

**MARCELA DIOGO DE SOUZA**



**INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DE POSSÍVEIS AMILOIDES  
BACTERIANOS NO BIOFILME DE *Bacteroides fragilis***

**Monografia apresentada ao Instituto de  
Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade  
Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito  
para a obtenção do grau de Bacharel em  
Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
RIO DE JANEIRO  
DEZEMBRO/ 2018**

**Trabalho realizado no Departamento de  
Microbiologia Médica, do Instituto de  
Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ,  
sob a orientação do Professor Leandro  
Araujo Lobo e Coorientação da Doutoranda  
Scarlathe Bezerra da Costa.**

## CIP - Catalogação na Publicação

719i Diogo de Souza, Marcela  
INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DE POSSÍVEIS AMILOIDES  
BACTERIANOS NO BIOFILME DE *Bacteroides fragilis* /  
Marcela Diogo de Souza. -- Rio de Janeiro, 2018.  
60 f.

Orientador: Leandro Araujo Lobo.  
Coorientadora: Scarlathe Bezerra da Costa .  
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto  
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:  
Microbiologia e Imunologia, 2018.

1. Bacteroide fragilis . 2. Amiloides  
Bacterianos. 3. Microbioma gastrointestinal . 4.  
Doenças neurodegenerativas. I. Araujo Lobo, Leandro,  
orient. II. Bezerra da Costa , Scarlathe ,  
coorient. III. Título.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ  
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO  
NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,  
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E  
IMUNOLOGIA

ALUNO: **Marcela Diogo de Souza**

DRE: 115026834

BANCA EXAMINADORA: Prof. André Luis Souza dos Santos (Presidente)  
Profa. Tatiana de Castro Abreu Pinto  
Dr. Felipe Lopes Teixeira  
MSc. Thaís Glatthardt da Silva dos Santos (Suplente)

Título da Monografia: "Investigação da presença de possíveis amiloides bacterianos na formação do biofilme de *Bacteroides fragilis*"

Local: **Sala D-27** / Instituto de Microbiologia Paulo de Góes / CCS / UFRJ

Data e hora de início: **7 de dezembro de 2018 às 14:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 7 de dezembro de 2018.

NOTA

10,0

10,0

10,0

Banca Examinadora:

André Luis Souza dos Santos  
Prof. André Luis Souza dos Santos

Tatiana de Castro Abreu Pinto  
Profa. Tatiana de Castro Abreu Pinto

Felipe Lopes Teixeira  
Dr. Felipe Lopes Teixeira

MSc. Thaís Glatthardt da Silva dos Santos  
MSc. Thaís Glatthardt da Silva dos Santos

Aluno:

Marcela Diogo de Souza  
Marcela Diogo de Souza

Orientador:

Prof. Leandro Araújo Lobo  
Prof. Leandro Araújo Lobo

Coorientador:

Scarlathe Bezerra da Costa  
MSc. Scarlathe Bezerra da Costa

Coordenador  
de TCC

Prof. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho  
Prof. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

**Aos meus pais Neide e Rogerio, com todo meu carinho.**

## AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus por ter me dado a oportunidade de estar aonde cheguei. Agradeço aos meus pais por serem minha base, meus maiores incentivadores e Porto seguro em todos os momentos de minha vida. Agradeço à minha irmã por ser meu exemplo de perseverança e busca de conhecimento constante. Agradeço aos meus tios, meus primos e minha querida avó por todo apoio incentivo, abraços e carinho. Agradeço ao meu noivo, por ser meu grande amigo, incentivador, ajudante em todas as etapas de minha formação.

Agradeço aos meus amigos de turma pelos anos de conhecimento compartilhado. Em especial agradeço à Carol por ser meu momento de paz dentro de tantos turbilhões passados. Sempre com uma palavra de incentivo que me animava. Agradeço à Gabi por ser minha companheira de desesperos e momentos de esperança de que no final, realmente tudo dá certo rs. Agradeço à Kobaye, por ser um exemplo de força e coragem. Tenho muito orgulho de você.

Agradeço ao meu orientador por ter me acolhido tão bem e por me dar a oportunidade de trabalhar com a pesquisa que amo. Obrigada por todo apoio e paciência! Agradeço à minha coorientadora e grande amiga Scar, por ser minha base no laboratório. Eu deveria ficar horas te agradecendo por todo o nosso dia a dia. Você foi fundamental nas etapas do projeto. Muito obrigada por todo apoio, carinho, incentivo, abraços, bolo de chocolate, artigos com referências mais novas e tantas e tantas coisas que fez e faz por mim! Agradeço à Karlinha por ter toda paciência. Você me recebeu de braços abertos quando ainda não tinha experiência nenhuma de laboratório e foi me ajudando a descobrir o meu eu cientista. Muito obrigada!

Agradeço à Mari por todas as etapas iniciais do projeto e por todo conhecimento compartilhado. Agradeço à prof<sup>a</sup> Regina por ser uma mãe para todos no lab. Só o seu sorriso já nos deixa bem, mas seu abraço quando chega, com certeza faz toda a diferença no nosso dia. Agradeço à Dede por estar sempre preocupada comigo e com o andamento do projeto. Por ter ideias que foram essências para o andamento do mesmo. Olha, você é a melhor fotógrafa de microscopia, não tenho dúvidas rs. Agradeço à minha gigante Gio, que com a sua doçura conquistou meu coração. Obrigada pelas conversas de reflexão de vida e todo carinho. Obrigada pelos conhecimentos de informática e tecnologia que atualizam a velhinha que tenho dentro de mim rs. Agradeço à Heidi por compartilhar comigo seu conhecimento e experiência, por todo carinho, paciência e me acalmar nos momentos de desespero. Agradeço à Isa pelos conhecimentos de biofilme compartilhados e todo incentivo e apoio. Agradeço à Lili pelas contribuições científicas e também de vida, pelas dicas de viagens e pelas receitas maravilhosas. Agradeço ao Quim por toda ajuda no laboratório e implicância que deixa meu dia mais leve. Agradeço à Renatinha e Kelly por salvarem meus últimos experimentos e me acalmarem nos momentos de desespero! Agradeço à Drika, Ju Soares, May, Karinne, Camilla, Eduardo, Lucindo e todos do lab pelas horas de descontração no almoço e por aguentarem minha risada ligeiramente alta. Muito obrigada a todos!

Agradeço à banca avaliadora prof André e prof<sup>a</sup> Tatiana por aceitarem meu convite e todas as contribuições e dicas na defesa do plano. Agradeço ao Dr Felipe pelo conhecimento passado e por aceitar meu convite da banca. Por fim, agradeço a todos os professores que já passaram pela minha vida desde o início de minha formação até agora. Com certeza carrego comigo um pedacinho de cada um deles

**“Quando não há mais certezas possíveis, só o amor sabe o que é verdade”**

**Para sempre Alice.**

## RESUMO

MARCELA DIOGO DE SOUZA

### INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DE POSSÍVEIS AMILOIDES BACTERIANOS PRESENTE NA FORMAÇÃO DO BIOFILME DE *Bacteroides fragilis*

Orientador: Leandro Araujo Lobo

Coorientadora: Scarlathe Bezerra da Costa

A microbiota é adquirida no nascimento onde ocorre a colonização do indivíduo por bactérias que, em sua maioria, são benéficas para o desenvolvimento do recém-nascido. A microbiota intestinal, por exemplo, é composta por uma gama de espécies de microrganismos e desempenha, coletivamente, diferentes funções no hospedeiro. Estudos de metabolômica revelaram que metabólitos bacterianos produzidos no intestino, tais como substâncias neurotransmissoras, LPS e amiloides podem influenciar no funcionamento do sistema nervoso central através da resposta imunológica, sinalização direta pelo nervo vago ou atravessando diretamente a barreira hemato-encefálica. A partir dessa constatação, surgiu o termo “eixo cérebro-intestino-microbiota”, no qual desequilíbrios nessa microbiota bem como a presença de neurotoxinas inflamatórias no lúmen intestinal passaram a ser observados nas doenças neurodegenerativas. Na literatura muito se tem descrito sobre os amiloides bacterianos presentes na formação de biofilme das enterobactérias, principalmente em *Escherichia coli*. No entanto, outras bactérias como os *Bacteroides* sp. também podem apresentar essa proteína, mas pouco se sabe sobre os amiloides produzidos por esse gênero na nossa microbiota intestinal. Sendo assim, o objetivo deste trabalho é determinar a presença e caracterizar potenciais amiloides bacterianos presente na formação do biofilme de cepas da espécie *Bacteroides fragilis* isoladas tanto da microbiota saudável como de bacteremias. Para tanto, foi realizada a indução da formação de biofilme por essa bactéria com intuito de investigar a composição dessa estrutura. Observou-se que a adição de proteinase K diminuiu significativamente a produção do biofilme, indicando que provavelmente esse biofilme é composto por proteínas. Além disso, quando a formação de biofilme foi induzida em placas de BHI suplementadas com sacarose 20% contendo o corante vermelho congo, observou-se a presença de amiloides a partir do aparecimento de uma coloração enegrecida. Todas as cepas investigadas no estudo apresentaram cápsula, de acordo com a coloração de nanquim contrastada com fucsina. A partir das análises de bioinformática pode-se observar que o *B. fragilis* possivelmente apresentam proteínas que são potenciais amiloides. Com esses resultados pode-se presumir que a bactéria estudada no presente estudo eventualmente apresenta amiloide na formação do biofilme quando relacionada à patologia.

Palavras chave: *Bacteroides fragilis*, amiloides bacterianos, microbiota intestinal.



**ABSTRACT****MARCELA DIOGO DE SOUZA****INVESTIGATION OF THE PRESENCE OF POSSIBLE BACTERIAL AMYLOIDS  
PRESENT IN THE BIOFILME OF FORMATION OF *BACTEROIDES FRAGILIS***

Orientador: Leandro Araujo Lobo  
Coorientadora: Scarlathe Bezerra da Costa

The microbiota is acquired at birth where the colonization of the individual occurs by bacteria that, for the most part, are beneficial to the development of the newborn. The intestinal microbiota, for instance, is composed by a range of microorganismsspecies and collectively plays different roles in the host. Metabolomics studies have revealed that bacterial metabolites produced in the gut, such as neurotransmitter substances, LPS and amyloids can influence central nervous system functioning through immune response, direct signaling by the vagus nerve or directly crossing the blood-brain barrier. From this finding, the term "brain-intestine-microbiota axis" appeared, in which imbalances in this microbiota as well as the presence of inflammatory neurotoxins in the intestinal lumen began to be observed in neurodegenerative diseases. In the literature, much has been described regarding the bacterial amyloids present in the biofilm formation of enterobacteria, especially *Escherichia coli*. However, other bacteria such as *Bacteroides* sp. may also present this protein, but little is known about the amyloid produced by this genus so abundant in our intestinal microbiota. Therefore, the aim of this work was to determine the presence and characteristics of potential bacterial amyloids present in biofilm formation of *Bacteroidesfragilis* strains isolated from healthy microbiota and bacteremias. For this, the induction of biofilm formation by this bacterium was carried out in order to investigate the composition of this structure. It was observed that the addition of proteinase K significantly decreased biofilm production, indicating that this biofilm is probably composed of proteins. In addition, when biofilm formation was induced on BHI plates supplemented with 20% sucrose containing the Congo red dye, the presence of amyloid was observed from the appearance of a blackish color. All the strains investigated in the study presented capsule. From the analysis of bioinformatics it can be observed that *B. fragilis* possibly present proteins that are potential amyloids. With these results it can be presumed that the bacterium studied eventually presents amyloid in the formation of the biofilm when related to the pathology.

Keywords: *Bacteroides fragilis*, bacterial amyloids, intestinal microbiota.

**LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1:** Observação da possível presença de estruturas amiloides em biofilme de *B. fragilis* formado em placa .....28
- Figura 2:** Avaliação da presença de cápsula em amostras de *B. fragilis* .....29
- Figura 3:** Microscopia de fluorescência do biofilme de *B. fragilis*.....29

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1:</b> Amostras usadas no estudo .....	20
<b>Tabela 2:</b> Resultado das proteínas que mais se assemelham com os amiloides já estabelecidos na literatura.....	31
<b>Tabela 3:</b> Resumo dos resultados .....	33

**LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

AGCCs - Ácidos Graxos de Cadeia Curta

APP - Proteína Precursora de  $\beta$ -amiloide

A $\beta$  -  $\beta$ -amiloide

BFT – Toxina de *B. fragilis* (*Bacteroides fragilis toxin*)

BHE - Barreira Hematoencefálica

BHI – Infusão de cérebro e coração (*Brain Heart Infusion*)

CFH - Fator de Complemento-H

COX-2 - Ciclo-Oxigenase-2

DNA- Ácido desoxirribonucleico (*Deoxiribonucleic acid*)

EGFR - Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico

EMVs - Vesículas da Membrana Externa

EPS - Polímeros Extracelulares

GABA - Ácido Gama- Aminobutírico

HT-5 (5-hidroxitriptamina )- Serotonina

IL6 - Interleucina 6

IL-17 - Interleucina 17

IL-22 - Interleucina 22

LPS - Lipopolissacarídeos

MHC-I - Complexo de Histocompatibilidade principal de Classe I)

mRNA - RNAs mensageiros

MRSA - *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina

NF- $\kappa$  $\beta$  - Fator nuclear kappa  $\beta$

NTBF - *B. fragilis* Não-Enterotoxigênica

PSA - Polissacarídeo A

PSB - Polissacarídeo B

PSMs - Modulinas Solúveis em Fenol

RNA- Ácido ribonucléico (Ribonucleic acid)

SHANK3 - Proteína SH3-prolina

SNC - Sistema Nervoso Central

SNE- Sistema Nervoso Entérico

SPs - Placas Senis

TEA- Transtorno do Espectro Autista

TGF- $\beta$  - Fator de Crescimento  $\beta$

TLR- Receptor do tipo *Toll-like*

TNF- $\alpha$  - Fator de Necrose Tumoral

## ÍNDICE

AGRADECIMENTO.....	vi
RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	x
LISTA DE TABELAS .....	xi
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS .....	xii
1 INTRODUÇÃO .....	3
1.1 Microbiota Intestinal.....	3
1.2 Composição da Microbiota Intestinal Adulta.....	4
1.3 Importantes funções da microbiota intestinal.....	4
1.4 Fatores que alteram a microbiota intestinal.....	5
1.5 Disbiose intestinal e doenças.....	6
1.6 Conexão cérebro-intestino-microbiota.....	7
1.6.1 Nervo vago .....	8
1.6.2 Sistema Nervoso Entérico .....	8
1.6.3 Sistema Imunológico.....	8
1.6.4 Metabólitos Bacterianos .....	9
1.6.5 Amiloides Bacterianos .....	10
1.7 Biofilme bacteriano .....	13
1.8 <i>Bacteroides fragilis</i> .....	14
1.9 Doença de Alzheimer como modelo de estudo da interação microbiana com Sistema Nervoso Central .....	16
2 JUSTIFICATIVA.....	18
3 OBJETIVO .....	19
Objetivo geral .....	19
Objetivos específicos .....	19
4 METODOLOGIA .....	20
4.1 Condições de crescimento das amostras de <i>Bacteroides fragilis</i> .....	20
4.2 Biofilme de <i>B. fragilis</i> .....	21
4.3 Análise da natureza do biofilme de <i>B. fragilis</i> .....	21
4.4 Observação de amiloides bacterianos em <i>B. fragilis</i> .....	22
4.5 Visualização de Cápsula de <i>Bacteroides fragilis</i> .....	22
4.6 Microscopia de fluorescência.....	22
4.7 Análise <i>in silico</i> .....	23
5 RESULTADOS.....	25
5.1 Formação de biofilme de <i>B. fragilis</i> em placa de poliestireno .....	25

5.2	Análise da natureza do biofilme de <i>Bacteroides fragilis</i> .....	26
5.2.1	Tratamento com proteinase K.....	26
5.2.2	Tratamento com metaperiodato de sódio .....	27
5.3	Observação de possíveis amiloides bacterianos em biofilme de <i>B. fragilis</i> .....	28
5.4	Visualização de Cápsula de <i>Bacteroides fragilis</i> .....	29
5.5	Observação da estrutura amiloide por microscopia de fluorescência .....	30
5.6	Análise <i>in silico</i> .....	31
6	DISCUSSÃO .....	35
7	CONCLUSÃO .....	40
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	41

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Microbiota Intestinal

A microbiota residente no corpo humano é adquirida no nascimento a partir da colonização de bactérias que, em sua maioria, são benéficas para o desenvolvimento do recém-nascido. Essa microbiota é transmitida da mãe para o filho durante o nascimento, e o tipo de parto pode ter um grande efeito sobre a composição desta comunidade bacteriana. Por exemplo, em caso de parto normal, bactérias provenientes do canal vaginal da mãe colonizam o bebê e são predominantes no início da vida. Quando ocorre à cesárea, os bebês são colonizados por bactérias provenientes das mãos dos médicos e do ambiente hospitalar, que passam a compor a microbiota em uma proporção acima do esperado. Diversos outros fatores podem afetar a composição da microbiota no início da vida como aleitamento, genética, uso de antimicrobianos entre outros. (Stinson *et al.*, 2017).

