HeLa quando comparadas às mesmas cepas selvagens (AVELINO et al., 2010; RENDÓN et al., 2007; SALDAÑA et al., 2009b). Outros estudos levantam a hipótese de que ECP além de desempenhar um papel no reconhecimento de células hospedeiras, atue na formação de biofilmes. A função de ECP na formação de biofilme parece ser dependente da hidrofobicidade da superfície, uma vez que a mutação de *ecpA* em cepas de NMEC levou à perda de adesão a superfícies de PVC e poliestireno, mas não de vidro (LEHTI et al., 2010). Blackburn e colaboradores, (2009) fizeram um levantamento da prevalência do gene *ecpA* e da produção de ECP em cepas de ETEC de diferentes regiões geográficas, com ou sem os genes que codificam os CFs. Este gene estava presente em 80% das cepas selecionadas, demonstrando sua alta prevalência entre ETEC e teve sua produção

identificada em 58% das cepas. Munhoz e colaboradores (2018) observaram que a produção de ECP por cepas de aEPEC está relacionada com a condição de cultivo, sendo que, o cultivo a 37 °C em meio DMEM na presença de sinais celulares do cultivo de células HeLa favoreceu a produção desta fímbria.

Quanto a relação desta fímbria com os padrões de adesão em cepas de tEPEC, ECP parece atuar de forma sinérgica com BFP durante a formação do padrão AL, uma vez que anticorpos contra ECP foram capazes de reduzir significativamente a adesão de uma cepa mutante em *bfpA* (SALDAÑA et al., 2009b). ECP também vem sendo implicado como um fator que contribui para o padrão de adesão agregativo (AA) de EAEC às células epiteliais (AVELINO et al., 2010).

A demonstração de que ECP é tão frequente quanto os CFs de ETEC (BLACKBURN et al., 2009), de que a maioria das cepas de EAEC produzem ECP (AVELINO et al., 2010) e que NMEC utiliza esta fímbria na formação de biofilmes (LEHTI et al., 2010) reforça a hipótese de que esta desempenhe um papel biológico importante nestes organismos e na interação com o hospedeiro. Embora ECP demonstre grande importância nos ensaios de aderência *in vitro* com diferentes grupos de DEC, não há relatos de sua função na colonização intestinal *in vivo* por cepas de aEPEC.

## **1.6. Zebrafish (*Danio rerio*)**

No passado a ausência de modelos animais de pequeno porte dificultaram a análise mais detalhada da interação patógeno-hospedeiro em modelo de infecção *in vivo* (DONNENBERG; FINLAY, 2013). Infecções por EPEC já foram estudadas em modelos de animais de maior porte, como coelhos, porcos e bezerros (BARUCK et al., 2011; LAW et al., 2013). No entanto, estes modelos não são facilmente modificados geneticamente e animais gnotobióticos ou *germ-free* não estão amplamente disponíveis e nenhum destes modelos reproduzem por completa a infecção causada por *E. coli*, cada um com suas vantagens e desvantagens (RITCHIE, 2014).

Leitões gnotobióticos inoculados com EHEC podem ser utilizados como modelo para doenças gastrointestinais, mas não desenvolvem sintomas sistêmicos. Além

disso, é um modelo caro que requer estrutura e pessoal extremamente especializados. A infecção de coelhos neonatos utilizando-se cateter leva à colonização, diarreia e lesões histopatológicas semelhantes às encontradas em humanos, mas não leva os animais à morte (ELLIOT et al., 1994; RITCHIE, 2014; RITCHIE et al., 2013). Camundongos são até o momento utilizados como o modelo vertebrado mais barato e mais amplamente distribuído. Porém, alguns microrganismos presentes em sua microbiota previnem a colonização de alguns grupos de *E. coli* e, portanto, devem ser removidos por tratamento com estreptomicina. Os animais tratados com este antibiótico podem ser utilizados para estudar a colonização, mas não levam à casos de diarreia e nem a colite. Além disso, este modelo também é idade-dependente, no qual apenas camundongos neonatos são colonizados por EPEC (DUPONT, 2016; WADOLKOWSKI; BURRIS; O'BRIEN, 1990). Todos estes modelos permitem acesso limitado ao estudo quanto a alterações fenotípicas com a interação patógeno hospedeiro simultaneamente e em tempo real por períodos prolongados.

Inicialmente utilizado no estudo da biologia do desenvolvimento, durante a última década o *zebrafish* ganhou atenção de microbiologistas e imunologistas. Também conhecido como paulistinha (*Danio rerio*) é um teleósteo tropical de água doce e altamente atrativo como modelo animal por seu pequeno tamanho, entre 3 a 4 cm. Este é um modelo de hospedeiro vertebrado com baixo custo de criação e alta taxa reprodutiva. Seu genoma foi sequenciado e apresenta importante homologia com os mamíferos, onde 70% de seus 26 mil genes são semelhantes aos genes humanos, incluindo aqueles que codificam citocinas e moléculas do sistema imune (KARI; RODECK; DICKER, 2007; LIESCHKE; CURRIE, 2007).

Este animal possui fertilização externa, ou seja, é possível analisar o desenvolvimento a partir do estágio com apenas algumas células embrionárias. Além disso, as larvas de *zebrafish* são transparentes até aproximadamente duas semanas após a fertilização, o que permite o rastreamento e acompanhamento em tempo real de todos os órgãos internos, células do sistema imune, entre outros (PAGE et al., 2013; ZAPATA et al., 2006). Essas características criam excelentes possibilidades de geração de imagens *in vivo* em combinação com ferramentas avançadas para análises genômicas e de mutantes em larga escala. Nos últimos anos, o modelo

*zebrafish* vem sendo utilizado para estudar patógenos humanos ou patógenos animais com o uso de peixes adultos com um sistema imunológico adaptativo e órgãos totalmente desenvolvidos ou com embriões e larvas que dependem apenas da imunidade inata (KANTHER; RAWLS, 2010; MIONE et al., 2009; PHELPS; NEELY, 2005; SULLIVAN; KIM, 2008; TREDE et al., 2007; VAN DER SAR et al., 2004). Por ser transparente durante todo o desenvolvimento, alterações fenotípicas do microrganismo e do hospedeiro, assim como sua resposta à infecção, podem ser estudadas durante todo o processo infeccioso com o hospedeiro vivo durante longos períodos (MILLER; NEELY., 2005; VENEMAN et al., 2013).

Importante ressaltar que o *zebrafish* possui sistema imune inato, com macrófagos, neutrófilos e eosinófilos (PAGE et al., 2013; ZAPATA et al., 2006), e adaptativo, tornando-se um modelo interessante para o estudo das interações dos patógenos com os hospedeiros. A resposta imune inata dos embriões é capaz de resistir à infecção microbiana, apenas um dia pós-fertilização, enquanto a maturação da resposta adaptativa é completada em apenas três semanas depois do desenvolvimento do peixe (VARAS et al., 2017). O contexto do desenvolvimento do sistema imunológico do embrião torna possível estudar a contribuição de diferentes tipos de células imunes para a progressão da doença. Além disso, com a separação temporal da imunidade inata das respostas adaptativas, embriões e larvas de *zebrafish* são particularmente úteis para dissecar os fatores inatos envolvidos na patologia.

Estudos recentes ressaltaram a notável semelhança entre o sistema imunológico de *zebrafish* e humanos, o que é de extrema importância para aplicações biomédicas (BOWMAN; ZON, 2010; LIESCHKE; TREDE, 2009; MEEKER; TREDE, 2008; TRAVER et al., 2003; TREDE et al., 2004). Essa similaridade faz com que os mecanismos envolvidos na relação patógeno-hospedeiro desses peixes sejam análogos com o que acontece em humanos (BASU; MULLER; SANGES, 2013). A maioria, senão todos os tipos de células do sistema imunológico dos mamíferos foram identificados neste modelo (BALLA et al., 2010; CARRADICE; LIESCHKE, 2008; MEEKER; TREDE, 2008), incluindo mais recentemente um subconjunto de células apresentadoras de antígenos que se assemelham fortemente às células dendríticas dos mamíferos (LUGO-VILLARINO et al., 2010). A expressão de genes de citocinas

pró-inflamatórias, como IL1 $\beta$  e TNF $\alpha$ , e anti-inflamatórias, como IL10, é induzida quando embriões de *zebrafish* são sistematicamente infectados com uma cepa bacteriana como *S. typhimurium*, que prolifera rapidamente e causa infecção letal (STOCKHAMMER et al., 2009). Adicionalmente, a expressão de componentes do sistema complemento e de peptídeos antimicrobianos (MEIJER, et al., 2005; STOCKHAMMER et al., 2009) também é acentuadamente induzida nos modelos de infecção em adultos e embriões, e formam uma primeira linha de defesa no intestino após infecções por bactérias Gram-negativas (REDDY; YEDERY; ARANHA, 2004).

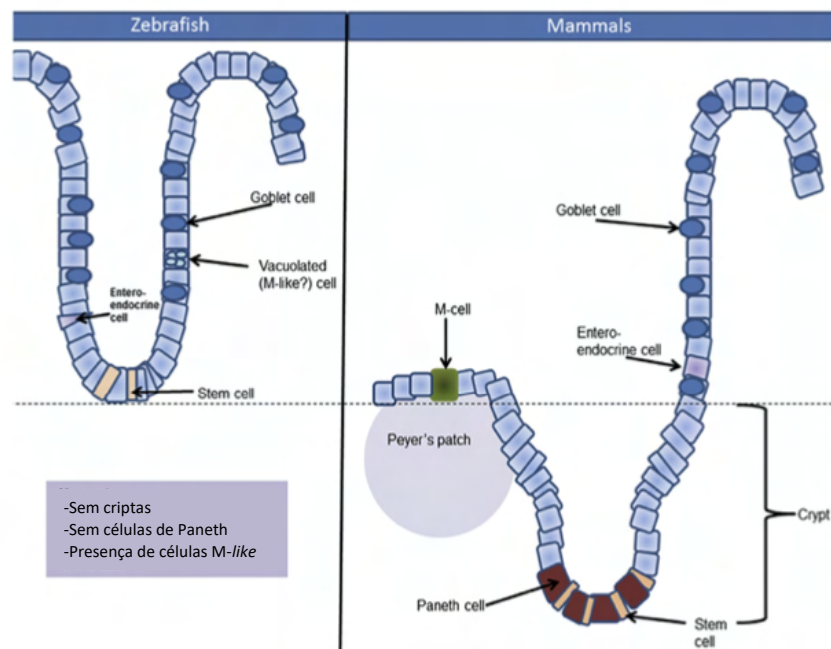
Até o momento já foram descritos três tipos de classes de imunoglobulina no *zebrafish*. Por muito tempo, pensou-se que estes animais possuíam apenas IgM e IgD, mas Danilova e colegas (2005) relataram uma imunoglobulina adicional que eles denominaram IgT. Estudos realizados por Zhang e colaboradores (2010) sugeriram que a IgT pode ser um anticorpo da mucosa em peixes teleósteos, semelhante à IgA em mamíferos.

O *zebrafish* geralmente eclode do córion dois dias após a fertilização, embora isso dependa da temperatura de cultivo. A boca do embrião abre no dia três e todo o tubo gastrointestinal é aberto no dia seis após a fertilização (WALLACE; PACK, 2003). A essa altura, o saco vitelino é consumido e as larvas começam a se alimentar de pequenos protozoários, como *Paramecium*, que é um grupo extremamente diversificado e abundante (> 25.000 espécies). Apesar do fato de a formação intestinal de *zebrafish* ser posterior a fase humana, a sequência temporal da formação do tubo intestinal é idêntica (WALLACE; PACK, 2003). Uma característica importante que precisa ser mencionada quando se discute o trato gastrointestinal de peixes é a presença de estômago (KWEK et al., 2009). Ao invés de um estômago, o *zebrafish* possui o intestino anterior, chamado bulbo intestinal, que possui um lúmen maior que a parte posterior e, portanto, pode funcionar como um reservatório comparável ao estômago. No entanto, esse bulbo intestinal carece de glândulas gástricas e, portanto, não possui pH baixo. De acordo com um estudo de Nalbant e colaboradores (1999), o pH do intestino do *zebrafish* nunca atinge valores abaixo de 7,5 sob condições homeostáticas.

Embora o *zebrafish* não possua cinco segmentos intestinais como os mamíferos (jejuno, duodeno, íleo, ceco e cólon), há homologia funcional. Existem três

segmentos intestinais discriminados com base na morfologia e na expressão gênica: o segmento intestinal anterior (bulbo intestinal), intestino médio e o segmento intestinal posterior (WALLACE; PACK, 2003). A camada epitelial do intestino de *zebrafish* carece de criptas intestinais, no entanto, protrusões em forma de dedo chamadas dobras (vilosidades) estão presentes e diminuem de tamanho da porção anterior para posterior (WALLACE; PACK, 2003) (Figura 6). Células epiteliais diferenciadas são também encontradas, como enterócitos no intestino anterior e posterior, células caliciformes produtoras de mucina no intestino inteiro e células enteroendócrinas no intestino anterior. Até o momento, as células de Paneth não foram histologicamente identificadas. Também não são encontradas células de microfoldagem clássica (M), embora um quarto tipo de célula epitelial tenha sido identificado dentro de um segmento posterior do intestino médio, contendo grandes vacúolos nos quais o conteúdo luminal pode ser armazenado (GEBERT; JEPSON; 1996; ROMBOUT et al., 1985).

Figura 6 - Representação e comparação da camada epitelial intestinal de *zebrafish* e mamíferos.



FONTE: Brugman, 2016

Os microrganismos também induzem o desenvolvimento intestinal em *zebrafish*. Bates e colaboradores (2006) observaram que, na ausência da microbiota, o epitélio intestinal do *zebrafish* foi interrompido em sua diferenciação, uma vez que

observaram uma falta de atividade da fosfatase alcalina intestinal na borda da escova, e falta de cálice e células enteroendócrinas. Além disso, na ausência de microbiota, o intestino falha em absorver macromoléculas de proteína na porção intestinal anterior e demonstra uma motilidade intestinal mais rápida (BATES et al., 2006). Esses achados ilustram que a microbiota molda o nível homeostático de neutrófilos no intestino de *zebrafish*. A microbiota de *zebrafish*, embora diferente da microbiota de mamíferos em termos de filos dominantes, induz uma resposta muito conservada do hospedeiro durante a colonização e desenvolvimento (BATES et al., 2007).

O estabelecimento de métodos de criação de embriões sob condições isentas de germes ou gnotobióticas tem sido uma contribuição importante para o estudo de interações microrganismos-hospedeiros em um ambiente controlado (PHAM et al., 2008; RAWLS; SAMUEL; GORDON, 2004). Já após um dia de embriogênese, os embriões possuem macrófagos funcionais que são capazes de detectar e responder às infecções microbianas (HERBOMEL; THISSE B; THISSE C, 1999). O reconhecimento de patógenos é mediado por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) do sistema imunológico inato (MOGENSEN, 2009), sendo a família mais bem estudada a dos receptores Toll-like (TLRs). Os TLRs de mamíferos têm especificidade para uma variedade de ligantes bacterianos, fúngicos e virais conservados, e ortólogos putativos dos TLRs de mamíferos e membros da família específicos de peixes foram identificados no *zebrafish* (JAULT; PICHON; CHLUBA, 2004; MEIJER et al., 2004). No caso do TLR5, o receptor da flagelina, a especificidade do ligante entre mamíferos e *zebrafish* é conservada (STOCKHAMMER et al., 2009). Por esse motivo, o estudo da relação patógeno-hospedeiro neste modelo vertebrado vem crescendo, sendo excelente para estudos comportamentais, genéticos, toxicológicos e para desvendar o mecanismo de diversas doenças humanas, bem como testar novas drogas (VARAS et al., 2017).

O *zebrafish* vem sendo utilizado para o estabelecimento de modelos de estudo da infecção por diversas bactérias, tais como por *Salmonella* (VARAS et al., 2017), *Edwardsiella tarda* (LIU et al., 2014), *Shigella flexneri* (MONSTOWY et al., 2013; WILLIS et al., 2016), *Streptococcus pneumoniae* (JIM et al., 2016), entre outros.

Em *E. coli*, existem alguns estudos utilizando *zebrafish* como modelo animal. Kjelstrup e colaboradores (2017) utilizaram o modelo de septicemia em *zebrafish* para

investigar o potencial de virulência da *E. coli* O78 K46, responsável por um surto de septicemia em cordeiros recém-nascidos. Stones e colaboradores (2017) desenvolveram um modelo em *zebrafish* para estudo da colonização, patogênese e transmissão de EHEC O157 utilizando vias de transmissão bacteriana por alimentação ou água.

Em um estudo realizado com cepas protótipos de ExPEC, foi observado um inesperado alto grau de diversidade fenotípica que não é facilmente detectado em modelos animais mais tradicionais. Em particular, a capacidade de diferentes isolados ExPEC de persistir e se multiplicar no *zebrafish* e causar doença mostrou-se dependente de duas toxinas secretadas,  $\alpha$ -hemolisina e fator necrosante citotóxico (CNF) (WILES et al., 2009). Os autores descreveram a capacidade de ExPEC de persistir e se multiplicar dentro das larvas, assim estabelecendo uma ferramenta válida para a análise funcional, elucidação dos fatores de virulência de ExPEC, e os mecanismos de defesa do hospedeiro.

Apesar dos trabalhos envolvendo alguns grupos de *E. coli* patogênica, nenhum estudo foi realizado com o intuito de determinar os mecanismos de infecção por aEPEC. Diante dos dados demonstrados, este estudo teve por interesse explorar o papel de ECP na patogênese de aEPEC.



## **2. Objetivos**

Analisar o papel desempenhado pela fímbria ECP na patogênese de aEPEC e estabelecer a infecção em *zebrafish* como modelo *in vivo* para estudo de adesinas fimbriais.

### 3. Materiais e métodos

#### 3.1. Cepas bacterianas e plasmídeos

No presente trabalho foram utilizadas 22 cepas bacterianas que apresentam o padrão ALL (ABE et al., 2009), isoladas de um estudo epidemiológico realizado em Salvador - BA, Brasil, em 2003. Essas cepas foram caracterizadas como aEPEC pela presença do gene *eae* (BUERIS et al., 2007) e ausência de genes que definem outros patótipos de DEC, da sequência que hibridiza com a sonda EAF e da expressão de BFP (ABE et al., 2009). As cepas utilizadas e o perfil genético fimbrial estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Características das cepas bacterianas e plasmídeos utilizados neste estudo.

<b>Cepas</b>	<b>Descrição</b>	<b>Referência/fonte</b>
Coleção (ALL)	aEPEC 22 cepas isoladas de crianças com diarreia na Bahia	ABE et al. (2009); BUERIS et al. (2007)
BA1250	Cepa selvagem aEPEC ONT:H6	ABE et al. (2009); BUERIS et al. (2007)
$\Delta$ <i>ecpA</i>	BA1250 mutante em <i>ecpA</i>	Este estudo
$\Delta$ <i>ecpRABCDE</i>	BA1250 mutante em <i>ecpRABCDE</i>	Este estudo
$\Delta$ <i>ecpA</i> +pEcpA	BA1250 mutante em <i>ecpA</i> + pEcpA	Este estudo
E2348/69	Cepa selvagem EPEC típica O127:H6	LEVINE et al. (1978)
1551-2	Cepa selvagem de <i>E. albertii</i>	ROMÃO et al. (2018)
<b>Plasmídeos</b>		
pKD46	Expressão de recombinases do fago $\lambda$ Red	DATSENKO; WANNER (2000)
pKM208	Expressão de recombinases do fago $\lambda$ Red	MURPHY; CAMPELLONE (2003)
pKD3	Contém o cassete de resistência a cloranfenicol	DATSENKO; WANNER (2000)
pKD4	Contém o cassete de resistência a canamicina	DATSENKO; WANNER (2000)
pCP20	Expressão da enzima flipase (Resolução da mutação)	DATSENKO; WANNER (2000)
pACYC184	Vetor de expressão com baixo número de cópias	CHANG; COHEN (1978)
pmCherry	Vetor para expressão de mCherry	Clontech, USA

As características quanto ao perfil fimbrial das 22 cepas de aEPEC utilizadas estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 - Perfil fimbrial das 22 cepas de aEPEC utilizadas.

<b>BA320</b>	fimA, fimH, lpfA1 (A1-B1), lpfA1 (A1-C <sub>[F]</sub> ), ecpA
<b>BA487</b>	fimA, lpfA1 (A1-C <sub>[F]</sub> ), ecpA
<b>BA714</b>	fimH, lpfA1 (A1-B1), ecpA
<b>BA1244</b>	fimA, fimH, papA, pilS, pilV, lpfA1 (A1-B1), lpfA1 (A1-C <sub>[F]</sub> ), lpfA2 (A2-B1), daaC, ecpA
<b>BA1250</b>	fimA, fimH, lpfA1 (A1-B1), lpfA1 (A1-B1), ecpA
<b>BA1324</b>	fimA, fimH, lpfA1 (A1-A), lpfA2 (A2-B1), ecpA
<b>BA1649</b>	fimA, fimH, lpfA2 (A2-B1), ecpA
<b>BA1652</b>	fimA, fimH, ecpA
<b>BA2034</b>	fimA, fimH, lpfA1 (A1-B1), ecpA
<b>BA2103</b>	fimA, fimH, lpfA <sub>O113</sub> , lpfA1 (A1-B1), lpfA2 (A2-B1), ecpA
<b>BA2853</b>	fimA, fimH, ecpA
<b>BA3157</b>	fimA, fimH, lpfA1 (A1-B1), lpfA2 (A2-B1), ecpA
<b>BA3378</b>	fimA, fimH, pilS, ecpA
<b>BA3574</b>	fimA, fimH, lpfA1 (A1-B1), lpfA2 (A2-B1), ecpA
<b>BA3733</b>	fimA, fimH, lpfA1 (A1-B1), ecpA
<b>BA3851</b>	fimA, fimH, lpfA1 (A1-A), lpfA1 (A1-B1), lpfA2 (A2-B1), ecpA
<b>BA3977</b>	fimA, fimH, lpfA1 (A1-A), lpfA1 (A1-B1), sfpA, ecpA
<b>BA4047</b>	fimA, fimH, lpfA1 (A1-C <sub>[F]</sub> ), lpfA2 (A2-B1), ecpA
<b>BA4077</b>	fimA, fimH, lpfA1 (A1-B1), lpfA2 (A2-B1), ecpA
<b>BA4095</b>	fimA, fimH, lpfA1 (A1-A), ecpA
<b>BA4132</b>	fimA, fimH, lpfA1 (A1-A), lpfA1 (A1-B1), lpfA2 (A2-B1), ecpA
<b>BA4147</b>	fimA, fimH, papA, lpfA1 (A1-C <sub>[F]</sub> ), ecpA

FONTE: MUNHOZ et al., 2018

Quando necessário, foi utilizada como controle positivo a cepa protótipo de tEPEC E2348/69 (O127:H6) e como controle negativo, foi utilizada a cepa de *Escherichia albertii* 1551-2 (ONT:H-) não produtora da fímbria ECP.

Os cultivos bacterianos foram realizados rotineiramente a 37 °C em meio Luria-Bertani (LB; Difco, Estados Unidos) por 16-18 h sem agitação. Quando adequado, os

meios foram suplementados com os antibióticos ampicilina (100 µg/mL), canamicina (50 µg/mL), ou cloranfenicol (25 µg/mL). Todos os estoques bacterianos foram mantidos a -20 ou -80 °C em meio LB acrescido de glicerol a 40%.

### **3.2. Ensaio de interação com células epiteliais *in vitro***

#### *3.2.1. Cultivo celular*

As células HeLa, originárias de adenocarcinoma cervical humano (SCHERER; SYVERTON; GEY, 1953), foram adquiridas no Instituto Adolfo Lutz. Estas células foram mantidas por cultivos sucessivos, em frascos apropriados para cultura de células contendo meio essencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) acrescido de gentamicina e de soro fetal bovino (SFB). As garrafas contendo as monocamadas celulares foram incubadas a 37 °C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> e o meio de cultura trocado a cada 2 dias. Para o sub-cultivo, após a formação da monocamada celular na superfície do frasco, a cultura foi lavada com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e descolada com a adição de solução de associação tripsina-versene (ATV). A ATV foi inativada com adição de meio DMEM 10% soro fetal bovino (SFB) e as células transferidas para um novo frasco.

#### *3.2.2. Teste de adesão*

Os ensaios de interação bactéria-célula foram realizados segundo Cravioto e colaboradores (1979) com algumas modificações. Após a formação de monocamada celular e descolamento das células com ATV, estas foram centrifugadas a 185 x g por 5 min e ressuspensas em DMEM para contagem em câmara de Neubauer. Após contagem, as células foram distribuídas com concentração final de  $5 \times 10^4$  células/poço em microplacas de 24 poços contendo lamínulas de vidro. As microplacas foram incubadas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, até confluência de 80% ou 48 horas. As culturas bacterianas foram cultivadas em meio LB a 37 °C por 18 h e adicionadas às monocamadas de células em multiplicidade de infecção (MOI) de 10 e incubadas por 3 h a 37 °C. O ensaio foi realizado com DMEM sem

antibiótico com 2% de SFB e 1% de manose. Após este período, os poços foram lavados 3 vezes com PBS e adicionado 1 mL do mesmo meio para manutenção de pH e nutrientes, seguido de incubação de mais 3 h a 37 °C. Com o total de 6 h de incubação, os poços foram novamente lavados 3 vezes com PBS e as células fixadas com metanol absoluto por 30 min à temperatura ambiente. Já fixadas, as células foram então coradas por 5 min com corante May-Grünwald, diluído 1:2 em tampão Sorensen (8,6 mM de fosfato de potássio monobásico, 28,6 mM de fosfato de sódio dibásico). Em seguida o corante foi desprezado e acrescentada a solução corante Giemsa diluída a 1:2 em tampão Sorensen por 20 min. Após lavagem para retirada do excesso de corante, as lamínulas foram secas à temperatura ambiente, montadas em lâminas de vidro com Entellan (Merck, Estados Unidos) e observadas ao microscópio ótico com aumento de 1000X.

### **3.3. Pesquisa dos genes *ecpRABCDE* em cepas de aEPEC**

As cepas bacterianas foram cultivadas em meio LB a 37 °C por 16 - 18 h de forma estática. Para a extração do DNA bacteriano, 1 mL deste cultivo foi centrifugado por 2 min a 14.500 x g. O sedimento foi ressuspensão em 500 µL de água ultrapura estéril e submetido a choque térmico por fervura a 100 °C por 15 min, seguido por resfriamento em banho de gelo. Para a eliminação de restos bacterianos, o lisado foi centrifugado por 5 min a 14.500 x g e o sobrenadante coletado para a realização das reações de PCR.

Para avaliar a presença do *operon ecp* nas cepas bacterianas foram realizadas reações de PCR com as sequências dos pares de iniciadores, as temperaturas de anelamento e o tamanho dos fragmentos amplificados de cada gene, descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Condições de amplificação dos genes do *operon ecp* para ensaio de PCR.

Gene	Temperatura de anelamento (°C)	Mg (mM)	Produto de amplificação (pb)	Sequência dos iniciadores
<i>ecpR</i>	57	2,0	683	(F) CTGTAAAAATTATAGGTTTG (R) ACCAGAGCTATTGCCAGA
<i>ecpA</i>	56	2,0	640	(F) ACCTCGGGAAGAAAAGCAA (R) CAATTCCGTCCAGGAATAAA
<i>ecpB</i>	47	1,5	780	(F) TCTGATGTACCAGCAGGG (R) CTTTCAGTCCTGGGGAGA
<i>ecpC</i>	57	1,0	1130	(F) ACGACAATGCCTTTACGAG (R) CGATCCATATGAAAGCTACG
<i>ecpD</i>	56	1,0	760	(F) AGTTTGTGTTTGTGCGAAAAC (R) GCCGAGGCTAACGACGA
<i>ecpE</i>	47	2,0	458	(F) AGTTTGTGTTTGTGCGAAAACA (R) GCCGAGGCTAACGACGA

FONTE: MUNHOZ et al., 2018

As reações foram preparadas em banho de gelo, em microtubos de polipropileno, com as concentrações de cloreto de magnésio descritas na Tabela 3, de acordo com cada gene, 10 pmol de cada um dos iniciadores (forward e reverse), 200 nM da mistura de dNTPs (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), tampão de reação de PCR 1X (Invitrogen), 1,5 U de Taq DNA Polymerase (Invitrogen) e água ultrapura estéril para um volume final de 10 µL. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador *Veriti 96 well Thermal cycler* (*Applied Biosystems*, Estados Unidos).

Após amplificação, 5 µL de cada reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,0 % corado com *GelRed* (Biotium, Estados Unidos) em tampão TAE (40 mM de tris-acetato; 2 mM de ácido etilenodiaminotetracético). Como marcadores de peso molecular foi utilizado 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). A migração foi realizada sob voltagem constante de 80 V em tampão TAE. Ao término da corrida, os géis foram fotografados com o auxílio do sistema de imagem *Alliance 6.7* (UVItec Cambridge, Reino Unido).

### 3.4. Ensaio de imunofluorescência

O ensaio de imunofluorescência foi utilizado a fim de determinar quais cepas produzem a fímbria ECP nas condições estabelecidas durante o estudo. Neste ensaio, as cepas bacterianas foram inicialmente cultivadas em LB a 37 °C por 16-18 h seguido de incubação em DMEM pré condicionado (sobrenadante do cultivo de células HeLa por 48 h com DMEM sem adição de SFB) a 37 °C por 16 – 18 h. Após o período de incubação, as cepas foram centrifugadas por 5 min a 900 x g. O sedimento foi ressuspenso em 10 µL do próprio meio e fixado em lâminas de vidro com  $\rho$ -formaldeído 4% a 4 °C por 18 horas. As lâminas foram lavadas duas vezes com PBS, bloqueadas com 10% de soro de cabra em PBS (PBS- SC) por 1 h a temperatura ambiente, seguido de incubação com anticorpo de coelho anti-EcpA diluído 1:1000 em PBS-SC a 4 °C por 18 h. As lâminas foram novamente lavadas com PBS e incubadas com soro de cabra anti-IgG de coelho conjugado ao FITC, diluído 1:500 em PBS-SC, a temperatura ambiente por 1 h. Após a incubação, as lâminas foram lavadas duas vezes com PBS e montadas com *antifade vectashield* (Vector Laboratories, California, EUA), para manter a fluorescência. A imunofluorescência foi visualizada no microscópio de imunofluorescência Zeiss com aumento de 1000 X.

### 3.5. Sequenciamento total

A cepa BA1250 foi selecionada para o sequenciamento total de seu genoma. Para tanto, foi cultivada em meio LB por 18 h a 37 °C e em seguida realizada a extração de DNA genômico com o *Wizard Genomic DNA purification* kit (Promega; Estados Unidos).

