

**ISADORA SILVA BARCELLOS**

INTERFERÊNCIA DE *Bacteroides thetaiotaomicron* NO  
CRESCIMENTO E VIRULÊNCIA DE *Escherichia coli*  
ENTEROAGREGATIVA



**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  
JULHO/2019

**Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Médica, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora Regina Maria Cavalcanti Pilotto Domingues e coorientação da Professora Karla Rodrigues Miranda.**

## FICHA CATALOGRÁFICA

### CIP - Catalogação na Publicação

S242 Siva Barcellos, Isadora  
i Interferência de *Bacteroides thetaiotaomicron* no  
crescimento e virulência de *Escherichia coli*  
enteroagregativa / Isadora Siva Barcellos. -- Rio  
de Janeiro, 2019.  
77 f.

Orientadora: Regina Maria Cavalcanti Pilotto  
Domingues.

Coorientadora: Karla Rodrigues Miranda.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) -  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto  
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:  
Microbiologia e Imunologia, 2019.

1. *Bacteroides thetaiotaomicron*. 2. *Escherichia coli*  
enteroagregativa. 3. Patótipos. 4. Microbiota  
Metaboloma. I. Cavalcanti Pilotto Domingues, Regina  
Maria, orient. II. Rodrigues Miranda, Karla,  
coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos  
pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**ISADORA SILVA BARCELLOS**

**Interferência de *Bacteroides thetaiotaomicron* no crescimento e virulência de *Escherichia coli* enteroagregativa**

**Rio de Janeiro, 03 de julho de 2019**

---

**(Renata Martins do Souto, Professora Adjunto, UFRJ)**

---

**(Scarlathe Bezerra da Costa, Mestra, UFRJ)**

---

**(Talita Gomes Baêta Lourenço, Doutora, UFRJ)**

---

**(Tatiana de Castro Abreu Pinto, Professora Adjunta, UFRJ)**

## AGRADECIMENTOS

Depois de praticamente 4 anos, o momento mais importante chegou. No início parece que é longe demais, na metade curso bate um nervoso porque o tempo está passando muito rápido e no final, parece de novo que falta muito e que esse dia não vai chegar nunca. Mas chegou! Não foram anos fáceis, não foram dias e nem períodos completamente tranquilos. Eu precisei enfrentar muitos medos em mim, crises de ansiedade, insegurança sobre meu conhecimento, sobre projeto, resultados... mas no final, a alegria de ver que tudo isso foi superado, o quanto pude crescer e aprender com tudo que vivi, é inexplicável. E por isso queria agradecer a todas as pessoas que fizeram parte de todo processo da minha formação.

Primeiramente agradeço à Deus, por Sua graça e sabedoria dadas a mim, pois sem Ele nada disso seria possível. Agradeço muito aos meus pais que eu tanto amo, Teresa e Fábio, que sempre me apoiaram e incentivaram no meu sonho de ser cientista, me ensinaram o valor do estudo e poder da educação no mundo. Ao Hugo que me encorajou na mudança de laboratório, sempre ouve meus desabafos, discussão de resultados, ou quando aprendo algo incrível e quero ensinar pra ele mesmo que ele não seja da área haha Amo vocês!

À minha família no Piauí que mesmo de longe sempre se preocupou comigo e fazia questão de falar nos grupos de família o quão são orgulhosos de mim. Aos meus padrinhos Mirtes, Marcos e Maurício que mesmo sem entender nada de biologia, sempre queriam ajudar e estavam dispostos a ajudar.

Ao PROVOC-FIOCRUZ (Programa de Vocação Científica), que ainda no ensino médio foi meu primeiro contato com a ciência e com microbiologia especificamente. Agradeço à Thelma e a Cris que escolheram me colocar em um laboratório de microbiologia, o que mudou completamente minha forma de ver o mundo, de escolha profissional e foi o ponta pé inicial para chegar aqui. Aos meus primeiros orientadores Vítor e Viviane do Laboratório de entomologia Médica e Forense que tiveram coragem de ensinar uma aluna de ensino médio de 15 anos o dia a dia de um laboratório, a relação de trabalho, a manipular bactérias, sobre dípteros muscoides, a fazer experimento, que frustração com resultados é normal. À Isabel que no início da faculdade foi minha

orientadora em outro projeto e me ensinou tudo o que sabe sobre a temida biologia molecular e fez eu me apaixonar por essa área e por genes de resistência. E às amigas Lohane e Raquel que também me ensinaram tanto e tornavam tudo mais tranquilo e divertido em meio às dificuldades.

Às minhas orientadoras Regina e Karlinha do Laboratório de Biologia de Anaeróbios. Mais do que orientadoras vocês são como uma mistura de mãe, amiga e irmã. Vocês me ensinaram sobre humanidade, empatia, carinho e claro, sobre ciência. Eu cheguei aqui sem saber absolutamente nada sobre bactérias anaeróbias e hoje o que eu sei devo muito a vocês. Regina com uma bondade e alegria fora desse mundo, literalmente me conquistou logo na primeira aula de do bloco de médica em TC-I, quando incentivou tanto a ideia de 4 jovens curiosos que nunca tinham ouvido falar de microbiota intestinal, de estudar a microbiota de vegetarianos e onívoros. Você foi minha tutora quando eu estagiava na FIOCRUZ, mas eu não resisti e pedi pra ser sua aluna hahaha E com isso conheci a Karlinha, rainha da microbiota. De um carinho, paciência e compreensão imensas, me acolheu tão bem, ficou até super tarde fazendo experimento comigo pra não me deixar sozinha e apoiou minhas ideias até o fim.

A todos do Anaeróbios, que é mais que um laboratório, é uma família. E como todas as outras tem briga, confusão, mas tem muito carinho e amor também. À Giovanna, minha Golden, minha versão gigante de mim, que já era minha amiga antes de eu entrar no Lab, e me acolheu tão bem quando cheguei. Sempre me acalma quando eu fico nervosa (e isso é bem comum), consegue arrancar um sorriso de qualquer pessoa em segundos, e está sempre disponível a ajudar. À Dede rainha dos casos e fofocas de família, quem me chamava sempre pra ir em festa e eu arrumava desculpa pra não ir, mas não desistiu de mim. Obrigada por ter me ajudado a encontrar uma moça da cabeça porque sem ela eu não tinha chegado aqui tão bem mentalmente. Por ter criado esse protocolo maravilhoso de adesão a proteína de matriz e por ficar horas na microscopia comigo tentando desvendar o mistério das minhas bactérias que não coram. À Scar, musa da sinceridade, minha companheira de 485, que combina de guardar no ônibus pra conseguir sentar e entende que tudo bem se eu apagar durante a viagem (o que também é bem comum). Obrigada por ter me ensinado sobre a rotina do lab logo nas minhas primeiras semanas, por me ensinar a fazer prensa, a usar a glove box no susto, a dar gás na jarra, ou seja por tudo hahaha À Marcela que é a única pessoa que consegue

ser engraçada até com raiva (aliás, não vou nem falar do quanto sua risada maléfica é ótima), rainha dos brownies funcionais e ovos de páscoa maravilhosos. À Drika que é um doce de pessoa e companheira de desesperos e à Renatinha outra rainha da microbiota e dos extratos fecais, que me ensinou a fazer o agar sangue mais perfeito que existe e dona do melhor e mais confortável abraço. Ao Joaquim salvador de todos, da autoclave, dos meios e das culturas puras. À Mayara que teve toda calma e paciência do mundo pra me ensinar nos meus primeiros dias no lab até eu entender de verdade; Camila com toda sua disponibilidade pra ensinar e com suas famosas perguntas nos seminários; Ju Soares que me cedeu o primeiro *B. thetaio*; Mellissa que iniciou esse projeto comigo criando uma logística pra fazer os experimentos juntas darem certo e não sobrecarregar ninguém; Juliana Riviello por ter me avaliado tão bem na Semana de Micro a ponto de eu conseguir o prêmio; Kelly, a rainha mesmo; Lili pelas ideias para o projeto; Heidi por me ajudar nas contas, pelas soluções nos momentos de dificuldade, por me salvar sempre, pelos toques na hora de fazer motilidade, por todo conhecimento que você passa a cada dia e por instalar o Prisma no meu computador; Felipe o cara da Biomol que sabe tudo de *Bacteroides* e Leandro, meu futuro orientador, por sempre dar sugestões para o projeto e discutir meus resultados. Amo todos vocês!

Aos amigos que fiz na faculdade Bruno, Igor, Marta, Matheus e Carolzinha. Bruno meu amigo de estudos de biomol e imuno, junto com a Marta. Se não fossem os dias que a gente virava a noite estudando e ensinando uns pros outros a matéria, acho que a gente teria repetido real. Obrigada por ser ombro amigo, por você e Igor toparem a loucura de fazer Hemato Clínica no último período comigo (eu não sabia que era tão difícil), por passarem o PTCC e o TCC junto comigo, acho que seria muito mais difícil se eu fizesse sozinha. Obrigada pelas vezes que você me alimentou, que pagou almoço ou lanche pra mim quando eu não tinha dinheiro, por me levar no Mc Donalds pra curar a bebedeira da festa junina, pela nossa viagem de um dia a Arraial, obrigada por tanto Bru. Igor, obrigada por sempre ficar até 00h me esperando terminar os experimentos só pra eu não ir pra casa sozinha, por fazer fotos das minhas lâminas, por sempre adiantar os relatórios, pelas piadas, pelas histórias engraçadas que você contava no meio da aula e ficava tudo gravado no áudio e pelas músicas que você criava do nada e grudavam na cabeça sempre. Martinha, que eu tanto peguei no pé, é porque te amo, tá? Acredito muito no seu potencial e quero ver você voando alto. Você é um doce de pessoa, atenciosa e cuidadosa, merece o mundo! Matheus, por ser esse cara sempre de

boa com tudo e com todo mundo, por me ensinar a ter mais paciência com as pessoas e por ser o amigo das festinhas que eu ia no início da faculdade. E Carolzinha, que ficou com a gente por tão pouco tempo e deixou muitas saudades, mas sempre se fez presente nesses anos todos. Amo vocês, a graduação não seria a mesma sem a nossa amizade, os trabalhos em grupo, os almoços no bandejão com horas de espera, os parabéns em público. Amo vocês!

Ao Dennys Monteiro Girão, por ceder as cepas de *E. coli* e as culturas de HEp-2, me ensinando com muita paciência e riqueza de detalhes os protocolos dos testes de adesão células e de biofilme, sobre cultivo de células e por ter cedido material pra que os experimentos pudessem ser realizados.

Ao Jefferson do UniMicro, pelas inúmeras tardes e manhãs cansativas dedicadas a fazer as fotos dos meus experimentos, mesmo com computador não tão bom, lâmina suja, apagão do nada. Obrigada pela sua disponibilidade, dedicação e ensinamento.

À criadora do Sci-Hub Alexandra Elbakyan! Sem esse site eu não teria lido metade dos artigos que li.

Ao André que quando trabalhava na secretaria ajudou todos os alunos com os problemas do Siga, e resolvia em um segundo notas e atividades que não eram lançadas. E a todos os funcionários que ajudam em todo o funcionamento do instituto.

Ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes nas pessoas da diretora Alane Beatriz Vermelho e da coordenadora de graduação Lígia Maria Torres Peçanha.

Às instituições de apoio à pesquisa: CNPq, PIBIC, FAPERJ e CAPES.



**"Knowing is better than wondering, waking is better than sleeping, and even the biggest failure, even the worst, beats the hell out of never trying."**

**(Meredith Grey)**

**RESUMO**  
**ISADORA SILVA BARCELLOS**  
**INTERFERÊNCIA DE *Bacteroides thetaiotaomicron* NO CRESCIMENTO E**  
**VIRULÊNCIA DE *Escherichia coli* ENTEROAGREGATIVA**  
**Orientador: Regina Maria Cavalcanti Pilotto Domingues**

**Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

*Bacteroides thetaiotaomicron* é um membro da microbiota das membranas mucosas, especialmente do trato intestinal de humanos. Estudos recentes demonstraram sua capacidade de interferir na expressão de genes de virulência de patógenos entéricos, sugerindo que componentes da microbiota e seus produtos metabólicos podem influenciar significativamente na patogenicidade de patógenos como *E. coli*. *E. coli* enteroagregativa (EAEC) é um enteropatógeno emergente constantemente associado a diarreias agudas ou persistentes e inflamação intestinal crônica em adultos e crianças. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo investigar a interferência dos produtos metabólicos de *B. thetaiotaomicron* presentes no seu sobrenadante, no crescimento e na virulência do patotipo EAEC. Inicialmente, o crescimento de uma cepa padrão de EAEC na presença do sobrenadante de *B. thetaiotaomicron* foi acompanhado por análise espectrofotométrica (DO<sub>600nm</sub>) em anaerobiose durante 9 h, sendo observada alteração significativa em relação a cepa cultivada na ausência do sobrenadante. Como a adesão aos enterócitos é extremamente importante para o estabelecimento e persistência de EAEC, foram realizados ensaios de adesão qualitativo e quantitativo da cepa padrão à células HEp-2 e ensaios de adesão a laminina de camundongo em lamínulas de vidro, na presença e ausência do sobrenadante de *B. thetaiotaomicron*, com inóculo inicial de 0,5 (DO<sub>600nm</sub>) e 5x10<sup>7</sup> respectivamente. A adesão às células HEp-2 sofre variações quantitativas quando a cepa de EAEC é cultivada com sobrenadante de *B. thetaiotaomicron* (1,3 x 10<sup>11</sup> UFC) em relação ao controle (4,56x10<sup>10</sup> UFC). A aderência a laminina foi quantificada através da captura de 10 imagens de campos aleatórios de cada lamínula [Campo de visão (CV) = 0,30mm<sup>2</sup>]. A adesão a laminina é aumentada quando a cepa é cultivada com sobrenadante de *B. thetaiotaomicron* (604,3 UFC/CV) em relação a cepa cultivada na ausência do sobrenadante (500,73 UFC/CV). Ambas condições foram comparadas com seus respectivos controles (BSA 2%), quantificados em 49,11 UFC/FV e 96,58 UFC/CV, respectivamente. Com base nesses testes foi investigado a produção de biofilme em ambas condições de cultivo da cepa padrão e cepas clínicas de EAEC em que a maioria das cepas foram caracterizadas como fortes (> 1) e moderada (0,79) produtoras de biofilme quando cultivadas com sobrenadante de *B. thetaiotaomicron*. Também foram realizados testes de motilidade a partir do cultivo das cepas com sobrenadante de *B. thetaiotaomicron*, no qual a motilidade diminuiu cerca de 6 vezes. Esses resultados permitem inferir que o sobrenadante de *B. thetaiotaomicron* é capaz de interferir significativamente nos principais fatores de virulência de EAEC. Estudos adicionais tornam-se necessários para caracterizar metabólitos específicos na tentativa de elucidar as interações interespecíficas de patógenos e comensais no ambiente intestinal, que possam estar envolvidos na persistência e/ou comportamento virulento dessa espécie.

**Palavras-chave:** *Bacteroides thetaiotaomicron*; *Escherichia coli*; Patotipos; Microbiota; Virulência; EAEC.

**ABSTRACT**  
**ISADORA SILVA BARCELLOS**  
**INTERFERENCE OF *Bacteroides thetaiotaomicron* IN THE GROWTH AND**  
**VIRULENCE OF ENTEROAGGREGATIVE *Escherichia coli***  
**Orientador: Regina Maria Cavalcanti Pilotto Domingues**

**Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

*Bacteroides thetaiotaomicron* is a member of the microbiota of the intestinal tract of humans. New-found researches revealed its ability to modulate the expression of many virulence genes of enteric pathogens such as *Escherichia coli*. Enteroaggregative *E. coli* (EAEC) is an emerging pathogen associated to acute diarrheic infections, persistent diarrhea and chronic intestinal inflammation. The aim of this study was to evaluate the interference of the metabolic products of *B. thetaiotaomicron* in the growth and virulence of EAEC. The growth of EAEC strain cultured in the presence or absence of *B. thetaiotaomicron* supernatant was monitored in anaerobiosis for 9 hours (OD<sub>600nm</sub>). It was observed that *B. thetaiotaomicron* supernatant increased EAEC's growth. Once adhesion to enterocytes is extremely important for the establishment and persistence of EAEC, qualitative and quantitative adhesion assays of the standard strain were performed on HEp-2 cells and mouse laminin adhesion assays on glass coverslips, in the presence and absence of *B. thetaiotaomicron* supernatant, with initial inoculum of 0.5 (OD<sub>600nm</sub>) and 5x10<sup>7</sup>, respectively. *B. thetaiotaomicron* supernatant significantly increased adhesion to HEp-2 cells (1,3 x 10<sup>11</sup> CFU) when compared to control (4,56 x 10<sup>10</sup> CFU). Laminin adhesion was quantified by capturing 10 random field images from each coverslip [Field of Vision (FV) = 0.30 mm<sup>2</sup>]. EAEC adhesion to laminin was improved by *B. thetaiotaomicron* supernatant (604.3 CFU / FV) in comparison to the strain cultured with medium (500.73 CFU / FV). Both conditions were compared with their respective controls (BSA 2%), quantified at 49.11 CFU / FV and 96.58 CFU / FV, respectively. Biofilm production was also investigated in both culture conditions of the standard and clinical EAEC strains in which most strains were characterized as strong (> 1) and moderate (0.79) biofilm producers in the presence of *B. thetaiotaomicron* supernatant. Motility tests were also performed from culturing strains with *B. thetaiotaomicron* supernatant, in which the motility was reduced about 6-fold. These results allow us to infer that the *B. thetaiotaomicron* supernatant is capable of significantly interfering with the main virulence factors of EAEC. Further studies are required to characterize specific metabolites to elucidate the interspecies interactions of pathogens and commensals in the intestinal environment, which may be involved in the persistence and / or virulent behavior of this species.

**Key-words:** *Bacteroides thetaiotaomicron*; *Escherichia coli*; Pathotypes; Microbiota; Virulence; EAEC.

## **LISTA DE FIGURAS**

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1:</b> Representação esquemática da técnica de spots para cálculo de UFC/mL. ....                              | 28 |
| <b>Figura 2:</b> Esquema do experimento de adesão a proteínas da MEC.....  | 31 |
| <b>Figura 3:</b> Fluxograma do teste de motilidade em placa.....   | 33 |
| <b>Figura 4</b> Curva de crescimento de <i>E. coli</i> enteroagregativa em anaerobiose.....                              | 35 |
| <b>Figura 5:</b> Adesão quantitativa de <i>E. coli</i> enteroagregativa à célula HEp-2.....                              | 36 |
| <b>Figura 6:</b> Adesão qualitativa de <i>E. coli</i> enteroagregativa à célula HEp-2.....                               | 37 |
| <b>Figura 7:</b> Adesão de <i>E. coli</i> enteroagregativa 042 à laminina I.....   | 38 |
| <b>Figura 8:</b> Adesão de <i>E. coli</i> enteroagregativa 042 à colágeno do tipo IV.....                                | 39 |
| <b>Figura 9:</b> Quantificação de <i>E. coli</i> enteroagregativa aderida a laminina I, por campo visual.....            | 40 |
| <b>Figura 10:</b> Quantificação de <i>E. coli</i> enteroagregativa aderidas a colágeno do tipo IV, por campo visual..... | 40 |
| <b>Figura 11:</b> Formação de biofilme de cepas de <i>E. coli</i> enteroagregativa, em superfície abiótica.....          | 41 |
| <b>Figura 12:</b> Motilidade de <i>E. coli</i> enteroagregativa em placa.....  | 42 |
| <b>Figura 13:</b> Análise quantitativa da motilidade de <i>E. coli</i> enteroagregativa em placa.....                    | 42 |

**LISTA DE TABELAS**

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1:</b> Cepas utilizadas.....                                  | 24 |
| <b>Tabela 1:</b> Condições de interação de <i>E. coli</i> testadas..... | 26 |