Alguns estudos recentes sugerem que o útero possui uma microbiota própria. (Verstraelen *et al.*, 2016). Dessa forma, acredita-se que microrganismos maternos podem colonizar diferentes compartimentos embrionários, mesmo em um desenvolvimento uterino normal, sendo encontrados na placenta (Zhenget *al.*, 2015) e no líquido amniótico (Rautava *et al.*, 2012). Além disso, foi evidenciada a presença de microrganismos no mecônio (Gosalbes *et al.*, 2013). Sendo assim, alguns autores sugerem que a primeira colonização pela microbiota começaria no útero, mas estudos complementares ainda são necessários para comprovar essa afirmação.

O estabelecimento da microbiota do trato gastrointestinal do recém-nascido é influenciado com a passagem do bebê pelo canal vaginal, predominando o gênero *Lactobacillus* sp. (Dominguez-Bello *et al.*, 2010). Novas pesquisas indicam que a presença de *Bifidobacterium* sp, habitando o intestino dos neonatos, é proveniente da microbiota intestinal de suas mães. A colonização inicial por essa bactéria tem um papel importante para o desenvolvimento da microbiota intestinal do recém-nascido, visto que o protege contra agentes patogênicos, contribui para ativação do sistema imune da mucosa e, conseqüentemente, protege contra futuras doenças (Makino *et al.*, 2011; Makino *et al.*, 2013).

Todavia, quando o recém-nascido não tem esse primeiro contato com a mãe, fica propenso a colonização por bactérias da pele da progenitora ou da equipe do hospital, sendo *Staphylococcus* e *Corynebacterium* gêneros mais



predominantes (Toscano *et al.*, 2017). O estabelecimento dessas bactérias no intestino aumentaria a suscetibilidade a patógenos como o *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) (Watson *et al.*, 2006). Outros estudos sugerem que o bebê nascido de cesárea tem maior probabilidade de desenvolver alergias e asma (Bager *et al.*, 2008).

## 1.2 Composição da Microbiota Intestinal Adulta

O tubo digestivo é formado por células epiteliais colunares altamente vascularizadas e inervadas, com cerca de nove metros. Ele é dividido em estômago, intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) e intestino grosso (ceco, cólon, reto e ânus). Cada região é habitada por uma microbiota diferente. O local com maior abundância microbiana é o intestino grosso, especificamente o cólon. (Zhao *et al.*, 20017). A microbiota intestinal do cólon é composta por organismos simbióticos. Sua maior população é de bactérias anaeróbias, mas esse nicho também é povoado por vírus, fungos e arqueas (*HumanMicrobiome Project Consortium*, 2012). Estima-se que o intestino seja habitado por centenas de espécies, a maioria distribuídas em sete diferentes filos. Os filos mais predominantes em termos de abundância são os Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria e Verrucomicrobia (Zhao *et al.*, 2017).

Estudos de metagenômica apontam que na microbiota intestinal pode haver milhões de genes bacterianos, cerca de cem a mil vezes mais que o genoma humano. No entanto, muitos desses genes estão desempenham funções redundantes. A hipótese de que este ecossistema possui uma comunidade de colonizadores centrais permanentes tem sido estudada nos últimos anos. Ao longo da vida adulta ocorrem alterações ambientais na microbiota afetando principalmente a abundância, mas não a presença de espécies microbianas específicas (Sai Manasa *et al.*, 2015).

## 1.3 Importantes funções da microbiota intestinal

A microbiota intestinal desempenha diversas funções no metabolismo dos seres humanos, tais como a absorção de nutrientes, uma vez que o corpo humano não possui algumas enzimas específicas para degradar compostos provenientes da

alimentação, complexos provenientes de plantas como a celulose (Zhao *et al.*, 2016). Além disso, contribui para a obtenção de energia dos alimentos e síntese de vitaminas e aminoácidos. A fermentação anaeróbia de carboidratos, que é realizada pela microbiota intestinal do intestino grosso, tem como produto final os ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs). Esses ácidos graxos são fonte de energia para as bactérias que habitam essa região do intestino e possuem atividade anti-inflamatória (Iraporda *et al.*, 2015).

Entre outras funções que a microbiota intestinal desempenha são a modulação do sistema imune e proteção contra patógenos. O sistema imunológico inato tem a capacidade de diferenciar os patógenos das bactérias comensais da microbiota intestinal. Esse mecanismo ocorre através dos receptores de reconhecimento de patógenos, como os receptores *Toll-like* (TLR) e receptores de domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeos. Ambos os tipos de receptores de reconhecimento de patógenos são expressos por células epiteliais intestinais e apresentadoras de antígenos. As células dendríticas e macrófagos são capazes de identificar facilmente qualquer célula bacteriana. Para evitar uma estimulação recorrente e indesejada do sistema imunológico inato, a barreira epitelial intestinal é protegida por um muco viscoso, que impede o contato próximo entre bactérias comensais e células epiteliais intestinais. No entanto, ao entrar em contato, o enterócito é capaz de enviar alertas na forma de quimiocinas e citocinas ao sistema imune da mucosa e ao mesmo tempo, secreta peptídeos bactericidas no lúmen intestinal. Dessa forma, o sistema imunológico entra em estágio de atenção quando compreende que está diante de um patógeno (Round *et al.*, 2011).

É importante ressaltar que o ecossistema microbiano faz uma barreira física protegendo o hospedeiro contra invasão de patógenos ao competir por sítios de adesão e nutrientes (Goul *et al.*, 2015). Portanto, o sistema imunológico co-evoluiu para viver em uma relação simbiótica com a microbiota saudável (Jandhyala *et al.*, 2015).

#### **1.4 Fatores que alteram a microbiota intestinal**

A comunidade bacteriana presente no intestino não permanece estável por todo tempo. Diferentes situações podem alterar a microbiota ao longo da vida,

como a utilização de medicamentos, idade, patologias, entre outros (Clemente *et al.*, 2012). Disbiose intestinal se caracteriza pelo desequilíbrio na microbiota. Esta acontece por diversos fatores, o mais bem estudado é o uso de antimicrobianos. Após o tratamento com fármacos há uma diminuição na diversidade microbiana a longo prazo. Nessas situações, o ecossistema intestinal pode ter número de bactérias comensais diminuído e, concomitantemente, aumentam-se as chances da proliferação de patógenos oportunistas (Clemente *et al.*, 2012). Estudos apontam que o uso de antibióticos de amplo espectro, como clindamicina, mesmo a curto prazo, causa efeito deletério na diversidade taxonômica da microbiota. Esse efeito pode durar até dois anos e altera diretamente a abundância e diversidade de gêneros bacterianos, entre eles o gênero de *Bacteroides* sp (Kennedy *et al.*, 2014).

A idade é outro fator que altera a microbiota intestinal. Até os três anos de idade a microbiota do bebê está sendo moldada. Após esse período, a microbiota permanece relativamente estável como a dos adultos. No entanto, ela ainda está propensa a ter perturbações por eventos da vida (Clemente *et al.*, 2012). Com a chegada do envelhecimento ocorrem alterações fisiológicas tendo como consequência a redução do filo Bacteroidetes, do gênero *Bifidobacterium* uma baixa produção de AGCC. Em contraste, há um aumento no crescimento de anaeróbios, tais como os gêneros *Fusobacterium*, *Clostridium* e há também maior atividade proteolítica. Estudos evidenciam o importante papel dos AGCC como principais mediadores metabólicos e imunológicos. Logo, sua diminuição contribui para o aparecimento de pequenos processos inflamatórios nos intestinos do idoso (Thursby *et al.*, 2017).

## **1.5 Disbiose intestinal e doenças**

Após o mapeamento do Microbioma Humano, muitos pesquisadores começaram a relacionar desequilíbrios na microbiota intestinal com várias doenças dentre elas distúrbios gastrointestinais, distúrbios neurológicos e até neurodegenerativos (Consórcio do Projeto Microbioma Humano, 2012).

A colite ulcerativa é uma doença gastrointestinal inflamatória crônica que se manifesta através do surgimento de úlceras espalhadas pelo revestimento do intestino grosso e reto. Nesta doença o sistema nervoso entérico (SNE) apresenta alterações no sistema nervoso entérico, como degeneração de células ganglionares e hiperplasia dos nervos entéricos. Consequentemente, desenvolve-se uma severa disbiose caracterizada pela diminuição do filo Firmicutes em comparação com um aumento da população de  $\gamma$ -Proteobacteria e Actinobacteria. Com o aumento da população de bactérias Gram-negativas pode ocorrer o aumento da presença de lipopolissacarídeos (LPS) no intestino, levando a um estado crônico de inflamação (Sokol, *et al.*, 2007, 2009; Lepage *et al.*, 2011).

Um exemplo da importância da microbiota em doenças neurológicas pode ser ilustrado pelo transtorno do espectro autista (TEA). O TEA consiste em vários transtornos neurocomportamentais do desenvolvimento caracterizados por alterações que prejudicam a interação social e a comunicação do indivíduo afetado. Muitos pacientes que apresentam severo grau do TEA desenvolvem alterações gastrointestinais, tais como diarreia, constipação, inchaço e dor abdominal. A propensão para problemas gastrointestinais associados com crianças que apresentam o TEA levou pesquisadores a sugerir o envolvimento da microbiota intestinal na doença (Toh e Allen-Vercoe, 2015). Eles começaram a comparar a microbiota de indivíduos que apresentam a patologia e os que são saudáveis. Song e colaboradores em 2004, encontraram um aumento significativo de *Clostridium boltea* em fezes de pacientes com TEA. Wang e colaboradores em 2010, encontraram níveis mais elevados de *Sutterellae Ruminococcus* spp e Finegold e colaboradores, em 2013, observou um aumento de *Desulfovibrio* spp em relação ao grupo controle. Estudos clínicos no ano 2000 relataram uma melhora no comportamento de pacientes com TEA a partir da administração de vancomicina e, ao interromper o tratamento, a melhora foi diminuída consideravelmente. Sendo assim, aponta-se que o microbioma pode contribuir com a gravidade das anormalidades comportamentais da doença (Sandler *et al.*, 2000).

## 1.6 Conexão cérebro-intestino-microbiota

O mecanismo de comunicação entre o intestino e o cérebro é bidirecional e ocorre através de múltiplas vias: nervo vago, sistema nervoso entérico sistema imunológico, metabólitos bacterianos, entre outros.

### **1.6.1 Nervo vago**

O nervo vago é uma estrutura longa com origem na parte posterior do bulbo raquidiano que inerva o abdômen chegando até o cólon (Browning *et al.*, 2017). Este nervo é o principal componente do sistema parassimpático, composto por 80% de fibras aferentes e 20% de fibras eferentes. As fibras aferentes vagais se ramificam por todas as camadas da parede digestiva, mas não ultrapassam a camada epitelial, sendo assim, não entram em contato direto com a microbiota do lúmen intestinal. Consequentemente, essas fibras só conseguem detectar sinais indiretamente, através da difusão de compostos, metabólitos bacterianos ou a partir de outras células localizadas no epitélio que retransmitem sinais luminiais. Ao detectar essa informação intestinal o nervo vago a transmite para o sistema nervoso central (SNC). Por sua vez, o SNC processa a informação e responde ao estímulo (Bonaz *et al.*, 2018).

### **1.6.2 Sistema Nervoso Entérico**

O SNE é muito importante para funções fisiológicas gastrointestinais essenciais, como motilidade, secreção de fluidos e fluxo sanguíneo. O intestino é colonizado por trilhões de bactérias que regulam a produção do hospedeiro de várias moléculas de sinalização, incluindo a serotonina (5-HT) e outros hormônios e neurotransmissores. Aproximadamente 90% da 5-HT se originam no intestino. O SNE pode atuar como um indicador de patologias neurodegenerativas que afetam o SNC. Esse tem dois papéis antagonistas, podendo oferecer um ponto de entrada para influências devastadoras da comunidade microbiana ou - inversamente - para abordagens terapêuticas via comensais intestinais (De Vadder *et al.*, 2018; Endres e Schäfer, 2018).

### **1.6.3 Sistema Imunológico**

A conexão cérebro intestino acontece também pela participação do sistema

imunológico intestinal. Este se desenvolve a partir da microbiota presente no local. A comunicação acontece pelos receptores TLR do hospedeiro com as bactérias intestinais. Esses receptores são parte do sistema imune inato e induzem a produção de citocinas pelas células que os possuem levando ao desenvolvimento de uma resposta. Estas citocinas interagem com sistema nervoso entérico e quando alcançam a corrente sanguínea atingem o sistema nervoso central (Wang *et al.*, 2016).

Recentemente foi descrito que a microbiota intestinal está intimamente ligada na maturação da microglia. Para entender os fatores que interferem nesta maturação, os pesquisadores utilizaram camundongos axênicos, desprovidos de microbiota desde o nascimento, e camundongos controle que apresentavam microbiota normal. Ao comparar a microglia desses grupos observaram-se diferenças significativas entre elas: o grupo livre de microbiota apresentou uma microglia hiper-ramificada, aumento da densidade celular e elevada presença de marcadores de superfície, que geralmente só aparecem em células imaturas. Em contrapartida, os camundongos controle retratam uma microglia madura com morfologia ramificada que não ultrapassa as fronteiras territoriais e os marcadores de superfície estavam em níveis normais (Erny *et al.*, 2017).

O estudo também observou que a administração de AGCC (acetato, butirato e propionato) induziu a maturação da microglia, pois AGCC são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica. Sendo assim, eles concluíram que a complexidade bacteriana presente na microbiota intestinal é fundamental para a maturação e morfologia normal da microglia (Erny *et al.*, 2017; Frost *et al.*, 2014).

#### **1.6.4 Metabólitos Bacterianos**

A via metabólica representa uma importante comunicação entre o SNC, o intestino e a microbiota, visto que moléculas sinalizadoras do hospedeiro podem ser sintetizadas ou são muito semelhantes a metabólitos derivados da microbiota intestinal. Bactérias comensais podem produzir diferentes moléculas neuroativas como: serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT), melatonina, ácido gama-

aminobutírico (GABA), catecolaminas, histamina e acetilcolina (Wang e Kasper., 2014). Yano e colaboradores em 2015 demonstraram que um grupo de bactérias produtoras de esporos presente na microbiota intestinal tem papel fundamental na formação de 5-HT no lúmen intestinal. Esses procariotos promovem a biossíntese de 5-HT a partir de mecanismos de sinalização para as células enterocromafinas do cólon. Essas células secretoras ao receber o sinal promovem um aumento na produção do neurotransmissor na mucosa intestinal (Yano *et al.*, 2015).

### 1.6.5 Amiloides Bacterianos

Amiloides são proteínas insolúveis com conformação em folhas  $\beta$ -pregueadas. Essas proteínas possuem uma sequência de aminoácidos que têm grande propensão a agregar-se, formando estruturas fibrilares. Certas bactérias presentes na microbiota intestinal têm a capacidade de sintetizar e secretar proteínas com características de amiloides (Pistollato *et al.*, 2016). As fibras amiloides são insolúveis em SDS e são muito resistentes. Isso se deve à estrutura “ $\beta$  pregueada” comum a todas as fibras amiloides, onde as folhas  $\beta$  posicionam-se paralelas ao eixo das fibras, composta de filamentos  $\beta$  empilhados verticalmente, como os degraus de uma escada. As folhas  $\beta$  estão próximas o bastante para serem governadas pelas forças de Van der Waals e, em alguns casos, as cadeias laterais conseguem se ligar uma na outra formando um “zíper”, conseguindo assim expulsar a água. As cadeias  $\beta$  individuais do protofilamento podem ser dispostas de maneira paralela ou antiparalela, cada uma delas extensivamente ligada por hidrogênio via grupos amida e carboxila na cadeia principal do polipeptídeo. Esses filamentos se acumulam para formar a quaternária. A combinação de interações de Van der Waals e uma extensa rede de ligações de hidrogênio confere às fibras amiloides sua extraordinária estabilidade (Erskine *et al.*, 2018).

A produção das proteínas amiloides é altamente regulada, pois a conformação  $\beta$ -pregueada facilita a união das células para formar biofilme e resistirem à destruição por agentes físicos e imunológicos (Friedland *et al.*, 2017).