O sequenciamento foi realizado utilizando a tecnologia Illumina, com kits da mesma empresa e seguindo as orientações do fabricante. A biblioteca genômica foi preparada com o kit *HiSeq Rapid SBS Kit v2 library kit*, e foi realizado sequenciamento do tipo *paired-ends*, com 2 x 250 ciclos de sequenciamento. O resultado foi tratado para a remoção de adaptadores, bases de baixa qualidade e leituras pequenas, utilizando a ferramenta Trimmomatic (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014).

A montagem dos genomas foi feita com o SPAdes, um montador de genoma que possui uma das melhores performances atuais (BANKEVICH. et al., 2012). Para analisar o conteúdo do genoma montado, alinhando-o a um genoma de referência, foi

utilizada a ferramenta QUAST (GUREVICH et al., 2013). Por fim, o genoma montado foi submetido à anotação automatizada utilizando o programa Prokka, que também possui ótima performance quando comparado com os anotadores atuais (SEEMANN, 2014).

### **3.6. Mutação dos genes *ecpA* e *ecpRABCDE* por recombinação homóloga**

A deleção dos genes *ecpA* e *ecpRABCDE* foi realizada segundo o método descrito por Datsenko e Wanner (2000), empregando o sistema de recombinases codificadas pelo fago  $\lambda$  *Red*.

#### *3.6.1. Amplificação dos fragmentos *ecpAcat* e *ecpRABCDEkan**

Com base nas respectivas sequências gênicas foram desenhados os iniciadores *ecpAcat-1/ecpAcat-2* e *ecpRkan-1/ecpEkan-2* apresentando aproximadamente 40 nucleotídeos homólogos aos genes *ecpA* ou *ecpR/ecpE* e outros 20 nucleotídeos específicos para amplificação do gene de resistência ao cloranfenicol ou canamicina, empregando-se os plasmídeos pKD3 e pKD4 como DNA molde, respectivamente. Para as reações foram utilizados 10 pmol de cada um dos iniciadores (forward e reverse), 200 nM da mistura de dNTPs (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), tampão de reação de PCR 1X (Invitrogen), 1,0 U de DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) e água ultrapura estéril para um volume final de 50  $\mu$ L. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador *Veriti 96 well Thermal cycler* (Applied Biosystems, Estados Unidos).

Após reações de PCR, os produtos obtidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%, purificados com o kit *Illustra™ Gfx PCR DNA and Gel band purification* (GE Healthcare; Reino Unido) ou *DNA clean and concentrator kit* (Zymo research; USA) e posteriormente tratados com *DpnI* (Invitrogen) para eliminação de DNA genômico metilado remanescente. A sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados no processo de mutação estão descritos na Tabela 4.



Tabela 4 - Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para mutação.

Iniciador	Sequência	Descrição
ecpAcat-1	GTTCTGGCAATAGCTCTGGTAACGGTGTTTACCGG TACAGGTGTGTAGGGCTGGAGCTGCTTC	Mutação de <i>ecpA</i>
ecpAcat-2	TTAACTGGTCCAGGTAGCGTCGAACTGTACGCTAA CGTCGCCCATATGAATATCCTCCTTAG	Mutação de <i>ecpA</i>
ecpRkan-1	ACTGAATGTACCTGTAAAAATTACAGGTTTGGAAAG TATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	Mutação de <i>ecpRABCDE</i>
ecpEkan-2	TCTCTGAGGTGGAATTCTTCCCTCGTCCGATGGAT AAGTCCATATGAATATCCTCCTTAG	Mutação de <i>ecpRABCDE</i>
ecpA-F1	GACTCACCGGGACTTCATGT	Adjacente à <i>ecpA</i>
ecpA-R1	AGGCAGAAGGTGCTTTTTCA	Adjacente à <i>ecpA</i>
ecpRAB- F	AACAGCAATATTAGGGGCGTG	Confirmação mutação <i>ecpA</i>
ecpRAB- R	GGATAACAGCAGAGCGAGAAG	Confirmação mutação <i>ecpA</i>
ecpR-F1	GGGCAAAGTTCCTGGCTAAT	Confirmação mutação <i>ecpRABCDE</i>
ecpE-R1	CATGCATGGATTCAGATTGC	Confirmação mutação <i>ecpRABCDE</i>
ecpABamHI	GGATCCTCATGAAAAAAAAGGTTCTGGC	Complementação <i>ecpA</i>
ecpAEagI	CGGCCGTTAACTGGTCCA	Complementação <i>ecpA</i>

Todos os sequenciamentos de fragmentos de DNA foram realizados no Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

### 3.6.2. Eletrocompetência

As cepas foram cultivadas em 3 mL de meio LB a 37 °C por 18 h a 210 rpm, seguido de inóculo a 1:100 em LB e incubado a 37 °C por 2 h a 210 rpm. Após este período as cepas foram submetidas a choque térmico a 42 °C por 15 min em banho-maria e em seguida levadas imediatamente para banho de gelo. As células foram então centrifugadas a 8000 x g a 4 °C por 10 min e o sedimento ressuspense em 1 mL de glicerol 10% gelado. Este passo foi repetido por mais duas vezes, sendo que na última lavagem o sedimento foi ressuspense em 100 µL de glicerol 10% gelado. As células competentes foram mantidas no gelo a 4 °C até a utilização, sem ultrapassar o período de 48 h.

### 3.6.3. Transformação por eletroporação

Células de BA1250 competentes foram transformadas por eletroporação (2,5 kV, 200  $\Omega$  e 25  $\mu$ F) com os plasmídeos pKD46 ou pKM208, ambos para expressão das recombinases, e seleção dos clones recombinantes foi realizada por plaqueamento em placas de LBA adicionadas de ampicilina (100  $\mu$ g/mL) a 30 °C. As recombinases foram induzidas com arabinose 0,1 M nas cepas BA1250(pKD46) e com IPTG nas cepas BA1250(pKM208) e posteriormente transformadas por eletroporação (2,5 kV, 200  $\Omega$  e 25  $\mu$ F) com o fragmento ecpAcat ou ecpRABCDEkan. As células foram então recuperadas por 3 h a 30 °C e plaqueadas em LBA suplementadas de cloranfenicol (25  $\mu$ g/mL) ou canamicina (50  $\mu$ g/mL) por 18 h a 30 °C. Clones recombinantes foram selecionados e incubados em 3 mL de LB suplementado com cloranfenicol (25  $\mu$ g/mL) ou canamicina (50  $\mu$ g/mL) por 18 h a 37 °C para expulsão dos plasmídeos termolábil pKD46 e pKM208. Para garantir a expulsão plasmidial, foram realizados repiques sucessivos dos clones em duas placas de LBA, uma contendo ampicilina (100  $\mu$ g/mL) e outra com cloranfenicol (25  $\mu$ g/mL) ou canamicina (50  $\mu$ g/mL), seguido por incubação a 42 °C por 18 h. As colônias resistentes a cloranfenicol ou canamicina e sensíveis à ampicilina foram selecionadas por terem perdido os plasmídeos. A confirmação da mutação foi realizada por PCR com os iniciadores ecpA-F1/ecpA-R1 e ecpR-F1/ecpE-R1.

### 3.7. Construção do plasmídeo de complementação

Após a confirmação da mutação no gene *ecpA*, foi utilizado o plasmídeo termolábil pCP20 para a remoção do cassete de resistência. Para isso, a cepa  $\Delta$ *ecpA* foi transformada com pCP20 por eletroporação (2,5 kV, 200  $\Omega$  e 25  $\mu$ F), recuperada em LB a 30 °C por 1 h e então semeada em placa de LBA suplementada com ampicilina (100  $\mu$ g/mL). Após este período, foram realizados repiques sucessivos das colônias obtidas em três diferentes placas de LBA, uma contendo ampicilina (100  $\mu$ g/mL), outra contendo cloranfenicol (25  $\mu$ g/mL) e a última sem adição de antibiótico. As placas foram incubadas a 42 °C por 16 – 18 h. As colônias que cresceram apenas nas placas de LBA sem antibiótico foram selecionadas por terem perdido o plasmídeo pCP20 e o cassete de resistência.

O gene *ecpA* foi amplificado por PCR empregando-se o gDNA de BA1250 extraído com o kit DNA genômico com o *Wizard Genomic DNA purification* kit (Promega; Estados Unidos) como molde de DNA e os iniciadores *ecpABamHI/ecpAEagI*. O produto de PCR foi purificado com o kit *DNA clean and concentrator* (Zymo research; USA), digerido com BamHI (*Thermo Fisher Scientific*) e EagI (NEB) e clonado nos sítios BamHI e EagI do plasmídeo pACYC184 sob controle do promotor do gene de resistência à tetraciclina (CHANG; COHEN, 1978). Os produtos de ligação foram transformados em células competentes de  $\Delta ecpA$  por eletroporação (2,5 kV, 200  $\Omega$  e 25  $\mu$ F) e os clones recombinantes selecionados em placas de LBA contendo cloranfenicol (25  $\mu$ g/mL) após incubação a 37 °C por 18 h. Colônias resistentes foram testadas quanto a presença do gene *ecpA* por PCR, sendo os clones positivos selecionados para análise da produção de ECP por ELISA.

### **3.8. Curva de crescimento**

As cepas foram cultivadas em 3 mL de meio M9, LB ou E3 a 28,5 ou 37 °C por 18 h sem agitação. Após esse período, foi realizado um inóculo a 1:100 no mesmo meio de cultivo e 200  $\mu$ L transferidos para poços de placas X100 *Bioscreen Plates Honeycomb* (Thermo Scientific, Reino Unido). Os cultivos foram incubados por 24 h a 28,5 ou 37 °C com leve agitação no aparelho *Bioscreen C Microbiology Reader* (Labsystems, Finlândia) com leituras de DO<sub>600nm</sub> a cada 30 min.

### **3.9. Ensaio de motilidade**

As cepas bacterianas foram cultivadas em 3 mL de LB a 37 °C por 18 h. Após este período, uma alíquota de 10  $\mu$ L do cultivo bacteriano foi aplicada no centro de placas de Petri contendo meio LB semissólido (LB 0,3% de ágar) e incubadas por 18 h. A motilidade bacteriana foi evidenciada pelo espalhamento bacteriano em torno do inóculo inicial.

### **3.10. Ensaio de biofilme**

#### *3.10.1. Método YESCA*

Para os ensaios de biofilme em meio YESCA o meio de cultivo foi preparado com 12 % ácido casamínico, 1,2% extrato de levedura e 2,2% de ágar. Placas grossas foram preparadas (~3/4) com o meio YESCA para que não ressecassem durante o período do ensaio. As bactérias foram cultivadas em meio LB a 37 °C por 16-18 h e 10 µL do cultivo bacteriano foram inoculados nas placas. As placas foram incubadas a temperatura ambiente por 15 dias para permitir a formação de biofilme. Imagens foram obtidas nos dias 1, 4, 7, 11 e 15 com o diâmetro do biofilme medido.

#### *3.10.2. Método com Cristal Violeta*

A adesão e formação de biofilme em superfície de poliestireno e vidro foram quantificadas em ensaios de 24 e 48 h seguindo a metodologia descrita por Sheikh e colaboradores (2001) com algumas modificações. As cepas foram cultivadas em meio TSB por 18 h a 37 °C em condições estáticas e em seguida inoculadas na proporção 1:100 em meio DMEM modificado sem fenol (Cultilab) em placas de cultura celular de 96 poços (TPP) ou placas de cultura celular de 24 poços (TPP) contendo lamínulas de vidro. As placas foram mantidas a 37 °C em condições estáticas por 24 ou 48 hs. Após o período de incubação, o meio de cultura foi retirado e a preparação lavada com PBS, seguido de fixação com etanol 75% por 10 min. O biofilme foi lavado três vezes com PBS para retirada do etanol e corado com solução de cristal violeta 0,5% por 5 min. A etapa de lavagem foi repetida e o conjunto biofilme-cristal violeta solubilizado com etanol 95%, seguido de leitura de absorbância em leitor de ELISA (Multiskan EX, Thermo Fisher Scientific, USA) a 595 nm. O ensaio foi realizado em triplicata em três repetições independentes.

### **3.11. Modelo de infecção *in vivo* com *zebrafish***

Todos os procedimentos com *zebrafish* foram realizados no *Centralized Zebrafish Animal Resource (CZAR)* da Universidade de Utah, Salt Lake City, Utah, Estados Unidos. Os protocolos utilizados foram realizados de acordo com as práticas

padronizadas que foram estabelecidas pelo órgão regulamentador americano *Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)*.

### 3.11.1. *Acasalamento e obtenção dos embriões de zebrafish*

Peixes da linhagem selvagem de *zebrafish (Danio rerio)* AB\* foram mantidos em ciclos de fotoperíodo de 14 h com luz/10 h ausência de luz.

Para o acasalamento, um macho e uma fêmea foram transferidos para tanques de acasalamento onde foram mantidos separados por um bloqueador transparente pelo período de 18 h. Em seguida, os peixes foram transferidos para novo tanque com água fresca onde o separador foi retirado por aproximadamente 3 h. Após este período, os peixes foram devolvidos para o tanque primário e os embriões coletados e transferidos para uma placa de Petri contendo meio E3 (5 mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,33 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 7,2) com azul de metileno com 24 horas pós fertilização (hpf) todos os ovos não fecundados foram retirados com pipeta Pasteur e o auxílio de uma lupa. Os ovos fecundados foram higienizados utilizando-se o seguinte protocolo: duas lavagens de 5 min em E3 estéril adicionado de 0,0038% (v/v) de solução de alvejante (Hipoclorito de sódio e Cloro; Sigma Aldrich) e 5 min em água destilada estéril, seguido pela etapa final de duas repetições de lavagens de 5 min cada em meio E3 estéril. Os embriões foram mantidos em estufa a 28,5 °C durante todo o processo de manipulação.

### 3.11.2. *Ensaio de colonização intestinal*

Neste ensaio foram utilizadas larvas de *zebrafish* com 96 hpf.

As cepas bacterianas foram cultivadas em 3 mL de meio M9 a 37 °C por 18 h sem agitação. Após este período, a DO<sub>600nm</sub> foi ajustada para 0,5 (aproximadamente 1 x 10<sup>9</sup> UFC) com centrifugação do cultivo a 8000 x g por 8 min e o sedimento ressuspensão em meio E3. As larvas foram transferidas para uma placa de Petri estéril contendo o cultivo bacteriano em E3, onde permaneceram em contato com as bactérias por 72 h com troca do meio e lavagem das larvas com E3 estéril a cada 24 h. Nos períodos de 24, 48 e 72 h, cinco larvas foram selecionadas e transferidas para uma nova placa de Petri contendo solução de Tricáína 20 X para anestesia até completa paralisação dos animais. Em seguida, individualmente as larvas foram

transferidas para tubos de ensaio contendo contas metálicas e levadas ao homogeneizador *Bullet Blender Homogenizer* (Scientific, USA) por 4 min. A solução obtida foi diluída em 0,7% NaCl até  $10^{-2}$ , plaqueadas em meio MacConkey e incubadas a 37 °C por 18 h para contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC). 1 mL do cultivo com a  $DO_{600nm}$  ajustada foi reservado para plaqueamento em meio MacConkey e contagem de UFC da carga bacteriana inicial de infecção.

Para os ensaios com imagens de microscopia, as larvas foram infectadas com as cepas BA1250,  $\Delta ecpA$  e  $\Delta ecpRABCDE$  transformados com o plasmídeo pmCherry, que confere fluorescência de cor vermelha às bactérias.

### 3.11.3. *Ensaio de infecção da cavidade cardíaca e via sistêmica*

Após higienização dos embriões com 24 hpf, o córion foi retirado utilizando 1 mg/mL pronase (Roche, VWR).

Larvas com 48 hpf foram infectadas por via local, como na cavidade cardíaca, ou sistêmica, como no vale de circulação, com aproximadamente  $10^3$  UFC/larva. Os animais foram monitorados quanto a enfermidades e sobrevivência, de acordo com a ausência de respiração e batimento cardíaco, a cada 24 h pelo curso do ensaio até 72 h. Log-rank (Mantel-Cox) foi utilizado para determinar significância estatística entre os grupos. Em cada experimento foi utilizado um n de 68 larvas/grupo. Para curva de sobrevivência foi estabelecido como 1 sendo morte e 0 sendo animais vivos.

## 3.12. **Detecção da produção de adesinas por ELISA**

As cepas BA1250,  $\Delta ecpA$  e  $\Delta ecpRABCDE$  foram cultivadas em 3 mL de LB a 37 °C por 16-18 h sem agitação. Em seguida, as culturas bacterianas foram inoculadas (1:100) em 3 mL de meio DMEM ou meio mínimo M9 e mantidas por 18 h a 28,5 ou 37 °C, respectivamente. As culturas bacterianas foram centrifugadas a 5.000 x g por 10 minutos e o sedimentado obtido ressuspensão em tampão Carbonato Bicarbonato 0,05 M pH 9,6 (Tampão Ca/Bi) a fim de se obter uma densidade ótica ( $DO_{600nm}$ ) de 1,0. Esta suspensão foi utilizada na sensibilização com 100  $\mu$ L/poço de placas *Maxisorp* (Thermo Fisher Scientific) a temperatura ambiente por 18 h. Para a detecção de intimina, o sedimento bacteriano foi primeiramente ressuspensão em solução de triton-X100 a 4% por 5 min, seguido de nova centrifugação e solubilização em tampão

Ca/Bi. Na detecção da produção de EspA, o sobrenadante do cultivo bacteriano foi utilizado na etapa de sensibilização das placas. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T (200 µL/poço), bloqueadas com solução de 1% de albumina de soro bovino (BSA) em PBS por 30 min a temperatura ambiente e incubadas com os seguintes anticorpos primários (100 µL/poço) por 1 h a temperatura ambiente: monoclonal anti-EspA 5 µg/mL, soro de coelho anti-ECP 1:3000, soro de coelho anti-T1P 1:5000, soro de coelho anti-HCP 1:5000, soro de coelho anti-Curli 1:5000, soro de coelho anti-YcbQ 1:5000 ou fração enriquecida de IgG anti-intimina 1:2000 em solução de bloqueio. As placas foram novamente lavadas com PBS-T e incubadas por 1 h a temperatura ambiente com anticorpos de cabra anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase (100 µL/poço) diluídos 1:5000 em solução de bloqueio. Finalmente, as placas foram novamente lavadas com PBS-T e o ensaio revelado com  $\sigma$ -nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (OPD; Sigma-Aldrich) com a leitura dos valores de DO<sub>492nm</sub> no leitor de ELISA *Multiskan EX*. Todas as cepas foram testadas em duplicatas em três ensaios independentes.

### **3.13. Análise de bioinformática para potenciais adesinas**

A busca por potenciais estruturas adesivas, nas sequências traduzidas das CDS (*Coding DNA Sequence*), obtida pelo sequenciamento total do genoma da cepa BA1250, foi realizada com o *software* SPAAN (SACHDEVA et al., 2005). O uso da inteligência artificial pelo programa se dá pela aplicação de um tipo específico de algoritmo de aprendizado de máquina (*machine learning*) denominado rede neural artificial.

Para tanto, a rede neural converte a sequência de aminoácidos em cinco características: frequência de aminoácidos, frequência de repetições de aminoácidos, frequências de dipeptídeos, composição de carga elétrica e hidrofobicidade. Com essas características, a camada de entrada da rede neural processa e repassa a informação para outras camadas até a predição da probabilidade daquela sequência específica se tratar de uma adesina. O banco de dados utilizado para “treinar” essa rede neural foi obtido no site do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Caracterização cepas de aEPEC

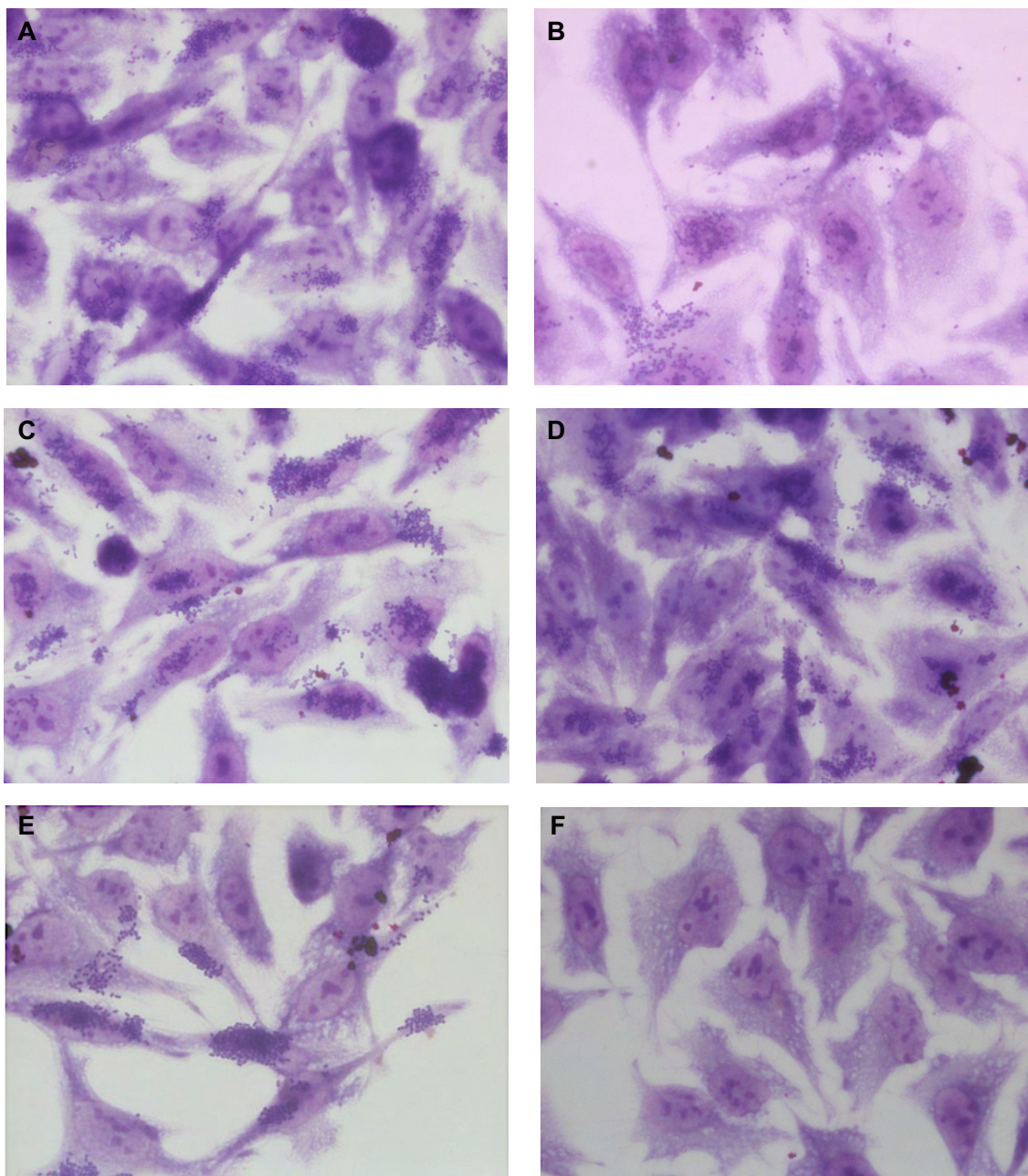
As cepas selecionadas para o estudo foram caracterizadas quanto ao padrão de adesão em ensaios de interação com células epiteliais *in vitro*, prevalência dos seis genes que compõem o *operon ecp* e a produção de ECP em condição de cultivo bacteriano que favorece a produção da fímbria.

#### 4.1.1. Ensaio de interação com células epiteliais *in vitro*

As cepas selecionadas para o estudo foram previamente caracterizadas por apresentarem o padrão de adesão ALL em ensaios de interação com células epiteliais *in vitro* (ABE et al., 2009). Contudo, com a contínua manipulação das cepas desde a definição deste padrão, os ensaios de adesão foram repetidos para comprovar se estas ainda apresentavam o padrão ALL. As 22 cepas testadas foram novamente classificadas com o padrão ALL em ensaios de adesão de 6 h (Figura 7).



Figura 7 - Ensaio de interação bacteriana com células epiteliais HeLa, com período de 6 h de incubação (3 h + 3 h).



**A:** BA1250 **B:** BA4047 **C:** BA1244 **D:** BA320 **E:** E2348/69 **F:** Controle de células HeLa sem infecção com cepas bacterianas. Aumento de 1000X.

#### 4.1.2. Prevalência do operon *ecp* nas cepas de aEPEC

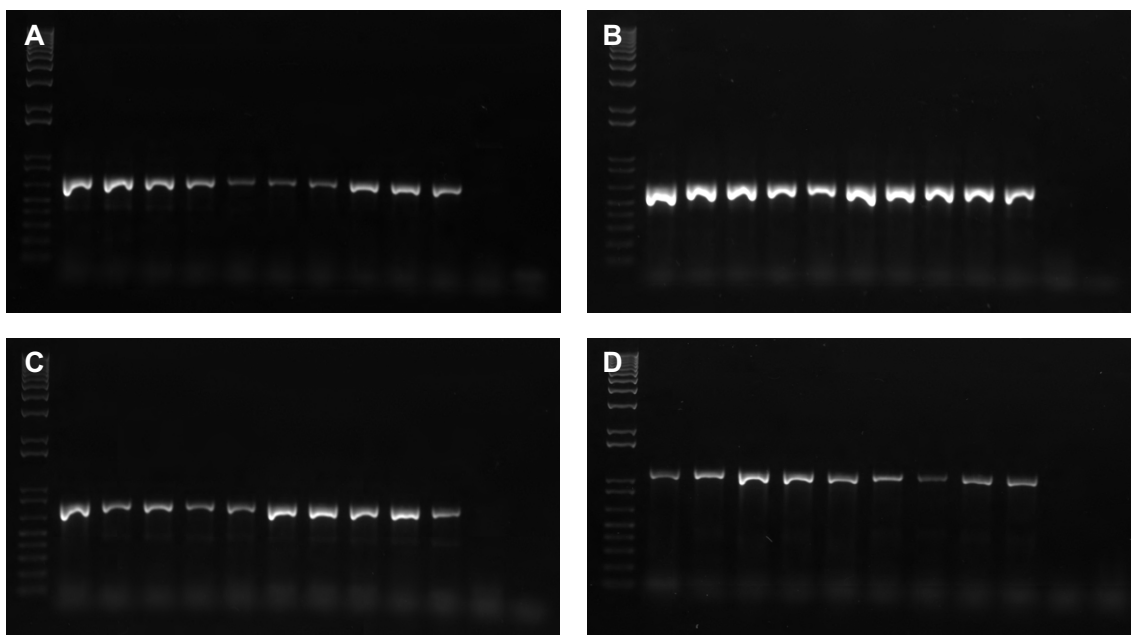
Os genes que compõem o operon *ecp* (*ecpR*, *ecpA*, *ecpB*, *ecpC* e *ecpE*) foram detectados em 100% das 22 cepas de aEPEC investigadas (Tabela 5 e Figura 8), o que demonstra alta conservação dentro do patotipo. O gene *ecpD*, responsável por

codificar a adesina da fímbria, foi o único a ser detectado em 96% (21) das cepas investigadas (Figura 8E).

Tabela 5 - Prevalência dos genes do *operon ecp* em cepas de aEPEC.

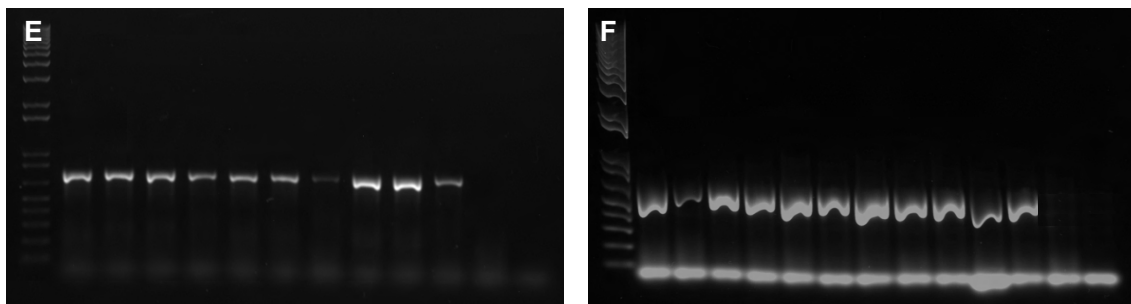
Gene	Cepas positivas	Cepas negativas	Frequência
<i>ecpR</i>	22	0	100%
<i>ecpA</i>	22	0	100%
<i>ecpB</i>	22	0	100%
<i>ecpC</i>	22	0	100%
<i>ecpD</i>	21	1	96%
<i>ecpE</i>	22	0	100%

Figura 8 - Eletroforese representativa em gel de agarose (1%) corado com *GelRed* das reações de PCR para detecção de *ecpR-E*.



(Continua)

(Continuação)



(A) *ecpR* – 683 pb (B) *ecpA* – 640 pb, (C) *ecpB* – 780 pb, (D) *ecpC* - 1130 pb, (E) *ecpD* – 760 pb, (F) *ecpE* – 458 pb. Canaletas: **PM**: 1 Kb Plus DNA ladder; **1 – 10**: Cepas de aEPEC; **11**: 1551-2 Controle negativo, **12**: Controle da reação – sem DNA.

#### 4.1.3. Análise da produção de ECP por cepas de aEPEC

A alta prevalência observada dos genes que codificam ECP nos levou a avaliar a produção desta fímbria por cepas de aEPEC. Para tal, foram realizados ensaios de imunofluorescência utilizando soro de coelho anti-ECP com as 22 cepas selecionadas. Nas condições de cultivo bacteriano estabelecidas, 55% das cepas foram classificadas como produtoras de ECP (Tabela 6).