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

|         |  |
|---------|--|
| %       | Porcentagem  |
| ° C     | Graus Celsius  |
| G       | Gramma   |
| Mg      | Miligrama  |
| µL      | Microlitros  |
| µm      | Micrometros  |
| mL      | Mililitros   |
| AA      | Adesão Agregativa  |
| AafA    | <i>Aggregative fimbria II, AAF/II</i>                          |
| AAF/I   | <i>Aggregative Adhesion Fimbria type I</i>                     |
| AAF/II  | <i>Aggregative Adhesion Fimbria type II</i>                    |
| AAF/III | <i>Aggregative Adhesion Fimbria type III</i>                   |
| AAF/IV  | <i>Aggregative Adhesion Fimbria type IV</i>                    |
| aap     | <i>Antigenic antiaggregant protein</i>                         |
| Afa/Dr  | <i>Afimbrial Adhesin Dr</i>                                    |
| A/F     | <i>Attaching and Effacing</i>                                  |
| Ag43    | Antígeno 43  |
| AggA    | <i>Aggregative fimbria I, AAF I</i>                            |
| Agg3A   | <i>Aggregative fimbria III, AAF/III</i>                        |
| Agg4A   | <i>Aggregative fimbria IV, AAF IV</i>                          |
| AggR    | <i>Transcriptional activator AggR/AAF/I regulatory protein</i> |
| AIEC    | <i>Adherent-invasive Escherichia coli</i>                      |
| AL      | Adesão Localizada  |

|                 |   |
|-----------------|---|
| Ang 4           | Angiogenina 4   |
| ASS             | Ágar Sangue Suplementado                                  |
| ATCC            | <i>American Type Culture Collection</i>                   |
| BHI             | <i>Brain Heart Infusion</i>                               |
| CCL20           | <i>Chemokine (C-C motif) ligand 20</i>                    |
| CD55            | <i>Complement Decay-Accelerating Factor</i>               |
| cGMP            | <i>Cyclic Guanosine Monophosphate</i>                     |
| cheY            | <i>Chemotaxis protein cheY</i>                            |
| CO <sub>2</sub> | Dióxido de carbono  |
| CV              | Campo de Visão  |
| DAF             | <i>Decay-Accelerating Factor</i>                          |
| DAEC            | <i>Diffusely adherent Escherichia coli</i>                |
| EAEC            | <i>Enteraggregative Escherichia coli</i>                  |
| EAHEC           | <i>Enteraggregative hemorrhagic Escherichia coli</i>      |
| EAST-1          | <i>Enteraggregative E. Coli Heat-Stable Enterotoxin 1</i> |
| ECF-type        | <i>Extracytoplasmatic Function- type sigma factors</i>    |
| EIEC            | <i>Enteroinvasive Escherichia coli</i>                    |
| ELISA           | <i>Enzyme Linked Immunono Sorbent Assay</i>               |
| EHEC            | <i>Enterohemorrhagic Escherichia coli</i>                 |
| EPEC            | <i>Enteropathogenic Escherichia coli</i>                  |
| ETEC            | <i>Enterotoxigenic Escherichia coli</i>                   |
| FucR            | <i>DNA-binding transcriptional activator FucR</i>         |
| FusK            | <i>Fucose sensor Kinase</i>                               |
| FusR            | <i>Fucose sensor response regulator</i>                   |

|               |   |
|---------------|---|
| GALT          | <i>Gut Associated Lymphoid Tissue</i>       |
| GEMS          | <i>Global Enteric Multi-Center Study</i>    |
| IBD           | <i>Inflammatory Bowel Disease</i>           |
| IgA           | Imunoglobulina A                            |
| IL 1          | Interleucina 1                              |
| IL1 $\beta$   | Interleucina 1 beta                         |
| IL 8          | Interleucina 8                              |
| INF $\gamma$  | Interferon gama                             |
| LEE           | <i>Locus of enterocyte effacement</i>       |
| LPS           | Lipopolissacarídeo                          |
| MAPK          | <i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>    |
| MEC           | Matriz Extracelular                         |
| NF $\kappa$ B | <i>Nuclear Factor Kappa B</i>               |
| pAA           | <i>Plasmid Aggregative Adherence</i>        |
| PBS           | <i>Phosphate-Buffered Saline</i>            |
| Pet           | <i>Plasmid-encoded toxin</i>                |
| pH            | Potencial de Hidrogênio                     |
| PI-3          | <i>Phosphoinositide 3-kinase</i>            |
| pIGR          | Polymeric immunoglobulin receptor           |
| PRAS          | Pré-reduzido e esterilizado anaerobicamente |
| PUL           | <i>Polyssaccharide Utilization Loci</i>     |
| RNAr          | <i>Ribonucleic acid ribosomal</i>           |
| SCFAs         | <i>Short Chain Fatty Acids</i>              |
| SFB           | Soro Fetal Bovino                           |



|       |   |
|-------|---|
| ShET1 | <i>Shigella enterotoxin 1</i>                                 |
| SPATE | <i>Serine Protease Autotransporters of Enterobacteriaceae</i> |
| SST3  | Sistema de Secreção do tipo II                                |
| STEC  | <i>Shiga toxin producing Escherichia coli</i>                 |
| Tir   | <i>Translocated intimin receptor</i>                          |
| UFC   | Unidade Formadora de Colônia                                  |

## Índice

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Introdução.....</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1. Microbiota intestinal humana.....   | 1         |
| 1.2. Interação microbiota x patógeno.....  | 3         |
| 1.3. <i>Escherichia coli</i> .....   | 6         |
| 1.3.1. <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa.....   | 8         |
| 1.4. Gênero <i>Bacteroides</i> .....   | 15        |
| 1.4.1. <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> .....   | 16        |
| <b>2. Justificativa.....</b>   | <b>23</b> |
| <b>3. Objetivo.....</b>  | <b>24</b> |
| <b>4. Metodologia.....</b>   | <b>25</b> |
| 4.1. Cepas bacterianas.....  | 25        |
| 4.2. Condições de cultivo.....   | 25        |
| 4.2.1. <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> .....   | 25        |
| 4.2.2. Obtenção do sobrenadante de <i>B. thetaiotaomicron</i> .....  | 26        |
| 4.2.3. <i>Escherichia coli</i> .....   | 26        |
| 4.2.4. Interferência do sobrenadante da cepa ATCC 29741 de <i>B. thetaiotaomicron</i> no crescimento da cepa 042 de <i>E. coli</i> ..... | 26        |
| 4.3. Teste de adesão a célula HEp-2.....   | 27        |
| 4.3.1. Cultura de células.....   | 27        |
| 4.3.2. Teste de adesão a células HEp-2 (quantitativo).....   | 28        |
| 4.3.3. Teste de adesão a células HEp-2 com lamínula (qualitativo).....   | 30        |
| 4.4. Adesão à proteína de matriz extracelular.....   | 31        |
| 4.5. Biofilme em superfície abiótica.....  | 33        |
| 4.6. Teste de motilidade em placa.....   | 33        |
| 4.7. Análise estatística.....  | 35        |
| <b>5. Resultados.....</b>  | <b>36</b> |
| 5.1. Curva de Crescimento.....   | 36        |
| 5.2. Teste de adesão a célula HEp-2 (quantitativo).....  | 36        |
| 5.3. Teste de adesão à célula HEp-2 (qualitativo).....   | 37        |
| 5.4. Adesão a proteínas de matriz extracelular.....  | 38        |
| 5.5. Biofilme em superfície abiótica.....  | 42        |
| 5.6. Teste de motilidade em placa.....   | 43        |
| <b>6. Discussão.....</b>   | <b>44</b> |
| <b>7. Conclusão.....</b>   | <b>51</b> |
| <b>8. Referências bibliográficas.....</b>  | <b>52</b> |

## 1. Introdução

### 1.1. Microbiota intestinal humana

O corpo humano é colonizado por diversos microrganismos, tais como procariotos, arqueas, alguns vírus e eucariotos (Costello e Relman, 2014). Esses microrganismos compõem a microbiota humana, um conjunto microbiano que coexiste em uma relação simbiótica e que em situações de equilíbrio podem trazer benefícios ao hospedeiro, fornecendo enzimas codificadas em seu genoma que participam de reações bioquímicas acessórias ao hospedeiro humano (Montalto *et al.*, 2009).

A microbiota está distribuída em diversos órgãos e tecidos do corpo humano, colonizando superfícies internas ou externas. A pele, as cavidades do trato respiratório superior e algumas mucosas como: conjuntiva, oral, trato gastrointestinal e genital são exemplos de sítios colonizados. Sua aquisição e evolução com indivíduo são influenciadas pelo tipo de parto, condições ambientais, alimentares e de saúde. Sabe-se que a maior parte da microbiota humana é de origem procariótica e estudos já consolidados especulavam que essa proporção entre células bacterianas e células humanas seria de 10:1 ou mais (Luckey, 1972). No entanto, atualmente, estima-se que o número de células bacterianas tenha a proporção de aproximadamente 1:1 em relação às células humanas (Sender, Fuchs e Milo, 2016).

O trato gastrointestinal é o sítio anatômico com maior abundância e diversidade de espécies microbianas, a microbiota intestinal corresponde a  $10^{11}$  bactérias/ mL no cólon (Sender, Fuchs e Milo, 2016). Nesse ambiente, o cólon, a absorção de nutrientes é mínima, o pH se aproxima do neutro e os níveis de oxigênio são baixos, tornando esse ambiente anaeróbio. Estão em maior abundância os gêneros anaeróbios *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Clostridium* e *Lactobacillus*, e bactérias aeróbias como *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* e *Streptococcus* (Noverr e Huffnagle, 2004).

A microbiota intestinal de um indivíduo é adquirida no nascimento e é influenciada pelo tipo de parto. No entanto, ao longo da vida sofre várias alterações por influências do tipo de dieta, uso de antimicrobianos, doenças e pressões seletivas do ambiente. Acredita-se que o intestino seja colonizado inicialmente por anaeróbios facultativos que preparam esse ambiente

para uma colonização futura por anaeróbios estritos (Browne *et al.*, 2016; Eggesbø *et al.*, 2011). No parto normal, o bebê adquire os microrganismos presentes na microbiota vaginal da mãe e, portanto, sua microbiota intestinal será majoritariamente composta por espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* nos primeiros dias de vida (Matsumiya *et al.*, 2002; Gajer *et al.*, 2012). Já os bebês nascidos por cesariana, adquirem principalmente a microbiota da pele da mãe e do ambiente, apresentando menor concentração das espécies que colonizam bebês nascidos por parto normal e um retardo na colonização pelo gênero *Bacteroides* (Jakobsson *et al.*, 2017). A microbiota intestinal desses bebês é primariamente composta por membros do gênero *Clostridium* e por anaeróbios facultativos (Browne *et al.*, 2016).

Em uma situação de equilíbrio, a microbiota desempenha diversas funções benéficas ao hospedeiro: auxílio na manutenção da homeostase, contribuindo para a proteção do hospedeiro contra patógenos oportunistas pela colonização da superfície de mucosa, reduzindo a disponibilidade de nichos, a produção de antimicrobianos (bacteriocinas) e produção de metabólitos que modificam esse microambiente favorecendo alguns gêneros e se tornando hostil para outros, geralmente patógenos (Montalto *et al.*, 2009).

Outra função associada a microbiota é o estímulo da ativação da imunidade de mucosa. O intestino recebe grandes quantidades de substâncias exógenas como antígenos alimentares, antibióticos, e eventualmente antígenos patogênicos. Por isso esse órgão possui mecanismos de defesa que atuam como barreiras físicas e químicas que protegem o hospedeiro e impedem que as bactérias da microbiota causem infecções caso haja o rompimento dessa proteção. Uma dessas barreiras é a mucosa intestinal que separa a microbiota do epitélio intestinal e tem associada a ela um sistema imune, o GALT (*gut associated lymphoid tissue*). O GALT é constituído pelas Placas de Peyer, folículos linfoides isolados e linfócitos intraepiteliais que desempenham as atividades efetoras da imunidade de mucosa (Bauer *et al.*, 2006). Durante seu desenvolvimento, as células efetoras da imunidade de mucosa são reguladas por células T reguladoras (TReg) para que tolerem a presença dos microrganismos comensais e não gerem resposta a eles. Por outro lado, as bactérias da microbiota regulam o sistema imune levando ao processo de tolerância a diversos antígenos microbianos e provenientes da dieta, reduzindo a ocorrência de alergias e doenças inflamatórias como IBD (*inflammatory bowel disease*) (Falk *et al.*, 1998; Cebra, 1999; Macpherson e Harris, 2004), ou aumentando sua resposta a determinados epítomos (Braun-Fahrlander *et al.*, 2002).

A microbiota intestinal está relacionada à estabilidade e atividade funcional do intestino, favorecendo o desenvolvimento do epitélio intestinal que atua na absorção de nutrientes alimentares, resposta de IgA secretória e no recrutamento de células da imunidade inata para o local de infecção (Didierlaurent *et al.*, 2002). Testes realizados com camundongos *germ-free* demonstram que a ausência da microbiota intestinal resulta em morfologia e função alterada das células do epitélio intestinal e menor cobertura pela mucosa, demonstrando a importância da microbiota nesse ambiente. Outro benefício fornecido pela microbiota é a modulação do perfil metabólico do hospedeiro através da produção de vitaminas como B<sub>12</sub>, principalmente por bactérias lácticas, K, riboflavina, biotina e outras. A microbiota também auxilia o organismo hospedeiro através da digestão de carboidratos complexos em moléculas menores, permitindo sua absorção pelo intestino e inclusão na dieta. Os carboidratos são a maior fonte de nutriente para a microbiota e sua digestão pelas bactérias anaeróbias da microbiota intestinal contribuem para a síntese de metabólitos como os ácidos graxos de cadeia curta (SCFA: *Short Chain Fatty Acids*) (Musso Gambino e Cassader, 2010). Os SCFAs predominantes no lúmen intestinal são propionato, butirato e acetato que, ao serem absorvidos pelo epitélio intestinal atuam em diversos processos da regulação celular, bem como são utilizados como fonte de energia para o hospedeiro (Hooper *et al.*, 2002; Corrêa-Oliveira *et al.*, 2016).

## **1.2. Interação microbiota x patógeno**

A relação que os componentes da microbiota estabelecem entre si e suas influências sobre o organismo humano tem sido cada vez mais estudada devido aos benefícios ao hospedeiro promovidos pela microbiota. Já foi demonstrado que uma microbiota em estado de equilíbrio proporciona ao hospedeiro proteção contra patógenos como *Salmonella* spp., *Clostridium difficile*, *Escherichia coli* diarreio gênica e *Vibrio cholerae*. Para o sucesso de uma infecção no intestino, uma bactéria patogênica precisa resistir ou evadir a atividade do sistema imune, tolerar e ter capacidade de expandir seu crescimento em um ambiente anaeróbio que contém ácidos biliares, além de competir por nutrientes e nichos de colonização com os microrganismos da microbiota intestinal. Portanto, algumas bactérias patogênicas desenvolveram estratégias para driblar a microbiota fazendo com que a interação estabelecida entre os microrganismos que a compõem influencie significativamente na sua patogenicidade

e estabelecimento da infecção. Como já mencionado, ao longo da vida, a microbiota intestinal pode sofrer inúmeras variações quanto sua composição e abundância de espécies. Essas alterações podem contribuir para a resistência a enteropatógenos ou promover seu crescimento, levando a infecção (Bäumler e Sperandio, 2016).

Willing e colaboradores em 2011, propuseram que a resistência ou susceptibilidade a infecções do trato gastrointestinal dependem da composição da microbiota e não apenas de fatores genéticos do hospedeiro. Essa hipótese foi comprovada através do estudo de camundongos resistentes (NIH Swiss) e sensíveis (C3H/HeJ) a colonização por *Citrobacter rodentium*, um enteropatógeno murino correspondente a *E. coli* enterohemorrágica O157:H7. Para demonstrar que o sucesso da infecção estaria relacionado com a composição da microbiota, os autores transferiram a microbiota de camundongos resistentes para camundongos sensíveis a *C. rodentium*, resultando no retardo da colonização e mortalidade. Por outro lado, a transferência da microbiota de camundongos sensíveis para os camundongos resistentes, previamente tratados com antibiótico, resultou na diminuição da atividade do sistema imune e por fim uma infecção letal (Willing *et al.*, 2011).

Um dos fatores que levam a alterações na microbiota é o tratamento com antimicrobianos. Na maioria das vezes, a antibioticoterapia atinge não somente o agente responsável pela infecção, mas também as bactérias da microbiota, matando ou diminuindo o crescimento de ambos. Dessa forma, a composição da microbiota pode ser alterada, comprometendo a resistência a colonização e disponibilizando nichos para colonização de patógenos resistentes. Um exemplo é a expansão de *C. difficile*, espécie que pode causar colite pseudomembranosa principalmente em indivíduos tratados com antibióticos, no ambiente hospitalar. Outra espécie que pode colonizar o intestino após o uso de antibióticos é *Salmonella* Typhimurium, devido ao aumento da disponibilidade de ácido siálico livre no lúmen do hospedeiro e da sua liberação pelas bactérias da microbiota como *Bacteroides thetaiotaomicron*. Tanto *C. difficile* quanto *S. enterica* Typhimurium utilizam o ácido siálico como fonte de carbono para promover sua expansão. Sendo assim, o uso de antimicrobianos além de reduzir a função de resistência a colonização da microbiota, também auxilia no fornecimento de nutrientes e condições necessárias para a perpetuação da infecção por bactérias patogênicas (Ng *et al.*, 2013).

Muitas bactérias pertencentes à microbiota intestinal possuem genes que possibilitam a degradação de carboidratos complexos, não metabolizados naturalmente pelo hospedeiro, como polissacarídeos vegetais e glicanas da mucosa intestinal. O epitélio intestinal é revestido por uma camada mucosa, que atua, entre outras funções, como uma barreira física na prevenção de infecções por patógenos ou por microrganismos da microbiota, em caso de desequilíbrio. A camada mucosa do intestino é composta por mucinas, proteínas glicosiladas ricas em resíduos de carboidratos como fucose, glicose, galactose, manose, ácido siálico, N-acetilgalctosamina e N-acetilglucosamina. As bactérias sacarolíticas, como as do gênero *Bacteroides*, possuem hidrolases glicosídicas que removem os resíduos de carboidrato das mucinas e os digerem em moléculas menores, tornando-os disponíveis tanto para o hospedeiro como para as bactérias da microbiota como fonte de carbono. Entretanto, bactérias patogênicas podem utilizar esses açúcares disponíveis para promover sua colonização e expansão (Bäumler e Sperandio, 2016).

Outro fator que influencia na infecção por um patógeno intestinal é a presença de pequenas moléculas, os metabólitos, no intestino. Os metabólitos atuam na interação entre microrganismos e o hospedeiro na saúde e na doença, modificando tanto a comunicação química entre microbiota e patógeno quanto patógeno e hospedeiro. Os metabólitos podem atuar na modulação de expressão de genes de virulência, no metabolismo e/ou fornecer um ambiente propício para o crescimento desses microrganismos. As bactérias da microbiota intestinal produzem metabólitos durante seu crescimento e sintetizam enzimas que modificam os metabólitos do hospedeiro. Essas enzimas modificam ácidos biliares e permitem a disponibilidade de esteroides para absorção que, em conjunto, alteram o ambiente químico do intestino e geram efeitos para o hospedeiro e para outras bactérias, que ainda precisam ser esclarecidos (Vogt *et al.*, 2015). Algumas bactérias patogênicas desenvolveram estratégias para evadir a resistência à colonização gerada pela microbiota e obter sucesso no processo infeccioso, porém a microbiota, em resposta, é capaz de criar uma competição por nutrientes (Bäumler e Sperandio, 2016).

Mecanismos de detecção de metabólitos são encontrados tanto em bactérias comensais quanto patogênicas. *E. coli* comensal coloniza o trato intestinal humano poucas horas após o nascimento, iniciando uma relação mutuamente benéfica (Kaper *et al.*, 2004). A *E. coli* patogênica emprega complexos mecanismos de virulência que são ativados por sinalização química e nutrientes, ambos essenciais para a colonização intestinal e evasão das defesas do

hospedeiro (Sperandio *et al.*, 2003; Hernandez-Doria e Sperandio, 2013). *B. thetaiotaomicron* por exemplo, consome carboidratos usados pelo patógeno *C. rodentium*, levando à exclusão competitiva do patógeno do intestino de murinos (Kamada *et al.*, 2012; Rolhion e Chassaing, 2016). Através da produção de metabólitos específicos, a microbiota intestinal pode modificar as condições ambientais do hospedeiro, comprometendo o crescimento do patógeno e/ou virulência. O butirato, um SFCA produzido pela microbiota intestinal, pode diminuir a expressão de vários genes de virulência de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis e Typhimurium e inibir o crescimento de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (Gantois *et al.*, 2006; Rolhion e Chassaing, 2016). Algumas cepas de *Bifidobacterium* também podem proteger da infecção por EHEC através da produção de acetato (Fukuda *et al.*, 2011). Com isso, a exploração de metabólitos e sinais moleculares produzidos pelas bactérias da microbiota se torna essencial para o sucesso da infecção por patógenos entéricos.

### 1.3. *Escherichia coli*

*E. coli* é um bacilo Gram-negativo da família *Enterobacteriaceae*, oxidase-negativo, anaeróbio facultativo, não formador de esporos, fermentador ou não de lactose e que pode ser móvel ou não devido à presença de flagelos peritríquios. A espécie *E. coli* é amplamente distribuída na natureza, sendo membro da microbiota intestinal e genital de humanos ou de animais de sangue quente. *E. coli* é a bactéria anaeróbia facultativa mais abundante da microbiota intestinal, colonizando a camada mucosa do cólon e coexistindo com hospedeiro humano. Porém as cepas comensais dessa espécie podem causar doenças em indivíduos imunocomprometidos ou quando a barreira física intestinal é rompida, permitindo que outros sítios sejam alcançados. Durante muitos anos, essa espécie foi considerada apenas um microrganismo inofensivo comensal, mas a aquisição e perda de genes tornou *E. coli* um patógeno extremamente diverso e bem adaptado. Alguns patótipos (cepas patogênicas) dessa espécie podem causar diarreias e infecções extra intestinais como infecções do trato urinário, sepse e meningite, tanto em indivíduos imunocomprometidos quanto em indivíduos saudáveis (Kaper *et al.*, 2004). As doenças diarreicas são um grande problema de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento onde os quadros letais ocorrem com mais frequência em crianças e devido à falta de saneamento básico, abastecimento e distribuição inadequados de água, condições precárias de higiene pessoal e pública. Outro fator a ser considerado é que as diarreias causadas por *E. coli* são as principais causas de mortalidade e



morbidade em neonatos e crianças (Gomes *et al.*, 2016). O *Global Enteric Multi-Center Study* (GEMS) relatou que *E. coli* enterotoxigênica e *Shigella* são dois dos quatro agentes etiológicos causadores de diarreias moderadas a graves na África Sub-Saariana e no Sudeste asiático (Levine *et al.*, 2012; Kotloff *et al.*, 2013).