Os amiloides produzidos por microrganismos estão muito ligados na formação de seus biofilmes (Taglialegna *et al.*, 2016). O sistema amiloide bacteriano mais estudado e caracterizado é a fímbria curli em *Escherichia coli*. As fímbrias curli possuem as propriedades biofísicas prototípicas das fibras amiloides: fibras ricas em

folha  $\beta$  que tem a capacidade de se ligar a corantes específicos (Vermelho do Congo ou Tioflavina T). O conjunto de amiloides requer os produtos de pelo menos dois operons divergentemente transcritos, *csgBAC* e *csgDEFG*. CsgA e CsgB são as subunidades de proteína que compõem o amiloide, enquanto o restante das proteínas estão envolvidas na regulação da produção, estabilização e secreção das subunidades CsgA e CsgB. A CsgA tem a propensão para se auto-agregar; no entanto, precisa da subunidade CsgB para nucleação em fibras *in vivo*. CsgA e CsgB são translocados para o periplasma pelo sistema Sec e exportados para o meio extracelular através de uma estrutura semelhante a poros constituída pela proteína CsgG formada na membrana externa. Associadas a este poro estão as proteínas CsgE e CsgF, que modulam a estabilidade das subunidades e a montagem adequada das fibras. A fímbria curli medeia a adesão bacteriana a uma variedade de proteínas hospedeiras ou superfícies abióticas, promovendo a formação de biofilme e patogenicidade (Hammer *et al.*, 2012; Van *et al.*, 2015).

Exemplos de fibras extracelulares com similaridade estrutural e funcional a fímbrias curtas de *E. coli* foram descritas em várias espécies de *Pseudomonas*, incluindo *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* e *P. putida*. Neste caso, os componentes proteicos para montagem amiloide são codificados no operon *fapABCDE*. A análise biofísica de fímbrias Fap purificadas mostrou a presença de uma estrutura em folha  $\beta$  pregueada, bem como a ligação ao corante tioflavina T específico. A análise bioquímica da composição da fibrila identificou a proteína FapC como principal componente proteico. Embora pequenas quantidades de FapB e FapE também estivessem presentes. Como para CsgB no sistema de amiloides, FapB atua como um nucleador de fibrilação de FapC (Dueholm *et al.*, 2013; Dueholm e Nielsen, 2013).

Existem as fibras extracelulares especiais, formadas pela polimerização de um monômero que é secretado correspondente às modulinas solúveis em fenol (PSMs) em *Staphylococcus aureus*. Os PSMs podem ser classificados de acordo com seu comprimento como  $\alpha$ -PSMs (20 a 25 aminoácidos) e  $\beta$ -PSMs (43 a 45 aminoácidos). Os PSMs são proteínas bifuncionais que podem ser armazenadas como fibras inertes em um biofilme sésil até que acontecem condições favoráveis a sua dissociação para promover a desmontagem e virulência do biofilme (Schwartz *et al.*, 2012; Cheung *et al.*, 2014).

Fibras funcionais com propriedades amiloidogênicas têm se mostrado parte



da matriz extracelular de biofilmes formados pelas bactérias do solo *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus*. Nesse caso, a matriz de biofilme contém fibras semelhantes a amiloide feitas pela TasA que mantêm as células juntas e fornecem suporte estrutural para a manutenção do biofilme. TasA é expresso a partir do operon *tapA-sipW-tasA*, juntamente com duas proteínas, TapA e SipW, das quais depende a formação das fibras (Branda *et al.*, 2006; Romero *et al.*, 2010).

As fibras amiloides além de participar diretamente na formação do biofilme também desempenham outras funções na relação das bactérias com o hospedeiro. O MHC-I (complexo de histocompatibilidade principal de classe I) é uma glicoproteína de membrana presente em todos os tipos de células nucleadas de mamíferos, curli demonstrou aderir a essa proteína, mostrando seu papel também na adesão. Essa adesão efetiva de *E. coli* a células hospedeiras e tecidos mediados por curli facilita a invasão celular e a patogênese, revelando o amiloide como um importante fator bacteriano nos primeiros estágios das interações humano-bacterianas. Na bactéria patogênica gram-negativa *Chlamydia pneumoniae*, a proteína Pmp21 desempenha um papel importante na patogênese, mediando a adesão às células do hospedeiro pela ligação ao receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e trabalhando como invasina. A proteína Pmp21 também mostra propriedades amiloides e uma tendência para polimerizar em fibrilas com uma estrutura secundária rica em folhas  $\beta$  (Gophna *et al.*, 2002; Luczak *et al.*, 2016).

No sistema nervoso, a resposta imune às fibras amiloides é mediada por receptores TLRs são expressos em células da microglia. Estes receptores protegem o hospedeiro contra invasão microbiana através da ativação do sistema imune inato. Os TLRs 2 nas microglias são ativados por amiloides, lipoproteínas e outros exudatos microbianos. Ao serem ativados induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias, fagocitose e respostas inatas do sistema imune que impactam diretamente na homeostase do SNC e influenciam as neuropatologias. Os receptores TLR1 e TLR2 podem reconhecer amiloides associados a biofilmes produzidos por membros dos filos Firmicutes, Bacteroidetes e Proteobacteria (Asti e Gioglio, 2014). Os amiloides microbianos também têm a capacidade de ativar IL-17 (Interleucina 17), que é uma precursora da sinalização NF- $\kappa$ B (fator nuclear kappa B), que por sua vez ativa ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e outros mediadores pró inflamatórios como a IL-22 (Interleucina 22) (Nishimori *et al.*, 2012). Zhang e colaboradores, em 2013, observaram que o aumento de IL-17 e IL-22 estão

associados a doenças inflamatórias crônicas, incluído a Doença de Alzheimer(DA) (Zhang *et al.*, 2013).

### **1.7 Biofilme bacteriano**

Biofilme é uma comunidade estruturada de células bacterianas envoltas em uma matriz polimérica produzida pelos seus componentes com a capacidade de se aderir a uma superfície biótica ou abiótica (Pumbweet *al.*,2007).Existe uma grande diversidade na composição da matriz do biofilme, no entanto, geralmente são constituídos de polissacarídeos, DNA extracelular e proteínas. Este pode ser composto somente por um ou ser uma associação de vários microorganismos, sendo chamado de biofilme polimicrobiano(Gabrilska e Rumbaugh, 2015).

Estudos recentes apontam que as bactérias apresentam comportamento e metabolismo diferenciado quando estão associadas a um biofilme em comparação ao seu crescimento planctônico (Lebeauxet *al.*,2013).A matriz do biofilme é dinâmica e cumpre múltiplas funções incluindo sequestro de nutrientes e adsorção de água, protegendo as células residentes do estresse ambiental e da competição, atuando como um facilitador de sinalização para células dentro e fora do biofilme (Flemminge Wingender, 2010; Dragos e Kovács, 2017).

O primeiro passo para a formação do biofilme é a adesão de células planctônicas em uma superfície. Esta primeira adesão é mantida por interações físico-químicas não específicas e pode ser facilmente reversível. Em seguida, as bactérias começam a secretar substâncias como a matriz de polímeros extracelulares (EPS) que pode ter natureza polissacarídica ou proteica. Ela é exposta na membrana externa das bactérias Gram-negativas e nopeptídeoglicano de Gram-positivas.Portanto ocorre a adesão secundária, que gera uma firme camada de elementos sólidos, onde se encontram embebidos na matriz de polissacarídeo os elementos celulares bacterianos e os da superfície.O biofilme maduro é envolvido por diferentes substâncias, principalmente açúcares e rodeados por poros e canais de água, atuando como um sistema de troca de nutrientes, oxigênio e metabólitos que precisam ser secretados para fora do mesmo. A última fase da formação do biofilme ocorre quando o ambiente não é mais vantajoso à sua manutenção, e consiste no descolamento do biofilme maduro em forma de conglomerados celulares ou células planctônicas. Depois de desprendidas, as

bactérias livres podem colonizar novos ambientes, reiniciando a formação de novos biofilmes (Stoodley *et al.*, 2002; Costerton *et al.*, 2007; Andrade *et al.*, 2008).

Acredita-se que a diversidade genética dos microrganismos dentro das comunidades de biofilme aumenta a resistência da comunidade residente, tornando-os mais preparados para sobreviver às tensões ambientais. Em grande parte, isso se deve a um pool genético expandido, que pode ser mais facilmente compartilhado dentro dos limites de uma comunidade de biofilme (Ehrlich *et al.*, 2005).

### **1.8 *Bacteroides fragilis***

*B. fragilis* é um bacilo Gram-negativo anaeróbio pertencente ao gênero *Bacteroides* e filo Bacteroidetes. Este microrganismo representa de 1 a 2% a microbiota intestinal e atua em diversos processos junto ao hospedeiro como a degradação de ácidos graxos que o corpo humano não metaboliza. *B. fragilis* é considerado um comensal, no entanto, quando consegue acessar outros sítios do corpo pode causar doenças graves como a bacteremia e infecções peritoneais, que têm em média uma mortalidade de 19% nos casos onde o tratamento não é adequado (Goldstein, 1986). Além disso, pode causar abscessos no abdome, fígado, cérebro e pulmões (Wexler, 2007). Esses abscessos são comuns nas infecções causadas pelo bacilo, devido à cápsula polissacarídica. A presença do polissacarídeo A (PSA) e polissacarídeo B (PSB) são suficientes para induzir a formação de abscessos em camundongos quando combinados a um adjuvante, o conteúdo cecal estéril (CCE) desses animais (Tzianabos *et al.*, 1993).

Algumas cepas de *B. fragilis* são capazes de produzir a toxina (BFT), uma metaloprotease dependente de zinco. Estas cepas são denominadas de *Bacteroides fragilis* Enterotoxigênico (ETBF). A BFT, também conhecida como fragilisina, é codificada pelo gene *bfte* se apresenta em três variantes: BFT -1, BFT-2, BFT-3, sendo a BFT-2 a mais tóxica. Esta toxina atua clivando a E-caderina, proteína responsável por manter a integridade do epitélio, sendo assim, o citoesqueleto de actina nas células sofre rearranjo nas células e o tecido torna-se mais permeável. Já as cepas não produtoras dessa toxina são classificadas como não-

enterotoxigênica (NTBF) (Fathi e Wu, 2016).

As vesículas da membrana externa (EMVs) são formadas por muitos microrganismos, desde os procariotos até os eucariotos. O processo de secreção de proteínas para o meio extracelular é importantíssimo na comunicação das bactérias. A liberação de vesículas está envolvida na resposta aos fatores de virulência, secreção de componentes destinados à superfície celular, antígenos, resposta ao estresse ambiental e, no caso de patógenos, interação com o hospedeiro. Existem muitas vias de secreção descritas em bactérias Gram-negativas que proporcionam a entrada de toxinas e outras proteínas específicas para as células do hospedeiro. Entre eles, está o sistema de secreção do tipo III (TSS3) que após contato com a superfície celular, pode injetar proteínas efetoras nas células. Em *B. fragilis*, essas vesículas são conhecidas por terem atividades de hemaglutinação e sialidase além de, também, conterem o PSA, porém não se sabe qual o seu papel na virulência (Ferreira *et al.*, 2018).

O biofilme é outro fator de virulência presente no *B. fragilis*. Esse mecanismo confere proteção contra o sistema imunológico do hospedeiro e proporciona a troca de material genético, podendo conferir, por exemplo, genes de resistência aos antimicrobianos (Hall *et al.*, 2004). A microbiota intestinal pode ser encontrada como organismos planctônicos luminiais ou associada à mucosa formando biofilme. Biofilmes formados por comunidades polimicrobianas têm sido associados a doenças humanas. Dejea e colaboradores, em 2018, observaram em estudos com camundongos e humanos, que desenvolveram o câncer de cólon, a presença do biofilme polimicrobiano formado pelo *B. fragilis* ETBF e *E. coli*. Portanto, sugeriram que a presença dessas bactérias e suas toxinas trabalhando sinergicamente no desenvolvimento de câncer de cólon (Dejea *et al.*, 2018).

As bactérias Gram-negativas presentes no lúmen intestinal secretam diversas neurotoxinas pró-inflamatórias, tais como LPS, que ao serem absorvidos pela corrente sanguínea são altamente prejudiciais para o hospedeiro e seu SNC. Os lipopolissacarídeos são componentes característicos das membranas externas de bactérias Gram-negativas. São liberados no espaço extracelular e desempenham um importante papel na interação patógeno-hospedeiro. O LPS de *B. fragilis* é penta-acilado e monofosforilado possuindo um lipídio A altamente inflamatório para a microglia do hospedeiro, visto que a microglia é sensível a qualquer corpo estranho. Esse agente inflamatório ativa os receptores TLRs da microglia

desencadeando produção de citocinas, inflamação, fagocitose e resposta inata de defesa imunológica, que impacta diretamente nas patologias neurodegenerativas (Minter *et al.*, 2016). Estudos recentes mostram que o LPS bacteriano foi encontrado no neocórtex e no hipocampo do encéfalo com DA, tendo maior abundância significativa na DA do que no controle. Sugere-se, portanto, que o LPS pode ser capaz de transitar por barreiras fisiológicas e, assim, chegar ao cérebro. Este acontecimento estaria relacionado com a chegada do envelhecimento, pois a barreira hematoencefálica (BHE) e as células do lúmen intestinal perdem sua permeabilidade, aumentando a probabilidade de toxinas inflamatórias e outros exudatos bacterianos alcançarem os neurônios (Zhao e Cong, 2017).

Estudos recentes relacionam o *B. fragilis* com a Doença de Alzheimer. Descobriu-se que o LPS se associa à periferia dos núcleos neuronais no cérebro da DA e promove a geração do fator de transcrição inflamatório NF- $\kappa$ B na cultura primária de células da glia. Por sua vez o NF- $\kappa$ B induz a transcrição de uma pequena família de microRNAs pró-inflamatórios (miRNAs), tais como o miRNA-146a. Este acaba se ligando em RNAs mensageiros (mRNA) e assim reduz a expressão dos genes codificados nessa molécula. Os mRNA alvos são aqueles que codificam o fator de complemento-H (CFH) e uma proteína SH3-prolina rica em prolina da densidade pós-sináptica (SHANK3). Assim, o LPS é capaz de conduzir uma deficiência mediada por NF- $\kappa$ BmiRNA na expressão gênica que contribui para alterações na arquitetura sináptica, amiloidogênese e sinalização inflamatória progressiva, todos os quais são características da neurodegeneração da DA (Zhao e Lukiw, 2018).

### **1.9 Doença de Alzheimer como modelo de estudo da interação microbiana com Sistema Nervoso Central**

Em 1907, Alois Alzheimer descreveu o caso de Auguste Deter, um paciente com uma combinação de déficits cognitivos, sintomas psiquiátricos e lesões cerebrais microscópicas. Esse conjunto sintomatológico e a histopatologia fez com que Emil Kraepelin chamasse de Doença de Alzheimer (Alzheimer, 1907; Lage, 2006). Atualmente, a DA é a principal causa para demências em idosos e é a doença neurodegenerativa mais comum. Esta doença é um distúrbio neuropsiquiátrico progressivo. É caracterizada pela formação de placas senis (SPs)

extracelulares contendo o peptídeo  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ), presença de emaranhados neurofibrilares intracelular constituídos por proteínas Tau hiperfosforiladas localizados no córtex e hipocampo do cérebro, perdas de sinapses e neurônios, e uma gliose aumentada (Jiang *et al.*, 2013).

A influência da microbiota intestinal na função do sistema nervoso central conhecido como eixo cérebro-intestino-microbiota, recentemente, obteve grande visibilidade. Dessa forma, alterações na microbiota estão sendo relacionadas com doenças neurodegenerativas como a Doença de Alzheimer. Estudos em camundongos sugerem que a deposição de amiloides está ligada com a redução da diversidade e composição da microbiana intestinal, caracterizando-se pelo aumento do filo Bacteroidetes e acompanhada da diminuição do filo Firmicutes e do gênero *Bifidobacterium*. Harach e colaboradores, em 2017, utilizaram camundongos transgênicos, na proteína APP/PS1 que conferem um fenótipo de susceptibilidade à DA, e sequenciaram o rRNA (RNA ribossomal) 16S bacteriano de amostras fecais desses animais e de camundongos selvagens, observaram uma diferença significativa entre os grupos. Posteriormente, geraram camundongos transgênicos livres de microrganismos e observaram uma mudança drástica na deposição do peptídeo  $A\beta$  quando comparados com o grupo controle com microbiota intestinal. Complementando o estudo, os pesquisadores colonizaram esses animais livres de germes com microbiota intestinal de camundongos APP/PS1 e observaram que a colonização com microbiota de camundongos selvagens protegeu esses animais do aumento da deposição do peptídeo  $A\beta$ . O grupo concluiu que os resultados obtidos indicam um possível envolvimento microbiano com o desenvolvimento e avanço da doença (Harach *et al.*, 2017).