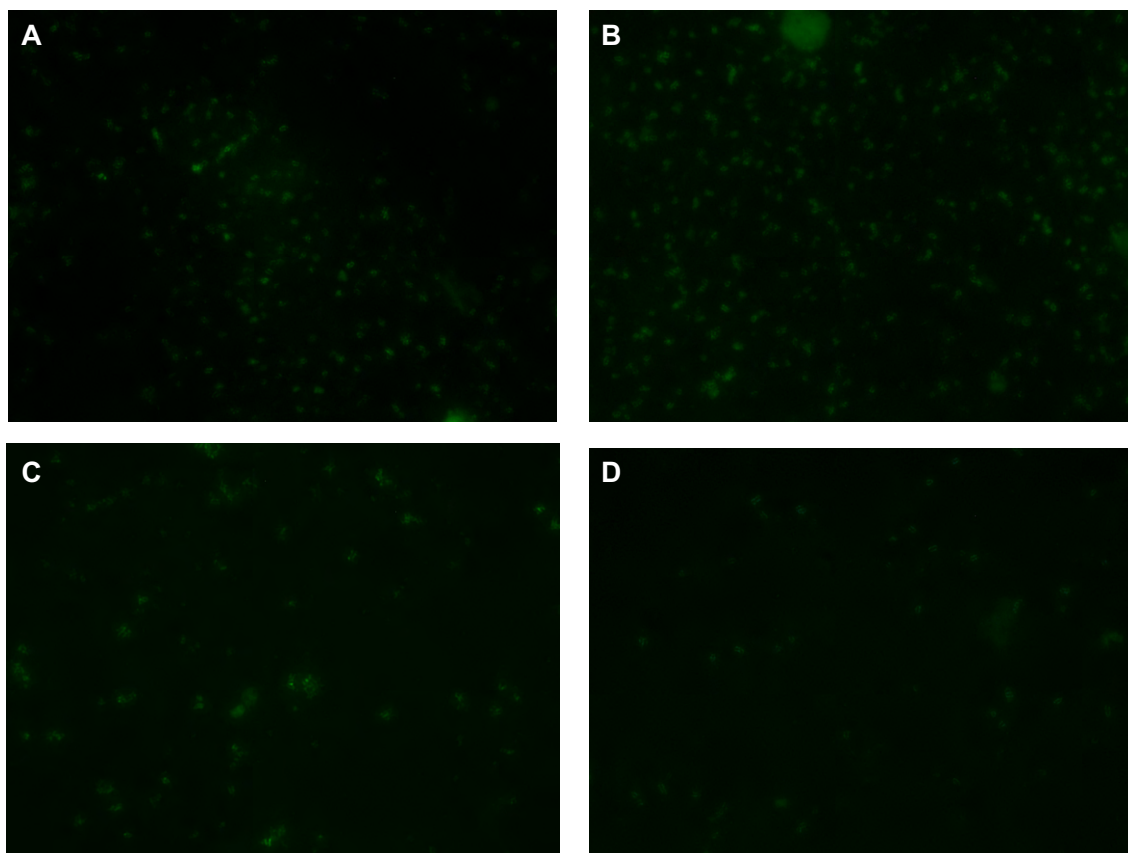
Tabela 6 - Frequência de cepas de aEPEC produtoras da fímbria ECP.

Cepa	Produção ECP
BA320	ECP+
BA487	ECP+
BA714	ECP-
BA1244	ECP-
BA1250	ECP+
BA1324	ECP+
BA1649	ECP+
BA1652	ECP+
BA2034	ECP-
BA2103	ECP+
BA2853	ECP-
BA3157	ECP-
BA3574	ECP-
BA3733	ECP-
BA3378	ECP-

BA3851	ECP+
BA3977	ECP+
BA4047	ECP-
BA4077	ECP-
BA4095	ECP+
BA4132	ECP+
BA4147	ECP+
<b>TOTAL ECP +</b>	<b>55% (12)</b>
<b>TOTAL ECP-</b>	<b>45% (10)</b>

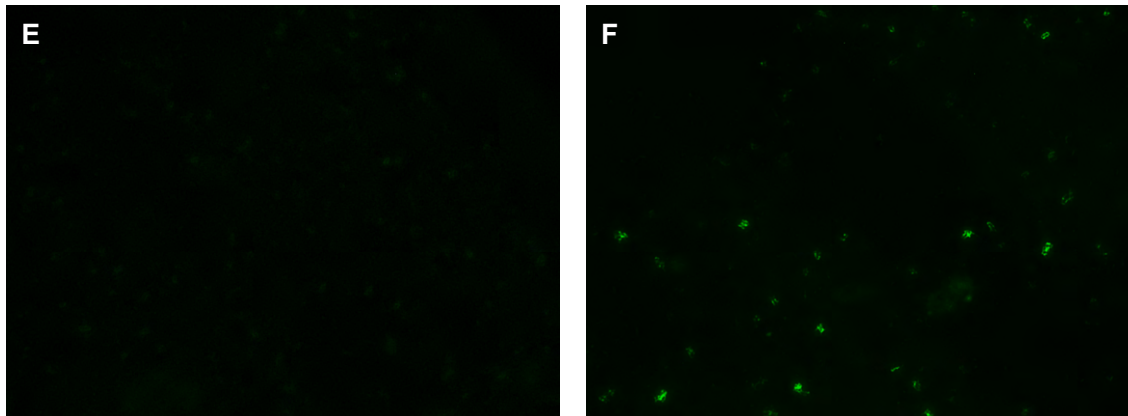
Nos ensaios de imunofluorescência observou-se que a produção da fímbria ocorria de maneira diferencial entre as cepas investigadas (Figura 9). Por este motivo, estas foram classificadas como forte produtoras (Figura 9A e B), produtoras intermediárias (Figura 9C e D) e baixa produtoras (Figura 9E).

Figura 9 - Ensaio de imunofluorescência com as 22 cepas de aEPEC.



(Continua)

(Continuação)



Detecção com soro de coelho anti-ECP **A:** BA4095 **B:** BA1250 **C:** BA3977 **D:** BA487 **E:** 1649 **F:** E2348/69. Aumento de 1000X.

Após a classificação das cepas de acordo com o nível da produção de ECP, a cepa BA1250, considerada alta produtora, foi selecionada para o estudo mais detalhado da função de ECP na patogênese de aEPEC.

#### **4.2. Sequenciamento do genoma da BA1250**

Após a remoção das sequências de adaptadores, das bases de baixa qualidade, dos *reads* (fragmentos de DNA genômico) pequenos e daqueles sem par correspondente, obtivemos uma cobertura do genoma de aproximadamente 77 vezes, considerando-se um tamanho médio de genoma de *E. coli* de 5.1 milhões de bases. Levando-se em consideração que uma cobertura de 30 vezes já é considerada suficiente para se obter uma montagem representativa de um genoma (KISAND; LETTIERI 2013), pode-se concluir que o sequenciamento realizado gerou dados que permitem montar um genoma representativo da amostra analisada.

A montagem resultou em 151 contigs (grandes sequências de DNA), com N50 de 129.195 bases. A anotação identificou um total de 4717 genes. Comparando-se com o genoma da cepa E2348/69 (GCA\_000026545.1), houve 83,14% de regiões alinhadas e 79,14% dos genes da cepa referência foram encontrados na BA1250. Esses resultados indicam que, embora tenha suas particularidades, o genoma montado é similar a um genoma referência, o que sugere que o sequenciamento e a etapa de montagem puderam gerar um material com boa representatividade do conteúdo genômico da amostra BA1250.

Com o sequenciamento total do genoma da cepa BA1250 foi possível analisar a sequência completa dos genes que compõem o *operon ecp* (Figura 10). Identificamos que as sequências dos genes *ecpC/ecpD* e *ecpD/ecpE* se sobrepõem no início e no final de cada gene. Além disso, confirmamos a ordem dos genes previamente caracterizada por Martinez-Santos e colaboradores (2012) como *ecpR*, *ecpA*, *ecpB*, *ecpC*, *ecpD* e por fim *ecpE*.

Figura 10 - Sequência completa do *operon ecp* da cepa BA1250.

```
GTGACATGGCAAAATGATTACAGCAGGGACTATGAGGTTAAAAACCATATGGAATGTCAAAACCGTTCTGATAAA
TACATCTGGTCTCCCATGACGCCTACTTCTATAAAGGACTATCTGAACTGATTGTGGATATCGACAGATTAATTTA
TCTATCGCTGGAGAAAATCAGAAAAGATTTTCGTGTTTATCAATCTCAATACGGTCTTTAACTGAGTTTATAAACC
GTGATAATGAGTGGTTATCCGCGGTAAAGGGGAAACAGGTCGTATTGATTGCGGCCAGAAAAGTCAGAAAGCCTTA
CTGGCCTATGTGATTAATGGCAGGTTCCGTGAGAAAAGATATTAAGAAAAGATAAAATCACTGACCGGAAATGGA
AATTATCCGCATGACGGCTCAGGGAATGCTGCCTAAATCGATTGCCAGAATTGAAAATTGTAGTGTGAAGACAGT
GTATACCCATCGCGGAATGCAGAGGCCAAGCTGTACTCAAAAATTATATAAGTTGGTTCAGTAAACTCCAGGGCAA
GTTAGTTTTAAAAATGACTACCGGGACTTCATGTCTCAATCAACTCGGGAAGAAAAGCAATGAAAAAAAAG
GTTCTGGCAATAGCTCTGGTAACGGTGTTTACCGGTACAGGTGTAGCGCAGGCTGCTGACGTAACAGCTCAGGC
TGTAGCGACCTGGTCAGCAACAGCCAAAAAAGACACCACCAGTAAGCTGGTTGTGACGCCACTCGGTAGCCTG
GCGTTCAGTATGCCGAAGGCATTAAGGTTTTAACTCACAAAAAGGTCTATTTGACGTGGCTATCGAGGGTGAC
TCAAACGGCTACCGCCTTTAAACTGACCTCACGCCTTATCACCACACCTTAACCCAGTTGGATACCTCAGGTTCC
ACACTGAATGTGGGCTGGATTATAACGGCGCGGCAGTCGAAAAAACTGGCGATACCGTGATGATCGATACCGC
CAACGGCGTACTGGCCGCAACCTTAGCCCACTGGCTAACGGTTACAATGCCAGCAATCGTACCACCGCACAGG
ATGTTTCACTTTTCCATCATCAGCGGCACCACCAATGGTACCACCGCAGTAACCGATTACAGCACTCTACCGG
AAGGCATCTGGAGCGGCGACGTTAGCGTACAGTTCCAGCGCTACCTGGACCAAGTTAATCTCTCTGATGTACCAGC
AGGGGTACCCCTGTCTTATTCCTGGACGGAATGTTATGAAAAAGCACCTTCTGCCTCTCGCTCTGCTGTTTTTC
CGGAATATCACCGGCCAGGCGCTGGATGTCGGCGATATATCATCGTTTATGAACAGTGACAGCAGCACGCTAAG
CAAAACGATCCAAAACAGTACCAGACAGTGGCCGCTCATCAATATCCGTCTCGAACCGGCTCTCTCACCGCTTG
ACGACGGGCAGGTTATCGCAATGGACAAGCCGGATGAGTTGCTACTACTCCCGCCAGCTTGCTGCTACCCGCC
CAAGCCAGCAAGTGATCCGCTTCTCTATAAGGGACCAGCAGATGAAAAAGAGCGCTACTACCGCATTTGCTG
GTTGATCAGGCCCTCAGTGTGCGCAGCGGATAATGCCAACCGTAGCGCTGTGGCCACTGCTTCCGCCCGCAT
GTTGACCAATCTGGTCTGCGTCCACCCCGCAGGGCAACTACCCTTTCAGTACGCCAACCGGCTCCCTGCAAAATA
CAGGAAATGCGACGTTGCGGATCCTCGCTACGGCCCTGCGCTGAAAGCCGCAATGGTAAGGAGTGTAAGA
GAATTACTACTGATGCCGGCAAGTCGCGTCTGTTTACCCGCGTGGACACGGCGGATAACAAAGGACGGGTTG
CACTTTGGCAGGGTGAAGTTTCACTCCCGTGAATAGATAGCTGTGCAGATGGATAACGACAATGCTTTACGA
CGGTTCTCCCCAGGACTGAAAGCCAGTTTGCCTTCCGCGATGGTCTTTTTGTTCTGCTCAGCCCGATGCCAGCGCT
GCTGACATAAGTGGCAGCAAAATAGGTGGGGTATTATCCGACGGCCTTCACTCAGGCGCTTACGACGGCAT
GAGCGTCCCGCTCTATATTCATCTCGCCGGTAGCCAGGGTCCGACGATCAGCGAATCGGCAGCGCTTTTAT
CTGGTTGGATGATGGACAGTTACGCATCCGAAAAATACAGCTGGAAGAGAGTGAAGATAACGCCAGTCTCAGCG
AACAACCTCGACAGCAGCTGACGACTCTGGCCAACGCCCGTTCAATGAGGCCCTTACCATCCCCCTGACTGAC
AACCGCAGTTGGATCTCAGCTTGGCCAACTGCTGTCAGCTGGTGGTCAAGCGCGAAGCGCTGGGCACCG
TACTACGCTCAGTACGCAAGACATCGGGCAGTCCAGTGTAAACACCCTCAGCAGTAATCTGAGCTATAACTCG
GCGTCTATAACAACCAGTTGCGTAACGGCGGGAGCAACACCTCCAGTATCTGTGCTGAATAACGTTACTGCGC
TGCGCGAACATCAGTGGTGTCTGACGGCTCACTGTACGGGATTGGTAGCGGTC AACAGGACAGTGAATATAT
AAAGCGATGTATGAACGCGATTTTGTGTCACCGATTTGCGGGTGAATGCTCGACACCTGGAACCTTGACGTC
CTTAGCCCGGGCGTGGCGTGGTGCACCGTGGCGTGGCAGATATGGGCGGTAGCTTTCATATGGATCGCTG
GTCCGAAAACGGGAAAAAGACGCGACCAAGCAAAAGAGAGTTGGCTGGCAGGTGCTCGACCTCGGGCTCACT
GAGTACGTTTACTGGGGCGCAACGGGATATGGATACGATAATCAGGCGGTGGGTGAAACCCGCTGTGACGCTGC
CGCTTGGGGGGGCGATCAACGTTAACCTGCAAAACATGCTGCCAGTGACAGCTCATGGAGCAACATCGCCAG
CATCAGCGCCACTCTACCTGGAGGCTCAGTTTCGCTGTGGGTTAACAGGAAAAAACCCGATTGGCAATCAAT
TGCGACGTAGCGATGCCGACAACCGTGCAATCGCGGCCACTCAACCTGAACTCACTGTGGTCTGAAGCTGGG
TACGTTACAGCATCAGTACAATGATACCGCCGCTACAACAGCCATTATACACGGCAGATTACTATCAAAGTGTCT
TACAGCAGTACCTTTGGTTGCTTGGCCTGCGGGCCGGTATTACGCGCTATAACAACGGCGACAGCAGCGCCAA
TACAGGGAATATATCGCTCTCGATCTCTCGCTACCACTGGGCAACTGGTTTAGCGCAGGGATGACCCATCAAAA
CGGCTACACCATGGCAAACTGTGACGACGCAACAGTTTGTATGAAGGAACCACTCGCACTGTTGGTGCACAATC
TGTACAGAGCATCTCCGGGATACCGGTGATGACAAAACCTCAGCGGTGGGGGCTATGCACAGTTTCAGCGCT
CGTTACGCCAGCGGAACGCTGACGCTCAATAGCGCGGGGACGGCTACATCAATACCAATTTGACCGCAACGG
CAGCGTCCGGCTGGCAGGTTAAAAACATCGCTGCCAGCGGGCGGACCGATGGCAACGCTGGGGTGATATTCGAC
ACTGGCTGGAGAACCTGTTGATGATCAGCGCCAAAATCAACGGGCGGATTTTCCCGCTTAACGGCAAGCGTAA
CTATCTCCCGCTCTCCATGGAAGATATGAGGTGGAGTTGAGCAACAGCAAAAACTCACTCGACAGTACGA
TATCGTACGGGTGCAAAAGTCACTGACTCTCTATCCAGGCAATGTCGCTGTCATTGAGCCAGAGGTGAAGCA
GATGGTTACCGTCTCCGGTCTATCCGTGCGGAAGACGGCACACTGCTGGCTAACGCACGGATTAACAACCATAT
CGCCGAAAGCCGATGAAAACCGCGAGTTTGTATGGACGTTGGATAAGAAATACCCACTATCGATTTTCT
GCTACAGTGGCAATAAACTGCGAAGTGGCACTGGAACCTAACCCAGGCGCGGCTGGCTGGTGGTGGTGA
TGTGGTCTGACGCGCCTCTCATCTGGGCGGGGTGACGCAGACAGGAGAAGAGA
```

**ATGAGAGTTAA**CCTACTGATAGCGATGATAATCTTTGCGCTAATCTGGCCTGCAACCGCGCTCAGAGCGGCAGTG  
AGCAAAACAACCTGGGCGGATGCACCGGCACGCGAGTTTGTGTTTGTGCGAAAACAACCTCAGACGACAACCTTTT  
TCGTCACTCCTGGCGGGGCGCTGGATCCGCGCCTGACCGGTGCCAACCGCTGGACCGGTTTAAAATACAATGGT  
TCAGGAACCATCTATCAGCAAAGCCTCGGCTACATTGATAACGGTTACAACACCGGCCTTTATACCAACTGGAAG  
TTTGATATGTGGCTGGAAAATTCACCAAGTTTCATCTCCTTTAACTGGCTTGGCGTGCATCAACTGGTACGCAGGGT  
GTAATATGACCACAGTCTTATCCTGCCGCAAACCACCGACGCCAGTGGATTTTATGGCGCGACGGTGACCAGCG  
GCGGCGCGAAATGGATGCACGGCATGTTGTGACAGCGCTTTTACCAGTATCTGCAACAAATGCCGCTCGGCAGC  
AGCTTTACAATGACCATCAATGCCTGCCAGACCTCTGTGAACCTATGACGCCAGCAGCGGCGCAGCTGTAAGGAT  
CAGGCCTCCGGCAACTGGTATGTTGCAACCGTACCCATAACGAAAAGCAGCAAATCTGGGTTGATAAAATACCCAC  
TCGTGGCGGAAGTATTATCAACAGCGACGGAGTACCGACTCTGGGCGAAGGGAACGCCGACTGCCGGACGC  
AAACCATCGGCAGTCTTACAGGATTAAGTTGTAAGATGGTTAACTATACCTGCAAAACAAACCGACTCAGCAAC  
ACCTCAATCCATATATTCCCGGCGATCGCCAACTCATCTAGCCTCGGCCGTCGGGGCGTACGATATGCAGTTCA  
GTCTGAATGGCAGTTCATGGAACCGGTGAGCAATACTGCCTATTACTACACCTTCAACGAGATGAAGAGCGCA  
GACTCGATCTATGTTTCTTCTCGAGCAACTCTTTAAACAGATGGTGAACCTCGGGATCAGCGATACAACACCA  
AAGATCTATTCAACTTTCCGTTTCAGAACACCACATACCCGGAGTCTGGCTGGTATGAATTTTCTACCTCCAACAC  
GCTGATTATCAAACCCCGTATTTCAGCATCAGTATTATCTCCGATGAATATACTCAGACACCGTCCGGGGAGGGA  
TATGTTGGCAGCGGCGAGTCCGCACTCGATTTCCGCTATATCGTAAACCACCGGGTAAACAGCTGCCGACGA  
AGTGTGATCAAGGTGACCGGACCCGCGCAGGTGATTGGCGGGCGCTCCTATTGTCTTCAGCTCCGATGACG  
GTAAGGCGAAAGTACCGTCCCGGCGACGCTTTCCTTTATTACCCGCAACGGAGCTACAAAAACCTACGATGCCG  
GGTGCATGATAGTGGCGGGATATGACCGATGCGTGTGGTTGACCAACCGTGGACTGATATCTCTGGCGAAG  
TGGGGCAGATGGATAAGACCACAGTCAAATTTTCGATTCCAATGGATAACGCCATTTCTCTGCGTACGGTAGATG  
ATAACGGCTGGTTTGGCGAAGTCAGCGCTTCAGGAGAGATTC**ATGTTACAGGCGACGTGGCGTAAACATTA****ACTA**  
**A**GGCCCTGCTGACAGTGGTCTGTATGCTGGCGGCACCTTTGACACAGGCGATTTCCGGTCCGCAATCTGACTTTTT  
CACTCCGTCAGACTGACTTTGTGACGAAACGCTGCTGTAATAACAACAAAAGCGCGGATATACCGTATT  
GCCATCAGTGTATTGATAGCCCGGCAGCAGTGAATTGCGCACCCGACCGGTGGATGGTGAACCTACTTTTCGCC  
CCCCGCCAGTGGCGTTGACAGGCTGGTGTAGAGCGAGTATTTAAATTTACTATCATGGTCCACGGGATAACCGC  
GAGCGTACTACCGGCTCATTTCGCGAGGTCCCACTGTAACCTGACAAAACGCAGCCCAACCGGCGGTGA  
GGTCAGCACGGAGCCGGTGGTGTGATGGATACCATTCTGGTAGTACGACCACGTCAGGTTCAAGTTTAAATGGTC  
CTTCGATCAGGTGACCGGAACAGTAAGTAACCCGGCAACACGTGGTTTAAAGCTACTGATTAAACCAGGATGTG  
ATTGACCGAAGAGGAAGGCGATGCCTGGTATCTACGTCCGGGAGACGTGGTTCATCAGCCTGAGTTACGTACG  
CCGGGAATCACTATCTGGTCTATAACGACAAATTCATTAAGATTAGCGATTCTGTCCGGCTAAGCCCCCTTCGG  
CGGACTAA

### 4.3. Papel de ECP na patogênese de aEPEC

#### 4.3.1. Construção e caracterização das deleções genéticas

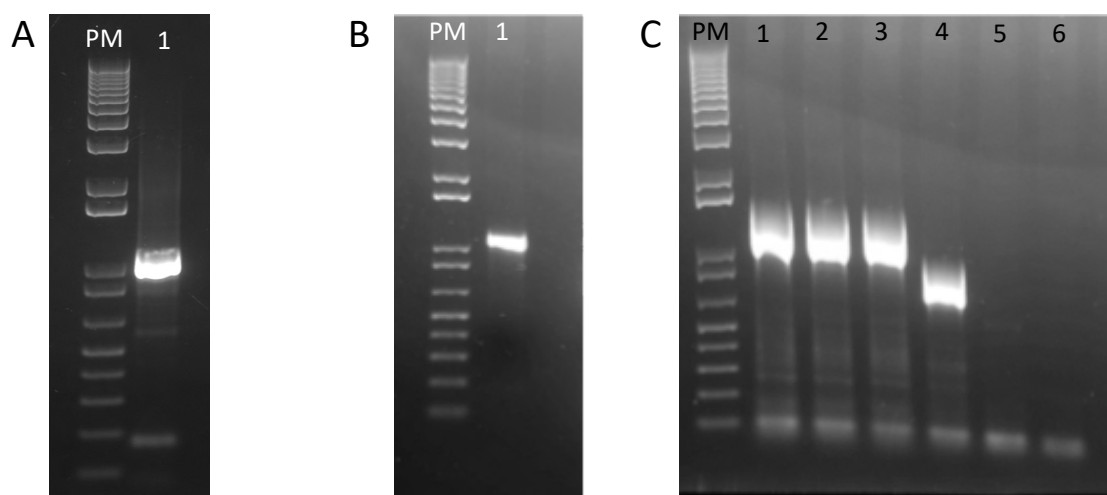
Para o estudo mais detalhado do papel de ECP na patogênese de aEPEC, foram realizadas duas mutações distintas na cepa BA1250. Todas as mutações foram realizadas de acordo com o sistema de recombinases codificadas pelo fago  $\lambda$  Red (DATSENKO; WANNER, 2000). A primeira mutação se deu apenas no gene *ecpA*, onde a cepa resultante  $\Delta ecpA$  ainda apresenta os genes restante do *operon ecp*, ou seja, os genes *ecpR*, *ecpB*, *ecpC*, *ecpD* e *ecpE*. Já a segunda deleção foi realizada com todos os genes que compõem o *operon*, ou seja, mutação desde o gene *ecpR* até o gene *ecpE*.

##### 4.3.1.1. Mutagênese sítio dirigida do gene *ecpA*

A primeira etapa na deleção do gene *ecpA* foi a obtenção do fragmento linear do cassete de recombinação por reação de PCR utilizando o plasmídeo pKD3 como molde de DNA e o par de iniciadores *ecpAcat-1/ecpAcat-2*. O fragmento do cassete de resistência ao cloranfenicol possui 1.100 pb (Figura 11A). Após obtenção do

fragmento, este foi tratado com a endonuclease *DpnI* para eliminação de qualquer DNA metilado (Figura 11B) e transformado em BA1250::pKD46 expressando as recombinases codificadas pelo plasmídeo pKD46. Três clones recombinantes foram obtidos pela obtenção de resistência ao cloranfenicol e submetidos a cura do plasmídeo pKD46 após dois repiques sucessivos a 42 °C. Os candidatos a mutantes foram submetidos às reações de PCR com os iniciadores *ecpRAB*, gerando fragmentos de aproximadamente 1.100 pb (Figura 11 C) ao invés de 730 pb como na cepa selvagem, o que indica a incorporação do cassete de recombinação ao genoma.

Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose (1%) corado com *GelRed* para confirmação da mutação em *ecpA*.



(A) reação de PCR para amplificação do cassete de resistência a cloranfenicol. **PM**: 1 Kb plus (Thermo Fisher Scientific, USA), **1**: cassete de resistência a cloranfenicol (B) Fragmento purificado pós tratamento com *DpnI* (C) Perfil eletroforético da reação de PCR para amplificação do cassete de resistência a cloranfenicol. **PM**: 1 Kb plus (Thermo Fisher Scientific, USA), **1**: clone 1; **2**: clone 2; **3**: clone 3; **4**: E2348/69 – controle positivo; **5**: 1551-2 – controle negativo; **6**: Controle da reação

Além da confirmação realizada por ensaio de PCR, os fragmentos foram sequenciados. A análise das sequências com a ferramenta BLAST revelou a presença do cassete de resistência ao cloranfenicol nos três fragmentos. Pelo anelamento com a sequência de *ecpRAB* da cepa selvagem observou-se 96% de identidade em 9% de cobertura e 96% de identidade em 91% de cobertura, quando comparado com o cassete de resistência (Figura 12). Este resultado demonstrou a deleção do gene *ecpA* e a permanência dos genes *ecpR* e *ecpB*, como desejado.



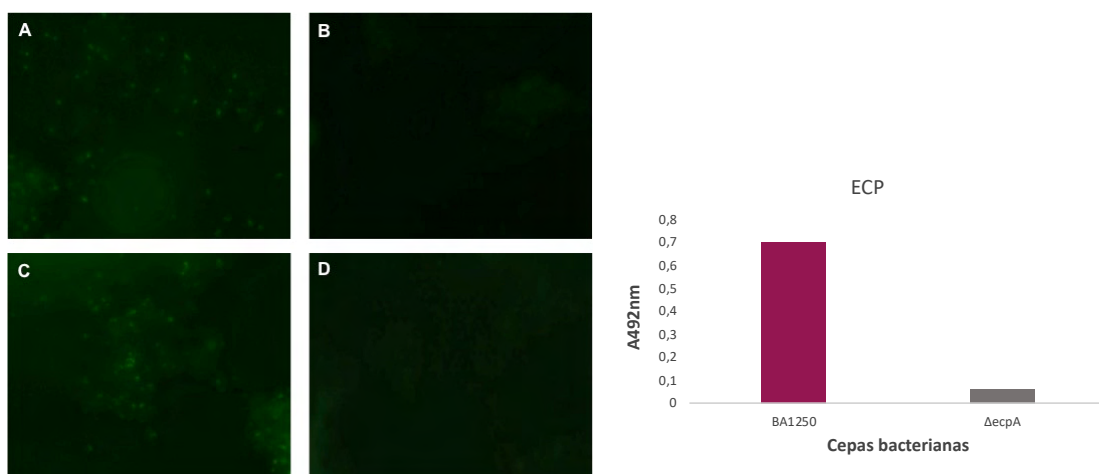
Figura 12 - Confirmação da mutação do gene *ecpA* por sequenciamento.

ACGGCGTCGCTTGGCMCTCATKCMAGATCGTTGATCYATAGCATCGCGACMTGAAGCATCACAACGCAT  
 GATGACTKGATCGCAGCGCATCAGCACTGTGCTGCGTATATATTGCCCATGGKGAACGGGGGCGAGAGT  
 GTCCATATGGCCAGTTTAATCAAACGTGAACTCACCCAGGGATTGGCTGAGACGAAAAACATATCTCAAT  
 AAACCCTTAGGGAAATAGGCCAGGTTTTACCGTAACACGCCACATCTTGCGAATATATGTGTAGAACTGC  
 CGGAAATCGTCGTGGTATTCACTCCAGAGCGATGAAAACGTTTCAGTTTGCTCATGGAAAACGGTGTAAACA  
 AGGGTGAACACTATCCCATATCACCAGCTCACCGTCTTTCATTGCCATACGTAATCCGGATGAGCATTATC  
 AGGCGGGCAAGAATGTGAATAAAGGCCGGATAAACTTGTGCTTATTTTTCTTACGGTCTTTAAAAAGGC  
 CGTAATATCCAGCTGAACGGTCTGGTTATAGGTACATTGAGCAACTGACTGAAATGCCTCAAAATGTTCTTT  
 ACGATGCCATTGGGATATATCAACGGTGGTATATCCAGTGATTTTTTTCTCCATTTTAGCTTCCTTAGCTCCT  
 GAAAATCTCGACAACTCAAAAAATACGCCCGGTAGTGATCTTATTTTCATTATGGTGAAAGTTGGAACCTCTT  
 ACGTGCCGATCAACGTCTCATTTTCGCCAAAAGTTGGCCAGGGCTTCCCGGTATCAACAGGGACACCAGG  
 ATTTATTTATTCTGCGAAGTGATCTTCCGTCACAGGTAGGCGCGCCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATA  
 GGAACCTCGGAATAGGAACTAAGGAGGATATTCATATGGCGGACGTTAGCGTACAGTTCGACGCTACCTG  
GACCAGTTAATCTCTCTGATGTACCAGCAGGGGTACCCCTGCTTATCCTGACGAATGTAGAAAGYT

As regiões flanqueadoras (sublinhadas) representam as porções conservadas do gene *ecpA* e a região central (não sublinhada) corresponde ao cassete de cloranfenicol.

Após a confirmação da recombinação homóloga e inserção do cassete de resistência, foram realizados os ensaios de imunodeteção por imunofluorescência e ELISA, com a confirmação da ausência de produção de ECP pelo mutante  $\Delta ecpA$  (Figura 13).