A aquisição de genes por transferência horizontal permitiu que algumas cepas de *E. coli* se tornassem patótipos diarreio gênicos. Os fatores de virulência adquiridos são geralmente codificados por elementos genéticos móveis, gerando uma combinação desses fatores que possibilita tropismo por diversos sítios, mecanismos de virulência e padrões de lesão ao tecido agressivos. Esses fatores de virulência são diferenciados em cada patótipo de *E. coli*, classificados como: enteropatogênica (EPEC), enterohemorrágica/produtora de toxina Shiga (EHEC/STEC), enteroagregativa (EAEC), enterotoxigênica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC), difusamente aderente (DAEC) e aderente invasiva (AIEC). A plasticidade genética de *E. coli* torna difícil a classificação dos patótipos. Um exemplo foi o surto da cepa O104:H4 de *E. coli* na Alemanha (Frank *et al.*, 2011), causado por uma EAEC que expressa a toxina Shiga causando diarreia hemorrágica e síndrome hemolítico-urêmica. Através da caracterização dessa cepa foram encontrados fatores de virulência de diferentes patótipos como: padrão de adesão de EAEC, falta da ilha de patogenicidade LEE e expressão da toxina Shiga (Bielaszewska *et al.*, 2011). Os isolados dessa cepa foram considerados híbridos de EAEC e EHEC/STEC, sendo caracterizados como *E. coli* enteroagregativa hemorrágica (EAHEC) (Brzuszkiewicz *et al.*, 2011).

EHEC é um importante patógeno entérico humano, mas é comensal em outros hospedeiros, como o gado, seu principal reservatório (Hugues e Sperandio, 2008). Estudos recentes, investigando a relação entre esse patógeno e a microbiota residente começaram a elucidar como esse microrganismo é capaz de superar as defesas do hospedeiro. Camundongos alimentados com amido acetilado aumentaram os níveis de acetato bacteriano em suas fezes, levando a proteção contra uma colonização inicial de EHEC. Além disso, camundongos co-infectados com EHEC e *Bifidobacterium longum*, que tem um subconjunto de carboidratos transportadores, podem produzir acetato suficiente via metabolismo de açúcar bacteriano para promover defesas do hospedeiro contra patógenos entéricos (Fukuda *et al.*, 2011). O intestino mantém uma comunidade homeostática equilibrada, mas a microbiota residente pode ser influenciada por patógenos bacterianos, como EHEC. Esse patógeno é capaz de utilizar metabólitos de diferentes microrganismos, como *B. thetaiotaomicron*, uma

bactéria sacarolítica altamente prevalente no intestino, capaz de quebrar amidos de plantas e outros carboidratos complexos para simplificar moléculas de açúcar que podem ser utilizadas por outros membros da microbiota (Xu *et al.*, 2003; Sonnenburg *et al.*, 2006). Por exemplo, a fucose liberada do muco por *B. thetaiotaomicron* pode ser usada por patógenos como EHEC para acionar seus fatores de virulência (Pacheco *et al.*, 2012, Lustrì *et al.*, 2017).

### 1.3.1. *Escherichia coli* enteroagregativa

Skaletsky e colaboradores em 1984 e Nataro e colaboradores em 1985 realizaram pesquisas de cepas de *E. coli* em amostras de surtos de diarreia em vários países. Através do ensaio de adesão a células HEp-2 (carcinoma de laringe humana) como método de identificação de patotipos diarreioagênicos, esses pesquisadores observaram que a maioria das cepas que se aderiam a célula eram do patotipo EPEC porque possuíam o padrão de adesão localizada (AL) em forma de *clusters* de microcolônias, característico desse patotipo. Porém, havia também cepas de *E. coli* aderidas que não possuíam o padrão de adesão AL, e sim adesões difusas. Em 1987, Nataro e colaboradores isolaram cepas de *E. coli* de 154 crianças com diarreia e 66 crianças saudáveis (controle), em Santiago, Chile, a fim de avaliar a adesão em células HEp-2. Foi então nesse estudo que os pesquisadores conseguiram distinguir dois novos patotipos diarreioagênicos de *E. coli* a partir do padrão de adesão a células. O fenótipo de adesão difusa foi dividido em duas categorias: adesão agregativa (AA) e adesão difusa (DA). Foi proposto que o agente causador do surto de diarreia nesse estudo era o novo patotipo, *E. coli* enteroagregativa (EAEC). EAEC tem como característica o padrão de adesão agregativa (AA) no qual as células se agregam em uma estrutura semelhante a tijolos, tanto na superfície celular de HEp-2 ou dos enterócitos, como também em superfícies abióticas como vidro e plástico. Sendo assim, EAEC é descrita como cepas de *E. coli* que aderem à célula HEp-2 com padrão de aderência agregativa e que não secretam toxinas termolábeis ou termoestáveis (Nataro e Kaper, 1998).

A EAEC é reconhecida atualmente como um patógeno emergente e possível ameaça à saúde pública (Nezarieh *et al.*, 2015). Esse patógeno acomete adultos e crianças, causando diarreia aguda, diarreia de viajantes, e pode persistir de forma latente, causando inflamação crônica no intestino, mesmo na ausência de diarreia (Harrington *et al.*, 2005b). Algumas cepas foram relacionadas a infecções extraintestinais como infecções do trato urinário (Boll *et al.*,

2013) e síndrome hemolítico-urêmica causada por cepas produtoras da toxina Shiga (Morabito *et al.*, 1998; Frank *et al.*, 2011). Esse patotipo é associado a morbidade em crianças com menos de 5 anos (Hebbelstrup *et al.*, 2014), a surtos de diarreia persistente (com duração de 14 dias ou mais) e aguda em crianças e adultos em países em desenvolvimento e desenvolvidos, sendo um dos mais isolados de amostras diarreicas na América do Norte (Croxen *et al.*, 2013). Além disso, surtos ligados infecções alimentares foram relatados em 1997, na Índia e em uma escola no Japão onde 2697 crianças ficaram doentes (Itoh *et al.*, 1997). A diarreia persistente causada por EAEC também tem sido ligada à má nutrição, pela indução de inflamação intestinal crônica e redução da capacidade absorptiva dos enterócitos, além de redução do desenvolvimento físico e intelectual. É possível que algumas crianças sejam portadoras assintomáticas de EAEC, tornando esse patotipo um patógeno de alto impacto e importância na saúde pública pela possível causa de comprometimento do desenvolvimento físico e cognitivo (Steiner *et al.*, 1988; Lima *et al.*, 2000).

A transmissão desse patógeno é via fecal oral pela ingestão de alimentos ou água contaminados, causando um quadro de diarreia aquosa autolimitada, com presença de muco, dor abdominal, vômito, febre baixa e com presença ou ausência de sangue. Eventualmente, esse quadro pode se tornar persistente, dependendo de fatores genéticos, status nutricional e da imunidade (Lima *et al.*, 1992; Hebbelstrup *et al.*, 2014). A patogênese de EAEC é associada aos fatores de virulência codificados em seu genoma, porém esse conhecimento é limitado devido à falta de modelos animais adequados e a heterogeneidade de seus fatores de virulência (Croxen e Finaly, 2010). Em 1998, Nataro e Kaper propuseram 3 etapas para patogênese de EAEC. A etapa 1 corresponde a adesão a mucosa intestinal, a etapa 2 estaria envolvida no aumento da produção de muco espesso sob o epitélio intestinal no qual contém biofilme de EAEC e a etapa 3 estaria envolvida na liberação de citotoxinas, lesando o epitélio. No entanto, Estrada-Garcia e Navarro-Garcia em 2012 utilizaram a cepa protótipo EAEC 042, não produtora de toxina Shiga, e estabeleceram as etapas da patogênese de EAEC da seguinte forma: 1) adesão a mucosa intestinal, 2) produção de enterotoxinas e citotoxinas, 3) inflamação da mucosa. De um modo geral, na primeira etapa, adesinas fimbriais e afimbriais, juntamente com fatores de colonização contribuem para a adesão de EAEC a mucosa do cólon. Nesse momento, a secreção de muco é aumentada favorecendo a formação de biofilme contendo as células de EAEC. Em seguida, EAEC passa a produzir citotoxinas, secretando toxinas que induzem a vacuolização das microvilosidades e aumento da extrusão do epitélio

intestinal (Gomes *et al.*, 2016). Todas essas etapas levam a inflamação e dano da mucosa intestinal, com a presença de IL-8, IL-1 $\beta$ , INF- $\gamma$  e lactoferrina (Steiner *et al.*, 1998).

A adesão a mucosa intestinal é mediada por adesinas afimbriais (proteínas adesinas de membrana externa) ou por fímbrias adesinas agregativas (AAF) codificadas pelo gene *aaf*, presente no plasmídeo pAA (Vial *et al.*, 1988). O fator de virulência mais estudado são as fímbrias AAF que variam de acordo com a cepa de EAEC em: AggA (AAF/I), AafA(AAF/II), Agg3A (AAF/III) e Agg4 (AAF/IV). Cada cepa de EAEC expressa apenas uma variante de AAF e é essa adesina a responsável pelo padrão de adesão agregativa e formação de biofilme. No entanto, alguns estudos que demonstram a presença do fenótipo AA sem que haja expressão de nenhuma dessas adesinas por ser mediado por adesinas afimbriais (Monteiro-Neto *et al.*, 2003). A adesão a células HEp-2 foi inicialmente descrita na cepa 17-2 de EAEC, mediada por AAF/I (Nataro *et al.*, 1992), organizada em um único cluster de genes no plasmídeo pAA que compreende a proteína fimbrial usher, chaperona, invasina e pilina (Svarino *et al.*, 1994). Em 1995, Nataro e colaboradores realizaram um ensaio com voluntários infectados pela cepa 042 e observaram que essa cepa era negativa para identificação pelo gene *aggA*, apesar de aderir a mucosa do colón por uma adesina fimbrial. Foi então descrito AAF/II, uma adesina morfologicamente e geneticamente distinta de AAF/I, organizada em dois clusters de genes, no qual um cluster corresponde a chaperona e pilina e ou outro corresponde a proteína fimbrial usher e invasina (Elias *et al.*, 1999). A adesina AAF/II é considerada o principal fator de virulência da cepa 042, uma vez que é necessária para adesão a célula e formação de biofilme (Czeczulin *et al.*, 1999).

AAFs pertencem à família de adesinas Afa/Dr que se ligam ao DAF (*decay accelerating factor*, conhecido como CD55) na superfície celular, levando a ativação de PI-3 quinase e acionamento de uma cascata de sinalização pró inflamatória mas, não existem registros da ligação de AAFs ao DAF ou receptores da mucosa intestinal (Farfan *et al.*, 2008). A cepa EAEC 042 possui no plasmídeo pAA o gene *aap*. Esse gene codifica a proteína antiagregativa antigênica (Aap), dispersina (Sheikh, *et al.* 2002) que atua se ligando ao LPS da membrana externa celular, neutralizando sua carga negativa, de modo que as AAFs, que possuem cargas positivas, não sofram autoagregação ou sejam atraídas pela membrana celular, permitindo a dispersão da célula pela superfície da mucosa intestinal (Harrington *et al.*, 2005b; Croxen e Finaly, 2010). O plasmídeo pAA também codifica o fator de transcrição AggR que atua regulando a biogênese de AAF (Nataro *et al.*, 1994) e que está associado a

diarreia inflamatória, uma vez que a presença desse gene está associada ao aumento das citocinas pró-inflamatórias IL-8 e IL-1, nas fezes de indivíduos acometidos por EAEC (Jiang *et al.*, 2002). Em resumo, AggR regula diversos genes que codificam fatores de virulência, presentes no pAA, além de regular ilhas de patogenicidade no cromossomo de EAEC (Okhuysen e DuPont, 2010). Como as fímbrias AAF, a dispersina e o transportador da dispersina são codificados no mesmo plasmídeo, sob o controle do fator de transcrição AggR (Harrington *et al.*, 2005b), essa proteína se tornou a principal reguladora dos fatores de virulência de EAEC. Isso levou a divisão desse patotipo em EAEC típica, para as cepas que possuem o gene *aggR* (Vijay *et al.*, 2014) e EAEC atípica, para as cepas que não o possuem (Kaper *et al.*, 2004).

Apesar dos receptores de EAEC não serem bem descritos, Farfan e colaboradores descreveram em 2008 a ligação de AAFs às proteínas de matriz extracelular: fibronectina, colágeno tipo IV e laminina. A matriz extracelular (MEC) é um complexo de macromoléculas com composição variada em cada tecido, estrutura e propriedades químicas adaptadas às funções do tecido em que se encontra. A MEC é composta principalmente por fibronectina, colágeno do tipo I ao XV, laminina, sulfato de heparan e condroitina (Pankov e Yamada, 2002). Esses componentes podem ser reconhecidos por bactérias quando houver rompimento da mucosa ou de junções oclusivas e durante a inflamação (Walia *et al.*, 2004), sendo a fibronectina a primeira proteína da MEC com atuação de receptor de adesão bacteriana em células eucariotas (Kuusela, 1978). Sendo assim, a utilização de componentes da MEC como receptores de adesinas pode auxiliar na colonização, invasão ou sinalização de enteropatógenos. Nesse estudo, os autores demonstraram que a cepa protótipo 042 de EAEC adere a superfícies tratadas com laminina, colágeno tipo IV e fibronectina, sendo essa a com maior taxa de adesão. Para comprovar que a subunidade principal de AAF/II (a proteína AafA) é a responsável pela adesão de EAEC a fibronectina, foram comparadas cepas mutantes nas subunidades AafA (subunidade maior) e AafB (subunidade menor). Foi observado que a adesão da cepa 042 *aafa* mutante era duas vezes menor que a da cepa selvagem e da 042 *aafb* mutante. Além disso, ensaios de adesão a células T84 polarizadas demonstraram que a adição de fibronectina a superfície apical dessas células leva ao aumento de adesão de EAEC, diretamente associado a presença de AafA. Dessa forma, a adesão de EAEC a fibronectina através de AAF/II contribui para a colonização do trato gastrointestinal, ancorando o biofilme ao epitélio (Farfan *et al.*, 2008).

O dano a mucosa intestinal é causado, entre outros fatores, pela liberação de citotoxinas e enterotoxinas por EAEC, na segunda fase de sua patogênese. A primeira a ser descrita nesse patotipo foi a EAST-1 (*enteroaggregative E. coli heat-stable enterotoxin 1*) por Saravino e colaboradores em 1991. Essa enterotoxina é homóloga a toxina termoestável STa de ETEC e está presente em tanto em cepas patogênicas, como cepas comensais de *E. coli* (Savarino *et al.*, 1995; Harrington *et al.*, 2005b), tornando seu papel no quadro diarreico questionável (Menard e Dubreuil, 2002). No entanto, acredita-se que sua função se resume a ativação de adenilato ciclase, levando ao aumento dos níveis de cGMP intracelular e resultando em perda de eletrólitos e água do epitélio intestinal (Saravino *et al.*, 1993; Gomes *et al.*, 2016). O mesmo efeito é causado por ShET1 (*Shigella enterotoxin 1*), enterotoxina do tipo AB codificada no genoma de EAEC, mas originária de *Shigella flexneri* que causa acúmulo de fluído nas alças do íleo e contribui para diarreia secretória (Fasano *et al.*, 1997). Os efeitos de EAEST-1 e de ShET1 foram demonstrados no intestino de coelhos, utilizando a câmara de Ussing. Sendo assim, o modo de ação dessas enterotoxinas ainda não foi claramente compreendido (Kaper *et al.*, 2004). Codificada no mesmo locus cromossomal, porém na cromátide oposta, está a toxina Pic, um prototransmissor de serino protease de *Enterobacteriaceae* (SPATE: *serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae*). Pic é uma proteína que desempenha inúmeras funções na patogênese de EAEC como: hemaglutinação, atividade de mucinase, hipersecreção de muco e clivagem de glicoproteínas de superfície envolvidas no tráfego de leucócitos (Ruiz-Perez e Nataro, 2014). Outras funções associadas à Pic são a capacidade de EAEC penetrar a camada da mucosa intestinal, devido a degradação das mucinas (Gutiérrez-Jiménez *et al.*, 2008) e a evasão do sistema imune pela clivagem de proteínas do sistema complemento (Abreu *et al.*, 2015).

Em 1998, Navarro-Garcia e colaboradores analisaram o sobrenadante da cultura de cepas de EAEC, causadoras de um surto de diarreia em hospitais no México. A partir dessa análise, foi detectada uma proteína secretada por EAEC durante o processo de infecção que foi chamada de toxina Pet (*plasmid-encoded toxin*), considerada também um SPATE (Eslava *et al.*, 1998), codificada no plasmídeo de virulência pAA, próximo ao gene *aaf* (Kaper *et al.*, 2004). Essa toxina não é expressa em todas as cepas de EAEC, mas sua expressão pela cepa 042 levou ao conhecimento de seu modo de ação (Czeczulin *et al.*, 1999; Henderson *et al.*, 1999). Pet é uma citotoxina que modifica o citoesqueleto dos enterócitos, clivando a proteína  $\alpha$ -fodrina (ligante de actina), levando ao arredondamento e destacamento dessas células, um

processo também chamado de esfoliação (Navarro-Garcia *et al.*, 2010). Outros efeitos descritos foram a dilatação das criptas e extrusão dos enterócitos (Henderson *et al.*, 1999).

Após a adesão à superfície de mucosa do epitélio intestinal, as células de EAEC estimulam a secreção de muco pela atividade de Pic (mucinase) (Navarro-Garcia *et al.*, 2010a), formando um biofilme agregado espesso. A formação desse biofilme dificulta o acesso de antibióticos e permite a troca e expressão de genes de resistência, dificultando sua eliminação por antibióticos ou pela atividade do sistema imune (Tokuda *et al.*, 2010). Dessa forma, o biofilme formado por EAEC é um importante fator de virulência pois permite o prolongamento da colonização e infecção, auxiliando no desenvolvimento do quadro de inflamação crônica (Sheikh *et al.*, 2001; Mohamed *et al.*, 2007). Cepas de *E. coli* não patogênicas são capazes de produzir biofilme mediado por fatores como curli, flagelos, fímbria do tipo 1 e antígeno 43 (Ag43), mas as cepas de EAEC aparentam não necessitar desses fatores (Sheikh *et al.*, 2001; Croxen e Finaly, 2010). Foi então que Sheikh e colaboradores descreveram em 2001 a importância de AAF/II para adesão agregativa seguida da formação de biofilme, pela cepa 042. Através de experimentos realizados com genes mutantes relacionados a biogênese de AAF/II, os autores descreveram que essa adesina não só é necessária para a formação do biofilme agregativo, como tem sua expressão regulada pelas proteínas codificadas pelos genes *fis* e *yafk*. Enquanto Fis atua na ativação da expressão do regulador AggR, que por sua vez ativa a síntese de AAF/II, YafK não teve seu papel esclarecido no estudo, mas acredita-se que está envolvido na transcrição dos genes estruturais dessa adesina (Sheikh *et al.*, 2001).

Em 2007, Fujiyama e colaboradores identificaram outro gene relacionado a produção do biofilme, o *shf*, cujo produto e sua função são desconhecidas, mas é homólogo a proteína IcaB (relacionada a adesina intercelular polissacarídica [PIA]) de *Staphylococcus epidermidis*, envolvida na produção de biofilme dessa espécie (Heilmann *et al.*, 1996). Com o sequenciamento do plasmídeo pAA, foi encontrado um *cluster* de três *open reading frame* (ORF) com 93% de similaridade com o *cluster* localizado no plasmídeo de *Shigella flexneri*, onde estão presentes os genes *shf*, *capU* e *virK* (Czeczulin *et al.*, 1999). Sendo assim, Fujiyama e colaboradores em 2007 deletaram esses genes para comprovar seu papel na formação de biofilme de EAEC 042. Apesar de não haver efeito no padrão de adesão agregativa, a deleção de *shf* reduziu significativamente, mas não inibiu, a capacidade de EAEC 042 de formar biofilme, em relação a cepa *wild type*. Através da reposição desse gene a

produção de biofilme foi reestabelecida. O mesmo comportamento não foi observado em relação aos genes *capU* e *virK*, cuja produção de biofilme não foi alterada, sugerindo que as proteínas geradas por eles não estão envolvidas nesse processo. Além disso, é sugerido que outras moléculas estejam envolvidas na formação de biofilme uma vez que, a deleção de *shf* não impossibilitou esse processo. Como os genes presentes no plasmídeo pAA são regulados por *aggR*, os autores avaliaram também se *shf* era dependente desse regulador, utilizando uma cepa mutante 042 *aggR*-. Nessa condição, a expressão de *shf* foi extremamente reduzida em comparação com a cepa *wild-type*, o que era esperado (Fujiyama *et al.*, 2007). Sendo assim, foi provado que o gene *shf* é importante para a formação de biofilme de EAEC 042, mesmo que não seja o único fator atuante, bem como que esse gene é regulado por AggR, assim como outros genes de fator de virulência. Num estudo realizado em 2010, Vijay e colaboradores isolaram 86 cepas de EAEC de 532 amostras fecais de crianças e animais com seis meses de idade, com diarreia. Foram encontradas cepas típicas e atípicas de EAEC, onde associaram essa classificação com a expressão dos genes *fis* e *ecp* para a produção de biofilme. Dentre as amostras típicas isoladas de humanos, houve uma maior expressão do gene *fis* em comparação as amostras atípicas, mostrando também que as cepas moderadas produtoras de biofilme expressam mais *fis* do que as cepas fracas produtoras. Enquanto isso, o gene *ecp* tinha expressão mínima, o que fez os autores inferirem que não há atuação do produto desse gene na formação de biofilme. Já as amostras atípicas isoladas de humanos apresentaram comportamento contrário, a expressão de *ecp* era muito maior em relação a expressão do gene *fis*, demonstrando a possível atuação do produto de *ecp* na formação do biofilme por cepas atípicas de EAEC (Vijay *et al.*, 2010).