## 2 JUSTIFICATIVA

Doenças neurodegenerativas são aquelas que causam a destruição progressiva dos neurônios. Alguns indivíduos acometidos apresentam um rápido avanço da doença, se tornando incapacitados de realizar suas tarefas diárias sozinhos. Segundo o IBGE, 4% da população brasileira desenvolvem essas doenças. As causas delas, em geral, não são determinadas. Por isso, diversos estudos estão sendo desenvolvidos para buscar compreender melhor a origem dessas patologias.

Nos últimos anos essas neurodegenerações estão sendo relacionadas com a microbiota intestinal. Como a microbiota é extremamente complexa e produz moléculas que podem afetar o funcionamento de diversos sítios do corpo, muitos pesquisadores começaram a relacionar essa área com as doenças. Dessa forma, descobriram que moléculas produzidas pelos microrganismos podem interferir no SNC, tais como os amiloides. Na doença de Alzheimer, por exemplo, alguns pesquisadores afirmam que a formação da placa A $\beta$  estaria relacionada com um mecanismo de defesa inata. A formação das placas teria o objetivo de proteger o corpo de ataques de microrganismos que conseguiram ultrapassar a BHE.

Os amiloides bacterianos são chamados de funcionais, pois desempenham um importante papel na estruturação no biofilme das mesmas. No entanto, quando em contato com o nosso sistema imunitário é reconhecido pelos receptores TLR's causando processos inflamatórios, que aliados com a neurodegeneração aumentam a progressão das patologias.

Na literatura os modelos mais utilizados para estudar essa relação são *E. coli* e *Salmonella*, que são bactérias facultativas. O objetivo do nosso estudo é observar se o *B. fragilis* é capaz de produzir proteínas do tipo amiloide, e incorpora-las em seu biofilme. A hipótese de que microrganismos habitantes comensais do trato gastrointestinal produzam proteínas amiloides ainda não foi testada, e a maioria dos trabalhos avaliou a produção dessas estruturas em microrganismos patogênicos. A descoberta de proteínas amiloides em representantes da microbiota normal pode ser importante para correlacionar doenças neurodegenerativas e disbioses.

### 3 OBJETIVO

#### Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo avaliar a produção de proteínas amiloides por cepas de *Bacteroides fragilis* e a sua integração ao biofilme dessa espécie.

#### Objetivos específicos

- Quantificar a produção de biofilme por cepas de *Bacteroides fragilis* isoladas de diferentes fontes, provenientes da coleção de cultura do laboratório de biologia de anaeróbios
- Caracterizar a natureza do biofilme de *Bacteroides fragilis* quanto à sua composição molecular
- Observar a presença de cápsula polissacarídica nas cepas estudadas
- Avaliar a produção de amiloides através do crescimento no meio BHI suplementado com o corante Vermelho Congo;
- Observar a presença de amiloides no biofilme produzidos por cepas identificadas como produtoras através da técnica de microscopia de fluorescência com o corante Tioflavina S;
- Avaliar por análise *in silico* similaridade entre os amiloides de *B. fragilis* e amiloides presentes em outras espécies bacterianas, assim como avaliar também a similaridade dessa molécula com o A $\beta$  humano.



## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Condições de crescimento

As amostras de *B.fragilis*(**Tabela 1**) utilizadas nesse estudo pertencem a Coleção de Culturas do Laboratório de Biologia de Anaeróbios e foram cultivadas em caldo *Brain Heart Infusion*(BHI) pré reduzido, suplementado com 1% de glicose, hemina (5µg/mL) e menadione (10µg/mL). Sendo crescidos em estufa a 37°C em atmosfera anaeróbica (80% de N<sub>2</sub>; 10% de H<sub>2</sub>; 10% de CO<sub>2</sub>) por 18 horas. Assim como a cepa de *S. epidermidis*ATCC 35984,*Clostridium citroniae*e*Staphylococcusagalactiae*.

**Tabela 1:** Amostras usadas no estudo.

Amostras	Origem	Ano de isolamento
<b>SBF1</b>	Abscesso de parede	1997
<b>SBF2</b>	Pús	1997
<b>SBF3</b>	Fenda operatória	1994
<b>SBF5</b>	Água de poço contaminada	1996
<b>SBF7</b>	Pús	2003
<b>SBF10</b>	Otite média crônica	1984
<b>SBF12</b>	Microbiota intestinal	2001
<b>638R</b>	Bacteremia	Costa, 2016
<b>ATCC25285</b>	Abscesso	*
<b><i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35294</b>	Biofilme de cateter	*
<b><i>Clostridium citroniae</i></b>	Microbiota intestinal	Antunes, 2014
<b><i>Staphylococcusagalactiae</i></b>	Orofaringe	*

\*Não consta no banco de dados.

#### 4.2 Biofilme de *B. fragilis*

O ensaio de produção de biofilme foi realizado segundo Donelli(2011), com algumas modificações. Após o crescimento bacteriano, o inóculo foi ajustado à escala 0,5 de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). Em uma microplaca de poliestireno de 96 poços foram adicionados 20µL do inóculo e 180µL de BHI suplementado com glicose 1% (p/v). A placa foi incubada por 48h em atmosfera de anaerobiose (80% de N<sub>2</sub>; 10% de H<sub>2</sub>; 10% de CO<sub>2</sub>) a 37°C. Após essa etapa, o meio de cultura foi descartado e lavado cuidadosamente três vezes com 200µL de PBS 1 vez (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 0,2 M; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12 H<sub>2</sub>O 0,2 M; NaCl 1%). Em seguida, a placa foi incubada por 1 hora em estufa a 60°C. Posteriormente, o biofilme foi corado com 150µL de cristal violeta 1% (p/v) por 5 minutos em temperatura ambiente. Após essa etapa, o corante foi retirado e o excesso foi lavado com água. Novamente a placa foi incubada a 60°C por 10 minutos. O corante foi solubilizado com 150µL de ácido acético 33% (v/v) e o resultado foi observado no leitor de microplaca Infinite F50(Tecan, EUA) a 360-380Å a 492 nm.

#### 4.3 Análiseda natureza do biofilme de *B. fragilis*

Para estudar a natureza do biofilme utilizou-se a técnica descrita no item 4.2 com algumas modificações por Botelho (2015). Após a etapa de crescimento por 48h o meio de cultura foi descartado e a placa foi lavada três vezes cuidadosamente com 200µL de PBS. Em seguida foi adicionado na placa 100µL de Proteinase K(30 U/ml; Qiagen, EUA), quando o objetivo foi estudar a natureza proteica do biofilme. Ou 100µL de metaperiodato de sódio (10 mM; Sigma,EUA), quando o objetivo foi estudar a natureza glicídica do mesmo. Após esse processo a placa foi incubada por 2h em estufa a 37°C. Posteriormente, remove-se o solvente, novamente, lavou-se a placa 3 vezes com PBS. Em seguida, a placa foi incubada por 1h em estufa a 60°C. Em seguida, o biofilme foi corado com 150µL de cristal violeta 1% (p/v) por 5 minutos em temperatura ambiente. Após essa etapa, o corante foi retirado e o excesso foi lavado com água. Depois a placa foi incubada a 60°C por 10 minutos. O corante foi solubilizado com 150µL de ácido acético 33% (v/v) e o resultado foi observado no leitor de microplaca Infinite F50 (Tecan, EUA) a 360-380Å a 492 nm.

#### 4.4 Observação de amiloides bacterianos em *B. fragilis*

Este experimento foi realizado de acordo com Lazzarotto (2010). Foram preparadas placas de ágar BHI suplementado com vermelho congo 0,08% (p/v) e sacarose 1% (p/v). Uma gota de 2µL de cada amostra de *B. fragilis* foi inoculada na superfície de meio BHI ágar suplementado com corante vermelho congo. As placas foram incubadas por 48h a 37°C em atmosfera de anaerobiose. As amostras positivas apresentaram um crescimento com coloração enegrecida e amostras negativas coloração transparente/esbranquiçada. O experimento foi realizado em duplicata e teve como controle positivo *S.epidermidis* ATCC 35984 e controle negativo *C. citroniae*.

#### 4.5 Visualização de Cápsula de *B. fragilis*

Este experimento foi realizado de acordo com Patrick, 1983. O volume de 10µL de suspensão bacteriana das amostras crescidas nas condições do item 4.1, foi depositado no centro da lâmina juntamente com 10µL de tinta nanquim e 10µL de glicose 6%. Em seguida, espalhou-se a gota por toda a lâmina com auxílio de outra lâmina de vidro. As lâminas foram deixadas em temperatura ambiente para secar. Depois, adicionou-se fucsina básica (0,25% [p / vol] em 10% de etanol) esperou-se 2 min e a lâmina foi lavada com água destilada e seca em temperatura ambiente. A coloração foi analisada em microscópio óptico de objetiva 1000x com óleo de imersão. A cápsula é visualizada sem coloração, a bactéria fica corada de rosa em contraste com o fundo da lâmina preto por conta do nanquim.

#### 4.6 Microscopia de fluorescência

Após a etapa de crescimento do item 4.1, ajustou-se a concentração bacteriana para 0,5 da escala McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). Em placa de 24 poços de poliestireno foi adicionada uma lamínula estéril por poço. Em seguida 10µL do inóculo e 90µL de meio BHI contendo 1% de glicose foram adicionados ao poço. A placa foi incubada por 24h a 37°C em atmosfera de anaerobiose. Depois a fração líquida foi removida e a lamínula contendo o microrganismo foi lavada

cuidadosamente três vezes com 200µL de PBS uma vez e foi incubada por 1h em estufa a 60°C para que qualquer líquido remanescente evaporasse. Posteriormente, foram adicionados 200µL de formaldeído 3,5% (v/v) por 30 minutos e a placa foi deixada em agitação. Após esse tempo cada poço foi lavado com 200µL de PBS 1 vez. Em seguida foi adicionado o corante tioflavina S (0,5% Sigma). A placa foi então incubada por 15 minutos sem abrigo da luz. Depois dessa etapa, as lamínulas foram retiradas dos poços e colocadas, cuidadosamente, em lâminas. Todas as lâminas foram armazenadas em recipiente protegido de luz a 10°C para posterior análise.

O resultado foi analisado em microscópio de fluorescência no filtro DAP (excitação 358nm, emissão 463nm) O resultado foi positivo ao ver a imagens com coloração azuis brilhantes ao redor do biofilme bacteriano. O resultado negativo foi a coloração azul bem escuro, pois a tioflavina quando não estava na presença do amiloide corou outros compostos do biofilme.

#### 4.7 Análise *in silico*

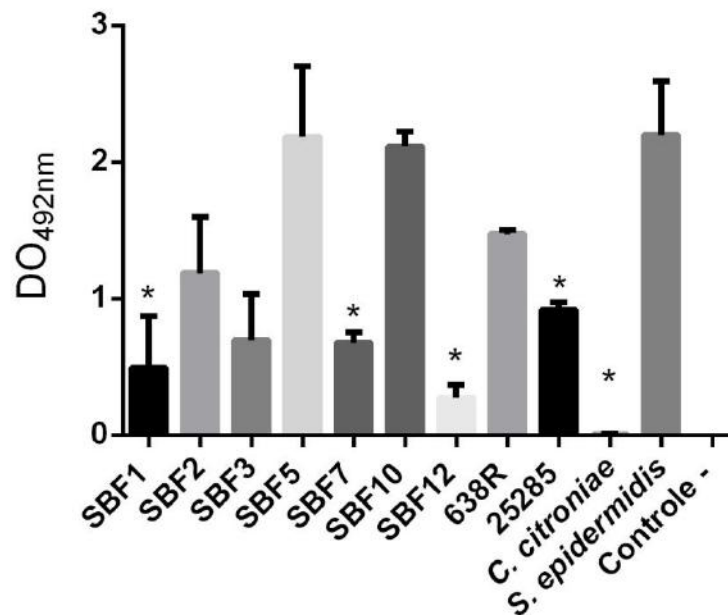
Inicialmente buscou-se *GenBank*(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) pertencente ao *National Center for Biotechnology Information*(NCBI) a sequência FASTA de todas as proteínas do *B. fragilis* YCH46. Após esse processo utilizou-se o servidor Pasta 2.0(<http://protein.bio.unipd.it/pasta2/help.html>). Este analisa a sequência de aminoácidos prevendo quais partes deste peptídeo tem propensão à formação de fímbrias amiloides (Walsh *et al.*, 2014). Com resultados de todas as proteínas que possivelmente fazem ligação amiloide adicionou-se o resultado da pesquisa no servidor Cello (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>). Este sistema classifica onde a sequência de aminoácidos está localizada na célula (Yu e Hwang., 2014). Sendo assim, selecionaram-se as proteínas que localizavam no periplasma, na membrana externa e as extracelulares. Posteriormente, esse resultado foi analisado pelo servidor Tango (<http://tango.crg.es/protected/correctlogin.jsp>) que prevê a agregação  $\beta$ -cruzada, alfa-hélice (Fernandez-Escamilla *et al.*, 2004; Linding *et al.*, 2004; Rousseau *et al.*, 2006). Paralelamente, o resultado também foi analisado pelo servidor da Universidade de Cambridge o VendruscoloLab - Software, este fornece o cálculo do perfil de solubilidade, visto que os aminoácidos com maiores

propensões a formação de amiloides são muito insolúveis. Dessa forma, conseguiu-se fazer um levantamento de quantas possíveis proteínas poderiam ter perfil amiloidogênico em *B. fragilis* YCH46 (Sormanniet al., 2015 e 2017).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Formação de biofilme de *B. fragilis* em placa de poliestireno

Das 11 cepas do estudo (**Gráfico 1**) duas são provenientes da microbiota intestinal de voluntários saudáveis (SBF12, *C. citroniae*), uma de água de poço contaminada (SBF 5) e as nove cepas restantes de infecções endógenas. Dentre as amostras provenientes de quadros infecciosos, todas apresentaram capacidade de formar biofilme nas condições testadas. Quando submetidas à análise estatística, Teste T de Stuart ( $p > 0,05$ ), em comparação ao controle positivo, a cepa ATCC 35284 de *S. epidermidis*, as amostras SBF1, SBF7, SBF12, a ATCC 25285 e *C. citroniae* apresentaram diferença significativa em relação à baixa produção de biofilme. Entretanto, a amostra SBF2, SBF5, SBF10 e 638R mostraram ter boa produção de biofilme, se aproximando ao controle positivo.

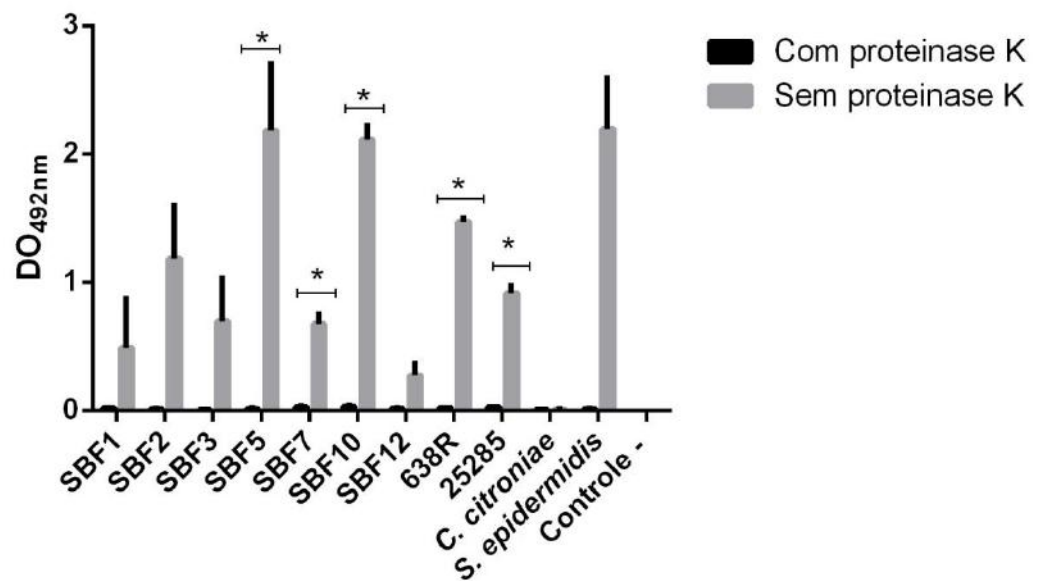


**Gráfico 1: Formação de biofilme por cepas de *B. fragilis*.** Os resultados foram comparados com o controle *S. epidermidis* 35284. Amostras marcadas com \* indicam  $p > 0,05$  de acordo com análise do teste estatístico t-student. A leitura foi feita na D.O 492nm.

