

**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

## 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

# 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 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 *pInV*, 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

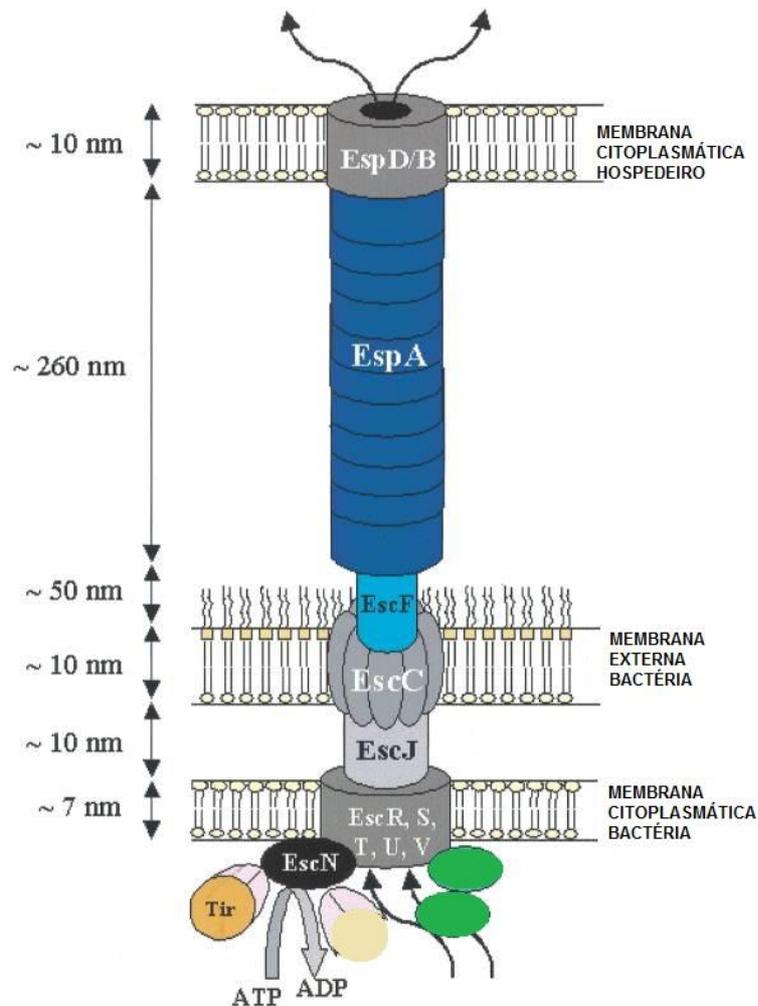
de nutrientes podendo se agravar para escassez nutricional e diarreia persistente (FAGUNDES-NETO; SCALETSKY, 2000).

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.



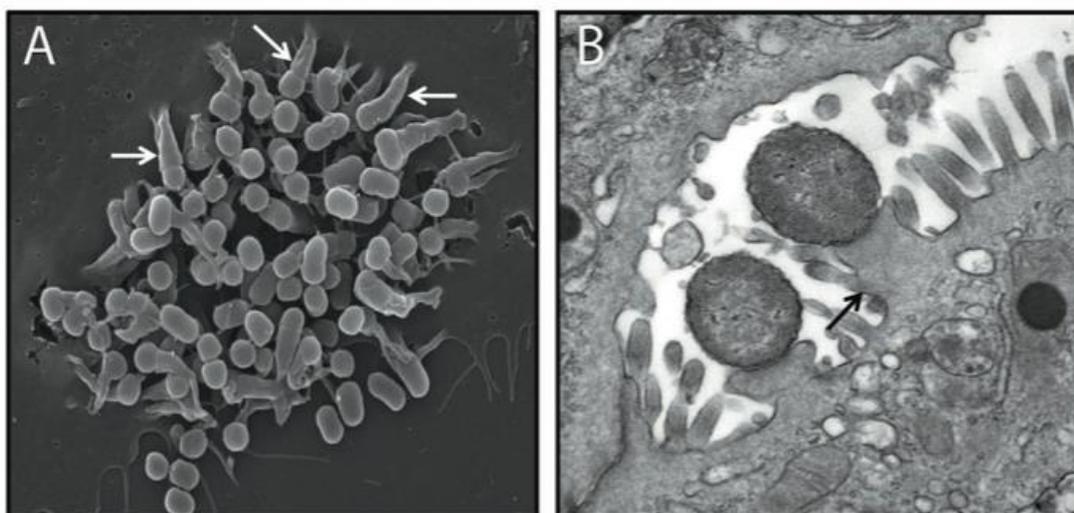
FONTE: Garmendia, Frankel e Krepin, 2005

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 envoltas 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; SCALETISKY et al., 2009).