A adesão de EAEC ao epitélio intestinal induz a inflação desse tecido, levando ao quadro de diarreia inflamatória ou a inflamação crônica no caso de infecção persistente. A própria adesão e formação de biofilme induz a liberação de IL-8 e CCL20 pela ativação da via de ativação MAPK (MAP quinase). Esse efeito foi demonstrado pela análise do proteoma da cepa EAEC-T8, que se mostrou interagir com a proteína de superfície Gp96 que desencadeia sinalização para ativação da resposta inflamatória em função da adesão de patógenos, através do fator de transcrição NFκB e da via de ativação MAPK (Croxen e Finaly, 2010; Konar *et al.*, 2012). A adesina AAF/II da cepa 042, juntamente com uma flagelina levam ao aumento de IL-8 em monocamadas polarizadas de células T84 epiteliais do cólon humano (Harrington *et al.*, 2005a) e induzem a infiltração de neutrófilos no epitélio, gerando dano tecidual e extrusão de líquidos (Kaper *et al.*, 2004).



#### 1.4. Gênero *Bacteroides*

A microbiota intestinal é majoritariamente composta por bactérias, tendo como maior representante das bactérias anaeróbias o gênero *Bacteroides*, que é constituído por bacilos Gram negativos, anaeróbios estritos, não esporulantes, formadores de cápsula e resistentes a bile (Wexler, 2007). As espécies pertencentes a esse gênero são membros da microbiota das membranas mucosas, especialmente do trato intestinal de humanos e de outros animais. As espécies do gênero *Bacteroides* correspondem a aproximadamente 25% das bactérias anaeróbias que compõem a microbiota intestinal e além disso, são cultiváveis e geneticamente manipuláveis, tornando-as modelos para entender a colonização e o estabelecimento da microbiota no ambiente intestinal, a tolerância a esse ambiente e seus mecanismos de defesa, a tolerância a xenobióticos e claro, a relação entre microbiota e hospedeiro (Wexler e Goodman, 2017).

Uma das estratégias de *Bacteroides* para se estabelecer na microbiota intestinal é modular o ambiente intestinal para se tornar mais propício para sua colonização. Isso é possível devido a sua capacidade aerotolerante e a presença de enzimas que respondem ao estresse oxidativo e a enzima citocromo bd-oxidase. A citocromo bd-oxidase utiliza concentrações nanomolares de oxigênio, levando à redução do mesmo no meio intracelular, e em consequência à redução dos níveis de oxigênio no intestino, permitindo assim seu crescimento e de outras bactérias anaeróbias (Wexler e Goodman, 2017).

*Bacteroides* também pode modificar o perfil nutricional no intestino pela regulação da síntese dos carboidratos que revestem o epitélio e pela liberação de resíduos de fucose e ácido siálico que são fontes de carbono para outras bactérias e patógenos. Os mono e dissacarídeos já foram absorvidos no intestino delgado e o que fica no cólon são os polissacarídeos complexos e derivados de plantas que não são digeridos nem pelo hospedeiro humano e nem pela maioria das bactérias da microbiota intestinal, por não possuírem as enzimas necessárias. No entanto, as espécies de *Bacteroides* possuem genes que codificam essas enzimas e estas estão presentes no *loci* PUL (*polysaccharide utilization loci*), fornecendo não só nutrientes para outras bactérias e para o hospedeiro, mas também sendo capaz de determinar o nicho

metabólico que as bactérias desse gênero podem ocupar (Donaldson, Lee e Mazmanian, 2015; Lee *et al.*, 2013).

Embora as espécies de *Bacteroides* estejam relacionadas a efeitos benéficos para o hospedeiro, auxílio na regulação da homeostase intestinal e produção de antimicrobianos que atuam na resistência a colonização por bactérias patogênicas, também podem estar associadas a processos infecciosos no hospedeiro. O rompimento do epitélio intestinal pode levar ao escape de *Bacteroides spp.* que alcançam o peritônio, ganham a circulação e colonizam outros nichos causando abscessos intra-abdominais, e em órgãos como cérebro, fígado e pulmões, podendo causar também bacteremia (Wexler, 2007). Dentre as espécies de *Bacteroides* isoladas dos quadros clínicos descritos estão *Bacteroides fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides ovatus* e *Bacteroides vulgatus* (Brook, 2016).

#### **1.4.1. *Bacteroides thetaiotaomicron***

*Bacteroides thetaiotaomicron* é um bacilo Gram-negativo, anaeróbio estrito que compõe a microbiota humana, colonizando o trato gastrointestinal e é a principal espécie representante do gênero *Bacteroides* na microbiota intestinal. *B. thetaiotaomicron* corresponde a 6% das bactérias presentes na microbiota intestinal, identificadas pelo sequenciamento do gene *rrs* (codifica 16S rRNA) e, por isso, através da manipulação genética esse microrganismo tem sido utilizado como modelo para compreensão do papel da microbiota intestinal na expressão de genes nesse ambiente (Zocco *et al.*, 2007). Essa bactéria também auxilia no estudo dos mecanismos moleculares envolvidos na interação entre microbiota e hospedeiro, uma vez que modula funções essenciais no ambiente intestinal do hospedeiro.

*B. thetaiotaomicron* é uma das espécies mais frequentemente isoladas de amostras fecais, sendo associada a uma série de funções metabólicas acessórias ao organismo hospedeiro. Como já mencionado, o epitélio intestinal é coberto por uma camada mucosa rica em glicoconjugados cuja estrutura de suas glicanas são determinadas por fatores genéticos do hospedeiro ou pela ação enzimática codificada pelo mesmo que leva ao processo de glicosilação. Estudos realizados comparando camundongos *germ-free* com camundongos associados a microbiota convencional demonstraram que essa microbiota é capaz de modificar

os padrões de glicosilação na mucosa intestinal quantitativamente e qualitativamente, mudando a distribuição de glicanas (Falk *et al.*, 1998; Freitas *et al.*, 2002). Bry e colaboradores em 1996 desenvolveram um modelo *in vivo* para estudar as interações entre a cepa VPI-5482 de *B. thetaiotaomicron* e os glicoconjugados do epitélio intestinal, demonstrando que fatores solúveis liberados por essa cepa foram capazes de reproduzir, em camundongos *germ-free*, os padrões de produção e distribuição de fucose no epitélio (Bry *et al.*, 1996). Em um estudo feito em 2001, Freitas e colaboradores elaboraram um modelo *in vitro* com células HT29-MTX e propuseram que a interação entre bactéria e hospedeiro depende de fatores solúveis, chamados pelos autores de modulinas. Essas modulinas produzidas por *B. thetaiotaomicron* foram capazes de modular o padrão de galactosilação das células HT29-MTX através da regulação pós transcricional da atividade das enzimas galactosiltransferases (Freitas *et al.*, 2001). Em 2005 o mesmo grupo realizou um estudo com a cepa VPI-5482 de *B. thetaiotaomicron* para investigar a influência da colonização de camundongos *germ-free* com células vivas da cepa ou com os fatores solúveis produzidos pela mesma, na expressão de carboidratos intestinais do camundongo. Os resultados demonstram que tanto as células vivas quanto os fatores solúveis da cepa testada de *B. thetaiotaomicron* são capazes de modificar o padrão de glicosilação, interferindo nos processos de fucosilação e galactosilação, nas células do intestino, seja alterando o nível de expressão ou a topologia das glicanas (Freitas *et al.*, 2005). A susceptibilidade ou resistência a microrganismos patogênicos se dá também pela presença de receptores glicosilados. A mudança na glicosilação ou na distribuição das glicanas pelo epitélio intestinal pode conferir ao hospedeiro resistência a infecção ou pode favorecer a adesão dos patógenos as células epiteliais do intestino (Ng *et al.*, 2013).

A atuação de *B. thetaiotaomicron* na microbiota intestinal não se restringe apenas a modificações fisiológicas como a modulação da composição e estrutura do epitélio intestinal. Essa espécie pode regular o ambiente do intestino a nível genético e atuar nas funções do sistema imune. Um exemplo é o aumento de expressão do receptor polimérico de imunoglobulina (pIgR), responsável pela translocação de IgA secretória pelo epitélio do intestino, levando a maior produção desse anticorpo (Zocco *et al.*, 2007). As células de Paneth são células especializadas presentes nas bases das criptas do epitélio intestinal e estão envolvidas na linha de defesa contra patógenos entéricos através da produção de peptídeos antimicrobianos (Bevins, 2004), moléculas com atividade antibiótica importantes para a imunidade inata, como as defensinas (Lerher e Ganz, 1992) e catelicidinas (Zanetti *et al.* 1995). Espécies de comensais *Lactobacillus spp.* têm demonstrado potencial na produção de

moléculas antimicrobianas, com atividade descrita contra patógenos como EHEC (Gopal *et al.*, 2001). Uma vez que as células de Paneth secretam esses peptídeos antimicrobianos nas criptas intestinais, sugere-se que as substâncias antimicrobianas produzidas pelos microrganismos da microbiota intestinal sejam secretadas nos mesmos nichos, atuando em sinergismo. Mas ainda não é claro se as bactérias da microbiota e seus produtos metabólicos influenciam diretamente na produção de peptídeos antimicrobianos (Liévin-Le Moal e Servin, 2006). Apesar disso, já é descrito que bactérias comensais são capazes de modular a imunidade inata. Um exemplo é *B. thetaiotaomicron*, importante espécie comensal da microbiota intestinal, que no estudo de Hooper e colaboradores em 2003, induziu a expressão de Ang4 e secreção no lúmen intestinal pelas células de Paneth em camundongos. Essa molécula tem como uma de suas funções a atividade microbicida, levando ao controle da inflamação (Hopper *et al.*, 2003). Além disso, López e colaboradores em 2000, demonstraram que *B. thetaiotaomicron* ao colonizar camundongos *germ-free*, é capaz de induzir a produção de matrilisina. A matrilisina é produzida pelas células de Paneth de camundongos e quando secretada, ativa prodefensinas responsáveis por eliminar bactérias exógenas no intestino (López *et al.*, 2000). Esses dados corroboram com a hipótese de que *B. thetaiotaomicron* atua na regulação positiva de genes que codificam produtos que auxiliam no mecanismo de defesa inata do hospedeiro contra enteropatógenos.

A microbiota intestinal desempenha um papel crucial na digestão de polissacarídeos da dieta indigeríveis pelo hospedeiro humano, uma vez que esses não possuem a maquinaria enzimática necessária para metabolizar grande parte dos polissacarídeos ingeridos. Sendo assim, a microbiota intestinal realiza essa função, sem que o hospedeiro tenha que desenvolver um repertório de glicosil hidrolases para tal. Os genes mais encontrados no genoma de *B. thetaiotaomicron* estão envolvidos na aquisição e degradação de polissacarídeos: 226 glicosil hidrolases, 15 polissacarídeos liases, 163 proteínas de membrana externas que se ligam e importam polissacarídeos, 11 enzimas que degradam produtos derivados do hospedeiro, e 20 transportadores de carboidratos. (Comstock e Coyne, 2003; Xu *et al.*, 2003). Nesse conjunto, também estão presentes fatores de transcrição que atuam em resposta a presença de determinado carboidrato, levando a expressão das enzimas glicosil hidrolases apenas quando seu substrato, um carboidrato específico, estiver disponível no intestino (Zocco *et al.*, 2007). A análise do proteoma de *B. thetaiotaomicron* revelou uma regulação da maquinaria de utilização de polissacarídeos, o fator sigma ECF-type (*Extracytoplasmic Function-type sigma factors*). O fator sigma ECF-type compõe os reguladores transcricionais do complexo

RNA polimerase, que atua em resposta a um estímulo externo. Quando esse estímulo é recebido pela bactéria, o fator sigma ECF-*type* é liberado e se liga aos promotores dos genes, codificando produtos com função extracitoplasmática (Comstock e Coyne, 2003; Xu *et al.*, 2003). Para isso, as regiões que codificam esse fator de transcrição contêm também um fator anti-sigma que se liga à membrana interna da bactéria, inibindo a liberação do fator sigma até que o estímulo necessário para tal, seja recebido (Helmann, 2002). A maquinaria de utilização de polissacarídeos mais bem descrita é operon *sus*, que contém genes envolvidos na ligação, transporte e hidrólise de amido. É justamente nessa região que se encontra o fator sigma ECF-*type*, regulando a aquisição de nutrientes. Todos esses fatores associados, conferem a essa bactéria um enorme repertório enzimático com capacidade de degradar os polissacarídeos originários da dieta e também os glicoconjugados da camada de mucosa intestinal, hialuronato e heparina, açúcares que estão sempre disponíveis devido a renovação das células desse epitélio e que são fermentados gerando energia e fonte de carbono para outras bactérias da microbiota intestinal (Sonnenburg *et al.*, 2005).

Por outro lado, a capacidade de *B. thetaiotaomicron* de metabolizar polissacarídeos pode ser utilizada por patógenos a seu favor. Como mencionado no item **1.4.1**, *B. thetaiotaomicron* promove a liberação de ácido siálico no lúmen intestinal e tem sua atividade aumentada quando o indivíduo é tratado com antibióticos. O ácido siálico é um açúcar terminal presente nas mucinas da mucosa intestinal que pode ser degradado pelas sialidases produzidas por *B. thetaiotaomicron*. Mas como essa espécie não possui a via de utilização de ácido siálico, ele é liberado para que a bactéria consiga utilizar outros açúcares da superfície intestinal. Ng e colaboradores em 2013, realizaram uma análise por *microarray* comparando a expressão de genes de *S. Typhimurium* entre camundongos *germ-free* e camundongos gnotobióticos monocolonizados com *B. thetaiotaomicron*. Na presença de *B. thetaiotaomicron*, os genes relacionados a aquisição e catabolismo de ácido siálico apresentaram um aumento na expressão em *S. Typhimurium*. Esse patógeno não possui as enzimas que clivam o ácido siálico das mucinas, mas possui as enzimas necessárias para catabolizar esse e outros açúcares disponibilizados pela microbiota, levando a suposição de que *S. Typhimurium* estaria utilizando as glicanas liberadas da mucosa por *B. thetaiotaomicron*. Para comprovar essa hipótese, os autores desenvolveram um mutante de *S. Typhimurium* que não possui os genes *nanA* e *fucI*, responsáveis pela utilização do ácido siálico e de fucose, respectivamente. Nos camundongos colonizados por *B. thetaiotaomicron*, o mutante não era capaz de competir por nutrientes com *S. Typhimurium wildtype*, já o contrário não foi observado nos camundongos

*germ-free*. Nesse cenário, *B. thetaiotaomicron* auxilia na expansão e colonização de patógenos pela sua atividade de degradação dos resíduos de mucina, o que pode ser exacerbado após o uso de antibióticos que levam ao desequilíbrio intestinal e a maior liberação glicanas no lúmen do intestino (Ng *et al.*, 2013).

*B. thetaiotaomicron* possui fucosidases que clivam a fucose da mucosa intestinal, tornando-a disponível no lúmen para ser usada como fonte de carbono por *S. Typhimurium*. Além das fucosidases, *B. thetaiotaomicron* possui genes relacionados ao metabolismo da fucose, incluindo um repressor transcricional (FucR) que modula a expressão desse açúcar nas glicanas da mucosa intestinal. O FucR regula a transcrição das enzimas da via da fucose e reprime a transcrição do locus que estimula a síntese de glicanas pelo hospedeiro, dessa forma o FucR atua como um sensor molecular de fucose no ambiente intestinal induzindo o hospedeiro a produzir os componentes das glicanas de acordo com a demanda necessária para suprir as necessidades nutricionais das bactérias da microbiota intestinal (Gagneux *et al.*, 1999).

Os produtos gerados por *B. thetaiotaomicron*, como resíduos de mucina livre e metabólitos podem atuar também como sinais químicos que auxiliam os patógenos a sentirem o ambiente intestinal, modulando seu metabolismo e virulência. *E. coli* enterohemorrágica O157:H7 (EHEC) é um dos patógenos que também se beneficiam dos produtos da microbiota intestinal. EHEC é um patotipo diarreiogênico de *E. coli* que se adere aos enterócitos do epitélio intestinal humano formando lesões *attaching and effacing* (A/E) e para se estabelecer, precisa competir por nutrientes com os membros da microbiota, principalmente cepas de *E. coli* comensais que utilizam preferencialmente a fucose como fonte de carbono quando colonizam o intestino (Kamada *et al.*, 2012). EHEC metaboliza mono e dissacarídeos como fucose, galactose e manose que não são usualmente metabolizados por cepas comensais de *E. coli*, mas para evitar a competição por nutrientes EHEC pode também modular seu metabolismo de acordo com a disponibilidade dos açúcares. Por transferência horizontal de genes, EHEC adquiriu um sistema regulatório FusKR (Pacheco *et al.*, 2012) que compreende o sensor de histidina ligado a membrana, a quinase FusK, e um fator de transcrição que atua em resposta a fucose, o FusR. FusK sente a presença de açúcares na camada mucosa e quando há fucose no lúmen, FusK se autofosforila em resposta a esse açúcar e fosforila também FusR, ativando-o. A ativação de FusR leva a inibição da expressão dos genes de metabolismo da fucose, evitando a competição de EHEC com *E. coli* comensais. Além disso, em resposta a

presença de fucose, FusR também reprime a expressão dos genes do sistema de secreção do tipo III (SST3), codificados na ilha de patogenicidade LEE (*locus of enterocyte effacement*), que estão envolvidos na aderência de EHEC às células intestinais no processo infeccioso. Dessa forma, EHEC modula a expressão de seus genes de virulência, gastando menos energia com a repressão do LEE e promovendo seu crescimento quando expressão do mesmo não é benéfica para a bactéria. Como já apresentado, *B. thetaiotaomicron* é um dos componentes da microbiota intestinal responsáveis por liberar resíduos de carboidratos da mucina presente na mucosa intestinal, e possui fucosidases que disponibilizam fucose no lúmen. Sendo assim, a liberação de fucose por *B. thetaiotaomicron* ativa a cascata de sinalização de FusKR auxiliando EHEC na programação de seu metabolismo e patogenicidade (Pacheco *et al.*, 2012).

Resultados semelhantes são demonstrados por Iversen e colaboradores em 2015, no qual foi realizado o co-cultivo de EHEC O103:H25 com *B. thetaiotaomicron* ou com seu sobrenadante (composto por fatores solúveis e metabólitos produzidos durante o crescimento). O cultivo com fatores solúveis de *B. thetaiotaomicron* levou a um aumento na expressão de genes flagelares e de genes envolvidos na quimiotaxia, mas diminuiu a motilidade de EHEC. O co-cultivo com *B. thetaiotaomicron* resulta no aumento da expressão dos genes estruturais do SST3, afetando então os genes presentes nos operons do LEE. Além disso, leva ao aumento de adesão de EHEC a células HeLa e da expressão da proteína EspA. O contato direto de EHEC com *B. thetaiotaomicron* ou com seus metabólitos pode levar a modulação da expressão de seus genes envolvidos na virulência, fazendo com que essa interação entre um membro da microbiota e um enteropatógeno seja um fator importante que contribui para o aumento da virulência de EHEC bem como uma interação mais eficiente com as células do hospedeiro (Iversen *et al.*, 2015).

A infecção é uma das causas mais comuns de disbiose da microbiota. A doença infecciosa e seu tratamento tem um impacto profundo na microbiota, que por sua vez determina o resultado da doença infecciosa no hospedeiro humano. Os patógenos devem primeiro reconhecer seu ambiente antes de selecionar seu arsenal de fatores de virulência. Além disso, a resposta específica de tais patógenos aos inúmeros metabólitos e sinais derivados do próprio hospedeiro e a microbiota residente deve ser integrada a sua regulação gênica, a fim de reconhecer um nicho apropriado e maximizar competitividade de forma a estabelecer o processo infeccioso. Essa complexa interação entre o microrganismo invasor, a

microbiota e o hospedeiro, mantém as relações hospedeiro-patógeno ainda pouco elucidados (Connolly *et al.*, 2018).