## 5.2 Análise da natureza do biofilme de *B. fragilis*

### 5.2.1 Tratamento com proteinase K

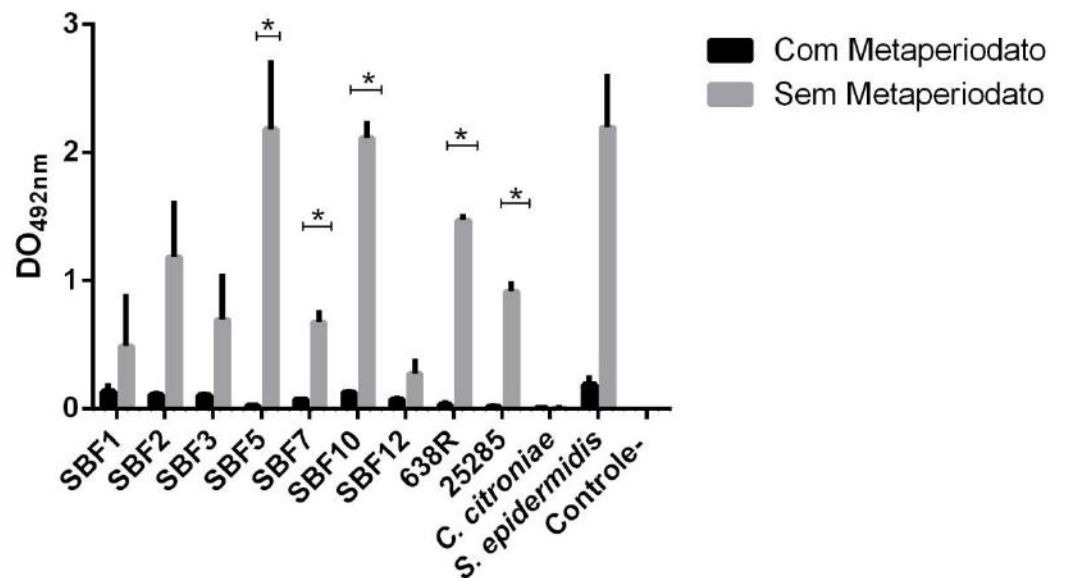
Para analisar se a composição do biofilme formado por amostras de *B. fragilis* foi realizado o tratamento dessas estruturas com proteinase K (30 U/ml). O biofilme formado pelas amostras testadas teve redução substancial quando tratados com essa enzima (**Gráfico 2**). Isso demonstra que provavelmente o biofilme formado por essa espécie bacteriana tem composição majoritariamente proteica. A análise estatística mostrou que todas as cepas testadas apresentaram diferença em relação a condição não tratada, tendo o biofilme se dissolvido por completo. As cepas SBF1, 2, 3 e 12 não apresentaram diferença significativa de acordo com o teste estatístico.



**Gráfico 2:** Tratamento do biofilme de *B. fragilis* com Proteinase K. Em comparação com o biofilme normal, sem tratamento as cepas SBF 5, SBF7, SBF 10, 638R, ATCC 25285 e o controle positivo *S. epidermidis* apresentaram reduções significativas ( $p > 0,05$ ), de acordo com o teste t-student indicadas pelos asteriscos (\*). A leitura foi feita na D.O 492 nm.

### 5.2.2 Tratamento com metaperiodato de sódio

O metaperiodato de sódio foi capaz, também, de diminuir a estrutura do biofilme formado por cepas de *B. fragilis* (Gráfico 3). Quando comparadas ao biofilme sem tratamento as amostras SBF5, SBF7, SBF10, 638R, ATCC 25285 e o controle positivo *S. epidermidis* demonstraram redução significativa de seu biofilme. Esse resultado aponta que além de proteico, o biofilme formado por *B. fragilis* pode ter em sua composição polissacarídeos necessários para a manutenção da estrutura do mesmo. Apesar da diferença não ter sido significativa nas amostras 1,2,3,12 e o *C. citroniae* no teste estatístico aplicado, é importante notar que o tratamento reduziu o biofilme em todas as amostras.

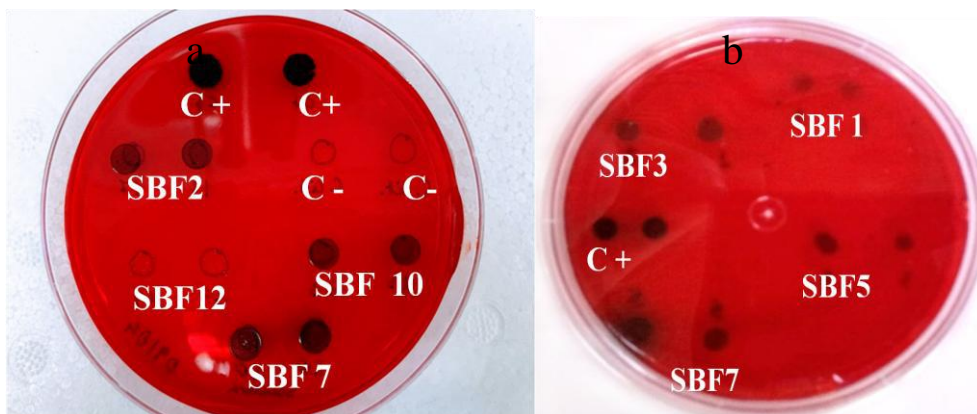


**Gráfico 3:** Tratamento do biofilme de *B. fragilis* com Metaperiodato de sódio. Em comparação com o biofilme sem tratamento as amostras SBF5, SBF7, SBF10, 638R, ATCC 25285 e o controle positivo obtiveram uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) na composição do biofilme indicada pelo asteriscos (\*). A leitura foi feita na D.O 492 nm.



### 5.3 Observação de possíveis amiloides bacterianos em biofilme de *B. fragilis*

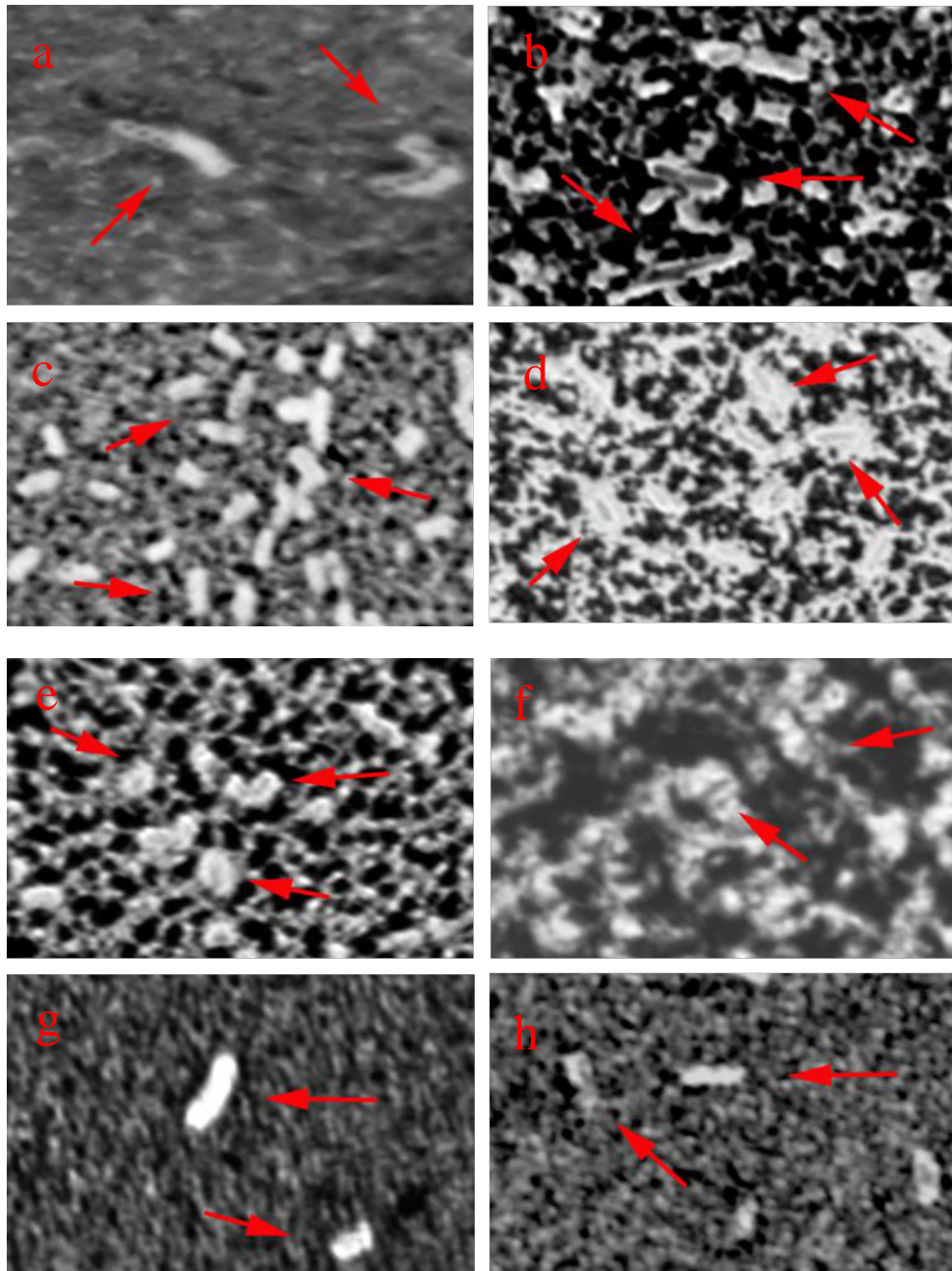
A presença de estruturas amiloides em biofilme bacterianos pode ser evidenciada a partir da utilização do corante vermelho do congo (**Figura 1**) Em amostras que apresentam essas estruturas, ocorre o escurecimento do biofilme em placa de ágar BHI contendo vermelho do congo. As cepas SBF 1, SBF2, SBF3, SBF5 e SBF10, apresentaram coloração acinzentada com borda bem delimitada. A amostra SBF7 apresentou uma coloração acinzentada mais escura, se aproximando do preto apresentado pelo controle positivo. Em contrapartida, as amostras SBF8 e SBF12 cresceram sem apresentar coloração, como observado no controle negativo.



**Figura 1 (a,b): Observação da possível presença de estruturas amiloides em biofilme de *B. fragilis* formado em placa.** As amostras positivas apresentaram coloração enegrecida e acinzentada, e as amostras negativas não apresentaram coloração. A: biofilme formado por *S. epidermidis* (C+); *C. citroniae* (C-); e pelas cepas de *B. fragilis* SBF2, SBF7, SBF10 e SBF12. B: biofilme formado por *S. epidermidis* (C+), e pelas cepas de *B. fragilis* SBF1, SBF3, SBF5, SBF7.

#### 5.4 Visualização de Cápsula de *Bacteroides fragilis*

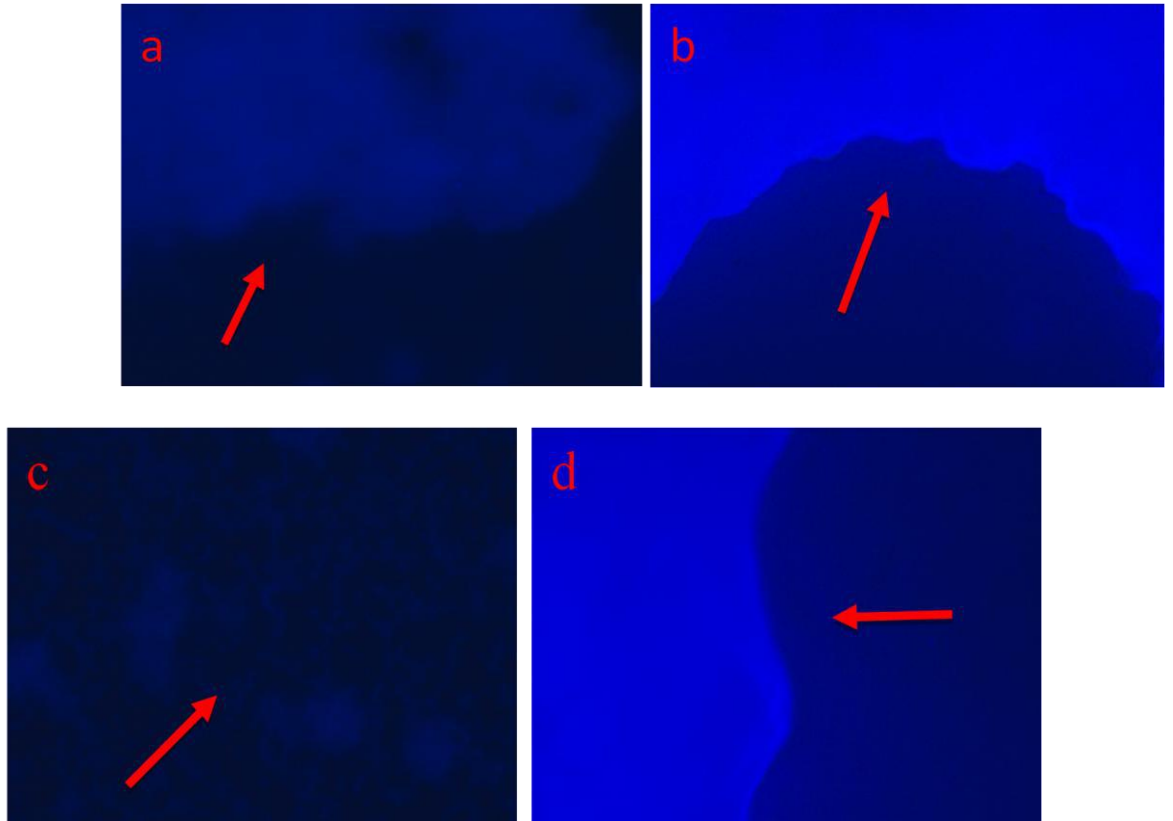
Todas as cepas utilizadas no estudo apresentaram cápsula. Aparentemente, as cápsulas não variaram entre si.



**Figura 2:** Avaliação da presença de cápsula em amostras de *B. fragilis*. a- Controle positivo de Cápsula *S. agalactiae*A10. b- Amostra SBF 1. 3- Amostra SBF 2. c- Amostra SBF 5. d- Amostra SBF 10. e- Amostra SBF 12. f- Amostra 638R. g- Amostra ATCC25285. h- *C. citroniae*. O fundo mais escuro se deve a coloração com nanquim. A estrutura da cápsula aparece sem coloração, como um halo ao redor da bactéria. As setas indicam a cápsula.

### 5.5 Observação da estrutura amiloide por microscopia de fluorescência

Nesta técnica espera-se visualizar as proteínas amiloides em destaque fluorescente. No entanto, encontramos todo o biofilme corado.



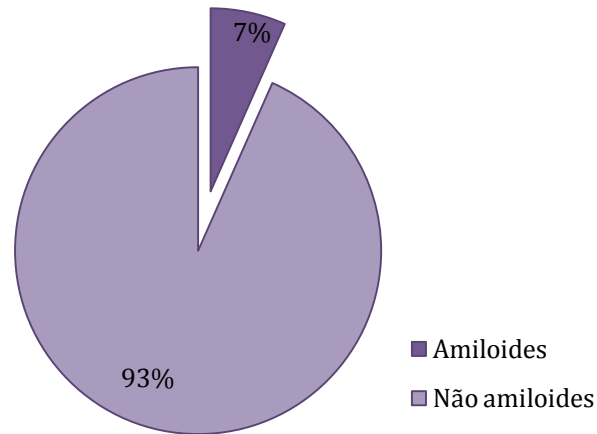
**Figura 3: Microscopia de fluorescência do biofilme de *B. fragilis*.** a: amostra SBF12, coletada de microbiota saudável. De acordo com o controle negativo, não apresenta amiloide em seu biofilme. b: amostra SBF7. Coletada de secreção com pés. De acordo com o controle positivo, apresenta amiloide em seu biofilme. As setas indicam o biofilme corado pela tioflavina. c: *C. citroniae*. Usado como controle negativo, aparentemente, não apresenta amiloide em seu biofilme. d: *S. epidermidis*. Utilizada como controle positivo. Apresenta uma coloração bem azulada, indicativa da presença de amiloides na formação de biofilme. As setas indicam o biofilme corado pela tioflavina.