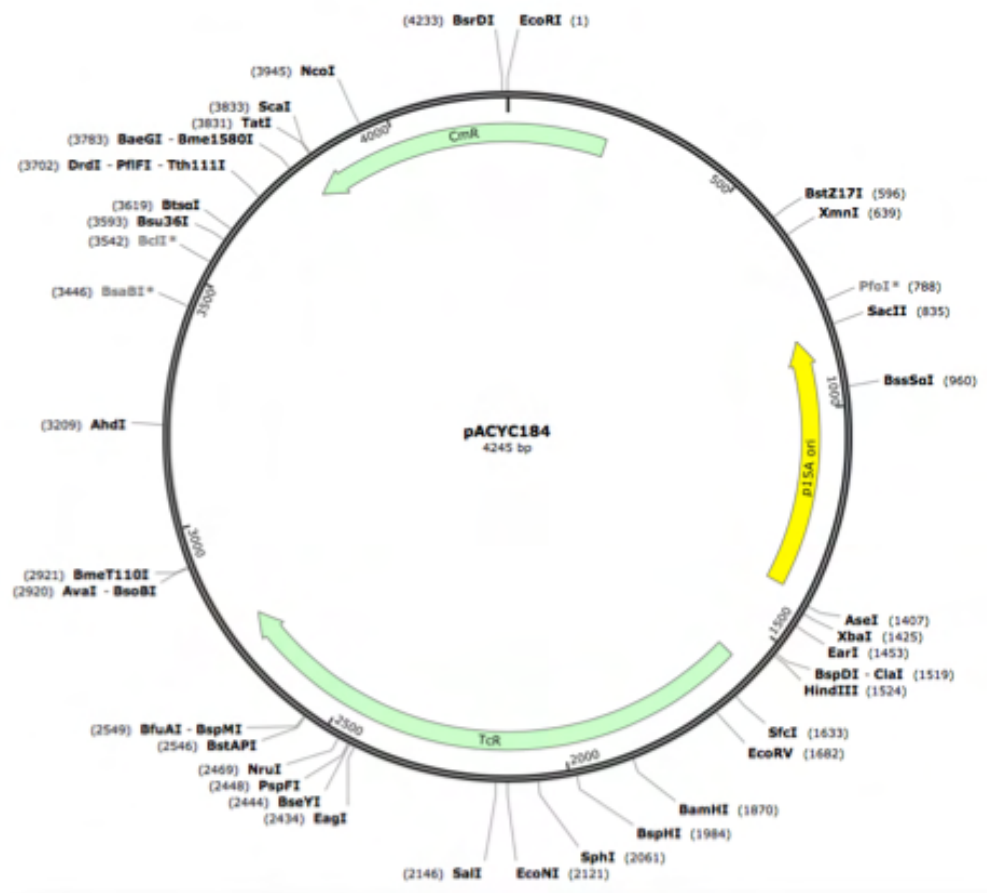
Figura 13 - Análise da produção de ECP para confirmação da mutação em *ecpA*.



(A) Imunofluorescência com soro de coelho anti-ECP. **A:** BA1250; **B:**  $\Delta ecpA$ ; **C:** E2348/69 – controle positivo; **D:** 1551-2 – Controle negativo. (B) ELISA com soro de coelho anti-ECP com as cepas BA1250 e  $\Delta ecpA$ .

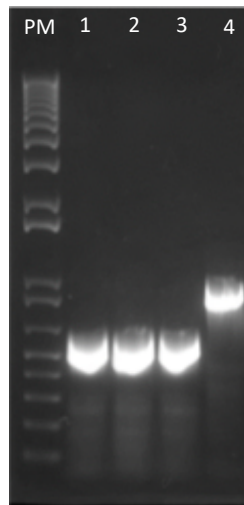
Confirmada a deleção do gene *ecpA* e a ausência da produção de ECP pelo mutante  $\Delta ecpA$ , a continuidade dos experimentos consistiu na complementação da mutação com a construção do plasmídeo pEcpA. Para esta etapa foi utilizado o vetor *pACYC184* (Figura 14) para a clonagem de *ecpA*<sub>BA1250</sub> após restrição dos sítios de BamHI e EagI.

Figura 14 - Esquema ilustrativo do plasmídeo *pACYC184* contendo os sítios de restrição BamHI e EagI.



Por conferir resistência ao cloranfenicol pelo vetor *pACYC194*, foi previamente realizada a retirada do cassete de resistência ao mesmo antibiótico de  $\Delta ecpA$  utilizando o plasmídeo pCP20. Este plasmídeo possui origem de replicação sensível a temperatura, confere resistência a ampicilina e codifica a recombinase FLP. Após a eletrotransformação e cultivo bacteriano a 30 °C, foi realizada a reação de PCR com o par de iniciadores *ecpRAB-F/ecpRAB-R* (Figura 15). Nas reações com os 3 clones obtidos foram observados fragmentos de aproximadamente 450 pb (Figura 15, canaletas 1-3), ao invés de 1.100 pb do cassete, como esperado.

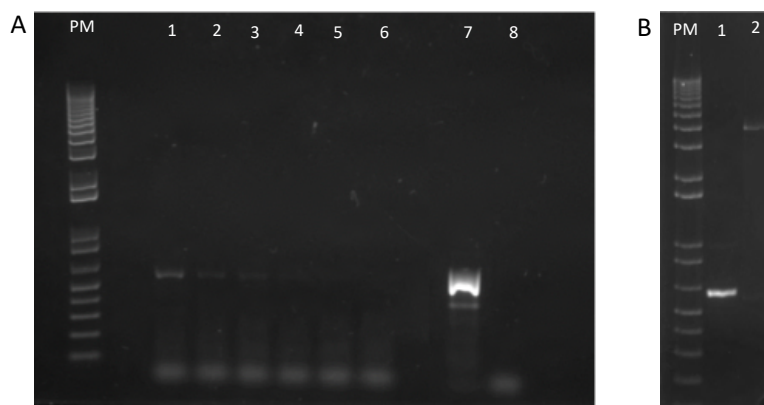
Figura 15 - Perfil eletroforético da reação de PCR para confirmação da retirada do cassete de resistência ao cloranfenicol.



**PM:** 1 Kb plus (Thermo Fisher Scientific, USA), **1:** clone 1; **2:** clone 2; **3:** clone 3; **4:** E2348/69 – controle positivo; **5:** 1551-2 – controle negativo; **6:** Controle da reação.

Utilizando o par de iniciadores *ecpA*-BamHI e *ecpA*-EagI e a cepa BA1250 como molde de DNA, foram realizadas reações de PCR para a obtenção do inserto a ser utilizado na complementação de  $\Delta ecpA$ . Um gradiente de temperatura de anelamento foi realizado para a otimização da reação (Figura 16) e na temperatura de 52 °C ocorreu a melhor amplificação do fragmento de 550 pb (Canaleta 1). O inserto foi obtido em maior concentração e foi realizada a dupla digestão com as enzimas de restrição BamHI e EagI com o fragmento e com a extração plasmidial do pACYC184 (Figura 16B – canaletas 1 e 2, respectivamente).

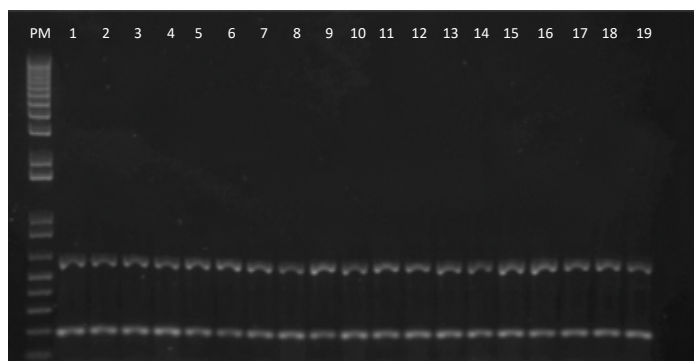
Figura 16 - Perfil eletroforético da reação de PCR para obtenção do inserto para complementação do  $\Delta ecpA+pEcpA$ .



(A) Reação de PCR para obtenção do inserto. **PM**: 1 Kb plus (Thermo Fisher Scientific, USA), **1**: 52 °C; **2**: 55 °C; **3**: 56 °C; **4**: 57 °C; **5**: 58 °C; **6**: 60 °C; **7**: E2348/69 – Controle positivo; **8**: 1551-2 – Controle negativo. (B) Dupla digestão do inserto (Canaleta 1) e vetor (Canaleta 2) com as enzimas BamHI e EagI.

Em seguida, foi realizada a ligação de *ecpA*<sub>BA1250</sub> com o vetor seguido pela transformação por eletroporação em cepas  $\Delta ecpA$  competentes. Para comprovação da clonagem por PCR foram selecionados 19 clones e, portanto, a complementação do mutante ( $\Delta ecpA+pEcpA$ ). Dos 19 clones obtidos todos foram confirmados positivos para a complementação (Figura 17, canaletas 1 – 19). Em todos os clones observou-se a amplificação de dois fragmentos distintos, um referente a clonagem em *pACYC184* e outro da amplificação do restante do gene no cromossomo, como esperado.

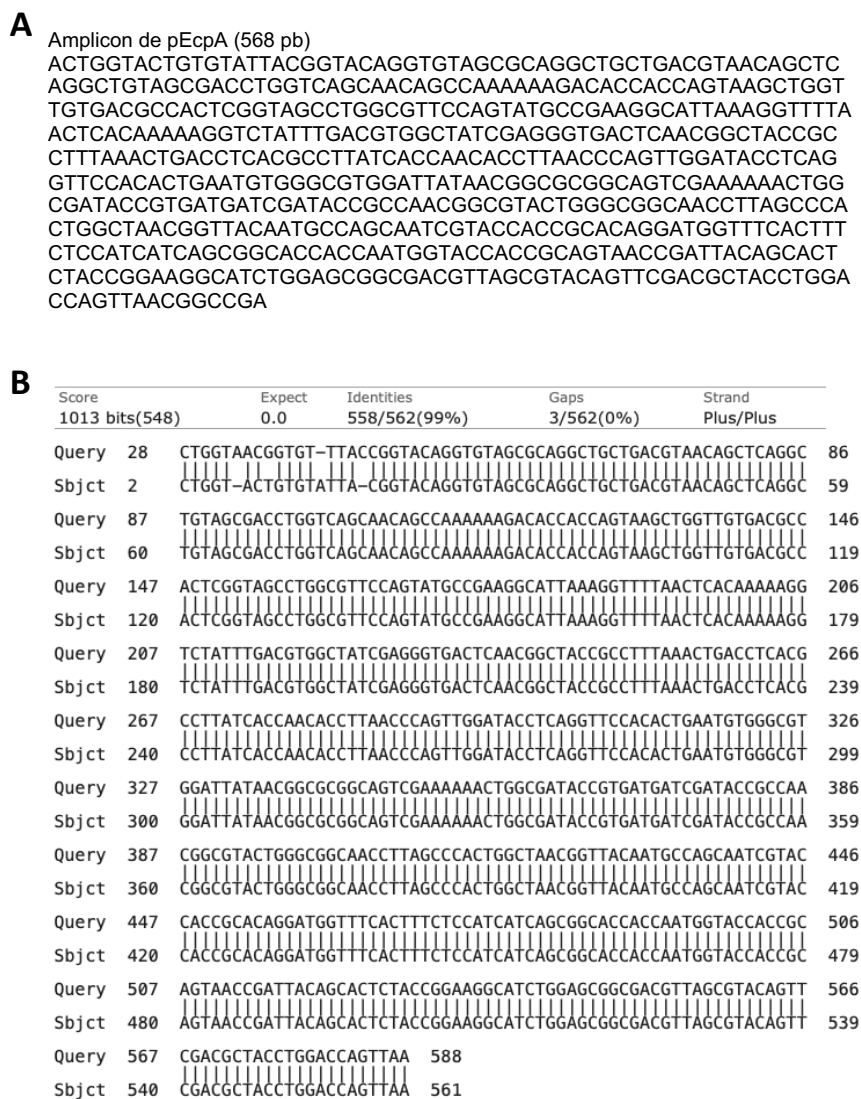
Figura 17 - Perfil eletroforético da reação de PCR para confirmação da complementação do  $\Delta ecpA+pEcpA$ .



**PM**: 1 Kb plus (Thermo Fisher Scientific, USA), **1-19**: clones 1 - 19

O fragmento de 550 pb do clone 1 foi purificado e sequenciado com os iniciadores *ecpRAB* (Figura 18 A). Alinhamento da sequência de *ecpA*<sub>BA1250</sub> clonado no vetor *pACYC184* com a sequência de *ecpA* da cepa selvagem resultou em uma identidade de 99% com 95% de cobertura (Figura 18 B).

Figura 18 - Confirmação da complementação de  $\Delta$ *ecpA*+pEcpA.

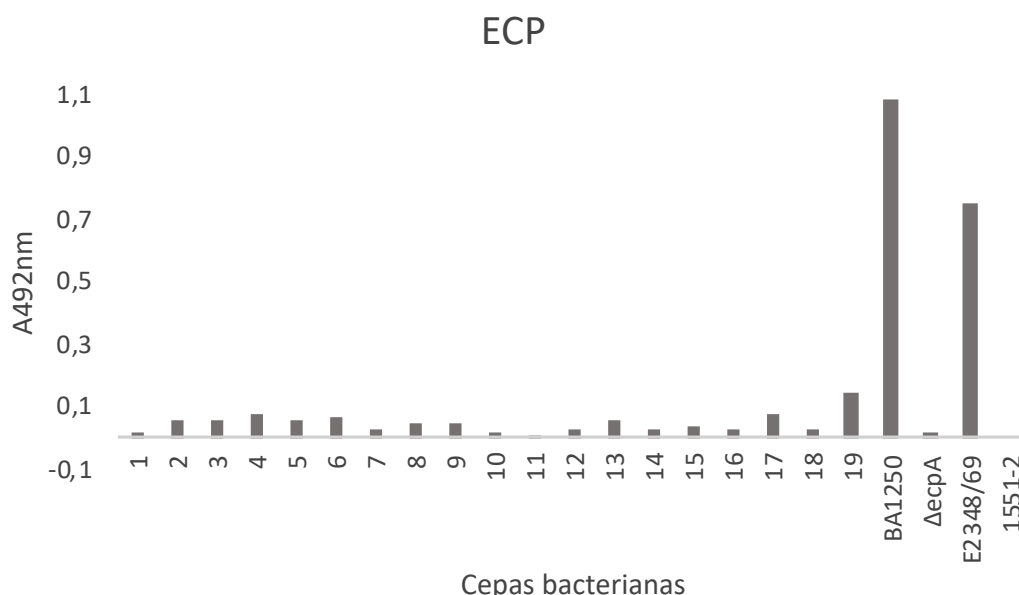


(A) Sequência de nucleotídeos do fragmento de *ecpA*<sub>BA1250</sub> clonado no vetor *pACYC184*. (B) Alinhamento da sequência de *ecpA*<sub>BA1250</sub> clonado no vetor *pACYC184* com a sequência de *ecpA* da cepa selvagem

As cepas BA1250,  $\Delta$ *ecpA* e  $\Delta$ *ecpA*+pEcpA foram caracterizadas quanto à produção de ECP para confirmação de complementação. Para isso, foram realizados

ensaios de ELISA com todos os clones obtidos para quantificar a produção da fímbria ECP pelas cepas (Figura 19). Em nenhum dos clones obtidos por complementação observou-se o reestabelecimento da produção da fímbria em níveis comparados com o da produção pela cepa selvagem, mesmo tendo-se confirmado a clonagem. O clone 19 apresentou discreta produção da fímbria, mas como a detecção foi extremamente baixa em relação à BA1250 não se pode considerar uma cepa complementada com sucesso.

Figura 19 - Análise da produção de ECP para confirmação da complementação por ELISA indireto com soro de coelho anti-ECP.

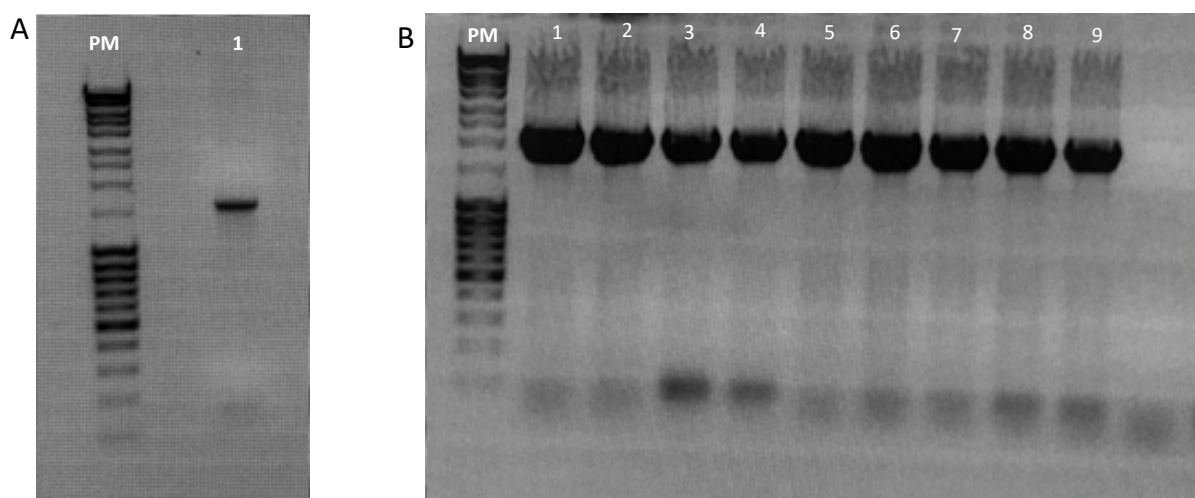


#### 4.3.1.2. Mutagênese sítio dirigida do operon *ecp* completo

A primeira etapa na deleção dos genes *ecpRABCDE* foi a obtenção do fragmento linear do cassete de recombinação por reação de PCR utilizando o plasmídeo pKD4 como molde de DNA e o par de iniciadores *ecpRkan-1/ecpEkan-2*. O fragmento do cassete de resistência à canamicina possui 1.400 pb, (Figura 20 A). Após obtenção do fragmento, este foi purificado e transformado na BA1250 expressando as recombinases codificadas pelo plasmídeo pKM208. Nove clones recombinantes foram obtidos com resistência à canamicina e submetidos a cura do

plasmídeo pKM208 após dois repiques sucessivos a 42 °C. Os candidatos a mutantes foram submetidos à reações de PCR com os iniciadores *ecpR-F1/ecpE-R1*, gerando fragmentos de aproximadamente 1.500 pb (Figura 20 B), o que indica a incorporação do cassete de recombinação ao genoma. O fragmento obtido após reação de PCR com os iniciadores *ecpR-F1/ecpE-R1* utilizando a cepa BA1250 como molde de DNA é de aproximadamente 7,5 kb, o que dificulta a sua visualização na eletroforese em gel de agarose (Figura 20 B – canaleta 10).

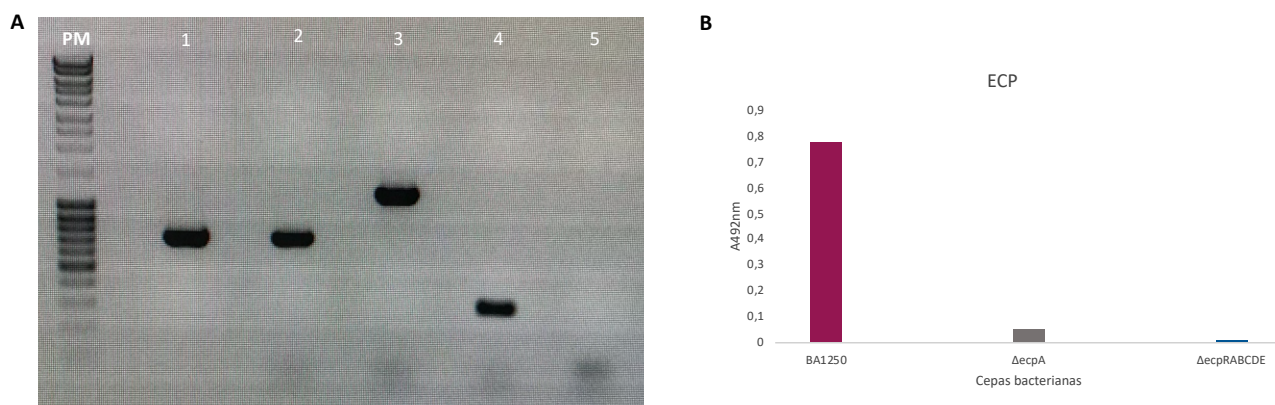
Figura 20 - Mutação em *ecpRABCDE* da cepa BA1250.



(A) Perfil eletroforético da reação de PCR para amplificação do cassete de resistência a canamicina. PM: Mass ruler (Thermo Fisher Scientific, USA), 1: cassete de resistência a canamicina. (B) Perfil eletroforético da reação de PCR para confirmação da deleção do *operon ecp*. PM: Mass ruler (Thermo Fisher Scientific, USA), 1: clone 1; 2: clone 2; 3: clone 3; 4: clone 4; 5: clone 5; 6: clone 6; 7: clone 7; 8: clone 8; 9: clone 9; 10: Cepa selvagem BA1250

Os pares de iniciadores *ecpA-F1/ecpA-R1* foram utilizados em reações de PCR com as cepas BA1250,  $\Delta ecpA:cat$ ,  $\Delta ecpA$  e  $\Delta ecpRABCDE$  (Figura 21 A). O iniciador *ecpA-F1* anela na porção intergênica de *ecpR* e *ecpA*, enquanto o iniciador *ecpA-R1* anela no início no gene *ecpB*. O amplicon esperado na reação com BA1250 era de 704 pb, enquanto  $\Delta ecpA:cat$  era de aproximadamente 1300 pb,  $\Delta ecpA$  de 200 pb e ausência de amplificação com  $\Delta ecpRABCDE$ . O tamanho dos produtos obtidos foram todos de acordo com o esperado (Figura 21 A). O mutante obtido também foi caracterizado quanto a produção de ECP por ensaio de ELISA, confirmando a deleção do *operon ecp* (Figura 21 B).

Figura 21 - Confirmação das deleções em *ecpA* e *ecpRABCDE*.



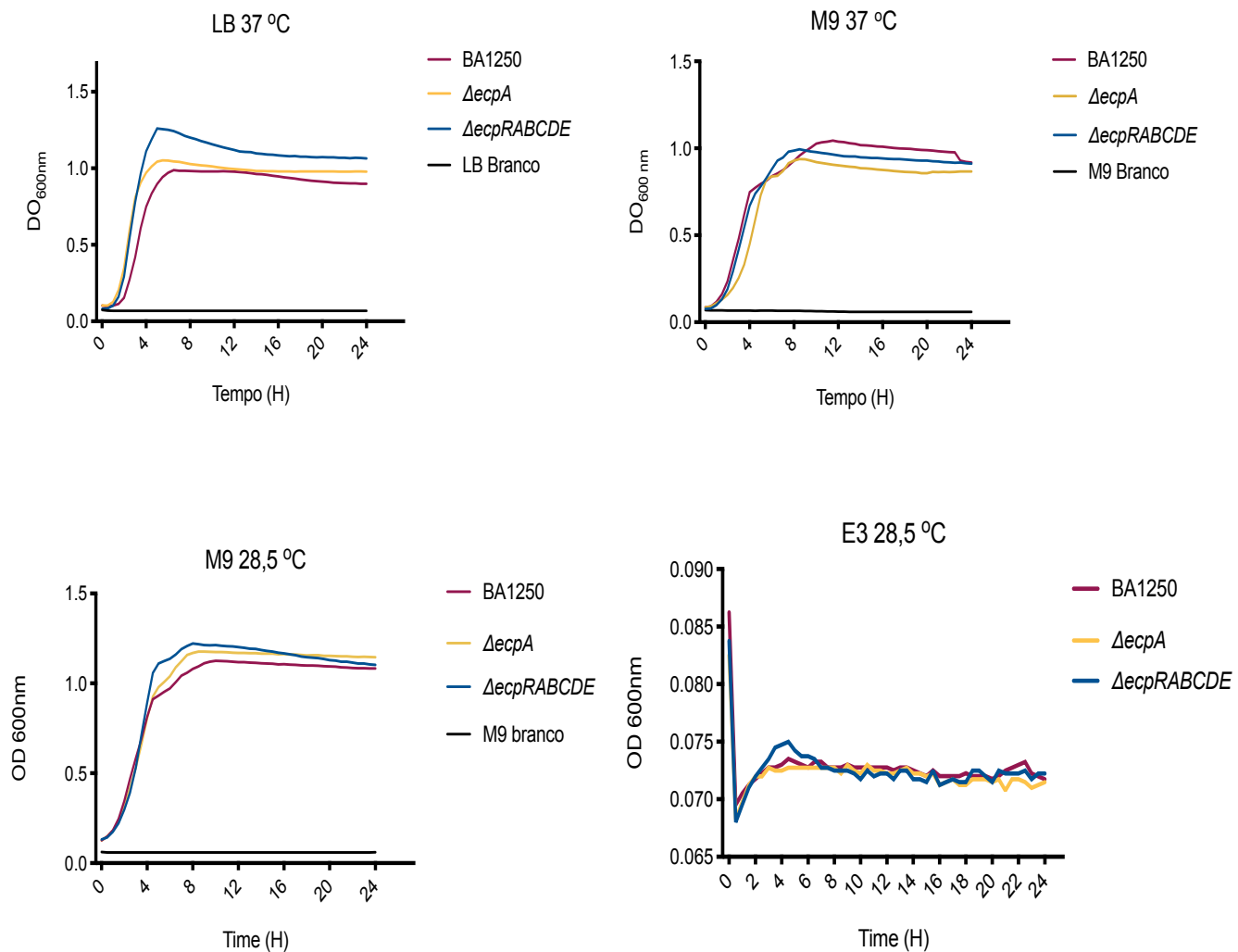
(A) Perfil eletroforético em gel de agarose (1%) para confirmação das duas deleções realizadas em *ecpA* e *ecpRABCDE*. (B) Análise da produção de ECP para confirmação da mutação de *ecpRABCDE* por ELISA indireto com soro de coelho anti-ECP.

#### 4.3.1.3. Curva de crescimento

As cepas geneticamente modificadas ( $\Delta ec p A$  e  $\Delta ec p R A B C D E$ ) foram avaliadas quanto ao perfil de crescimento em algumas condições de cultivo como LB e meio M9 a 37 °C e M9 e meio E3 a 28,5 °C por 24 h sob leve agitação, condições que seriam utilizadas em ensaios subsequentes. As três cepas analisadas apresentaram o mesmo perfil de crescimento, não havendo alteração desta característica nos mutantes (Figura 22).



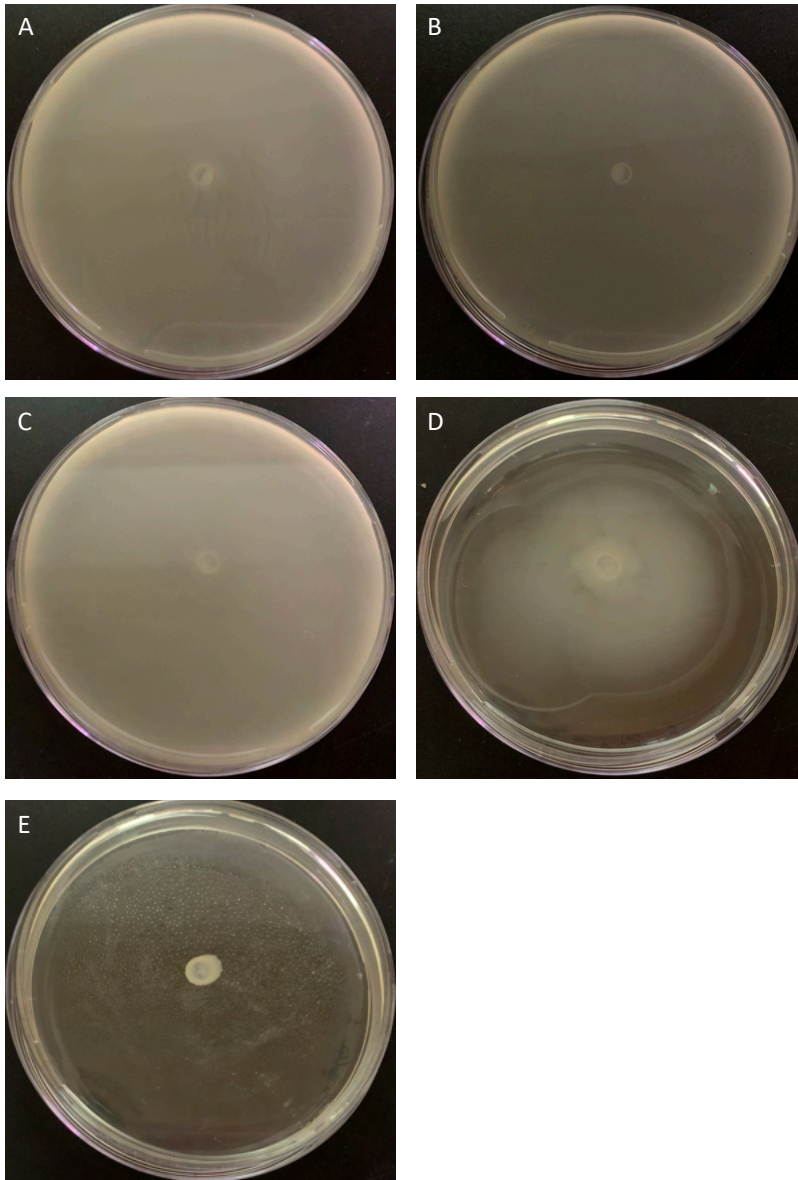
Figura 22 - Curva de crescimento das cepas BA1250,  $\Delta ecpA$  e  $\Delta ecpRABCDE$  cultivadas em LB e meio M9 a 37 °C e M9 e meio E3 a 28,5 °C por 24 h.



#### 4.3.1.4. Motilidade

Além da curva de crescimento, as duas cepas que sofreram manipulação genética ( $\Delta ecpA$  e  $\Delta ecpRABCDE$ ) também foram avaliadas quanto a motilidade, comparada com a cepa selvagem BA1250. Nos ensaios de motilidade todas as cepas apresentaram-se móveis (Figura 23), característica esta que, poderia influenciar na patogenicidade bacteriana.

Figura 23 - Motilidade das cepas BA1250,  $\Delta ecpA$  e  $\Delta ecpRABCDE$  em meio LB semissólido.



(A) BA1250; (B)  $\Delta ecpA$ ; (C)  $\Delta ecpRABCDE$ ; (D) EAEC 042 – Controle positivo; (E) *Shigella flexneri* – Controle negativo.