## 2. Justificativa

Estudos recentes demonstram a interação entre membros da microbiota e patógenos no estabelecimento do processo infeccioso. *B. thetaiotaomicron* é um importante comensal que tem sido associado a uma série de funções metabólicas acessórias ao organismo hospedeiro. *B. thetaiotaomicron* também é um dos principais membros de bactérias anaeróbias na microbiota intestinal e o mais estudado para avaliar a interação entre microbiota e patógenos entéricos. A maioria dos estudos destaca seu papel benéfico para o hospedeiro atuando na inibição de processos infecciosos. Até que, recentemente, alguns pesquisadores revelaram a capacidade dessa espécie de aumentar o potencial virulento de patógenos entéricos como *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (Iversen *et al.*, 2015; Sperandio *et al.*, 2017), mostrando que as bactérias da microbiota nem sempre são benéficas para o hospedeiro. *E. coli* enteroagregativa (EAEC) é um patógeno emergente causador de surtos de diarreia de viajantes, diarreia aguda e persistente e até inflamação intestinal crônica. No Brasil, EAEC possui impacto principalmente causando quadros de diarreia em crianças, quando gera o quadro de inflamação crônica, podendo levar ao comprometimento físico e cognitivo (Steiner *et al.*, 1988; Lima *et al.*, 2000). Considerando que o patotipo EHEC pode ser influenciado por *B. thetaiotaomicron* para o sucesso no estabelecimento do processo infeccioso, estender esse entendimento para EAEC é extremamente necessário para elucidar as interações interespecies de patógenos e comensais no ambiente intestinal, que possam estar envolvidos na persistência e/ou comportamento virulento dessa espécie. Além disso, EAEC possui alta importância na saúde pública brasileira e a investigação da interação desse patotipo com *B. thetaiotaomicron* ainda não foi descrita.

### 3. Objetivo

Este estudo tem como objetivo avaliar, a nível fenotípico, a interferência do *Bacteroides thetaiotaomicron* no crescimento e na de virulência da *Escherichia coli* Enteroagregativa.

Objetivos específicos:

- Investigar a interferência do sobrenadante de *B. thetaiotaomicron* ATCC 29741 no crescimento do patotipo EAEC (cepa 042);
- Quantificar e analisar o padrão de adesão da cepa EAEC 042 a células HEp-2 após o cultivo com o sobrenadante de *B. thetaiotaomicron*;
- Investigar a interferência do sobrenadante de *B. thetaiotaomicron* na virulência dessas cepas de EAEC, realizando testes de motilidade (cepa 042) e de biofilme (cepa 042 e cepas clínicas);
- Investigar a interferência do sobrenadante de *B. thetaiotaomicron* na adesão de EAEC 042 a proteínas da matriz extracelular (Laminina I e Colágeno do tipo IV);

## 4. Metodologia

### 4.1. Cepas bacterianas

Os experimentos foram realizados com a cepa ATCC 29741 de *Bacteroides thetaiotaomicron* adquirida da *American Type Culture Collection* através da Coleção de Culturas do INCQS do IOC e com cepas de *Escherichia coli* gentilmente cedidas pelo Dr. Dennys Monteiro Girão, pertencentes a Coleção de Culturas do Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica (LIMM), listadas na **Tabela 1**.

**Tabela 1: Cepas utilizadas**

| Cepas  | Espécie/ Patotipo               | Origem/características                                   | Referência/Ano                |
|--------|---------------------------------|--|-------------------------------|
| 29741  | <i>B. thetaiotaomicron</i>      | Apêndice supurado  | (ATCC® 29741™)                |
| 042    | <i>E. coli</i> enteroagregativa | EAEC O44:H18<br>(protótipo internacional)                | Nataro <i>et al.</i> , 1985   |
| HB101* | <i>E. coli</i> enteroagregativa | Cepa híbrida de <i>E. coli</i> B<br>e <i>E. coli</i> K12 | Boyer: Roulland-Dussoix, 1969 |
| 98005  | <i>E. coli</i> enteroagregativa | Espécime clínico   | Isolado no LIMM em 1998       |
| 98034  | <i>E. coli</i> enteroagregativa | Espécime clínico   | Isolado no LIMM em 1998       |
| 98176  | <i>E. coli</i> enteroagregativa | Espécime clínico   | Isolado no LIMM em 1998       |
| 99116  | <i>E. coli</i> enteroagregativa | Espécime clínico   | Isolado no LIMM em 1999       |

HB101\*: cepa não produtora de biofilme

### 4.2. Condições de cultivo

#### 4.2.1. *Bacteroides thetaiotaomicron*

Para cultivo da cepa ATCC 29741 de *B. thetaiotaomicron* foi utilizado o caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) pré-reduzido anaerobicamente (PRAS) suplementado com menadiona (10 µg/mL – Sigma®) e hemina (0,5 µg/mL – Sigma®) (Jousimies-Somer *et al.*, 2002) sob fluxo de CO<sub>2</sub>, com incubação a 37°C por 24 horas. Com o auxílio da alça bacteriológica, a cultura obtida foi semeada em placas de Petri contendo o meio Agar Sangue Suplementado (ASS) com menadiona (10 µg/mL – Sigma®) e hemina (0,5 µg/mL – Sigma®), com o objetivo de verificar a pureza das colônias. As placas foram incubadas a 37°C em jarras de anaerobiose, as quais têm o O<sub>2</sub> totalmente removido por uma bomba de vácuo e lavagens sucessivas com mistura gasosa de 80% de N<sub>2</sub>, 10% de H<sub>2</sub> e 10% de CO<sub>2</sub>, retendo-se esta mistura nas jarras. Após o crescimento, foi realizado um repique das colônias para um novo

caldo BHI-PRAS. Para a manutenção dessa cepa em estoque, o cultivo em caldo BHI foi centrifugado a 2264 xg por 10 minutos. Após o descarte do sobrenadante, o *pellet* celular foi ressuspensionado em caldo LB com 20% de glicerol, transferido para um criotubo e congelado a -80°.

Com o objetivo de obter o sobrenadante, foi realizado um repique das colônias para um novo caldo BHI-PRAS incubado *overnight* a 37°C.

#### **4.2.2. Obtenção do sobrenadante de *B. thtaiotaomicron***

Para a obtenção deste sobrenadante, o cultivo bacteriano foi centrifugado a 2264 xg por 15 minutos, e o pH foi ajustado para 7,0. O sobrenadante foi filtrado em membrana PES com porosidade de 0,22µm (KASVI) a fim de eliminar as células bacterianas residuais (Iversen *et al.*, 2015). O sobrenadante foi armazenado no congelador a -20°.

#### **4.2.3. *Escherichia coli***

A reativação das cepas de *E. coli* foi feita utilizando caldo BHI suplementado com menadiona (1µg/mL– Sigma®) e hemina (1µg/mL– Sigma®), sendo estes incubados *overnight* a 37°C, sob agitação de 250 rpm (Iversen *et al.*, 2015). Com o auxílio de alça bacteriológica, foi realizada semeadura em placas contendo Agar Sangue (AS) para teste de pureza das culturas. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Em seguida, as cepas foram transferidas para novos caldos BHI suplementados até o momento do teste. Para a manutenção dessa cepa em estoque, o cultivo em caldo BHI foi centrifugado a 2264 xg por 10 minutos. Após o descarte do sobrenadante, o *pellet* celular foi ressuspensionado em caldo LB com 20% de glicerol, transferido para um criotubo e congelado a -80°.

#### **4.2.4. Interferência do sobrenadante da cepa ATCC 29741 de *B. thtaiotaomicron* no crescimento da cepa 042 de *E. coli***

Para a realização dos experimentos de interação entre as espécies foi necessário um cultivo *overnight* do qual foram retirados 15µL do cultivo e inoculados em 2,985 mL de caldo BHI suplementado (1:200). O mesmo inóculo foi feito em caldo BHI suplementado 2x

concentrado acrescido com o sobrenadante da cepa ATCC 29741 de *B. thetaiotaomicron*, na proporção 1:1. O caldo BHI que é enriquecido com o sobrenadante precisa ser concentrado para suprir as necessidades nutricionais do crescimento bacteriano. As cepas foram incubadas em estufa a 37°C, sob agitação de 250 rpm, até atingirem a  $DO_{600nm}=0.5$  (Eley *et al.*, 1985; Iversen *et al.*, 2015). A fim de avaliar interferência do sobrenadante da cepa ATCC 29741 de *B. thetaiotaomicron*, o crescimento da cepa 042 de *E. coli* em anaerobiose foi acompanhado segundo as condições representadas na **Tabela 2**. Para isso, foram retirados 15µL do cultivo *overnight* em caldo BHI suplementado e inoculados em 2,985 mL (1:200mL) nos meios listados na **Tabela 2**, em tubos de vidro, em triplicata. Cada tubo foi lido no espectrofotômetro na  $DO_{600nm}$  a cada 30 minutos durante as primeiras 4 horas de experimento e depois a cada 1 hora, até o crescimento atingir a fase estacionária. A média do crescimento bacteriano em cada condição foi analisada pelo *software Graphpad Prism 6*. O experimento foi realizado em triplicata.

**Tabela 2. Condições de interação de *E. coli* testadas**

| <b>Condições testadas</b> |   |
|---------------------------|---|
| <b>1</b>                  | BHI suplementado (controle)   |
| <b>2</b>                  | Sobrenadante de <i>B. thetaiotaomicron</i> diluído em BHI suplementado 2x concentrado (1:1) |

### 4.3. Teste de adesão a célula HEp-2

#### 4.3.1. Cultura de células

As células HEp-2 foram gentilmente cedidas pelo Dr. Dennys Monteiro Girão, do Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica.

A linhagem celular foi cultivada em meio MEM-Eagle (Minimum Essential Medium - Invitrogen®) com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB-Invitrogen®), Penicilina e Estreptomicina 10µg/mL (Sigma®) e glutamina 10µg/mL (Sigma®), mantidas em estufa de 5% CO<sub>2</sub>, a 37°C. Foram realizadas passagens da cultura de células a cada 48 horas até a obtenção do crescimento ideal para realização dos ensaios. Nesse processo, o meio acidificado pelo crescimento celular foi removido e o tapete celular foi lavado com PBS 1x estéril (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2) a fim de remover

células mortas e componentes do meio que atrapalham a tripsinização, como o SFB. Após a lavagem, foi adicionado ao tapete celular 1 mL de Solução de Tripsina (Dfico®) para soltar a monocamada de células da superfície da garrafa. Com o descolamento completo das células, foi adicionado 1 mL de meio MEM-Eagle para parar a tripsinização, devido a presença do SFB, e para dissolver os grumos de células. Após homogeneizar as células, 1 mL da solução foi descartada e foram adicionados 4 mL de MEM-Eagle. A garrafa foi incubada em estufa de 5% CO<sub>2</sub>, a 37°C até a formação de um novo tapete celular, acompanhando o crescimento ao microscópio óptico invertido (Bird e Forrester, 1981).

Para os testes de adesão, após a etapa de tripsinização, as células foram suspendidas em 10 mL de meio MEM-Eagle. Foram retirados 200µL e transferidos para um tubo cônico tipo falcon com 200µL de corante Azul de Tripán e incubados por 10 minutos. Esse volume foi transferido para a câmara de Neubauer, onde as células viáveis foram contadas, com o objetivo de obter 1x10<sup>5</sup> células/mL. Após a contagem, as células foram propagadas em camada semiconfluyente em placa de 24 poços de poliestireno (TPP®), em meio MEM-Eagle com 10% de soro fetal bovino e solução de antibiótico. A cultura foi mantida em estufa de 5% CO<sub>2</sub>, a 37°C por 48 horas. Momentos antes do teste de adesão, o meio MEM-Eagle foi retirado, os poços foram lavados e foi adicionado o meio MEM-Eagle modificado para o teste de adesão, com 0,2% de soro fetal bovino e sem antibiótico (Bird e Forrester, 1981).

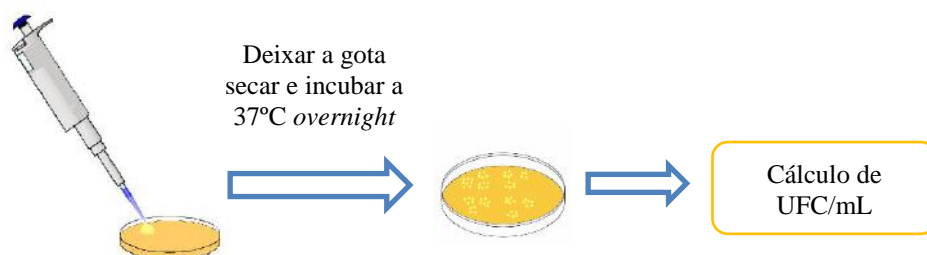
#### **4.3.2. Teste de adesão a células HEp-2 (quantitativo)**

Esse teste foi realizado segundo Iversen e colaboradores, 2015, com algumas adaptações para utilização da célula HEp-2. Esse ensaio foi realizado a fim de quantificar o número de colônias aderidas às células e sua variação quando incubadas com o sobrenadante ou com extrato da cepa ATTC29741 de *B. thetaiotaomicron*.

O teste de adesão foi feito em 2 placas de 24 poços de poliestireno (TPP®), contendo 1 mL de cultura de células HEp-2 na concentração de 10<sup>5</sup>/mL, em camada semiconfluyente, em triplicata para cada cepa testada e em duas placas, uma para o ensaio de 3 horas e outra para o de 6 horas. Foi testada a cepa 042 de EAEC, crescida segundo as condições listadas na **Tabela 2**.

Resumidamente, o meio acidificado pelo crescimento das células foi removido, seguido de lavagem dos poços com PBS 1x estéril. Após a lavagem, foi adicionado 1mL de meio MEM-Eagle (Invitrogen®) com 0,2% de Soro Fetal Bovino (Invitrogen®) e sem solução de antibiótico (Penicilina e Estreptomicina), em cada poço. Foram inoculados 100  $\mu$ L do cultivo da cepa de EAEC na  $DO_{600nm}=0.5$ , nos poços contendo as células HEp-2, em triplicata. Em seguida as placas foram incubadas em estufa de 5% de  $CO_2$ , a 37°C por 3 horas. Após esse período, as placas foram retiradas da estufa, o meio acidificado pelo inóculo bacteriano foi aspirado e os poços foram lavados com PBS 1x estéril para remover as bactérias que não aderiram à monocamada celular. A fim de quantificar as colônias aderidas às células HEp-2, foram adicionados 500 $\mu$ L de Triton x-100 0,1% em cada poço para lisar as células HEp-2, acompanhando o processo ao microscópio óptico invertido. Após a lise celular, 20 $\mu$ L desse conteúdo foi diluído em 180 $\mu$ L de PBS 1x até a diluição  $10^{-8}$ . Em placas de Agar LB (*Luria-Bertani*), foram aplicados 10 $\mu$ L em *spots* (gotas para cada replicata) do conteúdo diluído. As placas foram incubadas em estufa a 37°C, por 24 horas para posterior contagem de UFC/mL.

Após a primeira incubação da placa que foi incubada novamente, o meio acidificado pelo inóculo bacteriano foi removido e os poços foram lavados com PBS 1x estéril para remover as bactérias que não aderiram a monocamada de células. Em seguida, foi adicionado 1mL de meio MEM-Eagle (Invitrogen®) com 0,2% de Soro Fetal Bovino (Invitrogen®) e sem solução de antibiótico (Penicilina e Estreptomicina), em cada poço, seguido de incubação estufa de 5% de  $CO_2$ , a 37°C por mais 3h. Ao final do segundo período de incubação (6h), os poços foram lavados com PBS 1x, seguido de lise celular, diluição e plaqueamento do conteúdo lisado, como descrito anteriormente.



**Figura 1.** Representação esquemática da técnica de *spots* para cálculo de UFC/mL.

### 4.3.3. Teste de adesão a células HEp-2 com lamínula (qualitativo)

A fim de verificar as possíveis alterações no padrão de adesão das cepas de EAEC cultivadas na presença ou na ausência do sobrenadante da cultura da cepa ATTC29741 de *B. thetaiotaomicron*, foram feitos ensaios de adesão utilizando lamínula de microscopia para visualização ao microscópio ótico. Assim como os testes quantitativos, os testes qualitativos foram realizados com períodos de incubação de 3 e 6 horas.

Inicialmente, o meio acidificado pelo crescimento das células HEp-2 foi removido, seguido de lavagem dos poços com PBS 1x estéril. Após a lavagem, foi adicionado 1mL de meio MEM-Eagle (Invitrogen®) com 0,2% de Soro Fetal Bovino (Invitrogen®) e sem solução de antibiótico (Penicilina e Estreptomicina), em cada poço. Uma alíquota de 10µL do cultivo de cada uma da cepa 042 de EAEC na  $DO_{600nm}=0.5$ , foi inoculada nos poços contendo as células HEp-2, em duplicata. Em seguida as placas foram incubadas em estufa de 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C por 3 horas. Após este período de incubação, as placas foram retiradas da estufa e o meio acidificado pelo inóculo bacteriano foi aspirado e os poços foram lavados com PBS 1x estéril para remover as bactérias que não aderiram à monocamada de células. Para fixar as bactérias aderentes a monocamada foi adicionado o volume de 1 mL de metanol anidro (P.A.) em cada poço e as placas foram armazenadas a 4°C *overnight* para posterior coloração das lamínulas. Posteriormente, o metanol foi retirado e os poços foram lavados com PBS 1x estéril. Em seguida, foi adicionado o corante May-Grunwald por 5 minutos, seguido de lavagem dos poços com PBS 1x estéril. Em seguida, o corante Giemsa foi aplicado para corar as células HEp-2, por 20 minutos. Após a remoção do corante as lamínulas foram lavadas, secas em temperatura ambiente e fixadas em lâminas de vidro com resina Entellan (Merck®) em lâminas de vidro para observação ao microscópio ótico (Adaptado de Scaletsky *et al.*, 1984 e Ntaro *et al.*, 1988).



#### 4.4. Adesão à proteína de matriz extracelular

Para avaliar a interferência do sobrenadante da cepa ATCC 29741 de *B. thetaiotaomicron* na adesão da cepa de *E. coli* 042 à MEC, o seguinte protocolo foi adaptado a partir da metodologia proposta por Marre, 2017.

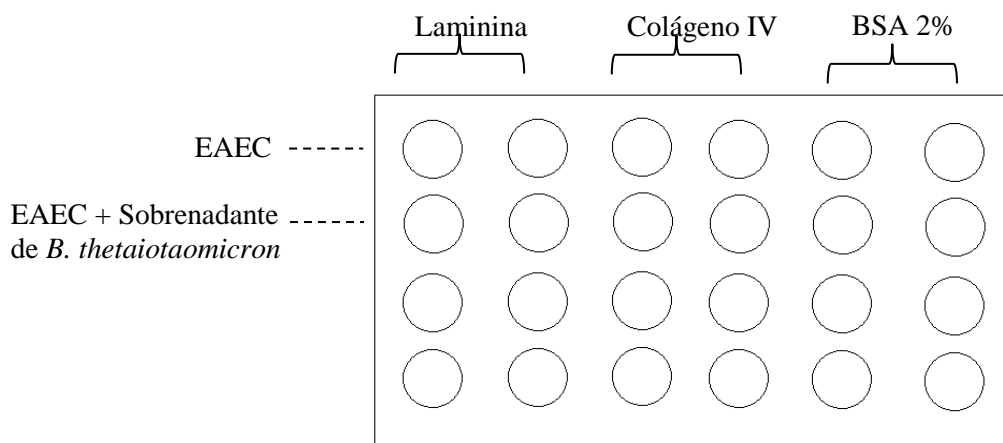
Resumidamente, a cepa de *E. coli* foi cultivada por 24 horas em 9 mL de meio BHI suplementado com menadiona (10 µg/mL – Sigma®) e hemina (0,5 µg/mL – Sigma®) acrescido ou não, do sobrenadante de *B. thetaiotaomicron*, em anaerobiose.

Paralelamente, 100µl da proteína de matriz e do controle, albumina do Soro Bovino (BSA) 2% (p/v), foram adsorvidas a lamínulas de vidro estéreis, posicionadas em placa de 24 poços e incubadas *overnight* a temperatura ambiente. Para tal, as proteínas Laminina tipo 1 (Natural, Mouse, Life Technologies™ - 1mg/ml) e Colágeno tipo IV (Human placenta, Sigma® - 1mg/mL) foram diluídos em tampão TRIS HCl (10mM, pH 6,6), para a concentração de 20µg/mL (Westerlund *et al.*, 1989).

Após o período de incubação, os poços foram lavados três vezes com solução de PBS (0,01 M, pH 7.2) contendo Tween-20 (0,01%) para retirar proteínas que, eventualmente, não se adsorveram à superfície da lamínula. As lamínulas foram bloqueadas com 200µl de uma solução de BSA (0,1%) e Tween-20 (0,01%) em PBS (0,01 M, pH 7,2) por 1 hora, para impedir ligações inespecíficas. As bactérias foram centrifugadas a 2404 xg por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* suspenso em tampão BLANKS-PRAS (sulfato de magnésio 7x H<sub>2</sub>O 0,004 M, fosfato de potássio monobásico 0,0014 M, cloreto de sódio 0,051 M, fosfato de sódio dibásico 0,008 M, cloreto de potássio 0,002 M, tioglicolato de sódio 0,008 M, cisteína 0,004 M, resazurina 2 mL – pH 7,4), na concentração de 10<sup>8</sup> UFC/mL, correspondendo a DO<sub>600nm</sub> = 0,4.