## 5.6 Análise *in silico*

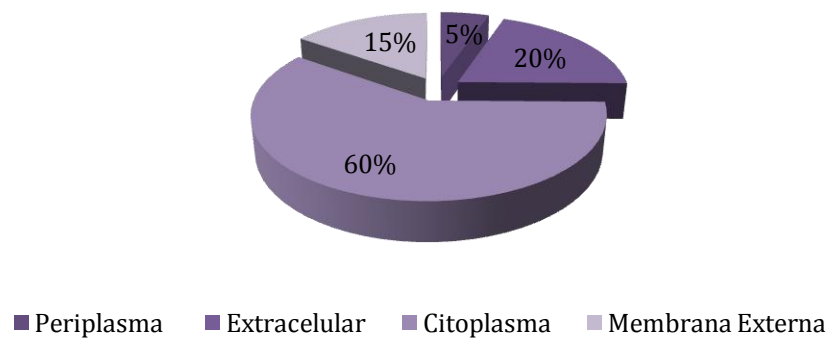
As sequências, em formato FASTA, de todas as proteínas do *Bacteroides fragilis* YCH46, foram depositadas no site PASTA 2.0 (**Gráfico 4**). O resultado obtido foi que 325(7%) do total das proteínas apresentam características amiloidogênicas. Todos os resultados foram comparados com proteínas amiloides já conhecidas na literatura são eles: a proteína Curli da *E. Coli*, A $\beta$ -42 de Humano. As proteínas identificadas pelo PASTA 2.0 foram analisadas pelo software Cello(**Gráfico 5**), assim descobriu-se que 195(60%) das proteínas são citoplasmáticas, 65 (20%) estão na membrana externa, 49 (15%) são extracelulares e 16 (5%) estão localizadas no periplasma. As proteínas que apresentam maior interesse para o estudo são aquelas presentes na membrana externa, as extracelulares e as periplasmáticas. Com isso, essas proteínas foram submetidas à análise a outros dois programas para confirmar outras características amiloidogênicas. O VendruscoloLab - Software confirmou que todas essas proteínas de interesse apresentam um score baixo ou negativo indicando que são muito insolúveis, característica igual às proteínas amiloidogênicas. Já o software Tango confirmou que as mesmas proteínas apresentam agregação  $\beta$ -cruzada, alfa-helices semelhante a modelos utilizados. As proteínas com melhores scores (**Tabela 2**) variaram de -0.7 até 0,73. Elas estavam localizadas na membrana externa e periplasma.

**Tabela 2:** resultado das proteínas que mais se assemelham com os amiloides estabelecidos na literatura.

<b>Proteínas</b>	<b>Localização</b>	<b>Score</b>	<b>Ligação <math>\beta</math>-pregueada</b>
A $\beta$ -42 - humana	Transmembrana	0.303015	57,14
Csg-A <i>E. coli</i>	Extracelular	0.566137	40,4
YP_097469.1 Proteína hipotética	Membrana externa	-0.623456	49,01
YP_0974381 Proteína hipotética conservada	Extracelular	0.020416	57,94
YP_10011711 Proteína hipotética	Extracelular / periplasma	0.326759	57,14
YP_1007461 Proteína hipotética	Extracelular	-0.776663	62,93
YP_0978741 Proteína hipotética	Extracelular	0.423518	54,59
YP_0992391 Proteína hipotética conservada	Extracelular	0.734028	53,49
YP_0975271 Proteína hipotética conservada	Extracelular	0.655104	53,28
YP_1005091 Proteína hipotética conservada	Membrana externa/ extracelular	0.658267	53,07
YP_0998241 Proteína hipotética conservada	Membrana externa	0.215046	51,49
YP_0990101 Sialidase	Extracelular	-0.642412	51,29



**Gráfico 4- Localização das Proteínas a partir do software Pasta 2.0.** De acordo com o software 60% das proteínas são citoplasmáticas, 15% extracelulares, 5% localizadas no periplasma e 20% estão localizadas na membrana externa.



**Gráfico 5- Localização das Proteínas a partir do software Cello.** De acordo com o software 60% das proteínas são citoplasmáticas, 15% extracelulares, 5% localizadas no periplasma e 20% estão localizadas na membrana externa.

**Tabela 3:** Resumo dos resultados.

<b>Amostras</b>	<b>Biofilme</b>	<b>Proteinase k</b>	<b>Metaperiodato de sódio</b>	<b>Congo Red</b>	<b>Tioflavina S</b>
<b>SBF 1</b>	Produz	Reduziu	Reduziu	Colônia cinza claro	Azul escuro
<b>SBF2</b>	Produz	Reduziu	Reduziu	Colônia acinzentada	Azul escuro
<b>SBF3</b>	Produz	Reduziu	Reduziu	Colônia cinza claro	Azul escuro
<b>SBF5</b>	Produz	Reduziu	Reduziu	Colônia acinzentada	Azul claro
<b>SBF7</b>	Produz	Reduziu	Reduziu	Colônia acinzentada	Azul claro
<b>SBF10</b>	Produz	Reduziu	Reduziu	Colônia acinzentada	Azul claro
<b>SBF12</b>	Produz	Reduziu	Reduziu	Colônia clara	Azul escuro
<b>ATCC 25285</b>	Produz	Reduziu	Reduziu	Colônia preta	Azul claro
<b>638R</b>	Produz	Reduziu	Reduziu	Colônia preta	Azul escuro
<b><i>S. epidermidis</i></b>	Produz	Reduziu	Reduziu	Colônia preta	Azul claro
<b><i>Clostridium citriniae</i></b>	Produz	Reduziu	Reduziu	Colônia clara	Azul escuro

## 6 DISCUSSÃO

*Bacteroides fragilis* é um bacilo gram-negativo que vive no intestino humano. Este microrganismo é um dos principais anaeróbios responsável por causar infecções endógenas. Para tal efeito, utiliza-se de diversos fatores de virulência. Um dos mais estudados é o complexo polissacarídeo capsular (CPC), que é formado por oito polissacarídeos distintos. Os polissacarídeos PSA e PSB, são compostos cada um com unidades de repetição que têm grupos amino carregados positivamente e grupos carboxila ou fosfato carregados negativamente. O CPC é um dos fatores que promovem a formação de abscesso em sítios fora do intestino (Coyne *et al.* 2000; Choiet *al.*, 2002; Doğanet *al.* 2013).

No presente estudo, observou-se que todas as amostras apresentaram cápsulas. O *B. fragilis* possui três tipos de cápsula que são classificadas como: Micro cápsula (MC), Grande cápsula (LC) e pequena cápsula. A grande cápsula está associada à resistência bacteriana. Estudos indicam que a micro cápsula está associada à formação de abscessos (Luttonet *al.*, 1991; Patrick *et al.*, 2010) Cox em 2009 relacionou o aparecimento de abscesso cerebral em uma criança na Uganda após a mesma apresentar otite crônica. As bactérias anaeróbias isoladas foram *Proteus mirabilis* e *B. fragilis*, ambas encapsuladas. O estudo evidencia que as bactérias encapsuladas estão muito relacionadas com diversos quadros infecciosos formadores de abscesso (Cox *et al.*, 2009).

A formação de biofilme é um dos fatores que contribui para adesão da bactéria ao sítio de interesse e também é um fator de virulência. Pouco se tem descrito sobre a formação de biofilme de bactérias anaeróbias do intestino. No presente estudo foi constatado que a formação de biofilme é uma característica presente nas amostras patogênicas e ambiental testadas. Por outro lado, a amostra coletada da microbiota saudável apresentou baixa formação de biofilme.

Nos últimos anos, a formação de biofilme no trato gastrointestinal vem sendo relacionado com possível estado pré-câncer no cólon. Um estudo recente de Dejea e colaboradores relataram a colonização e formação de biofilme bacteriano na superfície epitelial do cólon em pacientes com Polipose Adenomatosa Familiar (FAP). A mutação herdada na FAP bloqueia a montagem do complexo E-caderina /  $\beta$ -catenina nas junções aderentes do epitélio e aumentam o risco de passagens de



microrganismos por elas. Além disso, a formação de biofilme na superfície do tecido canceroso de cólon, e também nas criptas Lieberkühn, pode ser observada. A degradação da mucina por patógenos resulta na formação de biofilme na superfície epitelial que causa a invasão de bactérias até as criptas e aceleram a carcinogênese (Dejea *et al.*, 2018; Rascov *et al.*, 2018). É interessante notar a dualidade da relação de *B. fragilis* com o hospedeiro humano. O seu potencial carcinogênico pode estar relacionado a fatores de virulência presentes em apenas algumas cepas, como no caso do biofilme, enquanto cepas não patogênicas são importantes para o bom desenvolvimento do sistema imunológico.

A utilização da proteinase K e do metaperiodato de sódio nesse estudo teve como objetivo compreender os componentes presentes no biofilme de *B. fragilis*. O resultado foi que todas as cepas tiveram seu biofilme reduzido. A cepa ATCC 35294 de *S. epidermidis*, em condições de aerobiose, é conhecida na literatura como um biofilme predominantemente glicídico. No entanto, em nosso estudo ela sofreu também a ação da proteinase K. A explicação para tal efeito possivelmente é que nas condições de anaerobiose, que a cepa foi, estaria sofrendo a regulação quorum sensing e ativando genes formadores de biofilme diferentes. Sendo assim acabou apresentando um biofilme mais protéico. Para confirmar esse achado e melhorar a barra de erro do nosso estudo este ensaio será repetido futuramente.

Os amiloides associados à amiloidose humana e doenças degenerativas são bem conhecidos pelos seus efeitos citotóxicos. Os mecanismos moleculares de toxicidade nesses vários sistemas são diversos e incluem dano tecidual e inflamação causados por fibras maduras depositadas. Semelhante a amiloides patológicos, amiloides bacterianos podem estar associados com danos nas células e tecidos como uma consequência do processo de formação da fibra no local da infecção. Portanto, amiloide é considerado como um fator de virulência nas bactérias patogênicas por muitos autores (Van *et al.*, 2018).

No resultado obtido nesse estudo, os *B. fragilis* que apresentam eventual amiloide foram os coletados de amostras clínicas e a amostra ambiental. A amostra da microbiota intestinal não apresenta evidências de produzir amiloide na formação do biofilme. Nesse resultado pode-se sugerir que a presença do amiloide na formação do biofilme dessas bactérias pode ser mais um fator que contribui para que ele resista em ambientes que não é seu habitat comum. Sendo assim, seu biofilme precisa ser mais resistente ao ataque do sistema imunológico do hospedeiro.

Negi e colaboradores em 2017 estudaram potenciais peptídeos bacterianos parecidos com os humanos que seriam responsáveis por promover autoimunidade em doenças com início tardio. Esta autoimunidade pode destruir a funcionalidade da proteína alvo. Portanto, ela pode acabar sendo uma das causadoras de distúrbios metabólicos inflamatórios de início tardio, tais como, Diabetes, Artrite Reumatoide, Hiperlipidemias, Câncer e Doença de Alzheimer. Neste estudo, foi encontrado um grande número de peptídeos idênticos entre as bactérias humanas e intestinais, que se ligavam aos alelos HLA-II e, portanto, provavelmente auto imunogênicos. Além disso, observou-se que tais candidatos auto-ímmes foram relacionados com espécies bacterianas pertencentes aos filos Firmicutes e Proteobacteria. Levando os autores a concluir que esses filos podem ter maior impacto sobre a doença em indivíduos geneticamente predispostos (Negi *et al.*, 2017).

Existe uma estreita relação mutualística e simbiótica entre a microbiota intestinal e a saúde do intestino. Quando ocorre uma diminuição da biodiversidade intestinal ou o aumento de bactérias patogênicas, é caracterizado a disbiose. Este fenômeno resulta na alteração do sistema imunológico da mucosa intestinal e no surgimento de doenças inflamatórias, imunológicas, metabólicas ou degenerativas (Chassaing e Gewirtz., 2014). Evidências emergentes indicam que a alteração na composição da microbiota intestinal pode contribuir em alguns distúrbios neurológicos. Portanto, intervenções como antibióticos, probióticos, patógenos e nutrição devem afetar a composição da microbiota intestinal e a função fisiológica do intestino. Dessa forma, as intervenções na microbiota intestinal são novas estratégias para tratar ou ao menos retardar a progressão das doenças neurodegenerativas (Huet *al.*, 2016).

A idade avançada está associada à inflamação crônica de baixo grau. Consequentemente, os idosos apresentam também uma maior permeabilidade das células da mucosa intestinal e um aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica. Sendo assim, exudatos bacterianos conseguem ultrapassar essas barreiras mais facilmente (Bischoff *et al.*, 2014; VanSpaendonk *et al.*, 2017).

Zhan e colaboradores em 2016 provaram que bactérias gram-negativas estão associadas à neuropatologia da doença de Alzheimer (DA). Estudos prévios demonstraram que LPS e curli de *E. coli* foram detectados imunocitoquimicamente no parênquima cerebral e vasos em todos os cérebros com DA. Os níveis de curli medidos usando Western blots foram maiores na DA em comparação com os

cérebros de controle ( $p < 0,01$ ) e o curli foi localizado nos neurônios na DA mas não nos cérebros controle (Zhanet *et al.*, 2016).

Chen e colaboradores usaram modelo de camundongo para mostrar que a presença de bactérias produtoras de curli no intestino aumenta a inflamação e a deposição de  $\alpha$ -sinucleína no cérebro. Curiosamente, estudos anteriores apontam que o intestino pode estar envolvido, ou mesmo ser a origem da agregação de  $\alpha$ -sinucleína, na doença de Parkinson e também na Doença de Alzheimer. O eixo do intestino-cérebro pode fornecer contato de depósitos amiloides bacterianos localizados no intestino e hospedar proteínas propensas a amiloidose no sistema nervoso central, semelhante à via de infecção de príons que são ingeridos em encefalopatias espongiformes transmissíveis (EETs) (Chen *et al.*, 2016).

O estudo da presença de amiloides no biofilme bacteriano é um processo complexo e minucioso. A princípio, ao adicionarmos a Tioflavina S ao biofilme de *B. fragilis* não conseguimos distinguir as cepas produtoras de biofilme das não produtoras. A Tioflavina S é um corante que se liga às proteínas e moléculas hidrofóbicas, supostamente onipresentes em biofilmes bacterianos. No entanto, ao observar as fotos de microscopia de fluorescência com maior cuidado, observamos que existe certa diferença de tonalidade azul entre as cepas estudadas. Esse fenômeno é explicado pela capacidade do corante Tioflavina S de aumentar até 100x sua fluorescência na presença de amiloides. Isso ocorre por conta da ligação perpendicular que faz ao se aderir nas ligações  $\beta$ . O amiloide sofre uma pequena mudança conformacional que aumenta a fluorescência do corante (Groenning, 2009).

Recentemente, descobriu-se um novo corante que, aparentemente, se liga especificamente somente ao amiloide. Mahía e colaboradores, observaram que o corante Acetamida (composto 1D) cora bem as fibras amiloides humanas, a  $\alpha$ -sinucleína e também consegue corar peptídeos de *Staphylococcus* sp. No entanto, sua fluorescência é menor que a Tioflavina T (Mahía *et al.*, 2018). Esperamos incluir esse corante em estudos futuros com as cepas de *B. fragilis* testadas.

Em nossos estudos *in silico* conseguimos concluir que das 4640 proteínas do *B. fragilis* YCH46 somente 325 (7%) apresentam ligações amiloidogênicas próximas aos controles positivos que são  $\beta$ -42 de humano, e o Curli da *E. coli*. O programa Pasta 2.0 utiliza bancos de dados para comparar proteínas amiloides conhecidas e prever a formação de ligações entre folhas  $\beta$  em sequências de aminoácidos. Outros recursos importantes para a classificação de proteínas amiloides, podem ser

facilmente aplicado sem uma escala genômica, desde que as sequências de interesse estejam disponíveis. Além disso, com intuito de melhorar nossa pesquisa, determinamos onde estas proteínas estariam localizadas na célula. Utilizamos o servidor Cello, um programa de previsão de localização sub-celular de proteínas, para determinar se proteínas com características amiloides estão expostas na superfície de *B. fragilis*. Esse programa mostrou que das 325 proteínas amiloidogênicas selecionadas no programa Pasta 2.0, 130 delas estão localizadas nos compartimentos celulares que o amiloide é encontrado normalmente. Sendo assim, 65 estão localizadas na membrana externa, 49 são extracelulares e 16 estão no periplasma. A maioria são proteínas hipotéticas que não se sabe qual a função na bactéria. Esses resultados nos indicam que o *B. fragilis* pode produzir e secretar proteínas com características amiloides no biofilme.