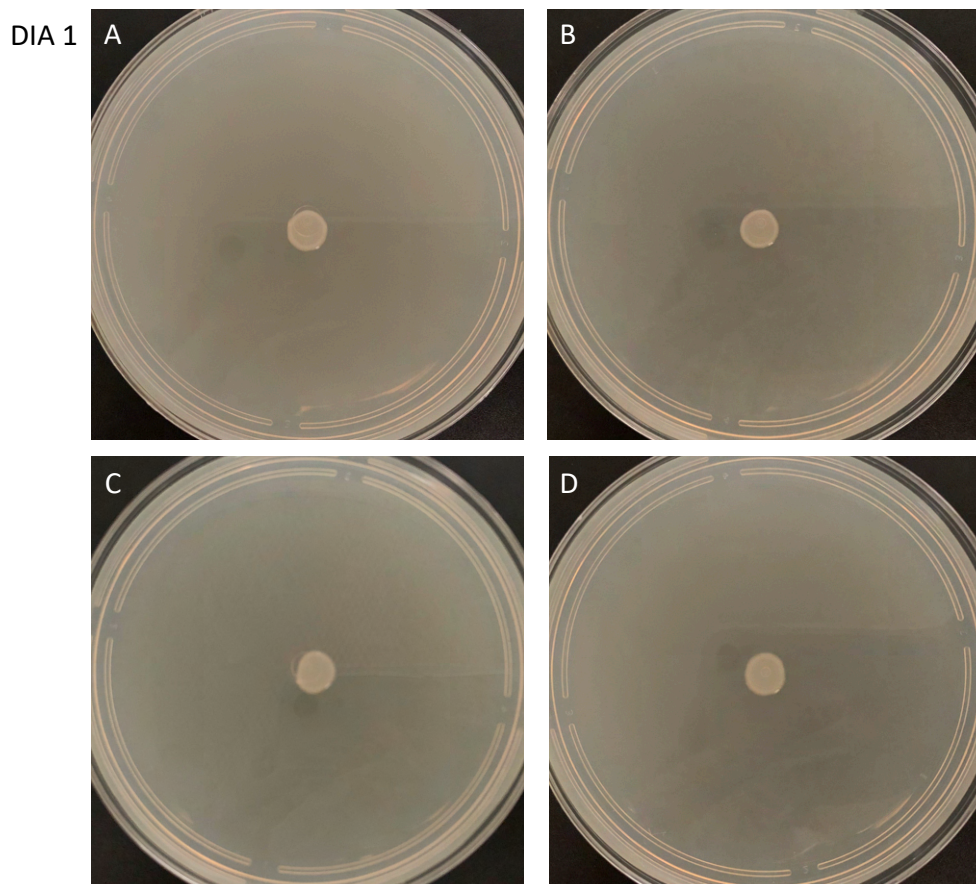
#### 4.3.1.5. Formação de biofilme

A formação de biofilme foi investigada utilizando-se três superfícies distintas, como o cultivo em placas de meio YESCA, placas de poliestireno e em lamínulas de vidro.

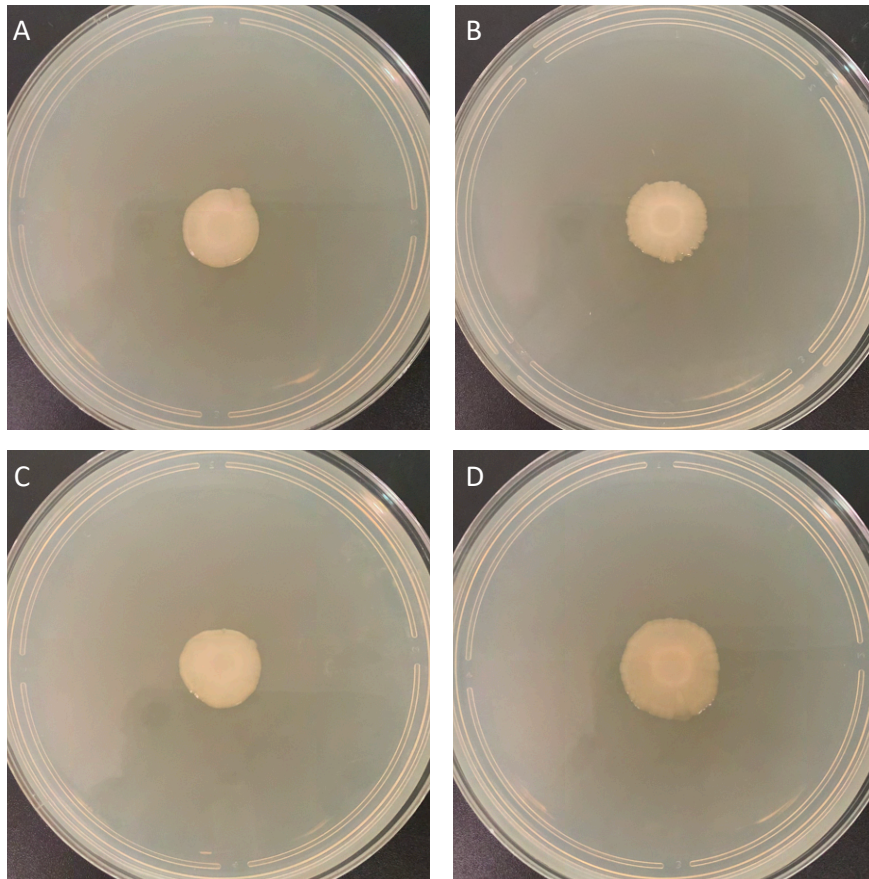
Para o ensaio de formação de biofilme em placas de meio YESCA, as cepas BA1250,  $\Delta ecpA$  e  $\Delta ecpRABCDE$  foram inicialmente cultivadas em meio LB a 37 °C, em seguida inoculadas nas placas de teste e incubadas a temperatura ambiente por 15 dias.

Um dia após o início do ensaio pode ser observado o crescimento bacteriano em formato circular bastante uniforme de todas as cepas testadas (Figura 24-1). Com 7 dias após o início do ensaio, as cepas BA1250 e  $\Delta ecpRABCDE$  continuaram a apresentar um crescimento circular com bordas bem delimitadas, sendo impossível de diferencia-las uma da outra. Já a cepa  $\Delta ecpA$  passou a apresentar um padrão de colônia com borda irregular, muito diferente da observada pela cepa selvagem e  $\Delta ecpRABCDE$  (Figura 24-7). No último dia de ensaio, as cepas BA1250 e  $\Delta ecpRABCDE$  permaneceram com o perfil de crescimento semelhante uma da outra, com as bordas da colônia praticamente definida como lisas. Por outro lado, a mutante  $\Delta ecpA$  apresentou um crescimento completamente irregular, com perda total da característica circular observada inicialmente e extremamente diferente das outras duas cepas testadas (Figura 24-15).

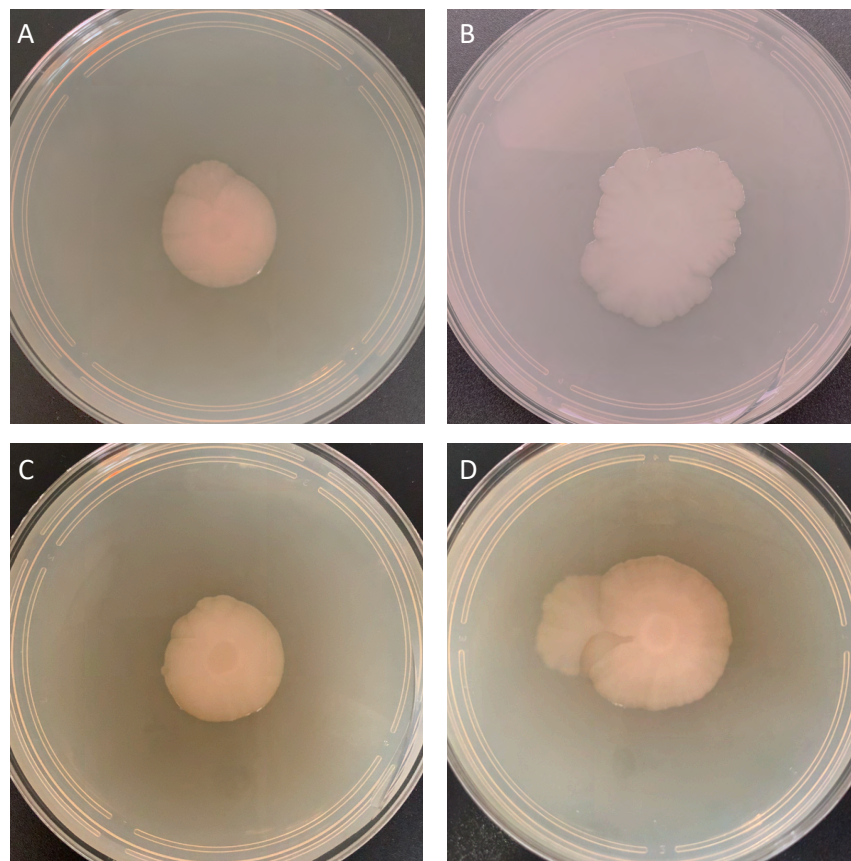
Figura 24 - Perfil de crescimento das cepas em placas de meio YESCA.



DIA 7



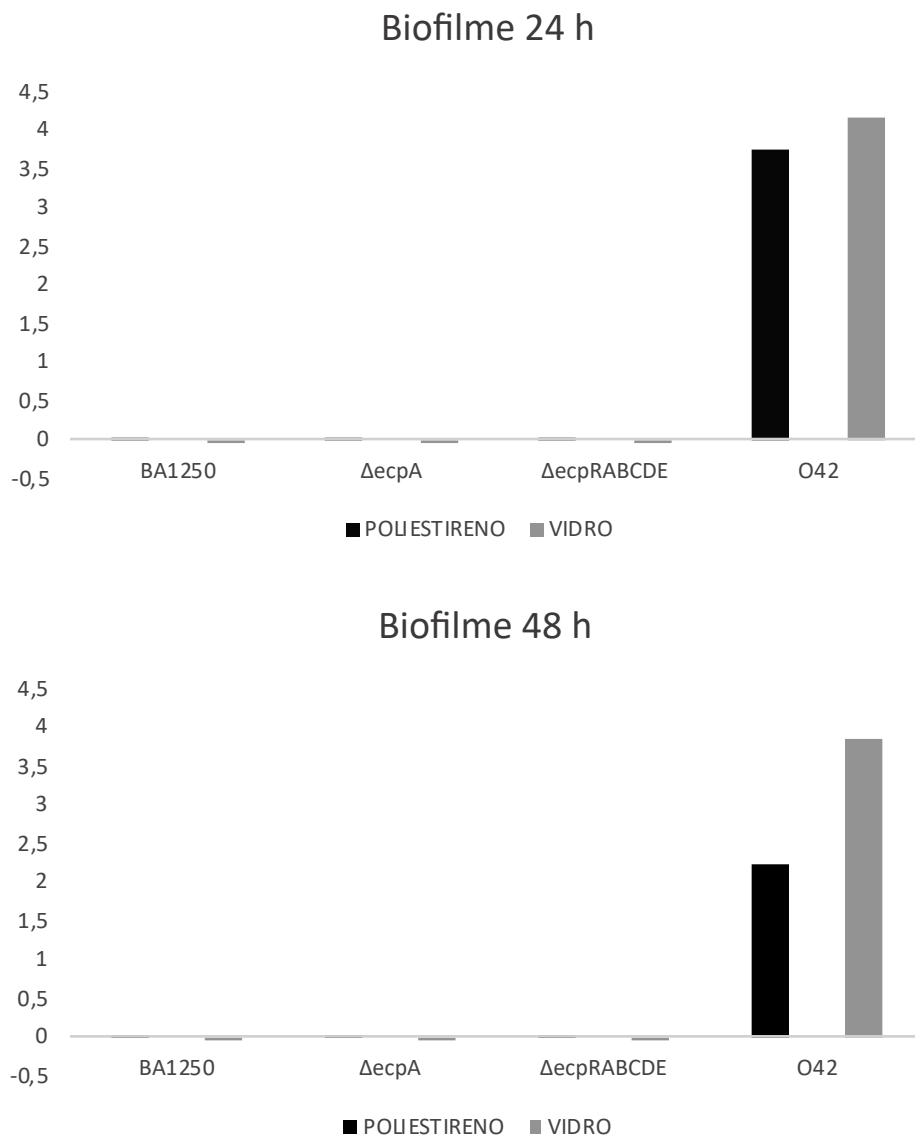
DIA 15



(A) BA1250, (B)  $\Delta ecpA$ , (C)  $\Delta ecpRABCDE$ , (D) 042 – controle positivo por 1, 7 e 15 dias a temperatura ambiente.

Os ensaios quantitativos de biofilme foram realizados em placas de poliestireno e sobre lamínulas de vidro com quantificação por incorporação de cristal violeta em períodos de 24 e 48 h com o cultivo realizado a 37 °C. Durante estes ensaios, foi observado que a cepa selvagem não é formadora de biofilme em nenhuma das superfícies testadas e que nenhuma das duas manipulações genéticas realizadas foram capazes de alterar esta característica, já que os mutantes também foram classificados como não formadores de biofilme (Figura 25).

Figura 25 - Formação de biofilme em placas de cultivo celular de poliestireno e sobre lamínulas de vidro após cultivo por 24 e 48 h a 37 °C.



Estas caracterizações fenotípicas demonstraram que ECP e as intervenções genéticas não alteraram o perfil de motilidade, níveis de crescimento e do padrão de

biofilme, pontos importantes da patogênese bacteriana. Entretanto, a deleção única do gene *ecpA* demonstrou significativa alteração quanto ao perfil da colônia bacteriana no cultivo em placas de meio YESCA.

#### 4.3.2. Modelo de infecção *in vivo* em zebrafish

O conjunto de dados obtidos até o momento demonstrou alteração de características fenotípicas após a deleção do gene *ecpA* na cepa BA1250. A etapa seguinte foi a investigação da influência desta fímbria na colonização intestinal por aEPEC, empregando o modelo *in vivo* com larvas de *zebrafish*.

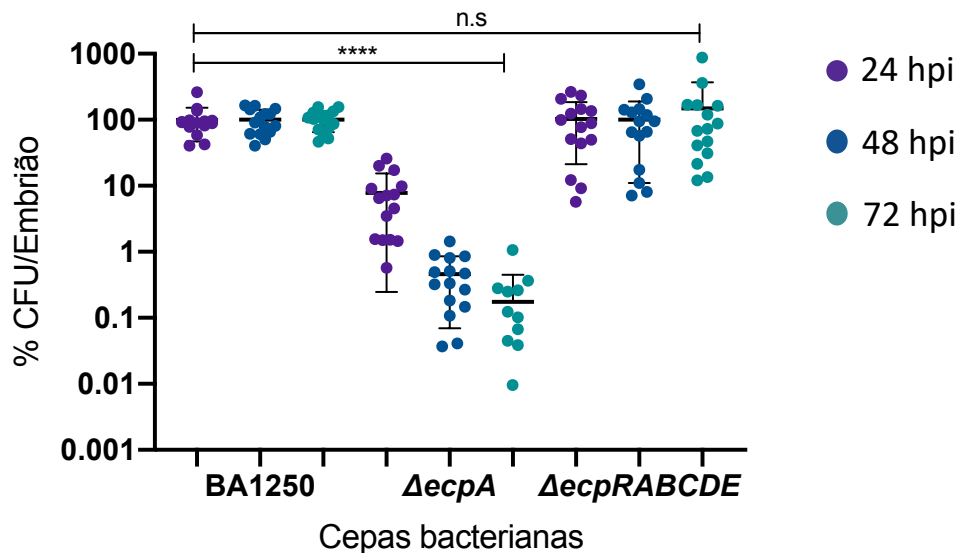
##### 4.3.2.1. Ensaio de colonização intestinal

Os animais utilizados nos ensaios de colonização intestinal possuíam 96 h pós-fertilização (hpf), momento em que as larvas já possuem boca e trato digestivo funcional, ou seja, poderiam ser infectadas por via oral. As infecções foram realizadas com aproximadamente  $2 \times 10^9$  UFC de BA1250,  $\Delta ecpA$  ou  $\Delta ecpRABCDE$  diluídos em meio próprio para cultivo das larvas (meio E3), seguido pela quantificação da carga bacteriana após 24, 48 e 72 h pós infecção (hpi). Como controle de infecção foi utilizada a quantificação da carga bacteriana de animais não infectados que eram mantidos em meio E3 estéril pelo mesmo período do ensaio e, como esperado não foi detectado crescimento de *E. coli* durante todo o período do experimento. Todas as quantificações foram realizadas em placas de MacConkey a fim de se utilizar um meio seletivo para *E. coli*.

As larvas infectadas com a cepa selvagem foram consistentemente colonizadas com alta carga bacteriana, entre  $1 \times 10^4$  e  $5 \times 10^5$ , durante os três pontos de infecção analisados (Figura 26). O mutante  $\Delta ecpA$  é extremamente deficiente na capacidade de colonização intestinal. Já nas primeiras 24 hpi a carga bacteriana recuperada foi menor do que 10% da carga recuperada nos ensaios com BA1250, sendo a infecção praticamente eliminada após 72 hpi. Surpreendentemente, não houve diferença estatística entre o número de UFC recuperados após infecção com o mutante  $\Delta ecpRABCDE$  quando comparado com a cepa selvagem. Este mutante foi capaz de colonizar as larvas consistentemente durante todo o período do ensaio

(Figura 26). Durante todo o experimento os animais foram avaliados quanto a morte e sinais clínicos de doença, mas não apresentaram resultados significantes.

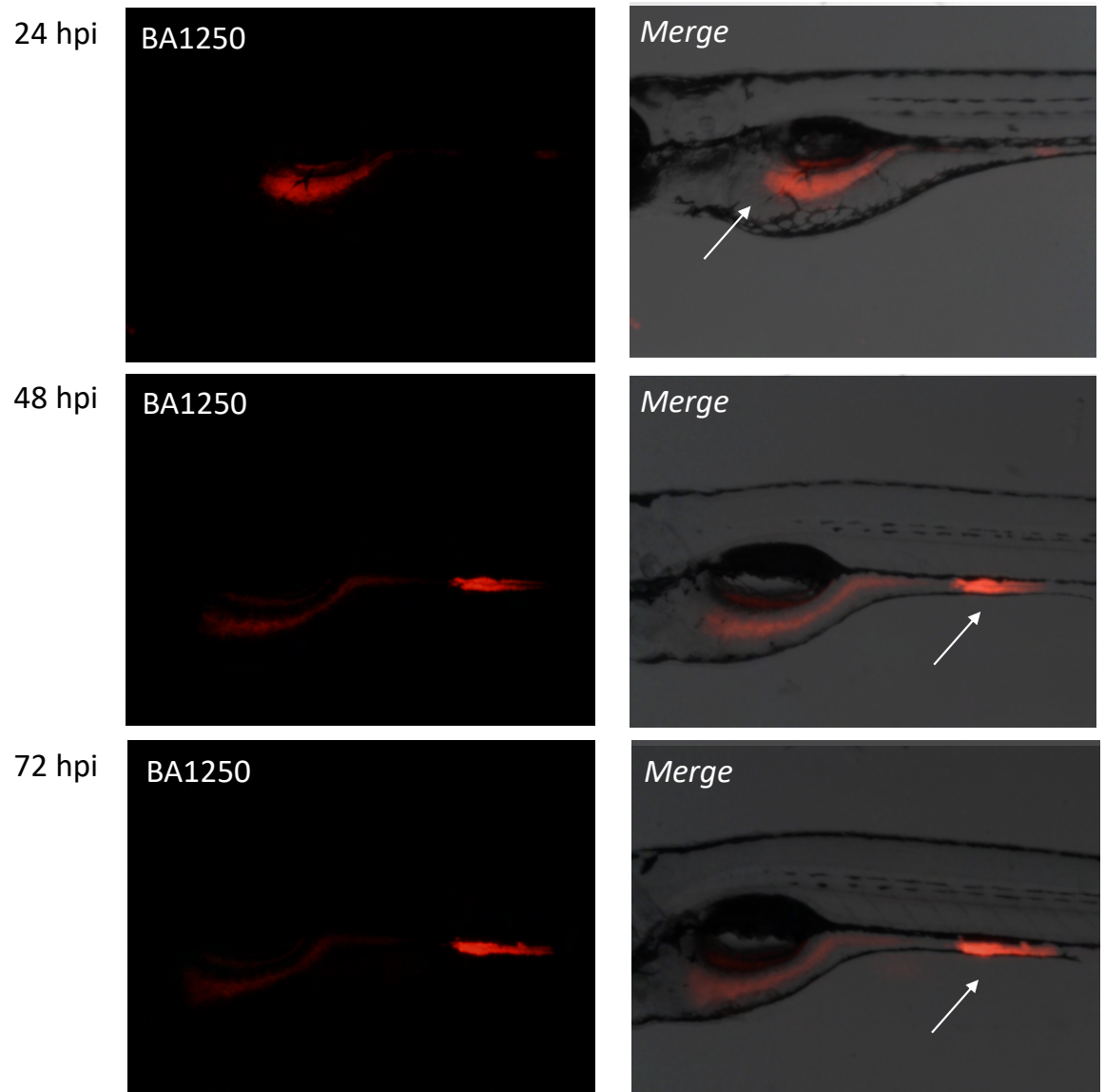
Figura 26 - Colonização intestinal de larvas de *zebrafish* com 96 hpf por BA1250,  $\Delta ecpA$ ,  $\Delta ecpRABCDE$ .



A fim de avaliar o sítio de infecção na colonização das larvas de *zebrafish* por via oral, as três cepas foram transformadas com o plasmídeo *pmCherry*, que confere coloração vermelha para as bactérias. O fato das larvas de *zebrafish* serem transparentes durante todo o desenvolvimento permitiu acompanhar o caminho percorrido por todo o curso da infecção bacteriana.

Após infecção das larvas com a cepa selvagem, foi possível observar uma colonização bastante específica, já que a adesão bacteriana ocorreu apenas na região intestinal. Nas primeiras 24 hpi houve uma maior concentração bacteriana na porção do bulbo intestinal, o que não se manteve após 48 e 72 hpi, pois houve uma maior concentração na porção posterior do intestino (Figura 27).

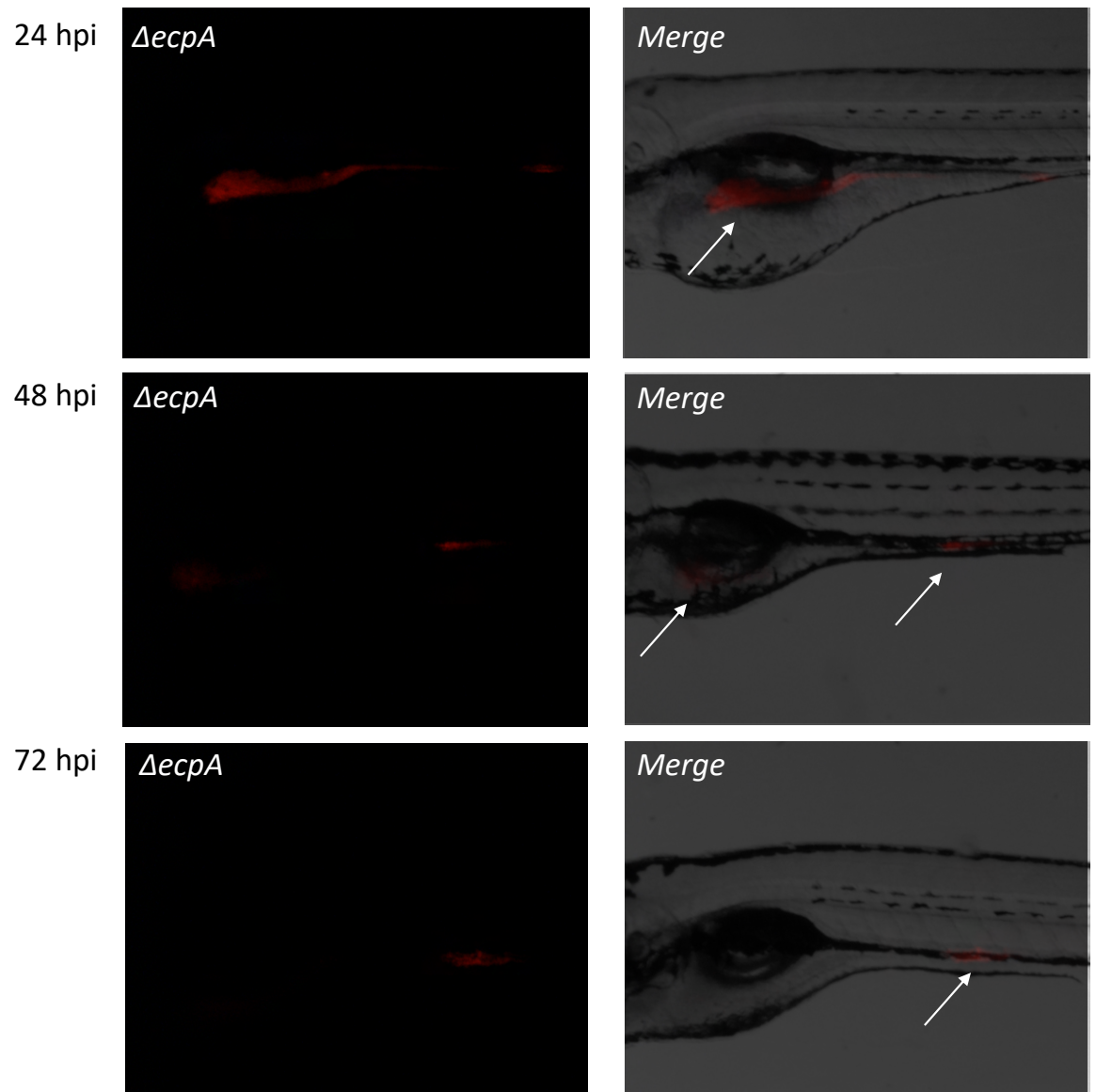
Figura 27 - Colonização intestinal de larvas de *zebrafish* com 96 hpf por BA1250::mCherry.



Após 24 hpi das larvas pelo mutante  $\Delta ecpA$  foi possível observar que a colonização detectada não ocorre no bulbo intestinal, sítio colonizado pela cepa selvagem no mesmo período. Diferentemente, a adesão observada parece ocorrer no pâncreas da larva de *zebrafish* (Figura 28). Já com 48 hpi há uma ligeira adesão na porção do bulbo intestinal e também na porção posterior do intestino, por onde é praticamente eliminada com 72 hpi. Estes resultados corroboram aos obtidos nos ensaios quantitativos de colonização.

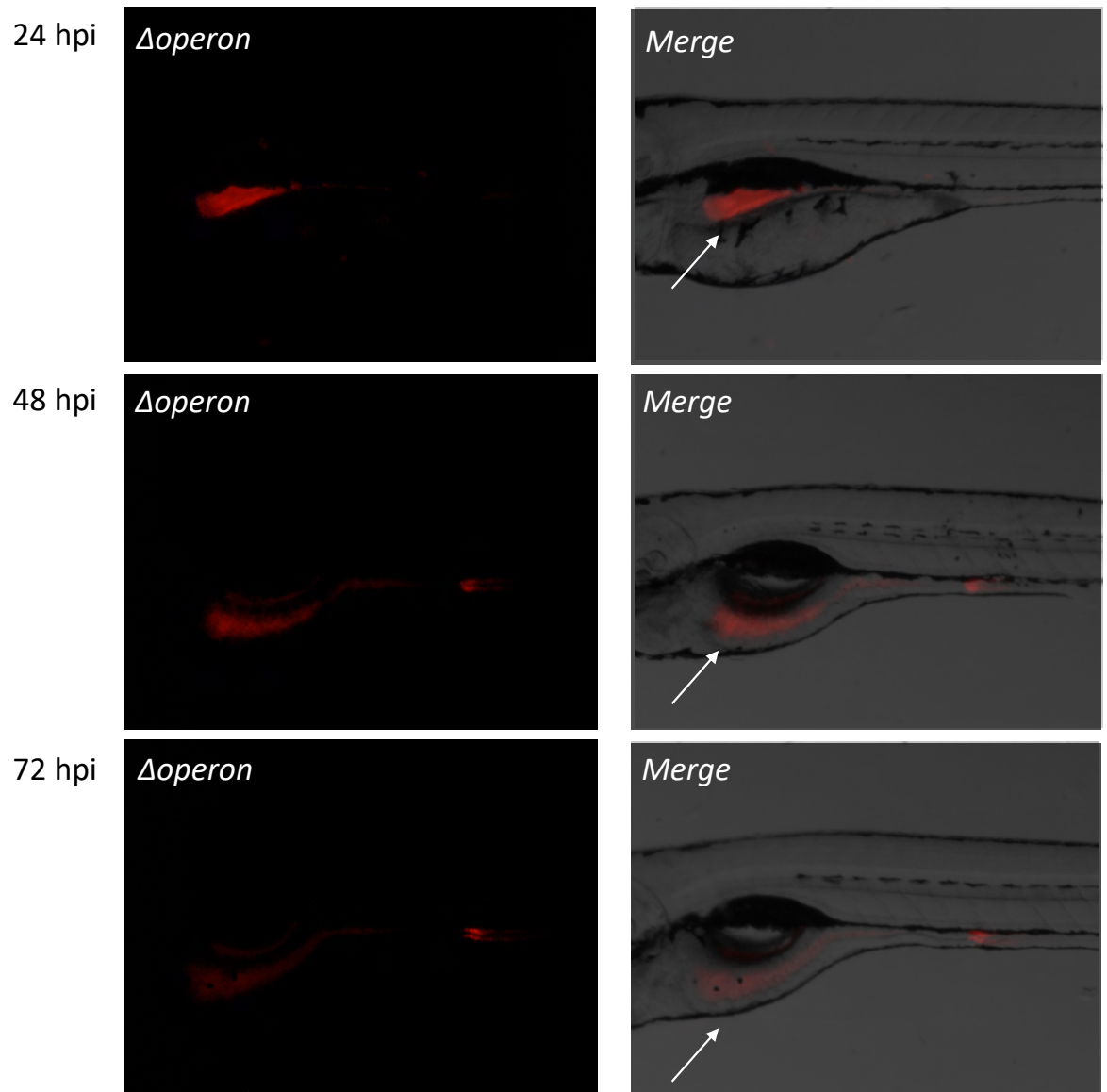


Figura 28 - Colonização intestinal de larvas de *zebrafish* com 96 hpf por  $\Delta ecpA::mCherry$ .



Novamente de maneira surpreendente, a colonização pelo mutante  $\Delta ecpRABCDE$  com 24 hpi foi detectada aparentemente no mesmo sítio de adesão do mutante  $\Delta ecpA$ . Porém, com 48 e 72 hpi a maior parte da adesão bacteriana foi detectada na porção do bulbo intestinal, com pequena colonização da porção posterior do intestino da larva (Figura 29). Estes resultados demonstram que apesar de não haver diferença estatística da carga bacteriana recuperada após infecção pelas cepas selvagem e mutante  $\Delta ecpRABCDE$ , o sítio de colonização não é o mesmo.

Figura 29 - Colonização intestinal de larvas de *zebrafish* com 96 hpf por  $\Delta ecpRABCDE::mCherry$ .