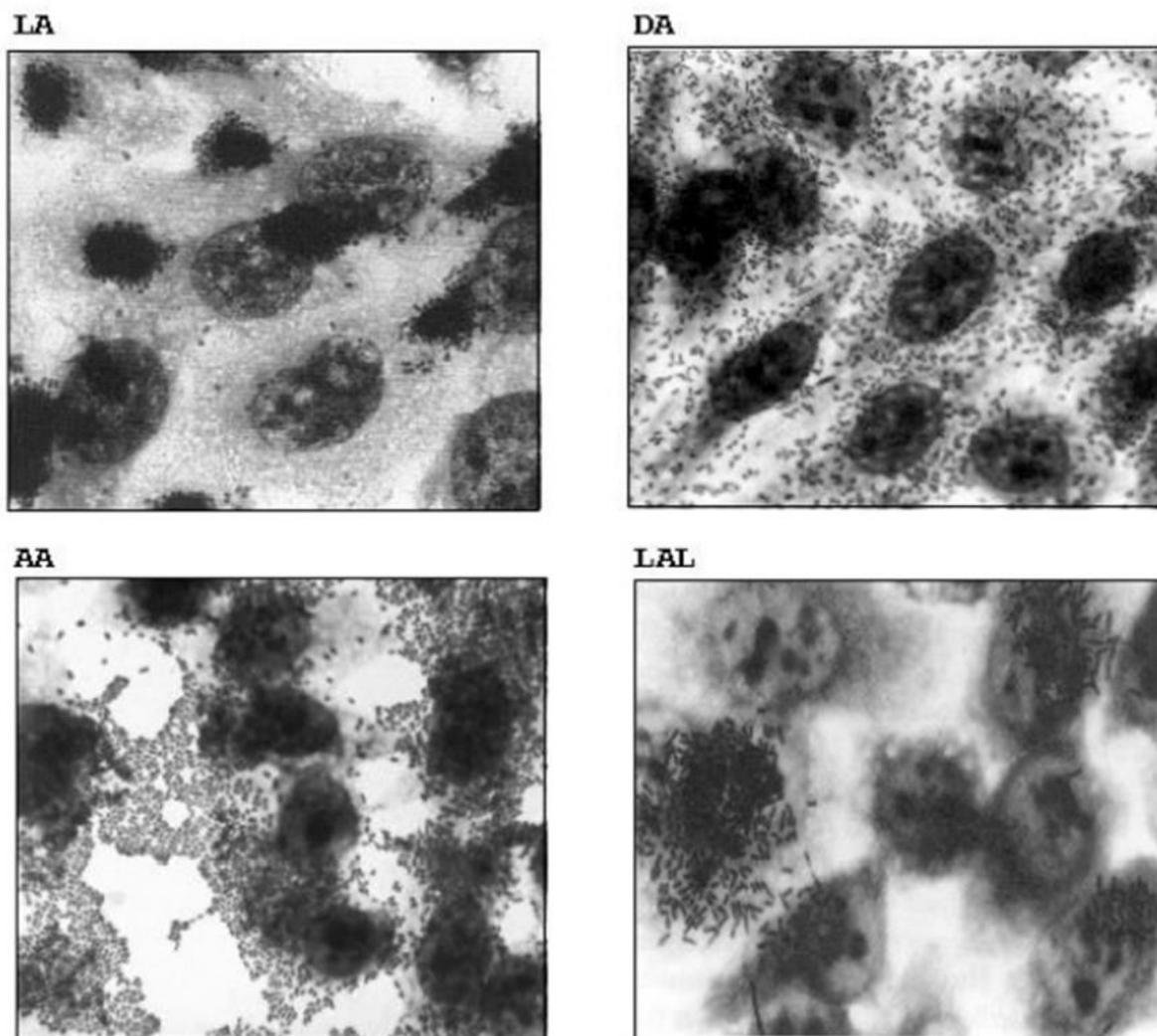
Infecções por tEPEC tendem a diminuir de acordo com a idade, sendo raramente reportada em adultos. A causa desta resistência em adultos e crianças mais velhas foi atribuída a perda de receptores específicos com o envelhecimento e com o desenvolvimento de imunidade. Por outro lado, aEPEC tem sido detectada 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 (SCALETISKY 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; SCALETSKY 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; McGUCKIN 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; CZECHULIN 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.

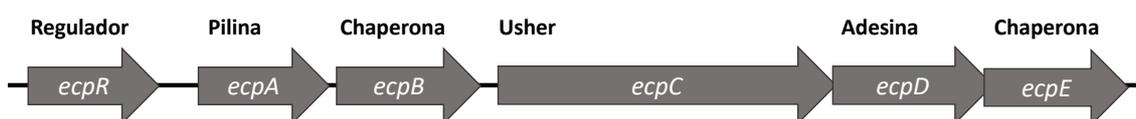
### **1.5. *E. coli common pilus***

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*.