Esperamos, com esse estudo, entender mais sobre o envolvimento de bactérias da microbiota no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas e enriquecer a pesquisa dos amiloides bacterianos, mostrando que podem existir mais espécies de bactérias produtoras de amiloides além das conhecidas na literatura. Para melhorar a investigação de amiloides no biofilme dos *B. fragilis*, iremos buscar novos corantes que sejam mais específicos para observação do amiloide no biofilme pela microscopia de fluorescência, como o corante sugerido no protocolo de Mahia e colaboradores em 2018. Planejamos fazer o tratamento do biofilme também com DNase. Testes com microscopia confocal nos permitirão observar a espessura do biofilme após os tratamentos. A microscopia eletrônica de varredura pode ser uma importante ferramenta para visualizarmos o amiloide no biofilme. Ademais, planejamos extrair esse amiloide do biofilme seguindo o protocolo de Naiki 1988 com algumas modificações. Paralelamente, continuaremos a pesquisa *in silico* comparando as proteínas selecionadas nesse estudo com os amiloides já conhecidos na literatura.

## 7 CONCLUSÃO

- O biofilme do *Bacteroides fragilis* possivelmente é composto por uma fração maior de proteínas, mas também possui polissacarídeos.
- Todos as cepas utilizadas nesse estudo apresentam cápsula polissacarídica
- Cepas de *B. fragilis* patogênicas e ambientais apresentam fortes indícios da presença de amiloides na formação de seus biofilmes.
- Estudos *in silico* evidenciam que *B. fragilis* apresentam proteínas com características que as encaixam em potenciais amiloides bacteriano.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agahi, A., Hamidi, G. A., Daneshvar, R., Hamdieh, M., Soheili, M., Alinaghypour, A., Salami, M. (2018). Does Severity of Alzheimer's Disease Contribute to Its Responsiveness to Modifying Gut Microbiota? A Double Blind Clinical Trial. *Frontiers in Neurology*, 9.
- Agostoni, E., Chinnoek, J. E., De Daly, M. B., Murray, J. G. (1957). Functional and histological studies of the vagus nerve and its branches to the heart, lungs and abdominal viscera in the cat. *J. Physiol.* 135, 182–205.
- Alexandrov, P.N., Pogue, A., Bhattacharjee, S., Lukiw, W. J. (2011). Retinal amyloid peptides and complement factor H in transgenic models of Alzheimer's disease. *Neuroreport*. 22, 623–627.
- Alzheimer A. (1907). Übereineeigenartige Erkrankung der Hirnrinde Allgemeine Zeitschrift fur Psychiatrie und Psychisch-gerichtliche Medizin. 1907 Jan ; 64:146-8.
- Andrade, N. J., Pinto, C. L. O., Lima, J. C. (2008). Adhesion and formation of microbial biofilms. *Hygiene in the Food Industry - Evaluation and control of adhesion and formation of bacterial biofilms*. São Paulo (SP): Varela. 410p.
- Asti, A., Gioglio, L. (2014). Can a bacterial endotoxin be a key factor in the kinetics of amyloid fibril formation *J. Alzheimers. Dis.* 39, 169–179.
- Bager, P., Wohlfahrt, J., Westergaard, T. (2008). Caesarean delivery and risk of atopy and allergic disease: Meta-analyses. *ClinExp Allergy*. 38, 634–642.
- Bischoff, S. C., Barbara, G., Buurman, W., Ockhuizen, T., Schulzke, J.-D., Serino, M. Wells, J. M. (2014). Intestinal permeability – a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterology*, 14(1).
- Bohm, C., Chen, F., Sevalle J., Qamar S., Dodd R., Li Y. (2015). Current and future implications of basic and translational research on amyloid- $\beta$  peptide production and removal pathways. *Mol Cell Neurosci*. 66, 3–11.
- Boix-Amoros, A., Collado, MC., Mira, A. (2016). Relationship between milk microbiota, bacterial load, macronutrients, and human cells during lactation. *Front Microbiol*. 10 567-569.
- Bonaz B., Bazin, T., Pellissier, S. (2018). The Vagus Nerve at the Interface of the Microbiota-Gut-Brain Axis. *Front. Neurosci.* 12. 456-567.
- Bourgade, K., Le Page, Bocti, A., Witkowski, C., Dupuis J. M., Frost, G., E. H., & Fülöp. T. (2016). Protective Effect of Amyloid- $\beta$  Peptides Against Herpes Simplex Virus-1 Infection in a Neuronal Cell Culture Model. *Journal of Alzheimer's Disease*, 50(4) 1227–1241
- Brady, A. J., Laverty G., Gilpin D.F., Kearney P., Tunney M. (2017). Antibiotic susceptibility of planktonic and biofilm-grown staphylococci isolated from implant-associated infections: should MBEC and nature of biofilm formation replace MIC? *J Med Microbiol*; 66:461e9
- Branda, S.S., Chu, F., Kearns, D. B., Losick, R., Kolter, R. (2006). A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Mol Microbiol* 59 : 1229 – 1238 .
- Browning, K., Verheijden N., S., & Boeckxstaens G. E., (2017). The Vagus Nerve in Appetite Regulation, Mood, and Intestinal Inflammation. *Gastroenterology*, 152(4), 730–744.
- Buxbaum, J. D., Oishi, M., Chen, H. I., Pinkas-Kramarski R., Jaffe, E. A., Gandy, SE, Greengard, P. (1992). Cholinergic agonists and interleukin 1 regulate processing and secretion of the Alzheimer beta/A4 amyloid protein precursor. *Proc Natl AcadSci USA*. 89:10075–10078.
- Chassaing B., Gewirtz A.T. (2014). Gut microbiota, low-grade inflammation, and metabolic syndrome. *Toxicol Pathol.* (2014) 42:49–53.
- Cheung, G.Y.C., Kretschmer, D., Queck, S.Y., Joo, H.S., Wang, R., Duong, A.C., Nguyen, T.H., Bach, THL.,

- Porter, A.R., DeLeo, F.R., Peschel, A., Otto M. (2014) . Insight into structure-function relationship in phenol-soluble modulins using an alanine screen of the phenol-soluble modulin (PSM)  $\alpha 3$  peptide . *Faseb J* **28** : 153 – 161.
- Chen, S.G., Stribinskis, V., Rane, M.J., Demuth, D.R., Gozal, E., Roberts, A.M., Jagadapillai, R., Liu, R., Choe, K., Shivakumar, B., Son, F., Jin, S., Kerber, R., Adame, A., Masliah, E., Friedland, R.P. (2016) Exposure to the functional bacterial amyloid protein curli enhances alpha-synuclein aggregation in aged fischer 344 rats and *Caenorhabditis elegans*. *Scientific Reports*, 6(1).
- Choi, Y., Roehrl, H., Kasper, D.L., & Wang, J.Y. (2002). A Unique Structural Pattern Shared by T-Cell-Activating and Abscess-Regulating Zwitterionic Polysaccharides†. *Biochemistry*, 41(51), 15144–15151.
- Clemente, J. C., Ursell, L. K., Parfrey, L.W. & Knight, R. (2012) The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell* 148, 1258–1270.
- Consortium of the Human Microbiome Project (2012) Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 486: 207-214.
- Costa, B. S. Association between transcriptional regulators *bmor* and *oxyr* and phenotypic characteristics of strains of *Bacteroides fragilis*. Institute of microbiology and immunology- feredeal University of Rio de Janeiro. 2016.
- Costerton, W., Veeh, R., Shirtliff, M., Pasmore, M., Post, C., Ehrlich, G. (2003-2007). The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J Clin Invest*. 2003 Nov;112(10):1466-77. Erratum in: *J Clin Invest*. 2007Jan;117(1):278.
- Coyne, M., Kalka-Moll, J., Tzianabos, W., Kasper, A.O., & Comstock, L. E. (2000). *Bacteroides fragilis* NCTC9343 Produces at Least Three Distinct Capsular Polysaccharides: Cloning, Characterization, and Reassignment of Polysaccharide B and C Biosynthesis Loci. *Infection and Immunity*, 68(11), 6176–6181.
- Cox, K., Al-rawahi, G., Kollmann, T. (2009) Anaerobic brain abscess following chronic suppurative otitis media in a child from Uganda. *Can J infect Dis Med Microbiol*;19(3):e91-e93.
- Crowther D.C., Kinghorn, K.J., Miranda, E., Page R., Curry J.A., Duthie, F.A., Gubb, D.C., Lomas, D.A. (2005). Intraneuronal A $\beta$ , non-amyloid aggregates and neurodegeneration in a *Drosophila* model of Alzheimer's disease. *Neuroscience*, v. 132, p.123–135.
- Dejea, C. M., Fathi, P., Craig, J.M., Boleij, A., Taddese, R., Geis, A.L., Wu X., DeStefanoShields, C.E., Hechenbleikner, E.M., Huso, D.L., Anders, R., A., Giardiello, F. M., Wick, E.C., Wang, H., Wu S., Pardoll, D.M., Housseau, F., Sears, C.L. (2018). Patients with familial adenomatous polyposis harbor colonic biofilms containing tumorigenic bacteria. *Science* 359, 592–597.
- De Vadder, F., Grasset E., Mannerås Holm L., Karsenty G., Macpherson, A.J., Olofsson, L.E., Bäckhed, F., (2018) Gut microbiota regulates maturation of the adult enteric nervous system via enteric serotonin networks. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 115(25):6458-6463
- Doğan, M., Keskin, F., Feyzioğlu, B., Baykan, M., Özdemir, M., Kalkan, E., and Baysal, B. (2-13). "A Case Report of Cerebellar Abscess Caused by *Bacteroides fragilis*." *American Journal of Clinical Medicine Research* 1, no. 4: 48-50.
- Dominguez-Bello, M.G., Costello, E.K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., Knight, R. (2010) Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 11971–11975.
- Dragoš A. and Kovács A. T. (2017) The peculiar functions of the bacterial extracellular matrix. *Trends Microbiol.*, 25, pp. 257-266
- Dueholm, M.S., Søndergaard, M.T., Nilsson M., Christiansen, G., Stensballe, A., Overgaard, M.T., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T., Otzen, D.E., Nielsen, P.H. (2013) . Expression of Fap amyloids in *Pseudomonas aeruginosa* . *P*.

*fluorescens*, and *P. putida* results in aggregation and increased biofilm formation *Microbiologyopen* **2** : 365 – 382.

Dueholm, M.S., Otzen, D., Nielsen, P.H.R. (2013). Evolutionary insight into the functional amyloids of the pseudomonads. *PLoS One* **8** : e76630.

Ehrlich, G.D., Hu F.Z., Shen, K., Stoodley, P., Post, J.C. (2005) Bacterial plurality as a general mechanism driving persistence in chronic infections. *Clin.OrthopRelat.Res*; (437): 20-24.

Eisenberg, D.S., Sawaya, M.R.(2017) Structural studies of amyloid proteins at the molecular level. *Annu. Rev. Biochem.* 2017;86:69–95.

Endres, K, Schäfer, K.H.(2018) Influence of Commensal Microbiota on the Enteric Nervous System and Its Role in Neurodegenerative Diseases. *J Innate Immun.*10(3).

Erny, D., Hrabě de Angelis, A.L. &Prinz, M. (2017) Communicating systems in the body: how microbiota and microglia cooperate. *Immunology* 150, 7–15.

Eradi, P., Ghosh, S., & Andreana, P.R. (2018). Total Synthesis of Zwitterionic Tetrasaccharide Repeating Unit from *Bacteroides fragilis* ATCC 25285/NCTC 9343 Capsular Polysaccharide PS A1 with Alternating Charges on Adjacent Monosaccharides. *Organic Letters*, 20(15), 4526–4530.

Erskine, E., MacPhee, C. E., & Stanley-Wall, N. R. (2018). Functional Amyloid and Other Protein Fibers in the Biofilm Matrix. *Journal of molecular biology*, 430(20).

Fathi, P., and Wu, S. (2016). Isolation, detection, and characterization of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in clinical samples *Open Microbiol. J.* 10, 57–63.

Fernandez-Escamilla, A.M., Rousseau, F., Schymkowitz, J., Serrano, L. (2004). Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins *Nat Biotechnol*

Ferreira, T. G., Trindade C. N. R., Bell P., Teixeira, A. F., Perales J., Vommaro R.C., Domingues R.M.C.P., Ferreira E.O. (2018) Identification of the alpha-enolase P46 in the extracelularmembranevesicles of *Bacteroides fragilis*. vol.113, n.3, pp.178- 184

Flemming, H. C.and Wingender J.(2010)The biofilm matrix. *Nature. Reviews. Microbiology.*, 8, p. 623-633.

Forný-Germano, L., Lyra E Silva, N. M., Batista, A. F., Brito-Moreira, J., Gralle, M., Boehnke, S. E.,(2014). Alzheimer's disease- like pathology induced by amyloid-beta oligomers in nonhuman primates. *J. Neurosci.* 34, 13629–13643.

Friedland, R.P., Chapman, M.R.(2017)The role of microbial amyloid in neurodegeneration. *PLoSPathog*13(12):654-756.

Frost, G., Sleeth M.L., Sahuri-Arisoylu, M., Lizarbe, B., Cerdan, S. Brody L. (2014). The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nat Commun*;5312-420.

Gabrilska, R. A., & Rumbaugh, K. P. (2015). Biofilm models of polymicrobial infection. *Future microbiology*, 10(12), 1997-2015.

Gilan, I., & Sivan, A. (2013). Effect of proteases on biofilm formation of the plastic-degrading actinomycete *Rhodococcus ruber*C208. *FEMS Microbiology Letters*, 342(1), 18–23.

Gofna U., Oelschlaeger T.A., Hacker J., Ron E.Z., (2002) Papel da fibronectina na internalização mediada por curvas. *FEMS Microbiol Lett.* 212: 55 - 58 .

Goldstein, E. J. (1996). Anaerobic bacteremia. *Clin. Infect. Dis.*23(Suppl. 1):S97-S101.



- Goulet O.(2015) Potential role of the intestinal microbiota in programming health and disease. *Nutr Rev*; 73: 32–40.
- Groenning, M. (2009). Binding mode of Thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils—current status. *Journal of Chemical Biology*, 3(1), 1–18.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W. & Stoodley, P.(2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Rev. Microbiol.* 2, 95–108 .
- Hammer, N.D., McGuffie, B.A., Zhou, Y., Badtke, M.P., Reinke, A.A., Brännström, K., Gestwicki, J.E., Olofsson A., Almqvist, F., Chapman, M.R.,(2012) . The C-terminal repeating units of CsgB direct bacterial functional amyloid nucleation . *J Mol Biol* **422** : 376 – 389.
- Han, M., Liu, Y., Tan, Q., Zhang, B., Wang, W., Liu, J., Zhang, X.J., Wang, Y.Y., Zhang, J.M. (2011). Therapeutic efficacy of stemazole in a beta-amyloid injection rat model of Alzheimer's disease. *European Journal of Pharmacology*, v. 657, p. 104- 110.
- Harach, T., Marungruang, N., Duthilleul, N., Cheatham, V., McCoy, K.D., Frisoni, G., Neher, J.J., Fåk, F., Jucker, M., Lasser, T., Bolmont, T.(2017). Reduction of Aβ amyloid pathology in APPPS1 transgenic mice in the absence of gut microbiota. *Sci. Rep.* 7, 41 802-903.
- Hardy, J., Selkoe, D. J.(2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*.;297(5580):353–356.
- Heppner, F. L., Ransohoff, R. M. & Becher, B.(2015) Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 16, 358–372.
- Hirose Y., Imai Y., Nakajima K., Takemoto N., Toya S., Kohsaka S.(1994). Glial conditioned medium alters the expression of amyloid precursor protein in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*;198:504–509.
- Hu, X. Wang, T. Jin, F. (2016) Alzheimer's disease and gut microbiota. *Sci China Life Sci.* 59:1006–23.
- Human Microbiome Project Consortium. A framework for human microbiome research. 2012 *Nature*;486:215–221.
- Iraporda, C., Errea, A., Romanin, D.E., Cayet, D., Pereyra E., Pignataro, O. (2015) Lactate and short chain fatty acids produced by microbial fermentation downregulate proinflammatory responses in intestinal epithelial cells and myeloid cells. *Immunobiology* 220: 1161–1169
- Jandhyala, S.M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., Reddy, D.N. (2015) Role of the normal gut microbiota. *World J. Gastroenterol.* 21, 8787–8803.
- Jiang T., Yu J.-T., Tian Y., Tan L.(2013) Epidemiology and etiology of Alzheimer's disease: from genetic to non-genetic factors. *Current Alzheimer Research*.;10(8):852–867.
- Kennedy, P.J., Cryan, J.F., Dinan, T.G., Clarke, G.(2014). Irritable bowel syndrome: a microbiome-gut-brain axis disorder? *World J Gastroenterol.* 2014;20:14105–14125.
- Kumar, D. K. V., Choi, S. H., Washicosky, K. J., Eimer, W. A., Tucker, S., Ghofrani, J., Moir, R. D. (2017). Amyloid-β peptide protects against microbial infection in mouse and worm models of Alzheimer's disease. *Science Translational Medicine*, 8(340), 340ra72–340ra72.
- Lage, J. M. M.(1906–2006) 100 Years of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease.* 2006;9(3):15–26.
- Langa, S., Maldonado-Barragán, A., Delgado, S., Martín, R., Martín, V. (2012) Characterization of *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a strain isolated from human milk: from genotype to phenotype

ApplMicrobiolBiotechnol;94(5):1279–1287.