#### 4.3.2.2. Ensaio de infecção cavidade pericárdica

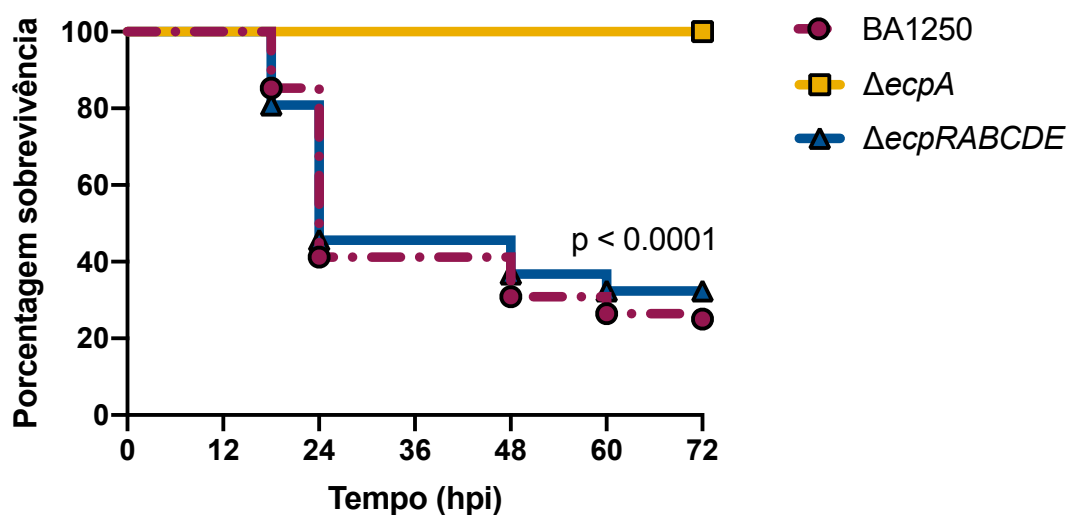
Os ensaios anteriores demonstraram uma significativa importância de EcpA para a colonização intestinal e a evidente capacidade de adesão do mutante  $\Delta ecpRABCDE$ , que ocorre de maneira similar à cepa selvagem. Com o intuito de investigar se este perfil de adesão ocorria apenas no sítio intestinal, foram realizados ensaios de infecção local na cavidade pericárdica.

Para estes ensaios foram utilizadas larvas com 48 hpf. Com 24 hpf os embriões tiveram o córion retirado pela adição da enzima pronase e liberação das larvas. As

microinjeções com as cepas BA1250,  $\Delta ecpA$  e  $\Delta ecpRABCDE$  foram realizadas diretamente na cavidade pericárdica com  $10^3$  UFC/larva. Os animais foram monitorados para o aparecimento de sinais clínicos de doença e sobrevivência.

Nas infecções realizadas com as cepas selvagem e  $\Delta ecpRABCDE$  apenas 25 e 32% das larvas sobreviveram, respectivamente. Surpreendentemente, todas as larvas sobreviveram após infecções realizadas com o mutante  $\Delta ecpA$  (Figura 30). Estes resultados sugerem fortemente que na ausência de EcpA a cepa de aEPEC não é capaz de colonizar o sítio da cavidade pericárdica e, portanto, é completamente eliminada do animal antes de causar quaisquer danos à saúde do mesmo.

Figura 30 - Infecção da cavidade pericárdica de larvas de *zebrafish* com 48 hpf por BA1250,  $\Delta ecpA$ ,  $\Delta ecpRABCDE$ .



#### 4.3.2.3. Ensaio de infecção sistêmica

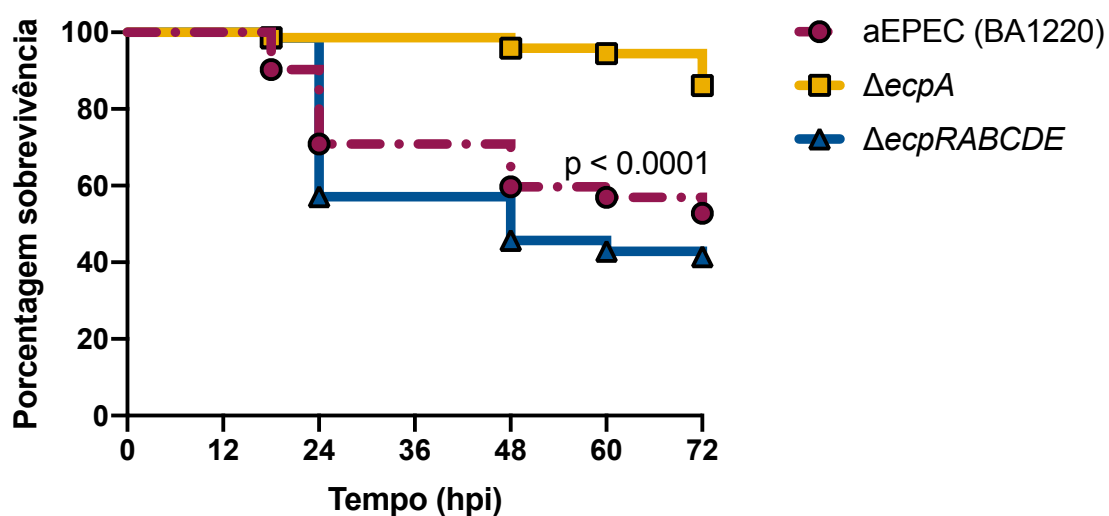
Em conjunto, os dados obtidos por colonização/infecção local demonstraram a significativa diferença entre a capacidade de adesão do mutante  $\Delta ecpA$  e a também significativa similaridade entre a adesão realizada pelo mutante  $\Delta ecpRABCDE$ . Com o intuito de investigar se este perfil se dava apenas em colonizações locais, foram realizados ensaios de infecção sistêmica.

Para tanto, larvas com 48 hpf foram utilizadas, o córion foi retirado pela adição da enzima pronase e liberação das larvas após 24 hpf. As microinjeções foram realizadas com as cepas BA1250,  $\Delta ecpA$  e  $\Delta ecpRABCDE$  diretamente na no vale de

circulação com  $10^3$  UFC/larva. Os animais foram monitorados quanto ao aparecimento de sinais clínicos de doença e sobrevivência.

Nos ensaios de infecção sistêmica foi observado um perfil similar de sobrevivência das larvas infectadas quanto ao detectado durante as infecções da cavidade pericárdica. Neste ensaio, 86% dos embriões infectados com o mutante  $\Delta ecpA$  sobreviveram, enquanto 52 e 41% das larvas infectadas com a cepa selvagem e  $\Delta ecpRABCDE$  sobreviveram, respectivamente (Figura 31). Vale ressaltar que, assim como nas infecções da cavidade pericárdica, apesar da diferença de sobrevivência das larvas infectadas com BA1250 e  $\Delta ecpRABCDE$ , não há significância estatística entre elas.

Figura 31 - Infecção sistêmica de larvas de *zebrafish* com 48 hpf por BA1250,  $\Delta ecpA$ ,  $\Delta ecpRABCDE$ .



#### 4.4. Análise da produção de adesinas em diferentes condições de cultivo

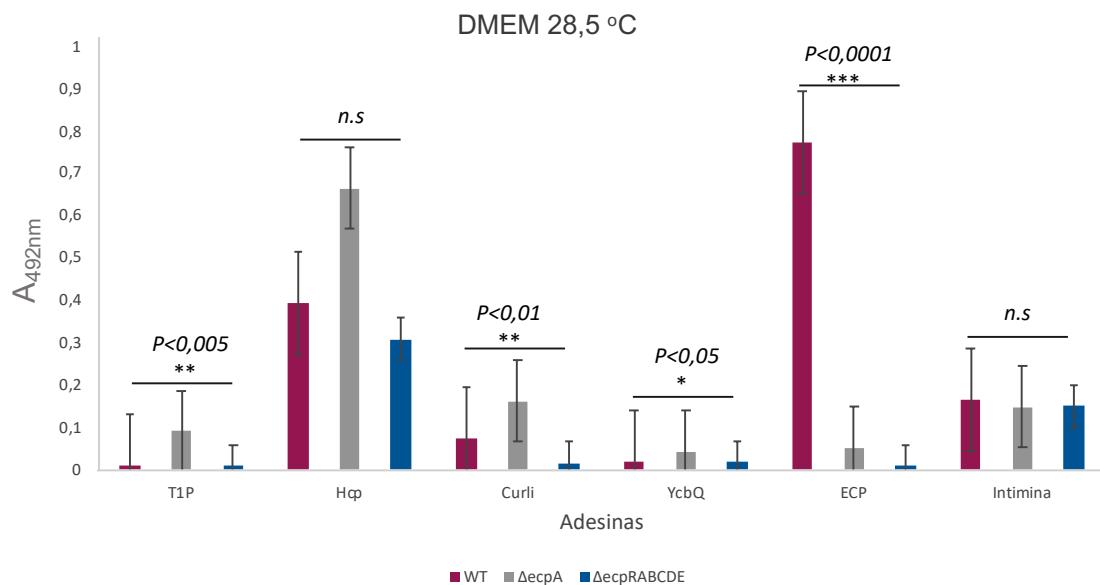
Os resultados obtidos sugerem dois importantes pontos, o primeiro que EcpA é fundamental na capacidade de adesão por cepas de aEPEC e o segundo é que na ausência de todos os genes que compõem o *operon ecp*, provavelmente outra adesina compense esta deleção e restabeleça a capacidade de colonização.

Para tentar identificar se alguma adesina passa a ter a sua produção aumentada na cepa mutante  $\Delta ecpRABCDE$  foram realizados ensaios de ELISA com o cultivo bacteriano realizado em condições que se assemelhem às encontradas nos

ensaios de colonização e infecção. Nestes ensaios foram utilizados anticorpos específicos para a detecção das seguintes adesinas: EspA, Fímbria do tipo 1 (T1P), Fímbria hemorrágica de *coli* (Hcp), Curli, Fímbria de ligação a laminina (ELF – YcbQ), intimina e ECP como controle da reação.

A primeira condição foi o cultivo das cepas bacterianas em meio DMEM a 28,5 °C. Na Figura 32 é possível observar que nesta condição de cultivo nenhuma das adesinas testadas têm uma maior produção pela cepa  $\Delta ecpRABCDE$  comparada com as outras duas cepas. Por outro lado, as adesinas T1P, Curli e YcbQ apresentam-se em um nível mais alto de produção pelo mutante  $\Delta ecpA$ .

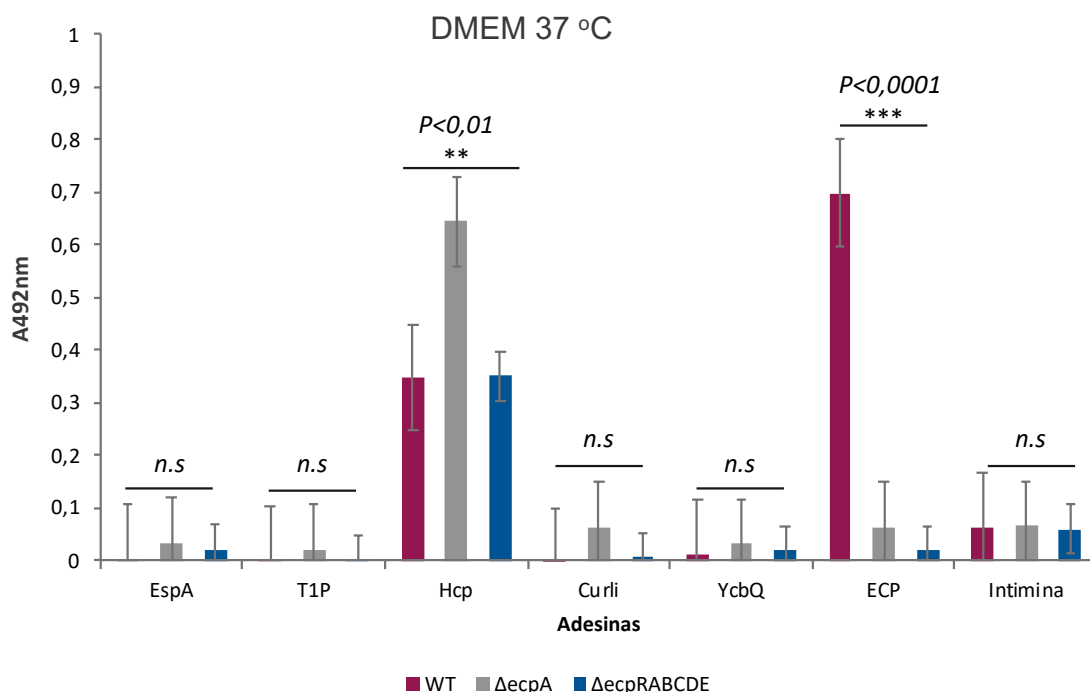
Figura 32 - Análise da produção de EspA, T1P, Hcp, Curli, YcbQ, intimina e ECP por ELISA indireto pelas cepas BA1250,  $\Delta ecpA$  e  $\Delta ecpRABCDE$  cultivadas em DMEM a 28,5 °C.



O ELISA indireto foi repetido após cultivo bacteriano em DMEM a 37 °C com o intuito de identificar se a temperatura poderia alterar o perfil de produção de adesinas pelas três cepas.

Nestes ensaios observamos que a Hcp foi mais produzida pelo  $\Delta ecpA$  quando comparado com a selvagem e mutante  $\Delta ecpRABCDE$  (Figura 33). Todas as outras adesinas testadas foram produzidas em baixo nível pelas três cepas e não houve diferença estatística entre elas.

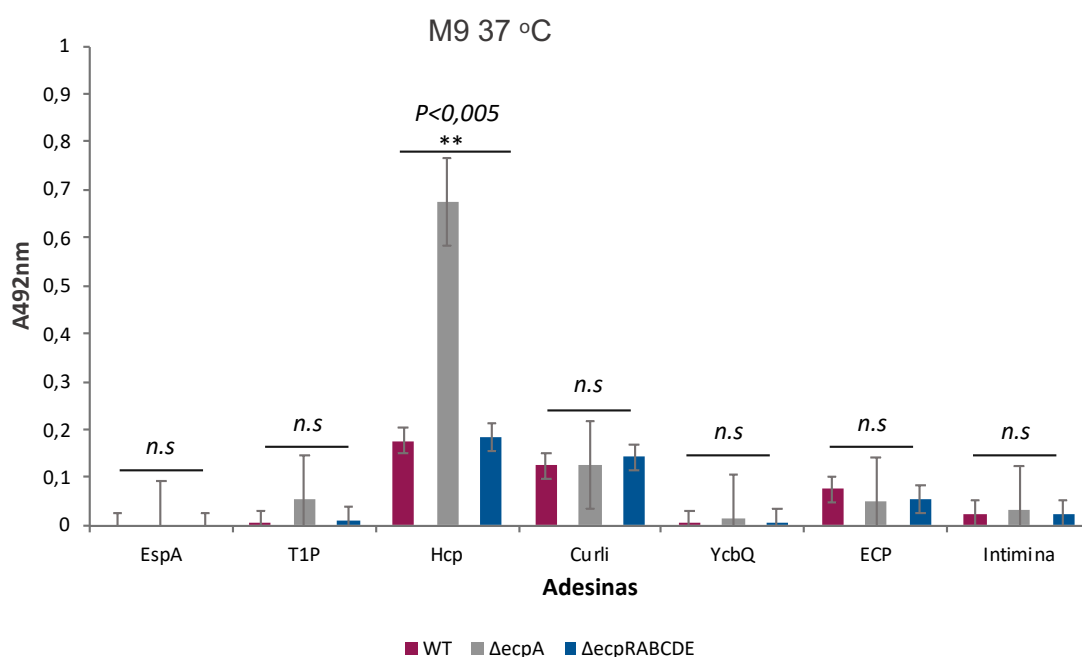
Figura 33 - Análise da produção de EspA, T1P, Hcp, Curli, YcbQ, intimina e ECP por ELISA indireto pelas cepas BA1250,  $\Delta$ ecpA e  $\Delta$ ecpRABCDE cultivadas em DMEM a 37 °C.



A última condição testada para a detecção de adesinas foi com o cultivo realizado em meio M9 a 37 °C. Esta condição foi selecionada por ser igual ao de cultivo bacteriano antes das infecções com larvas de *zebrafish*, assim, o intuito era avaliar se haveria uma maior produção de uma determinada adesina previamente do contato com o animal.

Porém, com o cultivo bacteriano realizado no meio M9 houve detecção apenas de Hcp, com o mesmo perfil de produção do cultivo em DMEM a 37 °C (Figura 34). Por ser um meio mínimo era realmente esperada uma baixa produção das adesinas por todas as cepas, inclusive de ECP.

Figura 34 - Análise da produção de EspA, T1P, Hcp, Curli, YcbQ, intimina e ECP por ELISA indireto pelas cepas BA1250,  $\Delta ecpA$  e  $\Delta ecpRABCDE$  cultivadas em M9 a 37 °C.



#### 4.5. Determinação *in silico* da presença de adesinas na cepa BA1250

Como não foi possível identificar qual adesina tem sua produção aumentada após deleção de todos os genes do *operon ecp* pela limitação da disponibilidade de anticorpos em nosso laboratório, passamos a realizar análises *in silico* utilizando o sequenciamento completo do genoma de BA1250.

Para isto, foi utilizado o software SPAAN (SACHDEVA et al., 2005), que utiliza a inteligência artificial para realizar predições, sobre quais estruturas possuem características de adesinas.

Com a aplicação do programa na sequência de aminoácidos obtidos pelo sequenciamento da cepa selvagem foram identificadas 4.547 estruturas com características relacionadas à adesinas (Tabela 7). Alguns parâmetros devem ser levados em conta, como o valor de  $P_{ad}$ , que está relacionado com uma maior ou menor probabilidade daquela predição estar correta, onde valores de  $P_{ad} > 0,51$  são considerados bons. Restringindo a análise para estruturas com valores de  $P_{ad} > 0,51$ , são identificadas 1045 estruturas.

Para limitar ainda mais a busca pela possível adesina alvo da análise, o valor de  $P_{ad}$  utilizado foi aumentado para  $> 0,70$ , resultando em 303 estruturas identificadas. Das 303 estruturas 91 estavam anotadas como “*Hypothetical protein*”, o que não traria

respostas conclusivas, visto que são proteínas ainda não descritas. Retirando estas proteínas hipotéticas da busca, das 212 sequências restantes 31 possuíam em sua anotação a palavra “*Fimbrial*”, o que demonstra a relação destas proteínas com adesinas fimbriais. As proteínas encontradas com estas características são subunidades de diversas fímbrias, sendo que diversas já analisadas nos ensaios de ELISA, restando então 24 proteínas “não testadas” (Tabela 7).

Tabela 7 - Proteínas com características de adesinas identificados no genoma de BA1250 pelo programa SPAAN.

Característica	$P_{ad}$	Número
Proteínas/Adesinas total	0,21 – 0,96	4.547
Adesinas	>0,51	1.045
Adesinas	>0,70	303
“Hypothetical protein”	>0,70	91
“Fimbrial”	>0,70	31
“Fimbrial” não testados	>0,70	24

Realizando um estudo mais aprofundado destas fímbrias é possível observar que todas possuem valores de  $P_{ad} > 0,70$ , o que demonstra a confiabilidade da análise *in silico*.

As 24 proteínas selecionadas são subunidades de 12 fímbrias sendo elas: LpfA, Pap, CFA/I, S, Yfc, Yad, Yeh, Ybg, K88, Prs, Sfm e Ycb (Tabela 8). Deste grupo de fímbrias destacam-se LpfA e Pap, amplamente estudadas pela relação com adesão ao hospedeiro.



Tabela 8 - Adesinas fimbriais identificados no genoma de BA1250 pelo programa SPAAN ainda não estudadas neste trabalho.

Fímbria	P <sub>ad</sub>
>DKEMMGOL_02627 putative major fimbrial subunit LpfA	0,96
>DKEMMGOL_03579 S-fimbrial protein subunit SfaH	0,94
>DKEMMGOL_03581 S-fimbrial protein subunit SfaG	0,86
>DKEMMGOL_00703 putative fimbrial-like protein YfcP	0,93
>DKEMMGOL_00704 putative fimbrial-like protein YfcQ	0,86
>DKEMMGOL_00708 putative fimbrial-like protein YfcV	0,78
>DKEMMGOL_00705 putative fimbrial-like protein YfcR	0,75
>DKEMMGOL_01394 putative fimbrial-like protein YadL	0,91
>DKEMMGOL_01395 putative fimbrial-like protein YadM	0,89
>DKEMMGOL_01398 putative fimbrial-like protein YadN	0,89
>DKEMMGOL_01392 putative fimbrial-like protein YadC	0,82
>DKEMMGOL_01393 putative fimbrial-like protein YadK	0,79
>DKEMMGOL_03313 Pap fimbrial major pilin protein	0,88
>DKEMMGOL_03307 Fimbrial protein PapE	0,79
>DKEMMGOL_03308 Fimbrial adapter PapK	0,76
>DKEMMGOL_03765 putative fimbrial-like protein YehA	0,87
>DKEMMGOL_04613 K88 fimbrial protein AC	0,87
>DKEMMGOL_01930 K88 fimbrial protein AD	0,77
>DKEMMGOL_01916 putative fimbrial-like protein YbgD	0,86
>DKEMMGOL_03306 Minor fimbrial protein PrsF	0,77
>DKEMMGOL_02112 CFA/I fimbrial subunit B	0,77
>DKEMMGOL_02633 putative fimbrial-like protein SfmH	0,77
>DKEMMGOL_02631 putative fimbrial-like protein YcbV	0,70

A análise *in silico* demonstrou que existem algumas opções importantes a serem estudadas para a identificação da possível adesina alvo.

Em conjunto, estes dados evidenciam a grande importância de EcpA na patogênese de aEPEC e levantam duas hipóteses, sendo a primeira da produção aumentada de uma adesina, ainda não identificada, na ausência completa dos genes que compõem o *operon ecp* e a outra de que este *operon* quando expresso possa ter papel inibitório sobre esta mesma adesina.

## 5. DISCUSSÃO

Diversos estudos indicam que na última década casos de infecções por aEPEC passaram a ser mais prevalentes do que por tEPEC em países em desenvolvimento e desenvolvidos (HERNANDES et al., 2009; HU; TORRES, 2015, OCHOA et al., 2008; SAKKEJHA et al., 2013; STAPLES et al., 2013). Os motivos das infecções emergentes por este patógeno ainda não foram completamente elucidados o que instiga a identificação de fatores de virulência determinantes para esse quadro clínico e melhor entendimento do mecanismo de adesão destes patógenos às células do hospedeiro.

Em bactérias patogênicas, as fímbrias frequentemente são fatores de adesão cruciais, que medeiam a ligação às células alvo, evasão do sistema imune do hospedeiro e formação de biofilme (CUSUMANO; HULTGREN, 2009; DURAND et al., 2009). Por este motivo, são consideradas importantes fatores de virulência, necessitando um melhor entendimento de suas estruturas e detalhamento de seu papel específico na colonização por cada patótipo.

Por possuir grande heterogeneidade, ainda não foi descrito nenhum marcador de adesão característico de aEPEC que seja de crucial importância para a sua patogênese. Neste estudo foi investigada a frequência, influência no fenótipo e o papel da fímbria ECP na patogenicidade de aEPEC.

Em diversos estudos o gene *ecpA* é descrito como altamente prevalente em cepas de DEC, presente em 96% em EAEC (AVELINO et al., 2010), 80% em ETEC (BLACKBURN et al., 2009) e 86 e 100% em estudos realizados com aEPEC (HERNANDES et al., 2011; MUNHOZ et al., 2018, respectivamente). Apesar da alta prevalência do gene *ecpA*, estudos ainda não haviam sido realizados a fim de identificar a totalidade dos genes que compõem o *operon ecp*. Nossos resultados demonstraram que este *operon* é bastante conservado em aEPEC com o padrão de adesão ALL, visto que foi identificado em praticamente 100% das cepas selecionadas, sendo a única exceção o gene *ecpD*, detectado em 96%. Hernandez e colaboradores (2011) observaram grande variação genética em alguns genes do *operon ecp*, visto que a detecção de *ecpA* utilizando-se iniciadores de PCR internos para *ecpA* foi em 76% das cepas estudadas, enquanto a utilização de iniciadores de PCR para *ecpRAB* resultou em apenas 46% de cepas positivas. A divergência entre os resultados pode estar relacionada com uma maior conservação deste *operon* em cepas de aEPEC que

apresentem o padrão ALL, já que no estudo realizado por Hernandez e colaboradores as cepas foram selecionadas randomicamente independente do padrão de adesão entre casos de diarreia e casos controles.

Apesar da alta conservação dos genes do *operon ecp*, os ensaios de imunofluorescência realizados neste trabalho para detecção de ECP demonstraram que 55% das cepas produzem a fímbria quando cultivadas em DMEM pré-condicionado a 37 °C. A ausência de produção de ECP por algumas aEPEC pode ser atribuída à presença de genes truncados e/ou à mecanismos regulatórios distintos de cada cepa à resposta específica a sinais ambientais. Além disso, não há um consenso na literatura quanto a condição ideal para a produção de ECP, já que diversos trabalhos demonstram a presença desta fímbria em condições diferentes para cada patótipo. Cepas de NMEC produzem ECP apenas após cultivo em LB a 20 °C (POUTTU et al., 2001), condição não compartilhada pelos grupos de DEC. A condição que favorece a produção de ECP por EHEC é o cultivo em DMEM a 26 °C na presença de 5% de CO<sub>2</sub>, onde 86% das cepas estudadas eram ECP+ (RENDÓN et al., 2007). Já para ETEC o cultivo em meio *pleuropneumonia-like organism* (PPLO) a 37 °C favorece a produção (BLACKBURN et al., 2009) e para aEPEC é o cultivo em DMEM na presença de sinais celulares a 37 °C (HERNANDES et al., 2011). Assim como demonstrado por Stacy e colaboradores (2014) em cepas de *E. coli* patogênica em aves (APEC), nossos dados indicam que não há relação entre o sorogrupo e a produção de ECP em cepas de aEPEC, visto que as cepas ECP+ pertencem aos sorogrupos O4, O34, O51, O55, O26 O111, O131 e ONT.

Para uma análise mais aprofundada da função de ECP na patogenicidade de aEPEC, a cepa BA1250 foi selecionada para a continuação do trabalho, sendo a maior produção da fímbria nos ensaios de imunofluorescência o critério de seleção utilizado. Com o resultado do sequenciamento foi possível realizar duas mutações distintas em BA1250, a primeira com a deleção apenas de gene *ecpA*, onde todos os outros genes do *operon* permaneceram intactos, e a outra com a deleção de todos os genes que compõem o *operon*, ou seja, dos genes *ecpRABCDE*. A deleção de *ecpA* já foi demonstrada ser de grande importância para adesão de cepas de UPEC em células epiteliais HeLa e HTB-4, visto que mutantes neste gene foram aproximadamente 60% menos aderentes (SALDAÑA et al., 2014). Além disso, a deficiência na capacidade

de adesão às células epiteliais também foi demonstrada em mutantes de *ecpA* de EHEC, EAEC e tEPEC (AVELINO et al., 2010; RENDÓN et al., 2007; SALDAÑA et al., 2009b). No entanto, para nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a realizar deleções dos genes *ecpA* e *ecpRABCDE* em cepas de aEPEC.

A deleção de *ecpRABCDE* foi realizada com o intuito de analisar alterações fenotípicas decorrentes da completa ausência de sinalização do *operon ecp*, visto a descrição da capacidade de polimerização de EcpD independente de EcpA em cepas de tEPEC (GARNETT et al., 2012). Apesar dos esforços, não foi possível a complementação do mutante em *ecpA*. A complementação dos mutantes em *ecpA* de estudos anteriores foi alcançada após clonagem do gene da cepa selvagem em vetores distintos sob controle do promotor do gene de resistência à diferentes antibióticos (AVELINO et al., 2010; RENDÓN et al., 2007; STACY et al., 2014). A clonagem do gene foi realizada com sucesso no vetor pACYC184, mas a produção da fímbria não foi reestabelecida. Os motivos para a ausência de detecção da fímbria por ensaios de ELISA e imunofluorescência podem ser deficiência na transcrição/tradução das subunidades ou até mesmo deficiência na estrutura conformacional da proteína final, o que impede sua detecção pelo anticorpo utilizado. A ausência de chaperonas pode resultar em subunidades com estrutura conformacional incorreta e agregação das mesmas, sendo posteriormente removidas por proteases no espaço periplasmático (REMAUT et al., 2008; WAKSMAN, 2017; WRIGHT; HULTGREN, 2006). Além disso, alterações na subunidade da adesina levaria a não formação de ECP, visto que esta é a subunidade chave para a polimerização por fímbrias formadas pela via CU (WERNEBURG; THANASSI, 2018).

Neste estudo foram realizadas algumas análises fenotípicas para identificar possíveis alterações resultantes das mutações realizadas na BA1250. Com a realização de curva de crescimento em diferentes condições de cultivo, pudemos demonstrar que tanto a deleção do gene *ecpA* quanto a deleção de *ecpRABCDE* não influenciam o padrão de crescimento.

Um trabalho comparando a motilidade da cepa APEC X7503 com os mutantes  $\Delta ecpA$ ,  $\Delta ecpD$  e  $\Delta ecpA\Delta ecpD$  em placas de ágar semissólido demonstrou que a deleção de *ecpA* tem pouco efeito neste fenótipo, enquanto a ausência de *ecpD* no simples e duplo mutante levou a diminuição significativa da motilidade a 28 e 37 °C

(STACY et al., 2014). Em contrapartida, estudos realizados com cepas de UPEC (SALDAÑA et al., 2014) e NMEC (LEHTI et al., 2012) corroboram os nossos resultados cuja deleção de *ecpA* ou de *ecpRABCDE* não alteraram a capacidade de motilidade de aEPEC. Interessantemente, a superexpressão de *ecpR* na NMEC IHE 3034 aboliu a motilidade da cepa pela intensa diminuição da expressão do *operon* responsável por codificar o flagelo (LEHTI et al., 2012).

A formação de biofilme é um ponto importante na patogenicidade, pois oferece diversas vantagens, como aumentar a capacidade de sobrevivência de bactérias no ambiente fora do hospedeiro e fornecer um ambiente propício para a troca de material genético. Um conjunto de expressões gênicas em *E. coli* facilita a formação de biofilme em seus diferentes estágios, incluindo iniciação, fixação e maturação. Trabalhos anteriores demonstraram que ECP está envolvida no estágio inicial do desenvolvimento de biofilme de NMEC a 20 °C (LEHTI et al., 2010) e em APEC a 28 °C (STACY et al., 2014). Nos ensaios realizados neste trabalho, a cepa BA1250 demonstrou-se não formadora de biofilme tanto em placas de poliestireno quanto em lamínulas de vidro a 37 °C e mutações não alteraram este fenótipo. Embora não tenha havido influência na produção de biofilme, houve significativa alteração da arquitetura da colônia bacteriana da cepa  $\Delta$ *ecpA* quando comparada com as cepas BA1250 e  $\Delta$ *ecpRABCDE*. Durante o período do ensaio, a mutante  $\Delta$ *ecpA* apresentou um crescimento completamente irregular, extremamente distinto do detectado nas cepas BA1250 e  $\Delta$ *ecpRABCDE* com colônias apresentando bordas praticamente lisas. Apesar de ensaio realizado em superfície diferente, Saldaña e colaboradores (2014) identificaram que a deleção de *ecpA* na UPEC CFT073 levou a significativa diferença do padrão e arquitetura do biofilme formado quando comparada com a cepa selvagem. Estes dados indicam que a produção de ECP contribui em algum grau para a forma e a arquitetura do biofilme/colônia bacteriana, e que outras estruturas de superfície estão claramente envolvidas nesse fenômeno.