As bactérias foram diluídas para a concentração de 5x10<sup>7</sup> UFC/mL e 200µL foram colocados em contato com as lamínulas adsorvidas com laminina, colágeno IV e BSA 2%, por 1 hora a 37°C em anaerobiose, em duplicata. Após o período de incubação, as lamínulas foram lavadas com solução de PBS (0,01 M) e Tween 20 (0,01%) para retirar as bactérias que não se aderiram. Em seguida, as células aderidas foram fixadas com 300µL de formaldeído 3,7% (v/v) por 30 minutos. Após a fixação, as lamínulas foram lavadas com água e coradas

com *Green Light Bacterial Staining* (BacLight™ Green Bacterial Stain-ThermoFisher), na proporção de 1µL de corante para 2mL de água, por 15 minutos na ausência de luz. As lamínulas foram lavadas para retirada do excesso do corante e foram montadas em lâminas, com auxílio de Prolong® Gold *antifade reagent* (Life Technologies™) para prolongar a vida do corante e foram seladas com esmalte. As lâminas foram levadas para o microscópio de fluorescência (Axioplan 2), onde foram fotografados 20 campos aleatórios de cada lamínula para análise no *software Image J* (NHI, EUA). A média de bactérias aderidas por campo foi determinada pelo *software Graphpad Prism 6*, onde também foram realizadas análises estatísticas com o teste t, para comparar quantitativamente a adesão de bactérias nas diferentes condições de interação.



**Figura 2: Esquema do experimento de adesão a proteínas da MEC.** Organização de uma microplaca de 24 poços para o experimento de quantificação de aderência a laminina I e colágeno IV. Diferentes condições de crescimento de EAEC foram adicionadas aos poços contendo lamínulas de vidro com laminina e colágeno imobilizados. Lamínulas recobertas com BSA 2% foram utilizadas como controles negativos para aderência. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

#### 4.5. Biofilme em superfície abiótica

Com o objetivo de avaliar a interferência do sobrenadante ou do extrato da cepa ATCC 29741 de *B. thetaiotaomicron* na produção de biofilme das cepas de EAEC, foram realizadas análises comparativas na presença e ausência do sobrenadante, sendo ainda incluído um controle negativo de *E. coli* não produtora de biofilme, a cepa HB 101. Para avaliar a produção de biofilme foi utilizado o parâmetro estabelecido por Mohamed e colaboradores, 2007: biofilme forte ( $DO_{570nm} > 1.0$ ), biofilme moderado ( $DO_{570nm} > 0.46 < 1.0$ ) e fraco ( $DO_{570nm} < 0.46$ ).

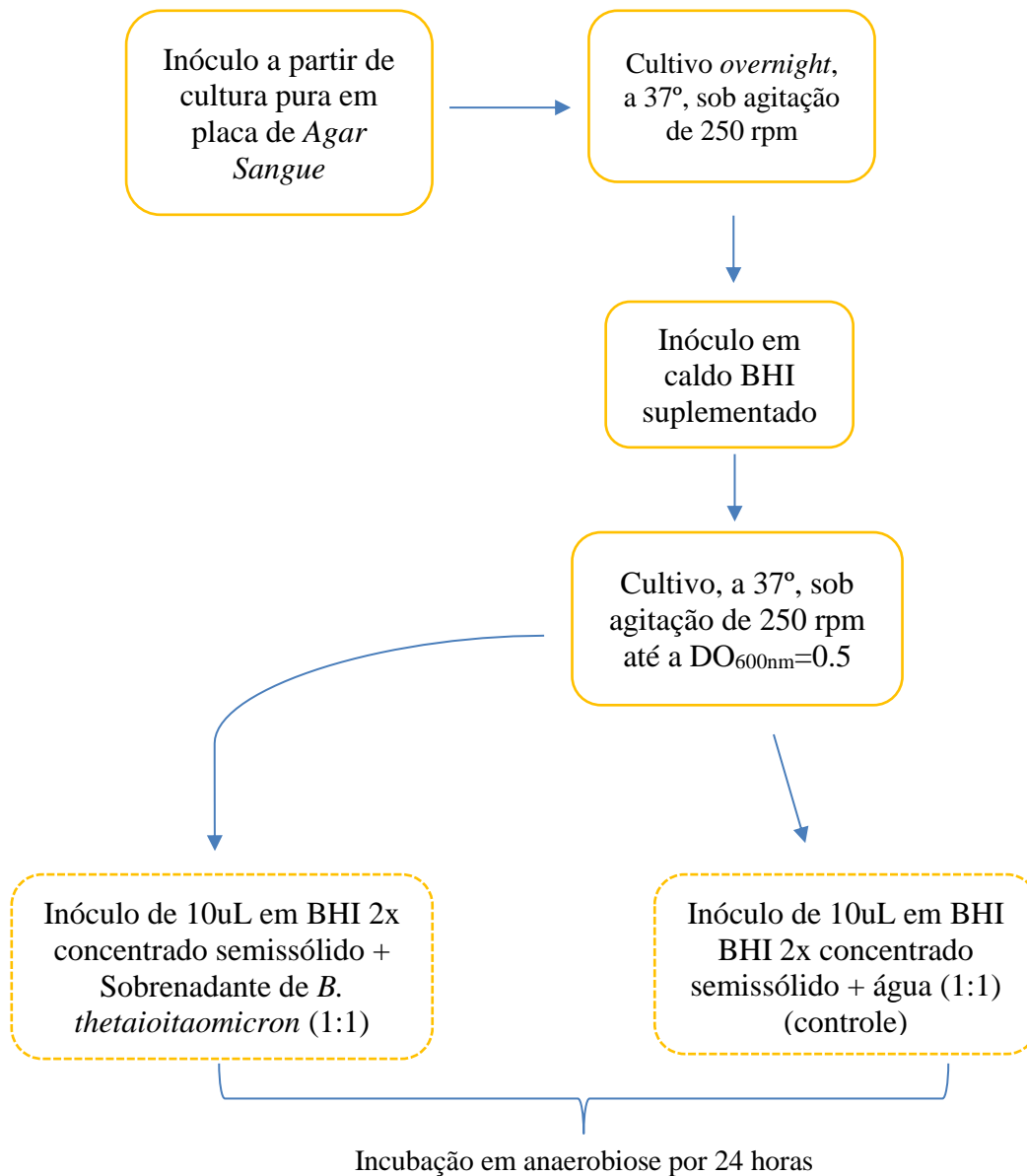
As cepas de *E. coli*, listadas na **Tabela 1**, foram crescidas de acordo com as condições listadas na **Tabela 2**, na estufa a 37°C até atingirem a  $DO_{600nm}=0.5$ . Uma alíquota de 200µL do crescimento foi adicionada a cada orifício da placa de 96 poços, em quintuplicata. A placa foi incubada em anaerobiose por 24 horas, em estufa a 37°C. Após o período de incubação, o conteúdo foi aspirado e em seguida os poços foram lavados três vezes com 200µL de PBS. Para corar o biofilme, foram adicionados 200µL de solução de Cristal de Violeta 0,1% (p/v) em cada orifício, sendo incubado por 30 minutos. Após este período o corante foi removido e os poços foram lavados com PBS 1x para remoção do excesso de corante. Após isso, o corante presente nos orifícios foi eluído com solução 20% etanol e 80% acetona (v/v) por aproximadamente 30 minutos e foi submetido a leitura  $A_{595nm}$  no leitor de ELISA, utilizando o *software* (*SoftMax pro 5.4.1*).

#### 4.6. Teste de motilidade em placa

A fim de avaliar possíveis variações na motilidade da cepa 042 de EAEC, esta foi cultivada com o sobrenadante da cepa ATTC29741 de *B. thetaiotaomicron* em comparação com a cepa cultivada na ausência deste para fins de controle.

Foram inoculados 5µL do crescimento bacteriano de EAEC em placas de Petri contendo BHI semissólido (0,3 % de agar) suplementado e 2x concentrado acrescido do sobrenadante de *B. thetaiotaomicron* (na proporção 1:1). Para o grupo controle foi feita uma placa com BHI semissólido (0,3 % de agar) suplementado e 2x concentrado acrescido de água (na proporção 1:1), na qual foi inoculado 5µL do crescimento bacteriano. As placas foram incubadas em anaerobiose, por 24 horas. O resultado foi definido como positivo pela

existência de variação no tamanho da colônia formada na presença do sobrenadante de cultura da cepa de *B. thetaiotaomicron* testada.



**Figura 3. Fluxograma do teste de motilidade.** Os quadros tracejados correspondem as diferentes condições do testadas no ensaio de motilidade.

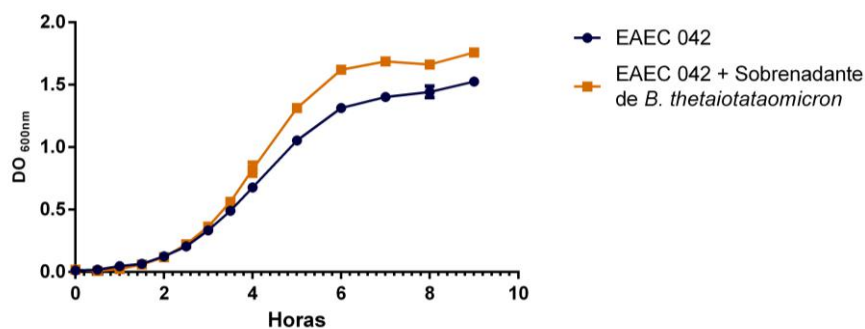
#### 4.7. Análise estatística

Todos os resultados obtidos foram analisados utilizando o *software* Graphpad Prism 6, gerando gráficos de colunas. Antes de realizar o teste estatístico foi feito *Column statistics* dos dados para determinar se o teste seria paramétrico ou não. Foi utilizado o teste t pareado para comparar médias de uma mesma amostra em condições diferentes de cultivo, ausência e presença de sobrenadante de *B. thetaiotaomicron*. Já para comparação entre amostras numa mesma condição de cultivo foi feito o teste t não pareado. Valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## 5. Resultados

### 5.1. Curva de Crescimento

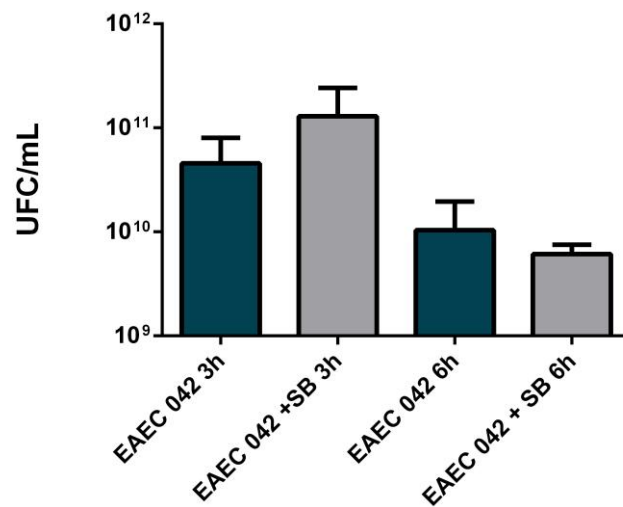
O crescimento da cepa 042 de EAEC foi avaliado em duas condições diferentes: somente o meio de cultura e na presença do sobrenadante de *B. thetaiotaomicron*. O maior crescimento foi obtido pela cepa que cresceu na presença do sobrenadante, sendo observada diferença significativa ( $p=0,0064$ , teste t) quando comparada com o crescimento obtido em meio de cultura puro (**Figura 4**).



**Figura 4: Curva de crescimento em anaerobiose.** Curva de crescimento de *E. coli* enteroagregativa 042 na ausência e presença de sobrenadante de *B. thetaiotaomicron*.

### 5.2. Teste de adesão a célula HEp-2 (quantitativo)

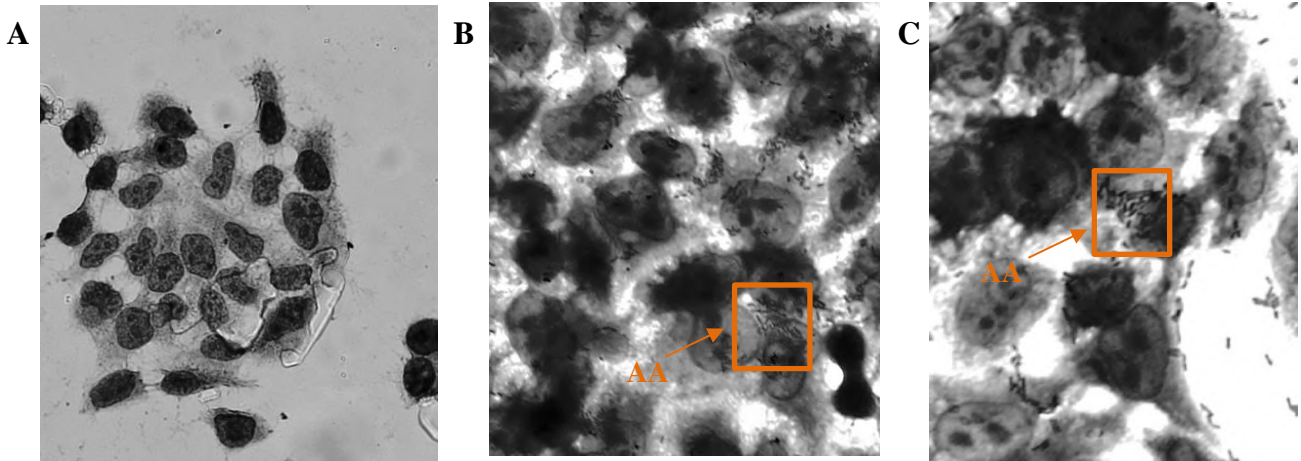
Foi avaliada a adesão quantitativa da cepa 042 de EAEC à célula HEp-2, sob cultivo na presença e ausência de sobrenadante de *B. thetaiotaomicron*. A adesão das células de EAEC 042, crescidas apenas em meio puro, às células HEp-2 foi quantificada em  $4,56 \times 10^{10}$  UFC/mL, ao final de três horas de incubação. Já a adesão das células de EAEC que foram cultivadas com sobrenadante de *B. thetaiotaomicron*, às células HEp-2, apresentaram um aumento em relação a cepa cultivada na ausência do sobrenadante, contabilizando  $1,3 \times 10^{11}$  UFC/mL (**Figura 5**). Embora a adesão de EAEC tenha aumentado quando cultivada com sobrenadante de *B. thetaiotaomicron*, esta diferença não foi considerada estatisticamente significativa ao realizar o teste t pareado de Student. O mesmo comportamento de adesão não foi observado após a troca de meio de cultura e reincubação por mais três horas.



**Figura 5: Adesão quantitativa à célula HEp-2.** Adesão de EAEC 042 cultivadas na presença e ausência do sobrenadante de *B. thetaiotaomicron*, à célula HEp-2, em três e seis horas de incubação.

### 5.3. Teste de adesão à célula HEp-2 (qualitativo)

Como mencionado no item 1.3.1 a adesão de EAEC ao vidro e a células humanas como HeLa e HEp-2 possui um padrão característico e exclusivo desta espécie. Foi então avaliado se o sobrenadante de *B. thetaiotaomicron* seria capaz de interferir na adesão a células, modificando o padrão de adesão agregativa de EAEC. Através da observação das lâminas ao microscópio óptico foi possível concluir que não houve nenhuma alteração no padrão de adesão de EAEC a células HEp-2, quando o cultivo bacteriano é feito com sobrenadante de *B. thetaiotaomicron* (**Figura 6 C**), em comparação com a cepa cultivada na ausência de sobrenadante (**Figura 6 B**). Também não houve alteração na morfologia das células HEp-2 ao longo do experimento (**Figura 6 A**).

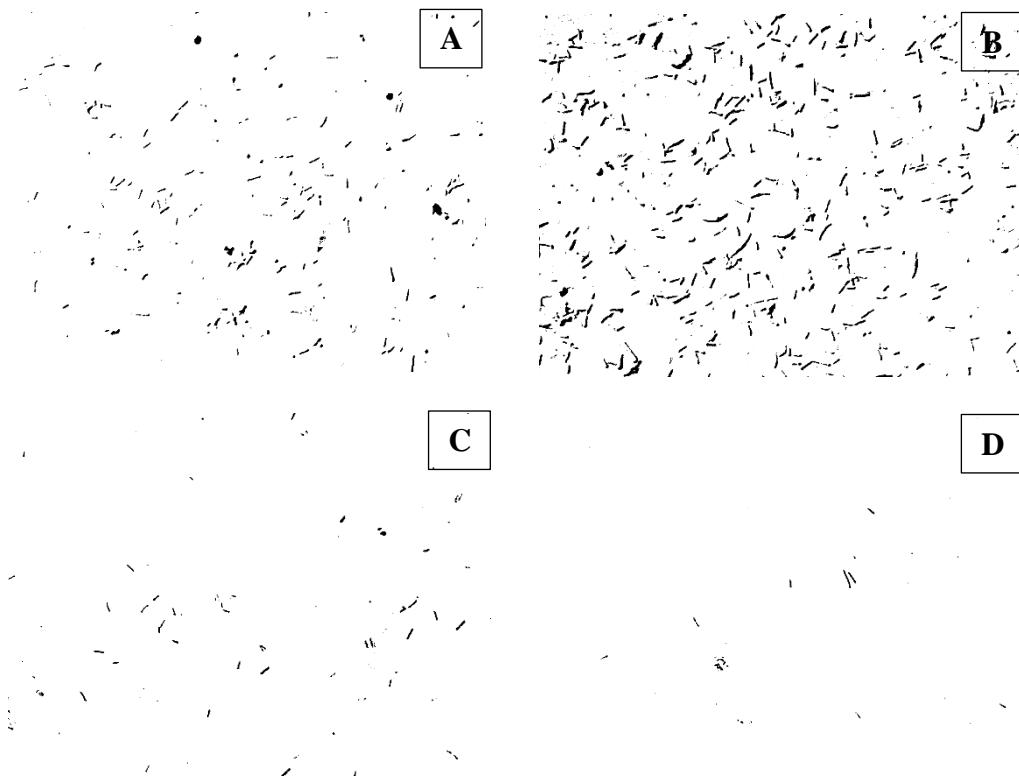


**Figura 6: Adesão qualitativa à célula HEp-2.** Análise visual do padrão de adesão da cepa 042 de *Escherichia coli* realizada através da observação ao microscópio ótico, com aumento de 100x. (A) Células HEp-2 sem inóculo bacteriano. (B) Adesão de EAEC 042 cultivada em meio de cultura puro, à célula HEp-2. (C) Adesão EAEC 042 cultivada em meio de cultura com sobrenadante de *B. thetaiotaomicron*, à célula HEp-2. Quadrados laranjas destacam o padrão de adesão agregativa (AA).

#### 5.4. Adesão a proteínas de matriz extracelular

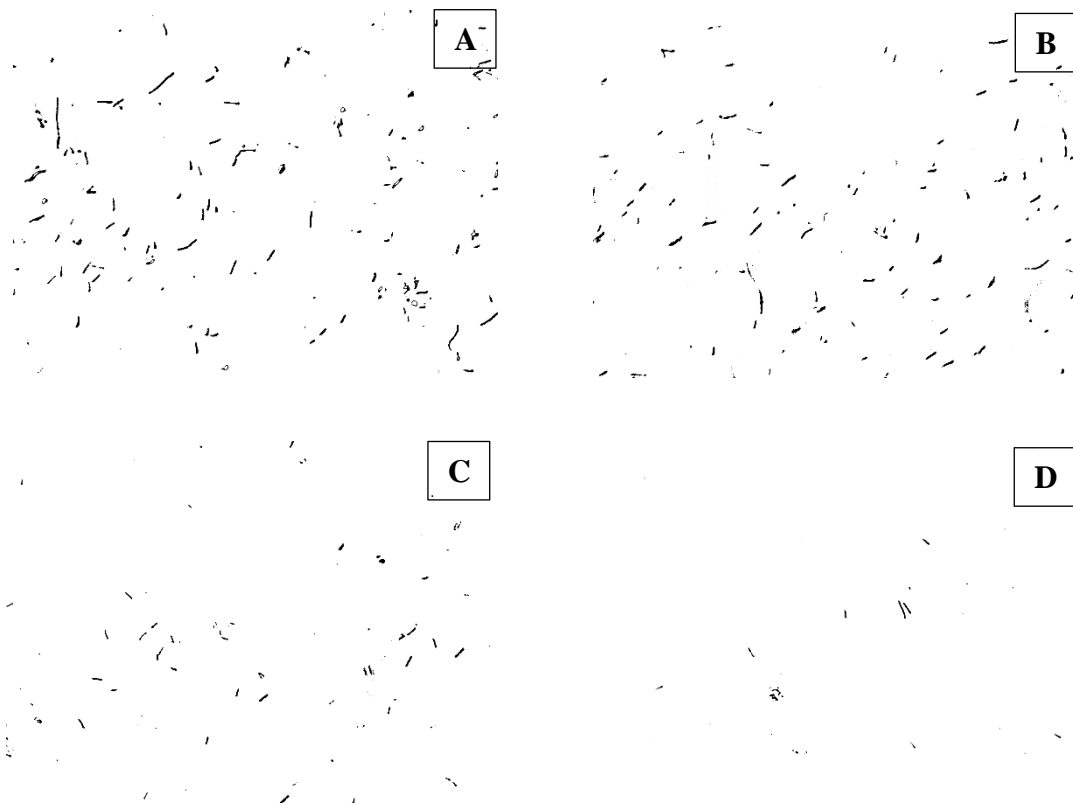
A cepa 042 de EAEC foi utilizada para avaliar a influência exercida pelo cultivo com sobrenadante de *B. thetaiotaomicron* na adesão à laminina I e colágeno do tipo IV. As imagens feitas na microscopia foram analisadas pelo *software* Image J para contagem de células por campo e as médias foram calculadas no programa *Graphpad Prism 6*. Para a cepa que foi cultivada apenas com meio de cultura puro, a média de adesão a Laminina I obtida foi de 500,73 UFC/CV na concentração de  $5 \times 10^7$  UFC/mL (**Figura 7 A**) e a média de adesão ao controle negativo (BSA 2%) foi 96,58 UFC/CV (**Figura 7 C**). Já a cepa cultivada com sobrenadante de *B. thetaiotaomicron* teve sua adesão aumentada em relação ao controle positivo, quantificando a média de adesão a laminina em 604,3 UFC/CV (**Figura 7 B**) e a média de adesão ao controle negativo (BSA 2%) em 49,11 UFC/FV (**Figura 7 D**), ambas na concentração de  $5 \times 10^7$  UFC/mL.