Lazzarotto, C. (2010). Formação de Biofilme de *Staphylococcus epidermidis* isolado de cateter venoso central através de métodos fenotípicos e genotípicos- Universidade Federal do Rio Grande do Sul- Faculdade de Medicina.

Lebeaux D., Chauhan, A., Rendueles, O., Beloin, C. (2013) From in vitro to in vivo models of bacterial biofilm-related infections. *Patógenos*;2 (2): 288-356

Lecanu, L., and Papadopoulos, V. (2013). Modeling Alzheimer's disease with non-transgenic rat models. *Alzheimers Res. Ther.* 5, 1– 9.

Leitsch D., Soki J., Kolarich D., Urban E., Nagy E. (2014) A study on Nim expression in *Bacteroides fragilis*. *Microbiology* 160:616– 622.

Linding, R., Schymkowitz, J., Rousseau, F., Diella, F., Serrano, L. (2004) A comparative study of the relationship between protein structure and beta-aggregation in globular and intrinsically disordered proteins *J Mol Biol* 345-353.

Luczak, S.E.T., Smits, S.H.J., Decker, C., NagelSteger, L., Schmitt L., Hegemann, J.H. (2016). A adesina *Chlamydia pneumoniae* Pmp21 forma oligômeros com propriedades adesivas . *J Biol Chem.* 291: 22806 - 22818 .

Lundmark, K., Westermark, G.T., Olsén, A., Westermark, P.(2005) Protein fibrils in nature can enhance amyloid protein A amyloidosis in mice: cross-seeding as a disease mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005;102:6098–6102

Lutton, D. A., Patrick, S., Crockard, A. D., Stewart, L. D., Larkin, M. J., Dermott, E. & McNeill, T. A. (1991). Flow cytometric analysis of within-strain variation in polysaccharide expression by *Bacteroides fragilis* by use of murine monoclonal antibodies. *J MedMicrobiol* 35, 229–237.

Mahía, A., Conde-Giménez, M., Salillas, S., Pallarés, I., Galano-Frutos, J. J., Lasa, Í., Sancho, J. (2018). A pyrene-inhibitor fluorescent probe with large Stokes shift for the staining of A $\beta$ 1–42,  $\alpha$ -synuclein, and amylin amyloid fibrils as well as amyloid-containing *Staphylococcus aureus* biofilms. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*.

Makino, H., Kushiro A., Ishikawa, E., Muylaert, D., Kubota, H.(2011). Transmission of intestinal *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* strains from mother to infant, determined by multilocus sequencing typing and amplified fragment length polymorphism. *Appl Environ Microbiol* 77: 6788–6793

Makino, H., Kushiro, A., Ishikawa, E., Kubota, H., Gawad, A., Sakai, T., Oishi, K., Martin, R., Ben-Amor, K., Knol, J. (2013). Mother- to-infant transmission of intestinal bifidobacterial strains has an impact on the early development of vaginally delivered infant's microbiota. *PLoS ONE* 8(345-355).

Marques, F., Sousa, J.C., Sousa N., Palha, J.A.(2013). Blood-brain-barriers in aging and in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.*;8:38

Martín, R., Lang, S., Reviriego, C., Jimenez, E., Martín, M.L.(2003). Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Pediatr.* ;143:754–758.

Minter, M. R., Taylor, J. M., Crack P. J. (2016). The contribution of neuroinflammation to amyloid toxicity in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 136 457–474.

Moir, R. D., Lathe, R., & Tanzi, R. E. (2018). The antimicrobial protection hypothesis of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia.* 2018 :1-13.

Morrisette, D.A., Parachikova, A., Green, K. N., laferla, F.M.(2009). Relevance of transgenic mouse models to human Alzheimer disease. *Journal of Biological Chemistry*, v. 284, p. 6033-6037.

- Mulle, J.G, Sharp W.G., Cubells, J.F.O.(2013).Microbioma intestinal: uma nova fronteira na pesquisa do autismo.Relatórios atuais da psiquiatria;15 : 337.
- Navarro, V., Sanchez-Mejias, E., Jimenez, S., Muñoz-Castro, C., Sanchez-Varo, R., Davila, J.C., Vizuete, M., Gutierrez, A., Vitorica, J.(2018). Microglia in Alzheimer'sDisease: Activated, Dysfunctional or Degenerative. *Front. Aging Neuroscience*, 29 356-398.
- Newman, M., Musgrave, F.I., Lardelli M. (2007).Alzheimer disease: Amyloidogenesis, the presenilins and animal models. *BiochimicaetBiophysicaActa*, v. 1772, p. 285-297.
- Nicolas, M. e Hassan, B. A.(2014). Amyloid precursor protein and neural development. *Development* 141, 2543–2548.
- Nishimori, J. H., Newman, T. N., Oppong, G. O., Rapsinski, G. J., Yen, J. H., Biesecker, S. G. (2012). Microbial amyloids induce interleukin 17A (IL-17A) and IL-22 responses via Toll-like receptor 2 (TLR2) activation in the intestinal mucosa. *Infect. Immun.* 80, 4398–4408.
- Oakley, R, TharakanB.(2014). Vascular hyperpermeability and aging. *Aging Dis.*;5:114–125.
- O'Brien, R. J., Wong P. C. (2011). Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Neurosci.* 34, 185–204.
- Patrick, S. e J. H. Reid. (1983).Separation of capsulate and non-capsulate *Bacteroides fragilis* on a discontinuous density gradient. *J. Med. Microbiol.* 16 239-241.
- Patrick, S., Blakely, G. W., Houston, S., Moore, J., Abratt, V. R., Bertalan, M., Cerdén o-Ta'rraga, A. M., Quail, M. A., Corton, N. & other authors (2010). Twenty-eight divergent polysaccharide loci specifying within- and amongst-strain capsule diversity in three strains of *Bacteroides fragilis*. *Microbiology* 156, 3255–3269.
- Payne, L. F., M.S., and Keelan, J.A. (2017). Planting the seed: Origins, composition, and postnatal health significance of the fetal gastrointestinal microbiota.Stinson. *Crit. Rev. Microbiol.* 43: 352–369
- Pistollato, F. (2016).Role of gut microbiota and nutrients in amyloid formation and pathogenesis of Alzheimer disease. *NutrRev.* ;74:624–34.
- Provasi, S., Cattaneo, A., Cattane, N., Galluzzi, S., Lopizzo, N., Plazzotta, G., Frisoni, G. (2016). Association of brain amyloidosis with pro-inflammatory gut bacterial strains and peripheral inflammation markers in cognitively impaired elderly. *European Neuropsychopharmacology*, 26, S649–S650.
- Pumbwe, L., Skilbeck, C. A., Nakano, V., Avila-Campos, M. J., Piazza, R. M. F., & Wexler, H. M. (2007). Bile salts enhance bacterial co-aggregation, bacterial-intestinal epithelial cell adhesion, biofilm formation and antimicrobial resistance of *Bacteroides fragilis*. *Microbial Pathogenesis*, 43(2-3), 78–87
- Radde, R. (2006). A $\beta$ 42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO Rep.* ;7(9):940–946.
- Rascov, H., Kragh, K. N., Bjarnsholt, T., Alamili, M., Gögenur, I. (2018). Bacterial biofilm formation inside colonic crypts may accelerate colorectal carcinogenesis. *Clinical Translation Medicine*. 2018; 7: 30.
- Rescigno, M., Urbano, M.(2001) Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol.*;2(4):361–367.
- Romero, D., Aguilar, C., Losick, R., Kolter, R. (2010). Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms . *Proc Natl Acad Sci USA* **107** : 2230 – 2234
- Round, J.L., Lee, S.M., Li, J., Tran, G., Jabri, B., Chatila, T.A., Mazmanian, S.K.(2011). The Toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota *Science*. 2011;332:974–977
- Rousseau,F., Schymkowitz, J., Serrano, L.(2006)Protein aggregation and amyloidosis: confusion of the

kinds? *Current Opinion in Structural Biology*, 16:1-9

Manasa, S., Jandhyala, R., Talukdar, S.C., Harish, V., M, S., Reddy, D. N. (2015). Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol*

Sandler, R.H., Finegold, S.M., Bolte, E. R., Buchanan, C. P., Maxwell, A.P., Vaisanen, M.L. (2000). Benefício de curto prazo do tratamento oral com vancomicina do autismo de início regressivo. *Jornal de neurologia infantil*; 15 : 429-435.

Sager, M., Benten, W. P. M., Engelhardt, E., Gougoula, C., & Benga, L. (2015). Characterization of Biofilm Formation in [*Pasteurella*] pneumotropica and [*Actinobacillus*] muris Isolates of Mouse Origin. *PLOS ONE*, 10(10), e0138778.

Servick K. (2018) Do gut bacteria make a second home in our brains? *Science*, San Diego, California, 9 nov. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencemag.org/news/2018/11/do-gut-bacteria-make-second-home-our-brains>>. Acesso 26 nov 2018.

Shukla S. K., Rao T. S. (2017). *Staphylococcus aureus* biofilm removal by targeting biofilm-associated extracellular proteins. *Indian J. Med. Res.*

Som Chaudhury, S., & Das Mukhopadhyay, C. (2017). Functional amyloids: interrelationship with other amyloids and therapeutic assessment to treat neurodegenerative diseases. *International Journal of Neuroscience*, 128(5), 449–463.

Sormani P., Aprile F. A. and Vendruscolo M. (2015) The CamSol Method of Rational Design of Protein Mutants with Enhanced Solubility. *J. Mol. Biol.*

Sormani P., Amery L., Ekizoglou S., Vendruscolo M., and Popovic B. (2017) Rapid and accurate in silico solubility screening of a monoclonal antibody library. *Sci. Rep.*

Spitzer, P., Condic, M., Herrmann, M., Oberstein, T. J., Scharin-Mehlmann, M., Gilbert, D. F., Maler, J. M. (2016). Amyloidogenic amyloid- $\beta$ -peptide variants induce microbial agglutination and exert antimicrobial activity. *Scientific Reports*, 6(1).

Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms as Complex Differentiated Communities. *Annual Review of Microbiology*, 56(1), 187–209.

Szczuka, E., Telega, K., Kaznowski, A., (2014) Biofilm formation by *Staphylococcus hominis* strains isolated from human clinical specimens. *Folia Microbiologica.*, 60: 1-5.

Schwartz, K., Syed, A. K., Stephenson, R.E., Rickard, A.H., Boles, B. R. 2012 . Functional amyloids composed of phenol soluble modulins stabilize *Staphylococcus aureus* biofilms . *PLoS Pathog* 8 : e1002744

Taglialegna, A., Lasa, I., Valle, J. (2016) Amyloid structures as biofilm matrix scaffolds. *J Bacteriol.* 2016;198:2579–88

Thursby, E., Juge, N. (2017) Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J.*; 474(11):1823–36.

Tissier, H. (1900). *Recherches sur la flore intestinale des nourrissons (état normal et pathologique)* (Méd.--Paris).

Toscano, M., De Grandi, R., Peroni, D. G., Grossi, E., Facchin, V., Comberiati, P., & Drago, L. (2017). Impact of delivery mode on the colostrum microbiota composition. *BMC Microbiology*, 17(1).

Tsukunda, K., Mogi, M., Iwanami, J., Min, L.J., Sakata, A., Jing, F., Iwai, M., Horiuchi, M. (2009) Cognitive deficit in Amyloid- $\beta$ - Injected mice was improved by pretreatment with a low dose of telmisartan partly because of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  activation. *Hypertension*, v. 54, p. 782-787.

Tursi, S. A., & Tükel, Ç. (2018). Curli-Containing Enteric Biofilms Inside and Out: Matrix Composition,

Immune Recognition, and Disease Implications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 82(4)

Tzianabos, A.O., Onderdonk, A.B., Rosner, B., Cisneros, R.L., Kasper, D.L.(1993) Structural features of polysaccharides that induce intra- abdominal abscesses. *Science*.;262(5132):416–419.

Van Gerven, N., Klein, R.D., Hultgren, S.J., Remaut, H. (2015) . Bacterial amyloid formation: structural insights into curli biogenesis . *Trends Microbiol* **23** : 693 – 706

Van Spaendonk H, Ceuleers H, Witters L., Patteet E., Joossens J., Augustyns K., Lambeir A.M., Meester I., Man D. J., Winter B. (2017) Regulation of intestinal permeability: The role of proteases. *World J Gastroenterol*. 2017;23(12):2106-2123.

Van Gerven, N., Van der Verren, S. E., Reiter, D. M., & Remaut, H. (2018). The Role of Functional Amyloids in Bacterial Virulence. *Journal of Molecular Biology*.

Vassar, R. (2001) The beta-secretase, BACE: a prime drug target for Alzheimer's disease. *J MolNeurosci.*, 17: 157-70.

Walsh, I., Seno F., Silvio, C.E., Tosatto and Trovato. (2014)A.PASTA2: An improved server for protein aggregation prediction *Nucleic Acids Research*, accepted.

Wang, Y., L.H.(2014). Kasper The role of microbiome in central nervous system disorders *Brain Behav. Immun.*, 38 , pp. 1-12 Wang H.X., Wang Y.P.(2016) Gut Microbiota-brain Axis. *Chin. Med. J.* 2016;129:2373–2380.

Watson, J, (2006) Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection among healthy newborns—Chicago and Los Angeles County, 2004. *MMWR*. 2006;55:329–332.

Wexler, H. M.(2007) *Bacteroides*: the good, the bad, and the nitty-gritty. *ClinMicrobiolRev.*;20:593–621.

White, M. R., Kandel, R., Tripathi, S., Condon, D., Qi, L., Taubenberger, J., & Hartshorn, K. L. (2014). Alzheimer's Associated  $\beta$ -Amyloid Protein Inhibits Influenza A Virus and Modulates Viral Interactions with Phagocytes. *PLoS ONE*, 9(7), e101364.

Witkowska-Zimny and Kaminska-El-Hassan, (2017). Cells of human breast milk. *Cellular & Molecular Biology Letters*.

Yano, J.M., K. Yu, G.P. Donaldson, G.G. Shastri, P. Ann, L. Ma, C.R. Nagler, R.F. Ismagilov, S.K. Mazmanian, E.Y. Hsiao (2015). Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis *Cell*, 161, pp. 264-276

Yu C.S., Lin, C. J., Hwang JK (2004). Predicting subcellular localization of proteins for Gram-negative bacteria by support vector machines based on n-peptide compositions. *Protein Science*, 13:1402-1406.

Yuhai, Z. and Walter J. (2017) Secretory Products of the Human GI Tract Microbiome and Their Potential Impact on Alzheimer's Disease (AD): Detection of Lipopolysaccharide (LPS) in AD Hippocampus.

Zhang, J., Ke, K. F., Liu, Z., Qiu, Y. H., Peng, Y. P. (2013). Th17 cell-mediated neuroinflammation is involved in neurodegeneration of A $\beta$ 42-induced Alzheimer's disease model rats. *PLoS ONE*8:e75786. 10.1371

Zhao X., Jiang Z., Yang F., Wang Y., Gao, X., Wang Y., Chai. X., Pan,G., Zhu, Y. (2016). Sensitive and simplified detection \* antibiotic influence on the dynamic and versatile changes of fecal short-chain fatty acids. *PLoSOne* 11(12):420-440.

Zhao, Y., Jaber, V., Lukiw,WJ., (2017).Secretory products of the human GI-tract microbiome and their potential impact on Alzheimer's disease (AD): detection of lipopolysaccharide (LPS) in AD hippocampus. *Front Cell InfectMicrobiol*:318.

Zou, Z., Liu, C., Che, C., Huang H.(2014) Clinical genetics of Alzheimer's disease. *Biomed Res* 23. 356-367.

Zhao, Y., Cong, L., Lukiw, W.J.(2017) Lipopolysaccharide (LPS) accumulates in neocortical neurons of alzheimer's disease (AD) brain and impairs transcription in human neuronal-glia primary co-cultures. *Front Aging Neurosci*9:407. 789-810.

Zhao, Y., Cong, L., Lukiw, W.J. (2018)*Bacteroidetes* Neurotoxins and Inflammatory Neurodegeneration. *Molecular Neurobiology* 90- 456-467.

Zhou, Y., Smith, D., Leong, B.J., Brännström, K., Almqvist, F., Chapman, M.R (2012) Promiscuous cross-seeding between bacterial amyloids promotes interspecies biofilms. *J. Biol. Chem.* 2012;287:35092–35103