Apesar do considerável número de trabalhos envolvendo a fímbria ECP e sua função na formação de biofilme e adesão às células epiteliais *in vitro*, nenhum estudo foi realizado aplicando-se modelos animais *in vivo*. O estudo de mecanismos da interação patógeno-hospedeiro é essencial e gera enorme contribuição para a saúde pública, sendo que a utilização de modelos *in vivo* aproxima os resultados do processo biológico e gera informações determinantes quanto ao diagnóstico e terapia. O

desenvolvimento de novos modelos animais para testes *in vivo*, de manutenção fácil e econômica, capazes de responder de maneira efetiva aos patógenos e de produzir respostas sobre as interações patógenos-hospedeiro, são primordiais para o conhecimento da patogênese de DEC.

Nos últimos anos, o *zebrafish* se tornou um poderoso modelo de animal vertebrado para decifrar mecanismos de virulência de patógenos que acometem humanos (BRANNON et al., 2009; KIZY; NEELY, 2009; NEELY et al., 2002; WILES et al., 2009). Embora o *zebrafish* tenha sido utilizado como modelo de infecções de diversos patógenos, inclusive EHEC (STONES et al., 2017), até onde sabemos esta é a primeira vez que é empregado para analisar infecções por aEPEC, assim como a importância de ECP na patogênese bacteriana.

A transmissão de aEPEC se dá por via oral através de contaminação fecal-oral, superfícies, alimentos ou água contaminada (revisado por HERNANDES et al., 2009; HU; TORRES, 2015). Por este motivo, a via de infecção utilizada foi a oral, já que a boca das larvas se abre três dias após a fertilização (WALLACE; PACK, 2003), o que possibilita o processo infeccioso. As larvas infectadas com a cepa selvagem foram consistentemente colonizadas com alta carga bacteriana, entre  $1 \times 10^4$  e  $5 \times 10^5$  UFC/larva, durante os três pontos de infecção analisados. O número de UFC obtido é consistente com o número obtido em infecções de *zebrafish* por *Aeromonas veronii*, no qual foram recuperados  $10^4$  UFC/larva no mesmo período de interação (WILES et al., 2009). É importante ressaltar que neste modelo a infecção por aEPEC não promoveu morte ou sinais clínicos, o que indica diferenças na patofisiologia do desenvolvimento da colonização entre humanos e *zebrafish*. No entanto, Stones e colaboradores (2017) demonstraram que a presença de sinais clínicos ou mortalidade neste modelo pode ser cepa específica, visto que a média de sobrevivência das larvas após infecção por EHEC O157:H7 Sakai foi de 76% e 56% com EHEC O157:H7 TUV 93-0.

O mutante  $\Delta ecpA$  foi extremamente deficiente na capacidade de colonização do *zebrafish*, visto que nas primeiras 24 hpi a carga bacteriana recuperada foi menor do que 10% da carga recuperada nos ensaios com a cepa selvagem, sendo a infecção extinta após 72 hpi. A deficiente colonização pela cepa  $\Delta ecpA$  era esperada e corrobora com outros estudos que demonstraram a diminuição da capacidade de

adesão às células epiteliais *in vitro* de cepas de *E. coli* patogênicas após deleção deste gene (AVELINO et al., 2010; RENDÓN et al., 2007; SALDAÑA et al., 2014).

Surpreendentemente, o mutante  $\Delta ecpRABCDE$  colonizou as larvas persistentemente durante as 72 hpi e com carga bacteriana semelhante a recuperada após infecção pela cepa selvagem. Diversos trabalhos demonstraram o complexo repertório de genes de virulência presente em cepas de aEPEC envolvidos na colonização de hospedeiros. Porém, nossos resultados demonstraram a capacidade de adaptação deste patótipo em decorrência da ausência total de sinalização da presença, do que indica ser, uma estrutura de adesão essencial para a colonização bem-sucedida por esta cepa de aEPEC.

Os genes *ecp* são transcritos como um *operon* a partir de um promotor localizado 121 pb a montante do códon inicial do *ecpR*, que é positivamente regulado pela ligação de EcpR. A ligação sítio específica de EcpR leva à transcrição do restante dos genes que compõem o *operon* e consequente produção de ECP. Além disso, a ativação mediada por EcpR é auxiliada pelo fator de integração do hospedeiro (IHF), que é essencial para interromper a repressão exercida pela proteína estruturadora de núcleo do tipo histona (H-NS) sob o promotor de *ecp* (MARTÍNEZ-SANTOS et al., 2012). Embora estudos futuros sejam necessários, uma das hipóteses levantadas para esclarecer a capacidade de adesão de  $\Delta ecpRABCDE$  é a de que na ausência de todos os genes que compõem o *operon ecp*, outra adesina seja regulada de forma positiva, e desempenhe a função de adesina principal exercida até então por ECP. Outra hipótese possível é a de que a deleção do gene regulador *ecpR* interrompeu o efeito repressor exercido por EcpR sobre a expressão de outra adesina. Corroborando com esta teoria, um estudo realizado com NMEC IHE 3034 demonstrou que EcpR exerce grande efeito repressor sob a expressão do *operon* responsável por codificar o flagelo, visto que a superexpressão de *ecpR* aboliu a motilidade da cepa (LEHTI et al., 2012). Para NMEC, a estrutura flagelar, além da motilidade, mostrou-se relevante para adesão e invasão bacteriana nas células endoteliais microvasculares do cérebro humano (PARTHASARATHY; YAO; KIM, 2007). Da mesma forma, demonstrou-se que flagelos de DEC estão diretamente envolvidos na adesão a células epiteliais (GIRÓN et al., 2002; MAHAJAN et al., 2009). O regulador principal FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub> é necessário para a expressão dos outros genes do regulador flagelar e, portanto,

determina quando os flagelos serão produzidos. Por consequência, o início da transcrição de *flhDC* constitui o principal ponto regulador do fenótipo de flagelação. Portanto, a transcrição do operon *flhDC* apresenta-se sob regulação negativa de EcpR, além de responder a reguladores globais como H-NS (BERTIN et al., 1994; SOUTOURINA et al., 1999). Outro exemplo seria o papel de SfaX que não regula significativamente a expressão da fímbria correspondente, mas regula negativamente a expressão da fímbria do tipo 1 (SJOÖSTRÖM et al., 2009).

Aproveitando-se da transparência das larvas de *zebrafish* e com o objetivo de identificar se a colonização pela cepa selvagem e as duas mutantes ocorriam de forma sítio específica no intestino, os ensaios foram repetidos com essas cepas transformadas com *pmCherry*. A cepa selvagem colonizou eficientemente o bulbo intestinal com 24 hpi, e predominantemente a porção posterior do intestino com 48 e 72 hpi. O sítio de colonização no *zebrafish* pela aEPEC BA1250 observado neste trabalho difere do encontrado por Stones et al (2017) em infecções com cepas de EHEC, onde ocorreu predominante adesão na porção média do intestino do animal. A adesão a porções distintas do intestino de *zebrafish* entre EHEC e EPEC demonstra semelhança com os resultados encontrados em infecções no intestino humano e de outros animais, onde estes patógenos também se aderem à diferentes sítios intestinais (NATARO, KAPER, 1998). Esta comparação reforça a utilização de adesinas distintas por cada patótipo, já que são encontrados diferentes tipos de células em cada porção intestinal, como enterócitos (bulbo e posterior), células caliciformes produtoras de mucina (intestino inteiro) e células enteroendócrinas (bulbo) (WALLACE et al., 2005).

As estruturas de adesão armam as bactérias com ferramentas moleculares para identificar sítios preferenciais nos tecidos e desempenham um papel decisivo na colonização e adaptação a longo prazo. A colonização detectada com 24 hpi pelo mutante  $\Delta ecpA$  parece ocorrer de maneira bastante inespecífica com ligação às células do pâncreas e em 48 e 72 hpi é praticamente eliminada. Estes dados corroboram com o padrão de colonização observado nos nossos ensaios quantitativos de UFC/larva, onde há baixa colonização inicial com posterior extinção da infecção.

Os ensaios realizados com a cepa mutante  $\Delta ecpRABCDE::mCherry$  demonstraram que apesar de não haver diferença estatística da carga bacteriana



recuperada após infecção comparado com BA1250, o sítio de colonização não é o mesmo. Assim como a  $\Delta ecpA$ , a adesão inicial deste mutante possivelmente ocorre no pâncreas com 24 hpi. No entanto, com 48 e 72 hpi a colonização ocorre fortemente na porção no bulbo intestinal, contrastando novamente com a cepa selvagem. Wang e colaboradores (2010) realizaram uma análise de *micro-arrays* do intestino do *zebrafish* adulto e identificaram a presença de três regiões distintas com base em dados sobre genes metabólicos. Os autores dividiram o intestino em 7 segmentos de comprimentos iguais (do bulbo 1 a porção posterior 7) e concluíram que o segmento de S1 a S5 possui características moleculares do intestino delgado, enquanto os segmentos S6 e S7 compartilham características do intestino grosso (WANG et al., 2010). Estes dados deixam claro que o processo de adesão das cepas selvagem e  $\Delta ecpRABCDE$  ocorre pela atuação de diferentes estruturas de adesão, visto que o tropismo bacteriano é determinado pela natureza de suas fímbrias/adesinas (STACY et al., 2014), que irão se ligar à receptores específicos provavelmente localizados em porções distintas do intestino do *zebrafish*.

Um ponto importante a ser ressaltado é que, assim como em humanos, o intestino do *zebrafish* exibe motilidade periódica, com ondas de contrações peristálticas que se propagam ao longo de seu comprimento. Assim como o identificado com infecções por *Aeromonas*, a adesão da BA1250 e  $\Delta ecpRABCDE$  parece ser afetada pelas contrações intestinais, já que são identificados aglomerados bacterianos. Em contrapartida, as infecções causadas por *Vibrio cholerae* são pouco afetadas por este mecanismo, por apresentarem-se bem distribuídas ao longo do intestino (WILES et al., 2016).

As bactérias podem sobreviver em ambientes muito diferentes, pois sentem e se adaptam às mudanças no ambiente externo, alterando a expressão de seus genes para aumentar a persistência (REDIERS et al., 2005). A presença de ECP na maioria das cepas de *E. coli* (RENDÓN et al., 2007) e em células da bexiga provenientes de pacientes com infecção do trato urinário (SALDAÑA et al., 2014) sugere que a função de ECP pode não ser específica apenas para doenças gastrointestinais humanas, mas também pode ser importante para a sobrevivência em vários nichos.

Para analisar se ECP também desempenha um papel de grande importância na colonização fora do trato intestinal, foram realizados ensaios de infecção local na cavidade pericárdica de *zebrafish*. As cepas BA1250 e  $\Delta ecpRABCDE$  mostraram-se

altamente letais, sendo que apenas 25 e 32% das larvas sobreviveram após serem infectadas por essas cepas, respectivamente. Nossos ensaios demonstraram que neste modelo animal, cepas de aEPEC possuem potencial de virulência muito maior do que cepas de UPEC causadoras de cistite e pielonefrite, APEC e NMEC (WILES et al., 2009). Este trabalho demonstrou que os altos níveis de letalidade comparados com os encontrados em nosso estudo só foram detectados após infecção com 5.000 UFC/larva, comparado com 1.000 UFC/larva utilizados nos ensaios com aEPEC. Novamente de maneira surpreendente, após infecções com o mutante  $\Delta ecpA$  todas as larvas sobreviveram, demonstrando a completa redução da virulência desta cepa. Esta alteração resulta, provavelmente, da incapacidade de ligação das adesinas expressas aos receptores presentes na cavidade pericárdica com consequente eliminação das bactérias.

O processo de ativação do sistema imunológico inato do *zebrafish* foi demonstrado em resposta às infecções realizadas na cavidade cardíaca com a cepa laboratorial K12 MG1655 e as cepas patogênicas de UPEC F11, CFT073, 536 e UT189 (WILES et al., 2009). Neste trabalho foi detectada uma intensa infiltração de fagócitos na cavidade pericárdica após a inoculação da cepa não virulenta que resultou em uma redução considerável no número de bactérias. Apesar da resposta imunológica equivalente ou até mais alta, os fagócitos falharam em erradicar os isolados mais letais de UPEC e acabaram sendo superados pelos patógenos que se multiplicam rapidamente. Curiosamente, os fagócitos foram vistos apenas ocasionalmente em estreita associação as micro-colônias bacterianas formadas, sugerindo que esses agregados possam ser fisicamente inacessíveis às células do sistema imunológico. Estudos futuros são necessários para investigar como o sistema imunológico do *zebrafish* é ativado com infecções causadas por aEPEC e os mutantes em *ecpA* e em *ecpRABCDE*.

Até o momento, o único trabalho realizado para investigar o papel de ECP na patogênese bacteriana em modelo *in vivo* foi o que empregou cepas de APEC na infecção de galinhas com um dia de vida (STACY et al., 2014). Este estudo demonstrou que a cepa APEC x7503 é altamente letal quando inoculada por via subcutânea, matando 100% dos animais em 48 horas de infecção. Já as cepas mutantes em *ecpA* e em *ecpD* permaneceram com alto grau de letalidade, mas de maneira mais lenta, visto que 10 e 18% dos animais permaneceram vivos após 7 dias de infecção. Este estudo também identificou que em comparação com a cepa

selvagem em uma infecção sistêmica, o mutante  $\Delta ecpD$  coloniza os animais lentamente sendo encontrada carga bacteriana mais baixas no sangue e órgãos internos (baço e fígado).

Apesar de não terem sido identificados casos de infecções sistêmicas causadas por aEPEC, tínhamos como objetivo analisar se ECP teria alguma função na adesão deste patótipo quando inoculado por esta via. Para tanto, larvas de *zebrafish* foram infectadas com a BA1250,  $\Delta ecpA$  e  $\Delta ecpRABCDE$ . Nestes ensaios o grau e perfil de letalidade das cepas testadas permaneceu o mesmo quando comparado com infecção da cavidade pericárdica, apesar de porcentagem de sobrevivência diferente, com 86, 52 e 41% das larvas vivas após infecção por BA1250,  $\Delta ecpA$  e  $\Delta ecpRABCDE$ , respectivamente. Assim como o observado com cepas de UPEC, o grau de letalidade em infecções sistêmicas por aEPEC e seus mutantes derivados pode ser dose-dependente, pois com aumento de UFC injetados, o número de larvas sobreviventes diminuiu (WILES et al., 2009). A resposta imunológica inata também é rapidamente ativada em infecções sistêmicas, onde há um significativo aumento da expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias, como IL1b, TNF $\alpha$ , e anti-inflamatória, como IL-10, de embriões de *zebrafish* infectados por uma cepa bacteriana, como *S. typhimurium*, que prolifera rapidamente e causa infecção letal (STOCKHAMMER et al., 2009)

Os dados resultantes das infecções em *zebrafish* com cepas de aEPEC e seus mutantes sugerem fortemente que ECP possa afetar significativamente não apenas a virulência deste patótipo, mas também a persistência e multiplicação bacteriana no hospedeiro e, conseqüentemente, o resultado final da infecção. A grande capacidade de adesão desta fímbria possibilita a colonização bacteriana em diversos sítios do hospedeiro. Curiosamente, também foi demonstrada a notável capacidade de compensação de  $\Delta ecpRABCDE$  para reestabelecer todo o perfil de virulência apresentado pela cepa selvagem.

Uma comparação realizada com a sequência de aminoácidos da fímbria CS20 expressa por ETEC com as sequências de outras fímbrias demonstra que embora a CS20 seja em alto grau geneticamente semelhante à fímbrias do trato urinário, ela compartilha propriedades bioquímicas mais semelhantes às fímbrias CS2 e CFA/I, que são expressas no intestino (MORTEZAEI et al., 2015). Estes dados sugerem que

existe uma adaptação órgão-específica da mecânica das fímbrias, e que esta função é extremamente importante para patogênese de *E. coli*, pois permite que as bactérias superem os desafios hidrodinâmicos encontrados em diferentes ambientes.

Durante este estudo foi bem apontado que a cepa  $\Delta ecpRABCDE$  na ausência de ECP utiliza outras adesinas no processo de infecção local e sistêmica. Já foi descrito um grande número de tipos de adesinas que auxiliam no processo de ligação e adesão de bactérias, com importantes variações que favorecem a aderência de cada grupo no ambiente e condição ideal. As adesinas EspA, T1P, Hcp, Curli, YcbQ e intimina foram selecionadas como uma tentativa de identificação da estrutura de adesão que passou a ter a sua produção aumentada na cepa mutante  $\Delta ecpRABCDE$ .

A proteína EspA desempenha importante papel no SST3 de EPEC, no qual configura uma estrutura filamentosa no injetossomo formado (CREPIN et al., 2005; DANIELL et al., 2001, 2003). Análises mutagênicas identificaram motivos adesivos no filamento EspA e o associaram na participação de agregados bacterianos durante a formação de biofilme em superfícies abióticas (MOREIRA et al., 2006), além da participação em conjunto com BFP na adesão intestinal realizada por EPEC (DEAN; KENNY, 2009). A T1P é detectada na maior parte dos grupos de *E. coli* causadoras de infecções diarreicas e extraintestinais, sendo uma importante adesina em UPEC e EAEC (CONNELL et al., 1996; MOREIRA et al., 2003). Cepas de APEC com mutações pontuais nos genes *ecpA* e/ou *ecpD*, apresentaram ainda significativa capacidade de adesão às células epiteliais *in vitro*, provavelmente pelo papel desempenhado por T1P (STACY et al., 2014).

Cepas não patogênicas de *E. coli* contêm e expressam o gene dependente da prepilina peptidase (*ppdD*), que codifica uma fímbria do tipo IV denominada fímbria hemorrágica de coli (HCP) (FRANCETIC; LORY; PUGSLEY, 1998), mas a montagem e sua associação com adesão e formação de biofilme foi demonstrada em EHEC O157:H7 (XICOHTENCATL-CORTES et al., 2007). Soros de pacientes com síndrome hemolítica urêmica, mas não soros de indivíduos saudáveis, reconhecem a subunidade principal da pilina, HcpA, sugerindo sua produção *in vivo* durante infecções por EHEC. Bactérias como *E. coli* e *Salmonella entérica* expressam fibras adesivas do tipo amilóide chamadas curli, que promovem agregação bacteriana (COLLINSON et al., 1993), favorece a colonização do hospedeiro e a formação de biofilme por EHEC O157:H7 (SALDAÑA et al., 2009a), e está associada ao

desenvolvimento de biofilme a baixas temperaturas em uma cepa aEPEC O55:H7 (WEISS-MUSZKAT et al., 2010).

A fimbria de ligação à laminina de *E. coli* (ELF), também conhecida como YcbQ, é uma fimbria cujos genes de biogênese são homólogos aos encontrados na fimbria F17 de ETEC. Já foi descrito seu papel como adesina acessória em cepas de STEC para mediar a adesão às células epiteliais intestinais humanas e ao tecido intestinal de vaca e porco *ex vivo* (SAMADDER et al., 2009). A intimina é uma proteína de membrana externa e é um dos mais importantes fatores de colonização da EPEC, que medeia a adesão íntima ao hospedeiro (KAPER et al. 2004). Estudos avaliando a prevalência dos subtipos de intimina mostraram que as classificadas como beta1, epsilon1 e teta aparecem como as mais frequentes entre as cepas de aEPEC (ABE et al. 2009; CONTRERAS et al., 2010; GOMES et al. 2004; XU et al, 2016).

Como também demonstrado em ECP, existe importante alteração na regulação da produção das fímbrias de acordo com o ambiente em que a bactéria se encontra. Saldaña e colaboradores (2009b) demonstraram que quando as bactérias eram previamente cultivadas em DMEM, ECP foi evidente nos estágios iniciais da infecção (1,5 h), e continuou presente durante toda a duração do experimento (6 h). Por outro lado, ECP não foi detectada durante as primeiras 3 h de infecção quando foram utilizadas bactérias previamente cultivadas em meio LB, sendo identificada apenas após 4,5 h do início da infecção.

Por este motivo, o cultivo em DMEM a 28,5 °C foi inicialmente selecionado por ser a temperatura de manutenção das larvas de *zebrafish* e por ser um meio extremamente rico, tendo em sua composição um grande conjunto de aminoácidos e vitaminas, a fim de se aproximar do ambiente fisiológico. A análise da produção destas cinco adesinas selecionadas demonstrou que, além da produção, sem diferença estatística, de EspA, Hcp e intimina, há um significativo aumento da produção de T1P, curli e YcbQ pela mutante em *ecpA* quando comparado com as cepas selvagem e  $\Delta$ *ecpRABCDE*. Este resultado demonstra uma tentativa da bactéria de contrabalancear a ausência da pilina EcpA com o aumento de produção de outras adesinas. No entanto, os ensaios com *zebrafish* demonstraram que estas adesinas devem ser utilizadas como acessórias nesta cepa de aEPEC e, portanto, não são suficientes no processo de colonização.

A temperatura é um fator importante que influencia a produção de adesinas, como ECP (LEHTI et al., 2010; RENDÓN et al., 2007). O cultivo das cepas em DMEM a 37 °C alterou o perfil de produção de adesinas, sendo todas expressas sem diferença entre as cepas, exceto Hcp que apresentou um aumento de produção pela  $\Delta ecpA$ . A última condição analisada foi após cultivo em M9 a 37 °C, por ser a condição adotada no crescimento das bactérias previamente aos ensaios com animais, o que seria útil em desvendar quais adesinas são utilizadas logo no primeiro contato com as larvas. Porém, como esperado por ser um meio mínimo, houve uma baixa produção de todas as adesinas testadas, inclusive ECP, sendo Hcp a única adesina amplamente detectada expressa por  $\Delta ecpA$ .

Em conjunto, estes dados demonstraram que EspA, T1P, Hcp, curli, YcbQ e intimina não são a adesina principal utilizada pela  $\Delta ecpRABCDE$  no processo infeccioso.

Patógenos dispõem de um complexo repertório de genes de virulência para uma colonização eficaz de seus hospedeiros. O genoma de *E. coli* patogênica e não patogênica contém pelo menos 16 *operons* diferentes que poderiam potencialmente codificar adesinas fimbriais (BLATTNER et al., 1997; PERNA et al., 2001), além daqueles que codificam adesinas afimbriais. No entanto, ainda não está claro quais desses *operons* são expressos ou funcionais no hospedeiro. As cepas de aEPEC abrigam vários *operons* fimbriais distintos cujos produtos podem ser produzidos isoladamente ou em combinação durante a infecção de células epiteliais cultivadas (HERNANDES et al., 2011).

A cepa BA1250 teve seu genoma completo sequenciado neste estudo, o que possibilitou análises *in silico* quanto a presença de genes que codificam estruturas de adesão. O *software* SPAAN (SACHDEVA et al., 2005) utiliza inteligência artificial para detectar padrões específicos contidos nas sequências de aminoácidos codificados pelos genes do cromossomo bacteriano. Após uma análise bastante restritiva, foram identificadas 303 estruturas com altíssima chance de serem classificadas como estrutura de adesão. Quando a busca no genoma da BA1250 foi realizada utilizando a palavra “*fimbrial*” foram identificados, além dos já estudados neste trabalho, genes responsáveis por codificar subunidades de 11 adesinas fimbriais, entre elas as fímbricas LpfA, Pap, CFA/I e S.

As fímbrias Pap e S tiveram sua relação com infecções do trato urinário por UPEC amplamente descrita (BIDET et al., 2007; MULVEY, 2002; WILES; KULESUS; MULVEY, 2008), em NMEC (CHAHALES; THANASSI, 2015; WRIGHT; HULTGREN, 2006), em algumas cepas de APEC (KARIYAWASAM; NOLAN, 2011) e em baixíssima frequência em aEPEC (GOMES et al., 2004). A fímbria S é codificada pelos genes cromossômicos *sfaCBADEFGSH* que fazem parte de uma ilha de patogenicidade transferida para UPEC por transmissão horizontal de genes (RIBIĆ et al., 2018; WRIGHT; HULTGREN, 2006). Um estudo recente realizado com o objetivo de estabelecer uma bacteriúria assintomática com efeito protetor em hospedeiros humanos acabou por detectar que a inserção da fímbria P em uma *E. coli* originalmente causadora de infecção assintomática reverteu o fenótipo e passou a causar sintomas nas pessoas infectadas (AMBITE et al., 2019). Os autores observaram que a fímbria P ativa o fator de transcrição IRF-7 do hospedeiro, que regula a patologia nos rins infectados, e sugerem que um único gene de virulência potente pode ser suficiente para criar sintomas em hospedeiros humanos.

Já foi relatado que LPF exhibe propriedades diferentes de acordo com o patótipo em que é encontrado, sendo que as variantes LPF<sub>1</sub> e LPF<sub>2</sub> desempenham papéis necessários na adesão de EHEC e AIEC às células intestinais do hospedeiro (FARFAN; TORRES, 2012). A LPF também foi detectada em outras categorias de DEC. Toma et al. (2006) relataram que a variante LPF<sub>O113</sub> estava presente em 64,9% das cepas de EAEC, 20% das cepas de EIEC, 43,3% das cepas de EPEC e 52% das cepas de ETEC.

A fímbria CFA é uma das principais características do grupo de ETEC, juntamente com a produção das toxinas LT e ST (NATARO; KAPER, 1998). Esta adesina quando expressa por ETEC facilita a adesão das bactérias à mucosa intestinal e confere especificidade quanto ao hospedeiro colonizado (GAASTRA; SVENNERHOLM, 1996; QADRI et al., 2005). Cepas deste patótipo que produzem CFA/I são consideradas como clinicamente mais importantes (GAASTRA; SVENNERHOLM, 1996) e, juntamente com outros fatores de colonização, são as mais prevalentes em estudos epidemiológicos (ISIDEAN et al., 2011).

Recentemente foi identificada a presença de uma fímbria ainda não descrita em trabalho realizado com uma cepa híbrida EHEC/EAEC do sorotipo O23:H8

(PRAGER et al., 2014) que demonstrou que esta apresenta padrão de adesão agregativo às células epiteliais *in vitro* na ausência dos genes que codificam a fímbria AAF (BIELASZEWSKA et al., 2011; BOISEN et al., 2015; NAVARRO-GARCIA, 2014). Nesta mesma cepa foram identificados genes plasmidiais que codificam proteínas com limitada homologia (11-61%) às subunidades de BFP. Com a significativa distância da homologia entre as fímbrias conhecidas, estes genes foram denominados como fímbria formadora de agregados (AFP) e o respectivo plasmídeo de *pAFP*. O *operon afp* é organizado de maneira semelhante ao *operon bfp*, e são responsáveis pela formação da fímbria, auto-agregação, adesão e citotoxicidade, além de estarem presentes em uma variedade de *E. coli* patogênica intestinal de infecções humanas (LANG et al., 2018). Apesar da clara distinção entre AFP e BFP, a homologia dos nucleotídeos e aminoácidos entre essas duas fímbrias sugere que elas podem ter funções semelhantes.

Dentre as adesinas encontradas em nossa análise *in silico*, estão 91 proteínas anotadas como "*Hypothetical proteins*". Hernandez et al. (2011) falharam ao detectar pelo menos uma das adesinas fimbriais investigadas em quase 25% das cepas de aEPEC utilizadas no estudo. No entanto, estas cepas foram caracterizadas como aderentes às células HeLa, o que torna razoável sugerir que outros mecanismos de adesão sejam mediados por fímbrias ainda não descritas existentes nesse patótipo. No entanto, como essas diferentes adesinas são sincronizadas e reguladas no contexto de sítio e tempo de infecção durante a interação da aEPEC com as células hospedeiras ainda precisam ser definidas.

Nossos resultados demonstraram que o *operon ecp* é altamente conservado e expresso em aEPEC, mas esta fímbria não influencia no padrão de crescimento e motilidade da BA1250. Além disso, ECP parece ser imprescindível para a adesão intestinal *in vivo* e atua como importante fator de adesão deste patótipo em infecções extraintestinais em *zebrafish*. Também evidenciamos que na completa ausência do *operon ecp* outra fímbria, ainda indeterminada, é capaz de contrapor a capacidade de adesão de aEPEC



## 6. CONCLUSÕES

Coletivamente, os dados obtidos neste trabalho quanto a caracterização fenotípica e interação com modelo *in vivo* evidenciam que ECP é de extrema importância para a patogênese de aEPEC. Além disso, sugerem que a função desta fímbria possa não ser específica somente para infecções gastrointestinais *in vivo*, mas que possa ser importante para a sobrevivência da bactéria em diferentes nichos. O trabalho também demonstrou a impressionante adaptabilidade da BA1250 por utilizar o grande repertório de genes de virulência a seu favor e estabelece o *zebrafish* como uma ferramenta valiosa para o estudo de adesinas fimbriais.

## REFERÊNCIAS\*

- ABE, C. M. et al. Virulence features of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* identified by the *eae+* EAF-negative *stx*-genetic profile. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 64, n. 4, p. 357-365, 2009.
- AFSET, J. E. et al. Identification of virulence genes linked with diarrhea due to atypical enteropathogenic *Escherichia coli* by DNA microarray analysis and PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, p. 3703–3711, 2006.
- ALLEN, W.J.; PHAN, G.; WAKSMAN, G. Structural biology of periplasmic chaperones. **Adv. Protein. Chem. Struct. Biol.**, v. 78, p. 51–97, 2009.
- AMBITE, I. et al. Fimbriae reprogram host gene expression – Divergent effects of P and type 1 fimbriae. **PLoS Pathog.**, v. 15, n. 6, p. e1007671, 2019.
- ASHWORTH, A. Treatment of severe malnutrition. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 32, n. 5, p. 516–518, 2001.
- ASSIS, F. E. A. et al. Impact of *Aeromonas* and diarrheagenic *Escherichia coli* screening in patients with diarrhea in Paraná, Southern Brazil. **J Infect Dev Ctries.**, v. 8, n. 12, p.1609–1614, 2014.
- AVALOS-VIZCARRA, I. et al. How type 1 fimbriae help *Escherichia coli* to evade extracellular antibiotics. **Sci Rep.**, v. 5, n. 6, p. 18109, 2016.
- AVELINO, F. et al. The majority of enteroaggregative *Escherichia coli* strains produce the *E. coli* common pilus when adhering to cultured epithelial cells. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 300, p. 440–448, 2010.
- BALLA, K. M. et al. Eosinophils in the zebrafish: prospective isolation, characterization, and eosinophilia induction by helminth determinants. **Blood.**, v. 116, p. 3944- 3954, 2010.
- BANKEVICH, A. et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. **J Comput Biol.**, v. 19, n. 5, p. 455-477, 2012.
- 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, n. 23, p. 7918–7930, 2005.
- BARUCH, K. et al. Metalloprotease type III effectors that specifically cleave JNK and NF-kappaB. **EMBO J.**, v. 30, p. 221–231, 2011.
- BASU, S.; MÜLLER, F.; SANGES, R. Examples of sequence conservation analyses capture a subset of mouse long non-coding RNAs sharing homology with fish conserved genomic elements. **BMC Bioinformatics.**, v. 14, p. 1- 17, 2013.
- BATES, J.M. et al. Intestinal alkaline phosphatase detoxifies lipopolysaccharide and prevents inflammation in zebrafish in response to the gut microbiota. **Cell Host Microbe.**, v. 2, n. 6, p. 371-382, 2007.