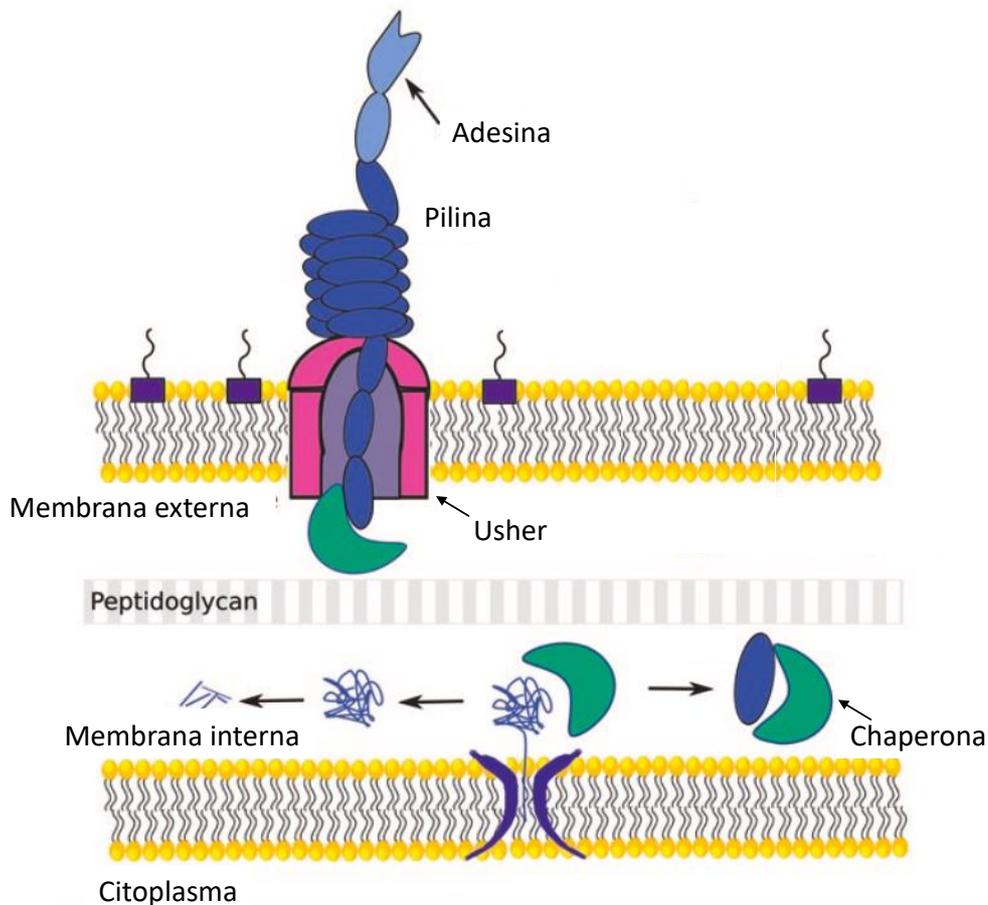


O sistema chaperona/*usher* é uma via de montagem que vem sendo bastante estudada nas últimas décadas (WAKSMAN; HULTGREN, 2009; ZAV'YALOV et al., 2010). As fímbrias secretadas por este mecanismo são compostas por subunidades de aproximadamente 8 nm de largura e 2 nm de comprimento, ligadas a uma base 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 chaperona/*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).

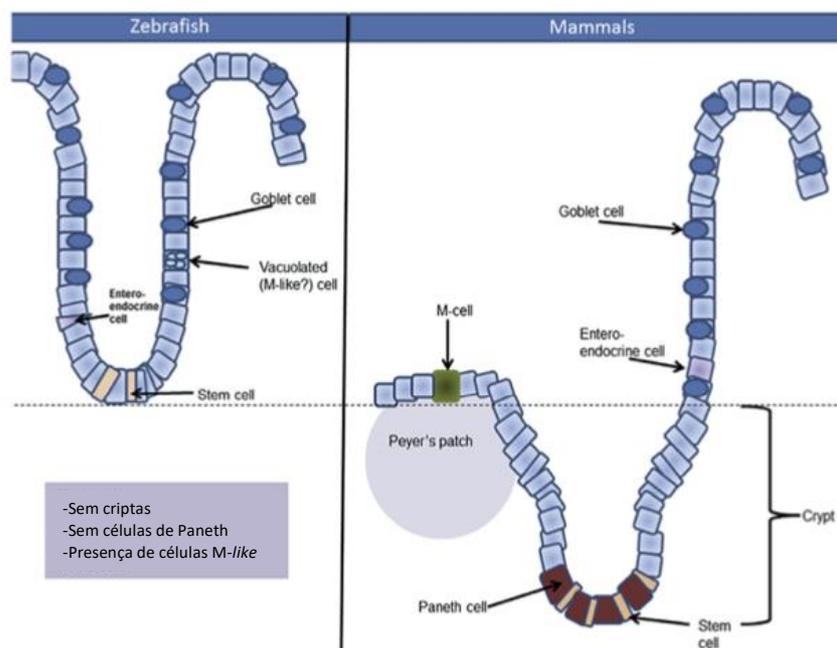
Até o momento já foram descritos três tipos de classes de imunoglobulina no *zebrafish*. Por muito tempo, pensou-se que estes animais possuíam apenas IgM e IgD, mas Danilova e colegas (2005) relataram uma imunoglobulina adicional que eles denominaram IgT. Estudos realizados por Zhang e colaboradores (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. 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 Comparative 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 (*ae*, *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.

FRANCETIĆ, 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 proteinsof 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 fimbriin 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 al. 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 conchoniensis*. **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.