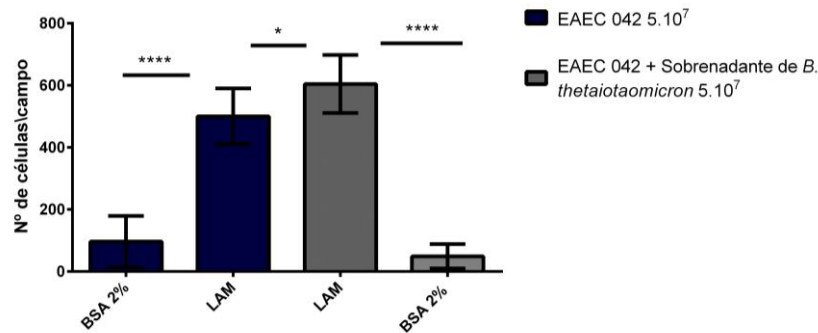
**Figura 7: Adesão de *E. coli* enteroagregativa 042 à laminina I.** A adesão foi quantificada através do programa Image J utilizando a análise de partículas. Imagens alteradas com o *software Image J* a partir de microscopia de campo claro com aumento de 60x na concentração de  $5 \times 10^7$  UFC/mL. (A) Adesão de EAEC cultivada em meio puro. (B) Adesão de EAEC cultivada em meio com sobrenadante de *B. thetaiotaomicron*, (C) Adesão de EAEC cultivada em meio puro, à BSA 2% (controle negativo). (D) Adesão de EAEC cultivada em meio com sobrenadante de *B. thetaiotaomicron*, à BSA 2% (controle negativo).

Para a adesão ao Colágeno tipo IV, a cepa que foi cultivada apenas com meio de cultura puro aderiu em média 311,8 UFC/CV na concentração de  $5 \times 10^7$  UFC/mL (**Figura 8 A**) e a média de adesão ao controle negativo (BSA 2%) foi 96,58 UFC/CV (**Figura 8 C**). A adesão da cepa cultivada com sobrenadante de *B. thetaiotaomicron* foi reduzida em comparação com a cepa cultivada apenas em meio puro, sendo quantificada em 275,76 UFC/CV (**Figura 8 B**) e a média de adesão ao controle negativo (BSA 2%) em 49,11 UFC/FV (**Figura 8 D**), ambas na concentração de  $5 \times 10^7$  UFC/mL.



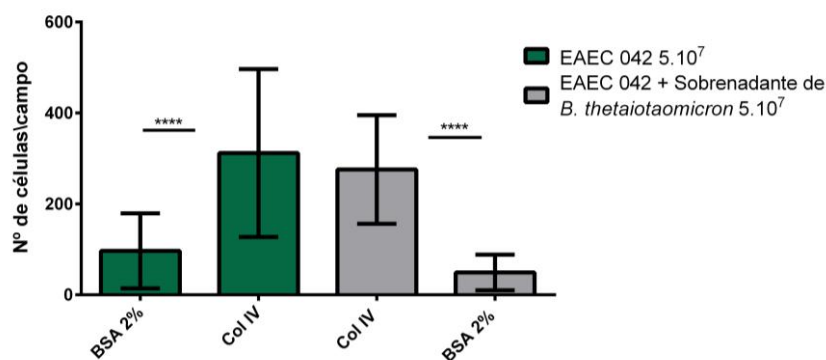
**Figura 8: Adesão de *E. coli* enteroagregativa 042 à colágeno do tipo IV.** A adesão foi quantificada através do programa Image J utilizando a análise de partículas. Imagens alteradas com o *software Image J* a partir de microscopia de campo claro com aumento de 60x na concentração de  $5 \times 10^7$  UFC/mL. (A) Adesão de EAEC cultivada em meio puro. (B) Adesão de EAEC cultivada em meio com sobrenadante de *B. thetaiotaomicron*, (C) Adesão de EAEC cultivada em meio puro, à BSA 2% (controle negativo). (D) Adesão de EAEC cultivada em meio com sobrenadante de *B. thetaiotaomicron*, à BSA 2% (controle negativo).

As médias obtidas foram analisadas no *Graphpad Prism 6* para produção de gráficos e realização de testes estatísticos de acordo com a distribuição das amostras. Para a comparação entre as condições de cultivo testadas na adesão a laminina e colágeno, foi realizado o teste de Wilcoxon. A adesão de EAEC cultivada com sobrenadante de *B. thetaiotaomicron*, a laminina teve aumento significativo em relação ao controle positivo ( $p=0,0269$ ) (**Figura 9**). A comparação da adesão a laminina e colágeno com os controles negativos (BSA 2%) foi feita utilizando o teste Mann-Whitney. Para a cepa cultivada apenas com meio puro, houve diferença significativa na adesão a laminina em relação a adesão a BSA 2% ( $p < 0,0001$ ). O mesmo foi observado para a cepa cultivada com sobrenadante ( $p < 0,0001$ ).



**Figura 9: Quantificação de *E. coli* enteroagregativa aderida a laminina I, por campo visual.** A contagem de bactérias foi realizada através do *software Image J* que contabiliza as partículas na imagem e gera um número de bactérias aderidas por foto. Esse número é analisado no programa *Graphpad Prism 6* e a média da aderência foi analisada pelo teste T. Os asteriscos (\*) indicam quais amostras quando comparadas entre si, apresentam uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Embora a adesão a colágeno IV tenha sido reduzida com o cultivo com sobrenadante de *B. thetaiotaomicron* (**Figura 10**), essa diferença não foi estatisticamente significativa ( $p = 0,4143$ ). Houve diferença significativa entre a adesão a colágeno tipo IV e a BSA 2% da cepa cultivada em meio puro ( $p < 0,0001$ ). Também foi observada diferença significativa entre adesão a BSA 2% e colágeno tipo IV, para a cepa cultivada com sobrenadante de *B. thetaiotaomicron* ( $p < 0,0001$ ).

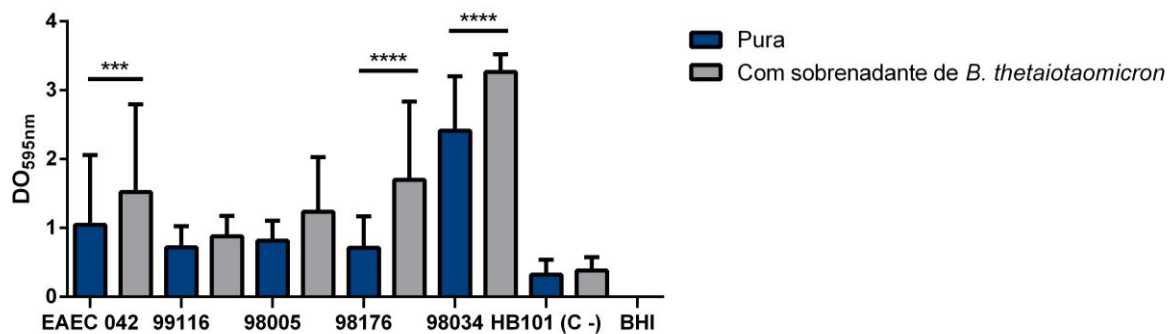


**Figura 10: Quantificação de *E. coli* enteroagregativa aderida a colágeno do tipo IV, por campo visual.** A contagem de bactérias foi realizada através do *software Image J* que contabiliza as partículas na imagem e gera um número de bactérias aderidas por foto. Esse número é analisado no programa *Graphpad Prism 6* e a média da aderência foi analisada pelo Teste T. Os asteriscos (\*) indicam quais amostras quando comparadas entre si, apresentam uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

### 5.5. Biofilme em superfície abiótica

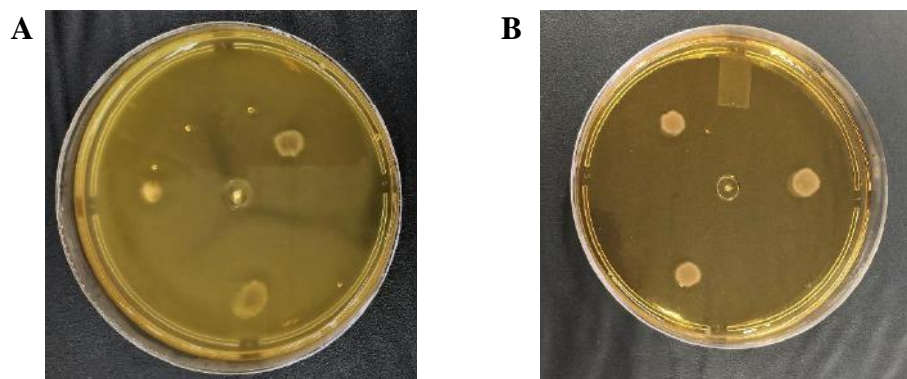
Foi avaliada a produção de biofilme da cepa padrão 042 e das cepas clínicas quando cultivadas com meio de cultura puro e na presença de sobrenadante de *B. thetaiotaomicron*, em anaerobiose. Após a leitura da microplaca de 96 poços, foi observado que, segundo a classificação descrita no **item 4.3**, a cepa 042 e a cepa 98034 são forte produtoras e a cepa 99116 é produtora moderada de biofilme. Já as cepas 98005 e 98176 passaram de produtoras moderadas a forte produtoras de biofilme quando cultivadas na presença do sobrenadante de *B. thetaiotaomicron*. Houve aumento de produção de biofilme na maioria das cepas cultivadas com sobrenadante (**Figura 11**), no qual as cepas 042 ( $p = 0,0003$ ), 98176 ( $p = < 0,0001$ ) e 98934 ( $p = < 0,0001$ ) tiveram aumento estatisticamente significativo, segundo o teste de Wilcoxon.

**Figura 11: Formação de biofilme de cepas de *E. coli*, em superfície abiótica.** Comparação de produção de biofilme entre cepas cultivadas na presença e ausência de sobrenadante de *B. thetaiotaomicron*. Os asteriscos (\*) indicam quais amostras quando comparadas entre si, apresentam uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ).



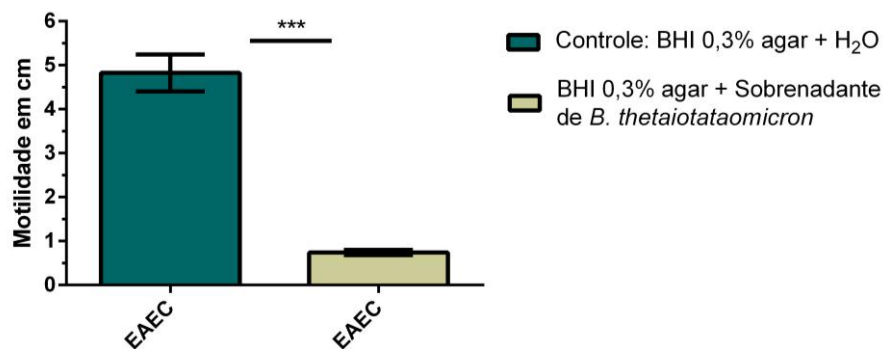
## 5.6. Teste de motilidade em placa

A interferência do sobrenadante de *B. thetaiotaomicron* na motilidade da cepa padrão EAEC 042 foi avaliada em anaerobiose. Os inóculos cultivados apenas no BHI 2x concentrado semissólido com água se espalharam pelo meio, formando grandes halos de dispersão (**figura 12 A**). Já os inóculos feitos em BHI 2x concentrado semissólido com sobrenadante de *B. thetaiotaomicron* não tiveram espalhamento algum (**Figura 12 B**).



**Figura 12: Motilidade de *E. coli* enteroagregativa em placa.** (A) Espalhamento da cepa 042 de EAEC em meio de cultura semissólido com água. (B) Redução do espalhamento da cepa 042 de EAEC em meio de cultura semissólido com sobrenadante de *B. thetaiotaomicron*.

As formações de colônias foram medidas e as médias foram obtidas pelo *software Graphpad Pris 6* onde também foi feito o Teste t de Student, sendo observado que o sobrenadante de *B. thetaiotaomicron* reduziu significativamente, em seis vezes, a motilidade de EAEC, em anaerobiose ( $p=0,0004$ ) (**Figura 13**).



**Figura 13: Análise quantitativa da motilidade de *E. coli* enteroagregativa em placa.** Comparação da motilidade entre cultivo na presença e ausência de sobrenadante de *B. thetaiotaomicron*, da cepa EAEC 042. Os asteriscos (\*) indicam quais amostras quando comparadas entre si, apresentam uma diferença significativa ( $p<0,05$ ).

## 6. Discussão

Muitos estudos abordam diretamente a influência dos microrganismos presentes na microbiota e seus produtos metabólicos, nas infecções por patógenos entéricos. Essa influência normalmente é vista como um auxílio na proteção do hospedeiro, de modo a inibir a infecção por enteropatógenos através da regulação de seus genes de virulência, da ação sinérgica com células do epitélio intestinal (Liévin-Le Moal e Servin, 2006) e manutenção da homeostase imune, prevenindo inflamação.

Em 2009, de Sablet e colaboradores apresentaram o primeiro estudo que demonstra de fato o impacto de *B. thetaiotaomicron* na virulência de enteropatógenos. Através de experimentos realizados em camundongos colonizados com a microbiota intestinal de indivíduos saudáveis, os autores verificaram que fatores solúveis produzidos por componentes da microbiota intestinal são capazes de reprimir a toxina Stx2 de EHEC, seu principal fator de virulência. No mesmo estudo, foi demonstrado que as moléculas que regulam a transcrição de Stx2, são produzidas por uma cepa de *B. thetaiotaomicron* isolada da microbiota intestinal humana (de Sablet *et al.*, 2009). A partir deste, muitos outros estudos têm sido realizados para esclarecer a influência de *B. thetaiotaomicron* ou de seus produtos metabólicos na virulência de EHEC, como um modelo de interação entre microbiota e patógenos entéricos. Até que em 2015, Iversen e colaboradores investigaram não só a interferência deste comensal na regulação do gene Stx2 de EHEC, como avaliou a interferência desta e outras bactérias comensais em fatores de virulência como motilidade e adesão a células e, assim como de Sablet e colaboradores, constaram que o gene que codifica Stx2 é reprimido por moléculas não identificadas, secretadas por bactérias comensais como *B. fragilis*, *C. perfringens* além de *B. thetaiotaomicron*. No entanto, também foi observado nesse estudo que o co-cultivo, ou seja, o contato direto de *B. thetaiotaomicron* com EHEC afetou seus principais fenótipos de virulência, expressão de SSTT e expressão de genes relacionados a adesão (como EspA), localizados na ilha de patogenicidade LEE. Resumidamente, tanto o contato direto com *B. thetaiotaomicron* quanto com substâncias secretadas por essa bactéria modulam a expressão de genes envolvidos na virulência, metabolismo e adesão de EHEC, sugerindo que *B. thetaiotaomicron* funciona como um sinalizador nicho-específico para EHEC, estimulando uma interação mais eficiente com os enterócitos do hospedeiro e aumentando seu potencial de virulência (Iversen *et al.*, 2015).

Ao mesmo tempo que *B. thetaiotaomicron* é capaz de atuar de modo benéfico para o hospedeiro, ou seja, inibindo direta ou indiretamente patógenos entéricos, novos estudos começam a demonstrar que a mesma bactéria comensal influencia na expressão dos genes de virulência de enteropatógenos de modo a favorecer o processo infeccioso. No entanto, quando se trata da interferência de *B. thetaiotaomicron* ou de componentes da microbiota, seja o contato direto com a célula bacteriana ou com metabólitos, sobre patotipos diarregênicos de *E. coli*, o único patotipo estudado é EHEC devido sua grande importância. Nesse contexto e inspirados pelo trabalho de Iversen e colaboradores em 2015, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do sobrenadante de *B. thetaiotaomicron* em cepas de EAEC, abordando fatores de virulência como motilidade, adesão e formação de biofilme.

Os resultados presentes nesse estudo mostram que quando a cepa 042 de EAEC é cultivada com sobrenadante de *B. thetaiotaomicron*, em anaerobiose, seu crescimento é acelerado a partir de quatro horas de incubação, em relação a cepa cultivada apenas em meio puro (controle). Porém, estudos anteriores realizados com EHEC obtiveram resultados distintos. Iversen e colaboradores em 2015, apontaram que EHEC apresenta uma redução no crescimento a partir de quatro horas, quando cultivada com sobrenadante de *B. thetaiotaomicron* e *B. fragilis*, justamente o resultado contrário ao obtido no presente trabalho para EAEC. Apesar disso, os autores não consideram que essa diminuição seja significativa a ponto de atenuar o crescimento de EHEC (Iversen *et al.*, 2015). Além disso, curiosamente outros estudos demonstram que não há alteração do crescimento de EHEC quando é co-cultivada com *B. thetaiotaomicron* (de Sablet *et al.*, 2009; Curtis *et al.*, 2014; Iversen *et al.*, 2015). Sendo assim, a alteração do crescimento de EAEC pode estar relacionada a modulação metabólica em resposta ao cultivo com produtos secretados por *B. thetaiotaomicron*, se tornando necessária a investigação da interferência dessa bactéria na expressão de genes metabólicos de EAEC.

A adesão aos enterócitos é um dos principais fatores de virulência de *E. coli* enteroagregativa, extremamente importante para o estabelecimento da infecção. Através da adesão EAEC é capaz de produzir biofilme, secretar toxinas e ativar cascatas de inflamação, levando ao quadro característico de diarreia persistente inflamatória. Em três horas de incubação a adesão de EAEC 042 às células HEp-2 foi aumentada quando esta cepa é cultivada com sobrenadante de *B. thetaiotaomicron*. Isso também foi observado por Curtis e colaboradores em 2014 e por Iversen e colaboradores em 2015, no qual a adesão de EHEC à célula HeLa foi aumentada, em virtude do aumento da expressão de genes envolvidos na

construção do SSTT, dos reguladores dos operons LEE, da expressão de EspA e intimina e seu receptor Tir, em resposta ao co-cultivo com *B. thetaiotaomicron*. Nesse estudo, o teste de adesão à célula não foi realizado com EHEC cultivada com sobrenadante de *B. thetaiotaomicron* porque não houve aumento da expressão de genes do SSTT nessa condição de cultivo (Iversen *et al.*, 2015). Além disso, Curtis e colaboradores em 2014, perceberam também um aumento na formação de lesões A/E, na presença de *B. thetaiotaomicron*, demonstrando mais uma vez seu impacto na virulência de EHEC (Curtis *et al.*, 2014). Não são encontrados na literatura estudos que abordem a interferência do sobrenadante de *B. thetaiotaomicron* na adesão de cepas de *E. coli* a células, provavelmente pela interferência nos genes envolvidos na adesão ser constatada apenas quando há co-cultivo entre as bactérias. No entanto, os resultados obtidos no presente trabalho mostram que há influência dos produtos de *B. thetaiotaomicron* na adesão de EAEC à célula HEp-2, inspirando futuras investigações dos genes de adesão de EAEC que podem estar sendo afetados por essa condição de cultivo.

Conforme observado na literatura, a cepa 042 de EAEC é capaz de se aderir a células humanas e, portanto, a proteínas de matriz extracelular (MEC), uma vez que a MEC se localiza na parte externa da célula, dando apoio e proteção. Em 2008, Farfan e colaboradores realizaram o primeiro de muitos trabalhos desse grupo sobre adesão de EAEC 042 a proteínas da MEC mais encontradas no epitélio intestinal, laminina, colágeno do tipo I e IV, mas foca na adesão a fibronectina uma vez que muitos outros patógenos se aderem a essa proteína, sendo essa interação mais bem descrita na literatura. Os autores comprovaram por ELISA (*Enzyme Linked Immunono Sorbent Assay*) que a cepa 042 de EAEC se adere a fibronectina, colágeno do tipo IV e laminina, essa com taxa de adesão menor do que as outras proteínas testadas. Já a adesão a colágeno do tipo I foi semelhante ao controle negativo usado, BSA 3%. Também foi feito um ensaio de quantificação de bactérias aderidas, utilizando a cepa protótipo 042 e a cepa 042 *aafA* mutante para verificar quantitativamente a importância da adesina AAF/II na adesão as proteínas da MEC. Como esperado, a cepa 042 que possui a adesina AAF/II apresentou maior adesão as proteínas da MEC em relação a cepa mutante 042 *aafA* que não possui essa adesina. Ao contrário do outro experimento, onde a adesão de EAEC 042 a fibronectina e colágeno do tipo IV eram maiores do que a adesão a laminina, no ensaio de quantificação de bactérias aderidas a adesão a laminina e a colágeno do tipo IV foi quantitativamente semelhante e houve uma maior adesão a fibronectina em relação as outras proteínas testadas (Farfan *et al.*, 2008). Ao contrário do que foi apresentado por Farfan e colaboradores em 2008, os resultados obtidos no presente estudo mostram que a adesão de



EAEC 042 a laminina (500,73 UFC/CV) foi superior a adesão ao colágeno do tipo IV (311,8 UFC/CV).