---

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

BATES, J.M. Distinct signals from the microbiota promote different aspects of zebrafish gut differentiation. **Dev Biol.**, v. 297, n. 2, p. 374-386, 2006.

BÄUMLER, A. J.; HEFFRON, F. Identification and sequence analysis of IpfABCDE, a putative fimbrial operon of *Salmonella typhimurium*. **J Bacteriol.**, v. 177, n. 8, p. 2087-2097, 1995.

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

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

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

BERTIN, P. et al. The H-NS protein is involved in the biogenesis of flagella in *Escherichia coli*. **J Bacteriol.**, v. 176, n. 17, p. 5537-5540, 1994.

BIDET, P. et al. Detection and identification by PCR of a highly virulent phylogenetic subgroup among extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* B2 strains. **Appl Environ Microbiol.**, v. 73, n. 7, p. 2373-2377, 2007.

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

BIELASZEWSKA, M. et al. Characterisation of the *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.

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

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

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

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

BOISEN, N. et al. Shiga toxin 2a and Enteroaggregative *Escherichia coli*--a deadly combination. **Gut Microbes.**, v. 6, p. 272-278, 2015.

BOISEN, N. et al. New adhesin of enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF family. **Infect Immun.**, v. 76, n. 7, p. 3281-3292, 2008.

BOLGER, A.M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114-2120, 2014.

BOWMAN, T.V. ZON, L.I. Swimming into the future of drug discovery: in vivo chemical screens in zebrafish. **ACS Chem Biol.**, v. 5, p. 159-161, 2010.

BRANNON, M.K. et al. Pseudomonas aeruginosa Type III secretion system interacts with phagocytes to modulate systemic infection of zebrafish embryos. **Cell Microbiol.**, v. 11, n. 5, p. 755-768, 2009.

BRUGMAN, S. The Zebrafish as a model to study intestinal inflammation. **Develop and Comperative Immunol.**, v.64, p. 82-92, 2016.

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

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

CARRADICE, D.; LIESCHKE, G.J. Zebrafish in hematology: sushi or science? **Blood**, v. 111, p. 3331-3342, 2008.

CERGOLE-NOVELLA, M.C. et al. Distribution of virulence profiles related to new toxins and putative adhesins in Shiga toxin-producing Escherichia coli isolated from diverse sources in Brazil. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 274, n. 2, p. 329-334, 2007.

CHAHALES, P.; THANASSI, D.G. Structure, Function, and Assembly of Adhesive Organelles by Uropathogenic Bacteria. **Microbiol Spectr.**, v. 3, n. 5, 2015.

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

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

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

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

CONTRERAS, C.A. et al. Allelic variability of critical virulence genes (eae, bfpA and perA) in typical and atypical enteropathogenic Escherichia coli in Peruvian children. **J Med Microbiol.**, v. 59, p. 25-31, 2010.

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

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

CROXEN, M.A. et al. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clin Microbiol Rev.**, v. 26, n. 4, p. 822–880, 2013.

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

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

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

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

DANILOVA, N. et al. The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z. **Nat Immunol.** v. 6, n. 3, p. 295-302, 2005.

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

DEAN P, KENNY B. The effector repertoire of enteropathogenic *E. coli* ganging up on the host cell. **Curr Opin Microbiol.** v. 12, n. 1, p.101–109, 2009.

DENG, W. et al. Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. **Proc Natl Acad Sci.**, v.101, n. 10, p. 3597–3602, 2004.

DIAS, R.C.B. et al. Diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes investigation revealed atypical enteropathogenic *E. coli* as putative emerging diarrheal agents in children living in Botucatu, São Paulo State, Brazil. **APMIS.**, v.124, p.299–308, 2016.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin Microbiol Rev.**, v.15, n. 2, p.167-193, 2002.

DONNENBERG, M.S.; FINLAY, B.B. Combating enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) infections: the way forward. **Trends Microbiol.**, v.21, p. 317–319, 2013.

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

DULGUER, M.V. et al. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains: phenotypic and genetic profiling reveals a strong association between enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin and diarrhea. **J. Infect. Dis.**, v.188, n. 11, p. 1685–1694, 2003.

DUPONT, A. et al. Age-Dependent Susceptibility to Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Infection in Mice. **PLoS Pathog.**, v. 12, n. 5, p. e1005616, 2016.

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

ELLISON, C.K. et al. Retraction of DNA-bound type IV competence pili initiates DNA uptake during natural transformation in *Vibrio cholerae*. **Nat Microbiol.**, v. 3, n. 7, p. 773-780, 2018.

ELLIOTT, S.J. et al. The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect Immun.**, v.68, n.11, p.6115–6126, 2000.

ELLIOTT, E. et al. Modulation of host response to *Escherichia coli* O157:H7 infection by anti-CD18 antibody in rabbits. **Gastroenterology**, v. 106, p. 1554–1561, 1994.

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

FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I.C. The gut at war: the consequences of enteropathogenic *Escherichia coli* infection as a factor of diarrhea and malnutrition. **Sao Paulo Med J.**, v.118, p. 21–29, 2000.

FARFAN, M.J.; TORRES, A.G. Molecular mechanisms that mediate colonization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. **Infect Immun.**, v.80, n.3, p.903-913, 2012.

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

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

FORMAL, S.B.; HORNIK, R.B. Invasive *Escherichia coli*. **J Infect Dis.**, v.137, p. 641–644, 1978.

FORMAL, S.B.; HALE, T.L.; SANSONETTI, P.J. Invasive enteric pathogens. **Rev Infect Dis.**, v. 5, p. 702–707, 1983.

FRANCETIC, O.; LORY, S.; PUGSLEY, A.P. A second prepilin peptidase gene in *Escherichia coli* K-12. **Mol Microbiol.** v. 27, n. 4, p. 763-775, 1998.

FRANKEL, G. et al. Characterization of the C-terminal domains of intimin-like proteins of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, and *Hafnia alvei*. **Infect Immun.**, v. 62, n.5, p.1835–1842, 1994.

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

FRANZOLIN, M.R. et al. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v.100, n.4, p. 359–363, 2005.

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

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

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

GARNETT, J.A. et al. Structural insights into the biogenesis and biofilm formation by the *Escherichia coli* common pilus. **Proc Natl Acad Sci.**, v.109, n.10, p.3950-3955, 2012.

GEBERT, A.; JEPSON, M.A. Is the epithelial origin of M cells controversial? **Gastroenterology**, v.111, n.4, p.1163, 1996.

GIRÓN, J.A. et al. The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. **Mol Microbiol.**, v.44, n.2, p.361-379, 2002.

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

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

GOMES, T.A. et al. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Braz J Microbiol.**, v.47, 3–30, 2016.

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

GUREVICH, A. et al. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. **Bioinformatics**, v. 29, n. 8, p. 1072-1075, 2013.

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

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

HE, T. et al. Mequindox resistance and in vitro efficacy in animal-derived *Escherichia coli* strains. **Vet Microbiol.**, v.177, n.3-4, p.341-346, 2015.

HERBOMEL, P.; THISSE, B.; THISSE, C. Ontogeny and behaviour of early macrophages in the zebrafish embryo. **Development.**, v.126, p.3735-3745, 1999.

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

HERNANDES, R.T. et al. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol Lett.**, v.297, p.137–149, 2009.

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

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

ISIDEAN, S.D. et al. A systematic review of ETEC epidemiology focusing on colonization factor and toxin expression. **Vaccine.**, v.29, p.6167–6178, 2011.

JARVIS, K.G. et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. **Proc Natl Acad Sci.**, v.92, n.17, p.7996-8000, 1995.

JAULT, C.; PICHON, L.; CHLUBA, J. Toll-like receptor gene family and TIR-domain adapters in *Danio rerio*. **Mol Immunol.**, v.40, p.759-771, 2004.

JENSEN, C. et al. Attaching and Effacing *Escherichia coli* strains isolated from Danish children: Clinical significance and microbiological characteristics. **Clin Microbiol Infect.**, v.13, p.863-872, 2007.

HU, J.; TORRES, A.G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: foe or innocent bystander? **Clin Microbiol Infect.**, v.21, n.8, p.729-734, 2015.

JIM, K.K. et al. Infection of zebrafish embryos with live fluorescent *Streptococcus pneumoniae* as a real-time pneumococcal meningitis model. **J Neuroinflammation.**, v.13, n.1, p.188, 2016.

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

KANTHER, M.; RAWLS, J.F. Host-microbe interactions in the developing zebrafish. **Curr Opin Immunol.**, v.22, p.10-19, 2010.

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

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

KARI, G.; RODECK, U.; DICKER, A.P. Zebrafish: an emerging model system for human disease and drug discovery. **Clin Pharmacol Ther.**, v.82, n.1, p.70-80, 2007.

KARIYAWASAM, S.; NOLAN, L.K. papA gene of avian pathogenic *Escherichia coli*. **Avian Dis.**, v.55, n.4, p.532-538, 2011.

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

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

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

KIZY, A.E.; NEELY, M.N. First *Streptococcus pyogenes* signature-tagged mutagenesis screen identifies novel virulence determinants. **Infect Immun.**, v.77, p.1854-1865, 2009.

KJELSTRUP, C.K. et al. *Escherichia coli* O78 isolated from septicemic lambs shows high pathogenicity in a zebrafish model. **Vet Res.**, v.48, n.1, p.3, 2017.

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



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

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

KWEK, J. et al. Molecular insights into evolution of the vertebrate gut: focus on stomach and parietal cells in the marsupial, *Macropus eugenii*. **J Exp Zool B Mol Dev Evol.**, v.312, n.6, p.613-624, 2009.

LACHER, D.W.; STEINSLAND, H.; WHITTAM, T.S. Allelic subtyping of the intimin locus (*eae*) of pathogenic *Escherichia coli* by fluorescent RFLP. **FEMS Microbiol Lett.**, v.261, p.80–87, 2006.

LACHER, D.W. et al. Molecular evolution of typical enteropathogenic *Escherichia coli*: clonal analysis by multilocus sequence typing and virulence gene allelic profiling. **J Bacteriol.**, v.189, n.2, p.342–350, 2007.

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

LANG, C. et al. Novel type of pilus associated with a Shiga-toxigenic *E. coli* hybrid pathovar conveys aggregative adherence and bacterial virulence. **Emerg Microbes Infect.**, v.7, n.1, p.203, 2018.

LAW, R.J. et al. In vitro and in vivo model systems for studying enteropathogenic *Escherichia coli* infections. **Cold Spring Harb Perspect Med.**, v.3, p.9977, 2013.

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

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

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

LEVINE, M.M. et al. *Escherichia coli* strains that cause diarrhea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. **Lancet.**, v.1, n.8074, p.1119-1122.

LIESCHKE, G.J.; CURRIE, P.D. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. **Nat Rev Genet.**, v.8, n.5, p.353-367, 2007.

LIESCHKE, G.J.; TREDE, N.S. Fish immunology. **Curr Biol**, v.19, p.678-682, 2009.

LINDBERG, F.; LUND, B.; NORMARK, S. Gene products specifying adhesion of uropathogenic *Escherichia coli* are minor components of pili. **Proc Natl Acad Sci.**, v.83, n.6, p.1891-1895, 1986.

LIU, X. et al. Role of intestinal inflammation in predisposition of *Edwardsiella tarda* infection in zebrafish (*Danio rerio*). **Fish Shellfish Immunol.**, v.41, n.2, p.271-278, 2014.

LOZER, D.M. et al. Genotypic and phenotypic analysis of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from Brazilian children living in low socioeconomic level communities. **BMC Infect Dis.**, v.13, p.418, 2013.

LUGO-VILLARINO, G. et al. Identification of dendritic antigen-presenting cells in the zebrafish. **Proc Natl Acad Sci.**, v.107, p.15850-15855, 2010.

MAHAJAN, A. et al. An investigation of the expression and adhesin function of H7 flagella in the interaction of *Escherichia coli* O157: H7 with bovine intestinal epithelium. **Cell Microbiol.**, v.11, n.1, p.121-37, 2009.

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

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

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

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

McWILLIAMS, B.D.; TORRES, A.G. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Adhesins. **Microbiol. Spectr.**, v. 2, n.3, p. 1-19 ,2014.

MEEKER, N.D.; TREDE, N.S. Immunology and zebrafish: spawning new models of human disease. **Dev Comp Immunol.**, v.32, p.745-757, 2008.

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

MEIJER, A.H. et al. Transcriptome profiling of adult zebrafish at the late stage of chronic tuberculosis due to *Mycobacterium marinum* infection. **Mol. Immunol.**, v.42, p. 1185-1203, 2005.

MEIJER, A.H. et al. Expression analysis of the Toll-like receptor and TIR domain adaptor families of zebrafish. **Mol Immunol.**, v. 40, p. 773-783, 2004.

MILLER, J.D.; NEELY, M.N. Large-scale screen highlights the importance of capsule for virulence in the zoonotic pathogen *Streptococcus iniae*. **Infect Immun.**, v. 73, n. 2, p. 921-934, 2005.

MIONE, M. et al. Disease modeling in zebrafish: cancer and immune responses--a report on a workshop held in Spoleto, Italy, July 20-22, 2009. **Zebrafish**, v. 6, p. 445-451, 2009.

MOGENSEN, T.H. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. **Clin Microbiol Ver.**, v. 22, p. 240-273, 2009.

MOSTOWY, S. et al. The zebrafish as a new model for the in vivo study of *Shigella flexneri* interaction with phagocytes and bacterial autophagy. **PLoS Pathog.**, v. 9, n. 9, p. e1003588, 2013.

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

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

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

MOREIRA, C.G. et al. Bundle-forming pili and EspA are involved in biofilm formation by enteropathogenic *Escherichia coli*. **J Bacteriol.**, v. 188, n. 11, p. 3952-3961, 2006.

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

MORTEZAEI, N. et al. Biomechanical and structural features of CS2 fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Biophys J.**, v. 109, n. 1, p. 49-56, 2015.

MULVEY, M.A. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. **Cell Microbiol.**, v. 4, n. 5, p. 257-271, 2002.

MUNHOZ, D.D. et al. Distribution of Major Pilin Subunit Genes Among Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* and Influence of Growth Media on Expression of the *ecp* operon. **Front Microbiol.**, v.9, p. 942, 2018.

**MURPHY, K.C.; CAMPellone, K.G. Lambda Red-mediated recombinogenic engineering of enterohemorrhagic and enteropathogenic *E. coli*. BMC Mol Biol.**, v. 4, p. 11, 2003.

NALBANT, P. et al. Functional characterization of a Na<sup>+</sup>-phosphate cotransporter (NaPi-II) from zebrafish and identification of related transcripts. **J Physiol.**, v.520, n. 1, p. 79-89, 1999.

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

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

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

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

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

NAVARRO-GARCIA, F. *Escherichia coli* O104:H4 pathogenesis: an enteroaggregative *E. coli*/Shiga toxin-producing *E. coli* explosive cocktail of high virulence. **Microbiol. Spectr.**, v.2, n. 6, p. 1- 19, 2014.

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

NEELY, M.N.; PFEIFER, J.D.; CAPARON, M. *Streptococcus*-zebrafish model of bacterial pathogenesis. **Infect Immun.**, v. 70, p. 3904–3914, 2002.

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

NEVES, B.C. et al. CesD2 of enteropathogenic *Escherichia coli* is a second chaperone for the type III secretion translocator protein EspD. **Infect Immun.**, v. 71, n. 4, p. 2130-2141, 2003.

NUCCIO, S.P.; BÄUMLER, A.J. Evolution of the chaperone/usher assembly pathway: fimbrial classification goes Greek. **Microbiol Mol Biol Rev.**, v. 71, n. 4, p. 551-575, 2007.

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

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

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

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

OCHOA, T.J. et al. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, v. 102, p. 852–856, 2008.

OCHOA, T.J.; CONTRERAS, C.A. Enteropathogenic *Escherichia coli* infection in children. **Curr Opin Infect Dis.**, v. 24, n. 5, p. 478-483, 2011.

ØRSKOV, F. et al. Clonal relationships among classic enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) belong to different O groups. **J Infect Dis.**, v. 162, n. 1, p. 76–81, 1990.

PAGE, L. et al. Bigh3 is upregulated in regenerating zebrafish fin. **Zebrafish.**, v. 10, n. 1, p. 36-42, 2013.

PARTHASARATHY, G.; YAO, Y.; KIM, K.S. Flagella promote *Escherichia coli* K1 association with and invasion of human brain microvascular endothelial cells. **Infect Immun.**, v. 75, n. 6, p. 2937-2945, 2007.

PATON, J. C.; PATON, A. W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, p.450–479,1998.

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

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

PHELPS, H.A.; NEELY, M.N. Evolution of the zebrafish model: from development to immunity and infectious disease. **Zebrafish.**, v. 2, p. 87-103, 2005.

PHAM, L.N. et al. Methods for generating and colonizing gnotobiotic zebrafish. **Nat Protoc.**, v. 3, p. 1862-1875, 2008.

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

PRAGER, R. et al. Two novel EHEC/EAEC hybrid strains isolated from human infections. **PLoS ONE.**, v.9, p. e95379, 2014.

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

RAWLS, J.F.; SAMUEL, B.S.; GORDON, J.I. Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 101, p. 4596-4601, 2004.

REDDY, K.V.; YEDERY, R.D.; ARANHA C. Antimicrobial peptides: premises and promises. **Int J Antimicrob Agents.**, v. 24, n. 6, p. 536-547, 2004.

REDIERS, H. et al. Unraveling the secret lives of bacteria: use of in vivo expression technology and differential fluorescence induction promoter traps as tools for exploring niche-specific gene expression. **Microbiol Mol Biol Rev.**, v. 69, n. 2, p. 217-261, 2005.

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

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

RIBIĆ, R, et al. Effective anti-adhesives of uropathogenic *Escherichia coli*. **Acta Pharm.**, v. 68, n. 1, p. 1-18, 2018.

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

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

RITCHIE, J.M. Animal models of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection. **Microbiol Spectr.**, v2, 2014.

RITCHIE, J.M. et al. Critical roles for stx2, eae, and tir in enterohemorrhagic *Escherichia coli*-induced diarrhea and intestinal inflammation in infant rabbits. **Infect Immun.**, v. 71, p. 7129 – 7139, 2003.

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

ROMÃO, F.T. et a. Complete Genome Sequence of *Escherichia albertii* Strain 1551-2, a Potential Extracellular and Intracellular Pathogen. **Genome Announc.**, v. 6, n. 9, p. e00075-18, 2018.

ROMBOUT, J.H. et al. Coexistence of PP- and glucagon-like-immunoreactivity in endocrine cells of gut and pancreas of mouse and a stomachless fish *Barbus conchoni*. **Cell Biol Int Rep.**, v. 9, n. 6, p. 520, 1985.

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

SACHDEVA, G. et al. SPAAN: a software program for prediction of adhesins and adhesin-like proteins using neural networks. **Bioinformatics.**, v. 21, n. 4, p. 483-491, 2005.

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

SAKKEJHA, H. et al. An update on the microbiology and epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* in England 2010-2012. **J Med Microbiol.**, v. 62, p. 1531–1534, 2013.

SALDAÑA, Z. et al. Production of the *Escherichia coli* Common Pilus by Uropathogenic *E. coli* Is Associated with Adherence to HeLa and HTB-4 Cells and Invasion of Mouse Bladder Urothelium. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. e101200, 2014.

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

bSALDAÑA, Z. et al. The *Escherichia coli* common pilus and the bundle-forming pilus act in concert during the formation of localized adherence by enteropathogenic *E. coli*. **J Bacteriol.**, v. 191, n. 11, p. 3451-3461, 2009.

SAMADDER, P. et al. The *Escherichia coli* ycbQRST operon encodes fimbriae with laminin-binding and epithelial cell adherence properties in Shiga-toxigenic *E. coli* O157:H7. **Environ Microbiol.**, v. 11, n. 7, p. 1815-1826, 2009.

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

SÁNCHEZ-SANMARTÍN, C. et al. Transcriptional regulation of the orf19 gene and the tir-cesT-eae operon of enteropathogenic *Escherichia coli*. **J Bacteriol.**, v. 183, n. 9, p. 2823-2833, 2001.

SANSONETTI, P.J.; KOPECKO, D.J.; FORMAL, S.B. Involvement of a plasmid in the invasive ability of *Shigella flexneri*. **Infect Immun.**, v. 35, p. 852–860, 1982.

SANTOS, A. FINLAY, B.B. Bringing down the host: enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* effector-mediated subversion of host innate immune pathways. **Cell Microbiol.**, v. 17, n. 3, p. 318–332, 2015.

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

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

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

SCALETISKY, I.C. et al. A localized adherence-like pattern as a second pattern of adherence of classic enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells that is associated with infantile diarrhea. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 7, p. 3410–3415, 1999.

SCALETISKY, I.C.A. et al. Evidence of pathogenic subgroups among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. **J Clin Microbiol.**, v. 47, n. 11, p. 3756–3759, 2009.

SCALETISKY, I. C. et al. 2010. Adherence factors in atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains expressing the localized adherence-like pattern in HEp-2 cells. **J. Clin. Microbiol.**, v. 48, p. 302– 306, 2009.

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

SEEMANN, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics**, v. 30, n. 14, p. 2068-2069, 2014.

SEKIYA, K. et al. Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 98, n. 20, p. 11638-11643, 2001.

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

SHEIKH, J. et al. Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. **Mol Microbiol.**, v. 41, p. 983–997, 2001.

SINGH, P. et al. Characterization of enteropathogenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle and deer in a shared agroecosystem. **Front Cell Infect Microbiol.**, v. 5, p. 29, 2015.

SJÖSTRÖM, A.E. et al. Analysis of the *sfaX* (II) locus in the *Escherichia coli* meningitis isolate IHE3034 reveals two novel regulatory genes within the promoter-distal region of the main S fimbrial operon. **Microb Pathog.**, v. 46, n. 3, p. 150-158, 2009.

SOUTOURINA, O. et al. Multiple control of flagellum biosynthesis in *Escherichia coli*: role of H-NS protein and the cyclic AMP-catabolite activator protein complex in transcription of the *flhDC* master operon. **J Bacteriol.**, v. 181, n. 24, p. 7500-7508, 1999.

STACY, A.K. et al. Evaluation of the Prevalence and Production of *Escherichia coli* Common Pilus among Avian Pathogenic *E. coli* and Its Role in Virulence. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e86565, 2014.

STAPLES, M. et al. Molecular epidemiological typing of enteropathogenic *Escherichia coli* strains from Australian patients. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v. 75, p. 320–324, 2013.

STOCKHAMMER, O.W. et al. Transcriptome profiling and functional analyses of the zebrafish embryonic innate immune response to *Salmonella infection*. **J Immunol.**, v. 182, p. 5641-5653, 2009.

STONE, K.D. et al. A cluster of fourteen genes from enteropathogenic *Escherichia coli* is sufficient for the biogenesis of a type IV pilus. **Mol Microbiol.**, v. 20, n. 2, p. 325-337, 1996.

STONES, D.H. et al. Zebrafish (*Danio rerio*) as a vertebrate model host to study colonization, pathogenesis, and transmission of foodborne *Escherichia coli* O157. **mSphere**, v. 2, p. e00365-17, 2017.

SUH, J.S.; HAHN, W.H.; CHO, B.S. Recent Advances of Oral Rehydration Therapy (ORT). **Electrolyte Blood Press.**, v. 8, n. 2, p. 82-86, 2010.

SULLIVAN, C.; KIM, C.H. Zebrafish as a model for infectious disease and immune function. **Fish Shellfish Immunol.**, v. 25, p. 341-350, 2008.

TENNANT, S. M. et al. Characterisation of atypical enteropathogenic *E. coli* strains of clinical origin. **BMC Microbiol.**, v. 9, p. 117, 2009.

THANASSI, D.G.; BLISKA, J.B.; CHRISTIE, P.J. Surface organelles assembled by secretion systems of Gram-negative bacteria: diversity in structure and function. **FEMS Microbiol Rev.**, v. 36, n. 6, p. 1046-1082, 2012.

TOMA, C. et al. The long polar fimbriae genes identified in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* are present in other diarrheagenic *E. coli* and in the standard *E. coli* collection of reference (ECOR) strains. **Res Microbiol.**, v. 157, n. 2, p. 153-161, 2006.

TORRES, AG.; ARENAS-HERNÁNDEZ, M.; MARTÍNEZ-LAGUNA, Y. Overview of *Escherichia coli*. In: Torres, AG., editor. Pathogenic *Escherichia coli* in Latin. **Bentham Science Publishers Ltd**; America: 2010. p. 1-7.

TORRES, A.G.; ZHOU, X.; KAPER, J.B. Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. **Infect Immun.**, v. 73, n. 1, p. 18-29, 2005.

TORRES, A.G. et al. Characterization of the second long polar (LP) fimbriae of *Escherichia coli* O157:H7 and distribution of LP fimbriae in other pathogenic *E. coli* strains. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 238, n. 2, p. 333-344, 2004.

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

TOZZOLI, R.; SCHEUTZ, F. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* Infections in Humans. In: Morabito, S., editor. Pathogenic *Escherichia coli*. **Caister Academic Press.**, p. 1-18, 2014.

TRABULSI, L.R. et al. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerg Infect Dis.**, v. 8, p. 508–513, 2002.

TRAVER, D. et al. The zebrafish as a model organism to study development of the immune system. **Adv Immunol.**, v.81, p. 253-330, 2003.

TREDE, N.S. et al. The use of zebrafish to understand immunity. **Immunity**, v. 20, p. 367-379, 2004.



TREDE, N. et al. Model systems for infectious disease and cancer in zebrafish: a report on an EMBO workshop held at the Lorentz Center, Leiden, The Netherlands, July 16-18, 2007. **Zebrafish**, v. 4, p. 287-292, 2007.

VAN DER SAR, A.M. et al. A star with stripes: zebrafish as an infection model. **Trends Microbiol.**, v. 12, p. 451-457, 2004.

VARAS, M. et al. *Salmonella Typhimurium* induces cloacitis-like symptoms in zebrafish larvae. **Microb Pathog.**, v. 107, p. 317-320, 2017.

VENEMAN, W.J. et al. A zebrafish high throughput screening system used for *Staphylococcus epidermidis* infection marker discovery. **BMC Genomics**, v. 14, p. 255, 2013.

VIEIRA, M.A.M., et al. Phenotypic and genotypic characteristics of *Escherichia coli* strains of non-enteropathogenic *E. coli* (EPEC) serogroups that carry *eae* and lack the EPEC adherence factor and Shiga toxin DNA probe sequences. **J. Infect. Dis.**, v.183, p. 762–772, 2001.

WADOLKOWSKI, E.A.; BURRIS, J.A.; O'BRIEN, A.D. Mouse model for colonization and disease caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Infect Immun.**, v. 58, p. 2438–2445, 1990.

WAKSMAN, G. Structural and Molecular Biology of a Protein-Polymerizing Nanomachine for Pilus Biogenesis. **J Mol Biol.**, v. 429, n. 17, p. 2654-2666, 2017.

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

WALLACE, K.N.; PACK, M. Unique and conserved aspects of gut development in zebrafish. **Dev Biol.**, v. 255, n. 1, p. 12-29, 2003.

WALLACE, K.N. et al. Intestinal growth and differentiation in zebrafish. **Mech Dev.**, v. 122, n. 2, p. 157-173, 2005.

WANG, Z. et al. Morphological and molecular evidence for functional organization along the rostrocaudal axis of the adult zebrafish intestine. **BMC Genomics**, v. 11, p. 392, 2010.

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

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

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

WERNEBURG, G.T.; THANASSI, D.G. Pili Assembled by the Chaperone/Usher Pathway in *Escherichia coli* and *Salmonella*. **EcoSal Plus**, v. 8, n. 1, p. 1-84, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Diarrhoeal disease**. Mar. 2017. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>> Acesso em: 18 Dez. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Levels and trends in child mortality report 2018**. n. 48, 2018. Disponível em: <[https://www.who.int/maternal\\_child\\_adolescent/documents/levels\\_trends\\_child\\_mortality\\_2018/en/](https://www.who.int/maternal_child_adolescent/documents/levels_trends_child_mortality_2018/en/)> Acesso em: 18 Dez. 2019.

WILES, T.J. et al. Host Gut Motility Promotes Competitive Exclusion within a Model Intestinal Microbiota. **PLoS Biol.**, v. 14, n. 7, p. e1002517, 2016.

WILES, T.J. et al. Use of Zebrafish to Probe the Divergent Virulence Potentials and Toxin Requirements of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. **PLoS Pathog.**, v. 5, n. 12, p. e1000697, 2009.

WILES, T.J.; KULESUS, R.R.; MULVEY, M.A. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. **Exp Mol Pathol.**, v. 85, n. 1, p. 11-19, 2008.

WILLIS, A.R. et al. Injections of Predatory Bacteria Work Alongside Host Immune Cells to Treat *Shigella* Infection in Zebrafish Larvae. **Curr Biol.**, v. 26, n. 24, p. 3343-3351, 2016.

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

WRIGHT, K.J.; HULTGREN, S.J. Sticky fibers and uropathogenesis: bacterial adhesins in the urinary tract. **Future Microbiol.**, v. 1, n. 1, p. 75-87, 2006.

XICOHTENCATL-CORTES, J. et al. Intestinal adherence associated with type IV pili of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **J Clin Invest.**, v. 117, n. 11, p. 3519-3529, 2007.

XU, Y. et al. Genetic Diversity of Intimin Gene of Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Isolated from Human, Animals and Raw Meats in China. **PLoS One.**, v. 11, n. 3, p. e0152571, 2016.

ZHANG, Y.A. et al. IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. **Nat. Immunol.**, v. 11, p. 827-835, 2010.

ZAPATA, A. et al. Ontogeny of the immune system of fish. **Fish Shellfish Immunol.**, v. 20, n. 2, p. 126-136, 2006.

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

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