Também foi demonstrado no presente estudo que o sobrenadante de *B. thetaiotaomicron* influencia na adesão de EAEC as proteínas da MEC de modo a aumentar adesão a laminina e reduzir a adesão ao colágeno do tipo IV. Como os estudos que abordam a interação de bactérias da microbiota e seus produtos metabólicos com patótipos diarreioogênicos de *E. coli* são feitos apenas com EHEC, não há na literatura nada que descreva a interferência na adesão de EAEC as proteínas da MEC. Mesmo nos estudos realizados com EHEC essa investigação ainda não foi feita, o que inicialmente torna a discussão dos resultados difícil, mas mostra que são resultados promissores e precisam continuar a serem investigados. Pouco se sabe sobre a adesão de EAEC 042 a laminina e ao colágeno tipo IV além de que ela ocorre de maneira dependente a AAF/II, mas sabe-se que cepas uropatogênicas de *E. coli* que possuem a adesina Dr (da mesma família Afa/Dr que as adesinas AAF) se aderem ao colágeno tipo IV pela subunidade principal DraE e que essa adesão pode ser inibida pela presença de cloranfenicol ou pela modificação dos aminoácidos que compõem DraE (Selvarangan *et al.*, 2004). Porém Farfan e colaboradores em 2008 demonstraram que a presença de cloranfenicol não afeta a adesão de EAEC 042 pela adesina AAF/II, ao colágeno tipo IV, o que sugere que essa ligação seja diferente da mediada pela adesina Dr. Como AAF/II e Dr são adesinas da mesma família, é importante entender por que a adesão de EAEC 042 ao colágeno do tipo IV é reduzida na presença do sobrenadante de *B. thetaiotaomicron*.

Apesar dos resultados de adesão a laminina e a colágeno tipo IV em resposta ao cultivo com *B. thetaiotaomicron* serem dados importantes e promissores, é necessário investigar a interferência do sobrenadante de *B. thetaiotaomicron* na adesão a fibronectina, uma vez que Farfan e colaboradores deram continuidade aos estudos com essa proteína mostrando que a cepa EAEC 042 se liga também a integrina  $\alpha 5\beta 1$  nas células do epitélio intestinal, de forma direta (independente de AAF/II) ou indireta, mediada pela fibronectina e adesina AAF/II. Além disso, EAEC 042 pode se ligar ao complexo integrina  $\alpha 5\beta 1$ -fibronectina com ou sem a adesina AAF/II, apesar de sua ausência levar a baixa adesão (Izquierdo *et al.*, 2014). EAEC persiste no intestino causando inflamação crônica pela superexpressão de citocinas próinflamatórias (Harrington *et al.*, 2005a) e pode levar a perda da barreira epitelial (Strauman *et al.*, 2010). Associado a isso, a fibronectina sofre aumento de expressão quando há inflamação intestinal (o que pode ser promovido por EAEC), tendo mais interação com as bactérias. Isso já foi comprovado por Farfan e colaboradores em 2008, quando adicionaram

adenosina (comumente secretada durante inflamação intestinal) a incubação de EAEC 042 com células polarizadas T84, aumentando a adesão bacteriana a célula. Posteriormente o tratamento com anticorpo anti-fibronectina reduziu a adesão de EAEC (Farfan *et al.*, 2008). Foi nesse cenário que Izquierdo e colaboradores em 2014, sugeriram que a capacidade de EAEC se ligar ao complexo integrina  $\alpha 5\beta 1$ -fibronectina pode estar envolvida no fenótipo de aderência agregativa em células intestinais (Izquierdo *et al.*, 2014). Outro fator que deve ser levado em conta é a possível atuação de fibronectina, laminina e colágeno tipo IV como âncoras para a formação do biofilme, evento que pode estar relacionando a persistência de EAEC no epitélio intestinal e que pode contribuir para a inflamação nesse tecido. Todos esses aspectos citados estão relacionados a virulência e EAEC e, portanto, se faz necessário avaliar a influência dos produtos presentes no sobrenadante de *B. thetaiotaomicron* na adesão de fibronectina, integrina  $\alpha 5\beta 1$ , no complexo formado por essas proteínas e como ocorre o aumento de adesão a laminina. Novos ensaios também precisam ser realizados a fim de obter imagens de microscopia de fluorescência, pois a coloração não foi eficaz em nenhum dos testes realizados no presente estudo.

O biofilme bacteriano é um dos principais fatores de virulência de microrganismos patogênicos, podendo ser observado em superfícies bióticas ou abióticas. Na literatura, encontra-se descrito que a produção de biofilme pode ser o principal fator de virulência nas infecções causadas por cepas de EAEC. Dentre as cinco cepas testadas, duas (042 e 98034) foram caracterizadas como fortes produtoras. A cepa 99116 foi considerada produtora moderada em ambas condições de cultivo, enquanto as cepas 98005 e 98176 foram caracterizadas como moderadas produtoras de biofilme apenas quando cultivadas em meio puro. Vijay e colaboradores em 2010, isolaram 86 cepas de EAEC do conteúdo fecal de crianças com seis meses de idade e identificaram que a maioria (54,05%) das cepas eram moderadas produtora de biofilme, 27,03% eram fracas produtoras e 18,91% eram fortes produtoras de biofilme (Vijay *et al.*, 2010), através do mesmo critério utilizado no presente estudo, estabelecido por Mohamed e colaboradores em 2007. Nesse mesmo estudo, Vijay e colaboradores discutem os achados clínicos relacionados a produção de biofilme de cepas EAEC, cujos resultados foram controversos, tendo em vista que Mohamed e colaboradores em 2007 encontraram que 21% de cepas isoladas de humanos eram fortes produtoras de biofilme, enquanto 32% foram consideradas fracas produtoras (Mohamed *et al.*, 2007). Em contrapartida, Samie e Nkgau em 2012, observaram que 60% das cepas isoladas de humanos eram fracas produtoras de biofilme (Samie e Nkgau, 2012). Segundo Vijay e colaboradores

em 2010, esse conflito de dados se dá pelo isolamento dessas cepas de EAEC ter sido feito em diferentes regiões geográficas, e como EAEC é um patógeno heterogêneo em relação aos seus genes de virulência, modificações na produção de biofilme como essas descritas podem ser observadas.

Em 2019, Song e colaboradores demonstraram a atividade inibitória da cepa *Lactobacillus rhamnosus* GG na produção de biofilme de *E. coli* K-12. *Lactobacillus rhamnosus* GG (Gorbach-Goldin) (ATCC 53103) é uma cepa isolada do trato gastrointestinal humano saudável em 1983 por Sherwood Gorbach e Barry Goldin e patenteada em 1985. Desde então, tem sido amplamente estudada e considerada a bactéria probiótica mais pesquisada e comercializada. Nesse estudo, foram feitas microcápsulas de *L. rhamnosus* GG utilizadas para interagir com *E. coli* K-12 em experimentos de formação de biofilme. Foi observado que as microcápsulas da cepa probiótica são capazes de reduzir a formação de biofilme de *E. coli* K-12, pela inibição do sistema de *quorum sensing luxS* envolvido na regulação de genes de virulência relacionados a formação de biofilme, sugerindo que sua atuação é como um inibidor de *quorum sensing*, além de *L. rhamnosus* GG ser capaz de destruir biofilmes maduros. Como não houve contato direto entre as células de *E. coli* e de *L. rhamnosus* GG, os autores sugerem que os resultados encontrados se deram pelo efeito de algum composto secretado por *L. rhamnosus* GG e captado por *E. coli*. Apesar de *E. coli* K-12 não ser uma cepa patogênica, esse estudo indica *L. rhamnosus* GG como uma terapia alternativa adjunta aos antibióticos, já que esse probiótico já vem sendo usado na clínica para auxiliar no tratamento de diarreia, câncer e do desequilíbrio da microbiota intestinal. (Song *et al.*, 2019).

Por outro lado, os achados no presente estudo foram diferentes. Todas as cepas crescidas com sobrenadante de *B. thetaiotaomicron* tiveram sua produção de biofilme aumentada, sendo três delas um aumento estatisticamente significativo (042, 98176 e 98034). Além disso, o sobrenadante de *B. thetaiotaomicron* também foi capaz de interferir na produção de biofilme das cepas 98005 e 98176, tornando-as fortes produtoras nessa condição. Sabe-se que o processo de formação de biofilme bacteriano é regulado por *quorum sensing* (Marques *et al.*, 2015) e que *lsrR* e *lsrK* são os principais genes regulados justamente pelo sistema de *quorum sensing luxS* em *E. coli* K-12 (Wang *et al.*, 2005). É importante realçar que a maior parte do conhecimento sobre produção de biofilme por *E. coli* é baseada em estudos com a cepa laboratorial K-12, que difere no seu repertório genético de cepas de *E. coli* patogênicas. Sendo assim, é necessário investigar se a influência do sobrenadante de *B. thetaiotaomicron* ocorre

nos genes que codificam produtos que estão envolvidos diretamente na produção de biofilme de EAEC ou se ocorre em genes relacionados ao *quorum sensing*.

A motilidade é também considerada um dos fatores virulência de diversos patógenos, pois confere a eles a capacidade de se disseminar em ambientes bióticos e abióticos. Após a adesão ao epitélio intestinal, os enteropatógenos podem se disseminar pelas células a fim de conquistar nichos especializados que proporcionem sua sobrevivência no tecido e garantam o sucesso da colonização (Liévin-Le Moal e Servin, 2006). O sobrenadante de *B. thetaiotaomicron* reduziu a motilidade da cepa EAEC 042 em seis vezes. Esse resultado é correspondente com o encontrado por Iversen e colaboradores em 2015, no qual o sobrenadante de *B. thetaiotaomicron* reduziu a motilidade de EHEC em quatro vezes, efeito atribuído a aumento da expressão de genes flagelares de EHEC e genes envolvidos na quimiotaxia desse microrganismo, como *cheY* (Iversen *et al.*, 2015) cuja superexpressão do seu produto faz com que a motilidade de *E. coli* seja reduzida (Kuo e Koshland, 1986). Esse é um resultado extremamente importante porque uma vez que o sobrenadante de *B. thetaiotaomicron* reduz a motilidade de EAEC, isso pode estar fazendo com que mais células bacterianas consigam se aderir à laminina e às células HEp-2, culminando na forte formação de biofilme. EAEC 042 não possui a proteína *cheY*, mas sim proteínas dessa família que desempenham a mesma função. Sendo assim, é necessário investigar quais genes de quimiotaxia e genes flagelares estão sendo afetados pela presença do sobrenadante de *B. thetaiotaomicron*.

Por fim, os resultados encontrados no presente trabalho sugerem a interferência dos produtos do metabolismo de *B. thetaiotaomicron*, presentes em seu sobrenadante, nos fenótipos de virulência de cepas de *E. coli* enteroagregativa, sendo o primeiro trabalho que avalia a influência de *B. thetaiotaomicron* em outros tipos diarreiogênicos que não EHEC. Sendo assim, esses achados justificam a continuidade desse estudo a fim de avaliar essa possível interferência a nível genético, além de ser necessário caracterizar os metabólitos específicos na tentativa de elucidar as interações interespecíficas de patógenos e comensais no ambiente intestinal, que possam estar envolvidos na persistência e/ou comportamento virulento dessa espécie.

## 7. Conclusão

- Houve aumento significativo do crescimento da cepa 042 de *E. coli* enteroagregativa pelo sobrenadante de *B. thetaiotaomicron*.
- A adesão da cepa 042 de *E. coli* enteroagregativa às células HEp-2 foi aumentada pelo sobrenadante de *B. thetaiotaomicron*, em três horas de incubação.
- A cepa 042 de *E. coli* enteroagregativa teve sua adesão à laminina significativamente aumentada pelo sobrenadante de *B. thetaiotaomicron*, enquanto a adesão à colágeno do tipo IV foi reduzida nessa condição de cultivo.
- Das cinco cepas de *E. coli* enteroagregativa, três tiveram aumento significativo na produção de biofilme em superfície abiótica (042, 98176, 98034) quando cultivadas com sobrenadante de *B. thetaiotaomicron*. Além disso, as cepas 98005 e 98176 passaram de produtoras moderadas a forte produtoras de biofilme nessa condição de crescimento.
- A motilidade da cepa 042 foi significativamente reduzida pelo sobrenadante de *B. thetaiotaomicron*, corroborando com os resultados anteriores, mostrando a interferência dos produtos dessa bactéria nos fenótipos de virulência de EAEC.

## 8. Referências bibliográficas

- Abreu, A.G., Fraga, T.R., Granados Martínez, A.P., Kondo, M.Y., Juluiano, L., Navarro-Garcia, F., Isaac, L., Barbosa, A.S., Elias, W.P. (2015). The serineprotease Pic from enteroaggregative *Escherichia coli* mediates immune evasion by the direct cleavage of complement proteins. *J Infect Dis.*212:106–115.
- Bauer, E., Williams, B.A., Smidt H., Verstegen M.W., Mosenthin, R. (2006). Influence of the gastrointestinal microbiota on development of the immune system in young animals. *Curr Issues Intest Microbiol.* 7, 35–51.
- Bäumler, A.J., Sperandio, V. (2016). Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Nature.* 535, 85.
- Bevins CL. The Paneth cell and the innate immune response. *Curr Opin Gastroenterol.* 2004;20:572–580. doi: 10.1097/00001574-200411000-00012.
- Bielaszewska, M., Mellmann, A., Zhang, W., Köck, R., Fruth, A., Bauwens, A., Peters, G., Karch, H. (2011). Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *Lancet Infect. Dis.* 11, 671–676.
- Bird, R.R. and Forrester, F.T. (1981). Basic laboratory techniques in cell culture. Ed. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service Center for Disease Control.
- Boll, E. J., Struve, C., Boisen, N., Olesen, B., Stahlhut, S.G., Krogh, K.A. (2013). Role of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in uropathogenesis. *Infect. Immun.* 81, 1164–1171. 10.1128/IAI.01376-12.
- Braun-Fahrlander, C., Riedler, J., Herz, U., Eder, W., Waser, M., Grize, L., Maisch, S., Carr, D., Gerlach, F., Bufe, A., Lauener, R.P., Schierl, R., Renz, H., Nowak, D., von Mütius, E., Allergy and Endotoxin Study Team. (2002). Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl J Med.* 347, 869–77.
- Brook, I. (2016). Spectrum and treatment of anaerobic infections. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 22, 1–13.
- Browne, H.P., Forster, S.C., Anonye, B.O., Kumar, N., Anne, B., Stares, M.D., Goulding, T. e Lawley, T.D. (2016). Culturing of 'unculturable' human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation. *Nature*, 533(7604) 543-546.
- Bry, L., Falk, P.G., Midtvedt, T., Gordon, J.I. (1996). A model of host microbial interactions in an open mammalian ecosystem. *Science* 273:1380–1383.
- Brzuszkiewicz, E., Thürmer, A., Schuldes, J., Leimbach, A., Liesegang, H., Meyer, F-D., Boelter, J., Petersen, H., Gottschalk, G., Daniel, R. (2011). Genome sequence analyses of two isolates from the recent *Escherichia coli* outbreak in Germany reveal the emergence of a new pathotype: enteroaggregative-haemorrhagic *Escherichia coli* (EAHEC). *Arch. Microbiol.*193, 883–891.
- Cebra, J.J. (1999). Influences of microbiota on intestinal immune system development. *Am J Clin Nutr.* 69,1046S–51S.
- Corrêa-Oliveira, R., Fachi, J.L., Vieira, A., Sato, F.T. and Vinolo, M.A.R. (2016). Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. *Clin Transl Immunol* 5, e73.
- Comstock L. E., Coyne M. J. (2003). *Bacteroides thetaiotaomicron*: a dynamic, niche-adapted human symbiont. *Bioessays* 25, 926–929.
- Connolly JPR, Slater SL, O'boyle N, Goldstone RJ, Crepin VF, Gallego DR, et al. (2018) Host-associated niche metabolism controls enteric infection through fine-tuning the regulation of type 3 secretion. *Nature Communications* volume 9, Article number: 4187

- Costello, E.K. e Relman, D.A. (2014). Population health: Immaturity in the gut microbial community. *Nature*, 510(7505), 344–345.
- Croxen, M.A., Finlay, B.B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Micro* 8:26–38.
- Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K.M., Wlodarska, M., Finlay, B.B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 26(4):822–880.
- Curtis MM, Hu Z, Klimko C, Narayanan S, Deberardinis R, Sperandio V. (2014). The gut commensal *Bacteroides thetaiotaomicron* exacerbates enteric infection through modification of the metabolic landscape. *Cell Host Microbe* 16:759–769. doi:10.1016/j.chom.2014.11.005
- Czczulin, J.R., Whittam, T.S., Henderson, I.R., Navarro-Garcia, F., and Nataro, J.P. (1999). Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. *Infect Immun* 67: 2692 – 2699.
- de Sablet T, Chassard C, Bernalier-Donadille A, Vareille M, Gobert AP, Martin C. (2009). Human microbiota-secreted factors inhibit shiga toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun*. 77:783–790. doi: 10.1128/IAI.01048-08
- Didierlaurent, A., Sirard, J.C., Kraehenbuhl, J.P, Neutra, M.R. (2002). How the gut senses its content. *Cell Microbiol*. 4, 61–72.
- Donaldson, G.P., Lee, S.M., Mazmanian, S.K. (2015). Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol*. 14, 20–32.
- Eggesbø, M., Moen, B., Peddada, S., Baird, D., Rugtveit, J., Midtvedt, T., Bushel, P.R., Sekelja, M., Rudi, K. (2011). Development of gut microbiota in infants not exposed to medical interventions. *APMIS* 119:17–35.
- Eley, A., Greenwood, D., O’Grady, F. (1985). Comparative growth of *Bacteroides* species in various anaerobic culture media. *J Med Microbiol*. 19, 195–201. pmid:3981610.
- Elias, W.P., Jr, Czczulin, J.R., Henderson, I.R., Trabulsi, L.R., and Nataro, J.P. (1999). Organization of biogenesis genes for aggregative adherence fimbriae II defines avirulence gene cluster in enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 181: 1779 – 1785
- Eslava, C., Navarro-Garcia, F., Czczulin, J.R., Henderson, I.R., Cravioto, A. & Nataro, J.P. (1998) Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* 66: 3155–3163.
- Estrada-Garcia, T., Navarro-Garcia, F. (2012). Enteroaggregative *Escherichia coli* pathotype: a genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*. 66:281–298.
- Falk, P.G., Hooper, L.V., Midtvedt, T., Gordon, J.I. (1998). Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol Mol Biol Rev*. 62, 1157–70.
- Farfan, M.J., Inman, K.G., Nataro JP. (2008). The major pilin subunit of the AAF/II fimbriae from enteroaggregative *Escherichia coli* mediates binding to extracellular matrix proteins. *Infect Immun*. 76, 4378–4384.
- Fasano, A., Noriega, F.R., Liao, F.M., Wang, W., Levine, M.M. (1997). Effect of *Shigella* enterotoxin 1 (ShET1) on rabbit intestine in vitro and in vivo. *Gut* 40:505–511.
- Frank, C., Werber, D., Cramer, J.P., Askar, M., Faber, M., Van der Heiden, M., Bernard, H., Fruth, A., Prager, R., Spode, A., Wadl, M., Zoufaly, A., Jordan, S., Kemper, M.J., Follin, P., Müller, L., King, L.A., Rosner, B., Buchholz, U., Stark, K., Krause, G. (2011). Epidemic profile of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *N. Engl. J. Med*. 365, 1771–1780.

- Freitas, M., Cayuela, C., Antoine, J.M., Piller, F., Sapin, C., Trugnan, G. (2001). A heat labile soluble factor from *Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482 specifically increases the galactosylation pattern of HT29-MTX cells. *Cell Microbiol.* 3(5), 289–300.
- Freitas, M., Axelsson, L.G., Cayuela, C., Midtvedt, T., Trugnan, G. (2002). Microbial-host interactions specifically control the glycosylation pattern in intestinal mouse mucosa. *Histochem Cell Biol.* 118, 149–161.
- Freitas, M., Axelsson, L.G., Cayuela, C., Midtvedt, T., Trugnan, G. (2005). Indigenous microbes and their soluble factors differentially modulate intestinal glycosylation steps in vivo. Use of a “lectin assay” to survey in vivo glycosylation changes. *Histochem. Cell. Biol.* 124, 423–433.
- Fukuda S, Toh H, Hase K, Oshima K, Nakanishi Y, Yoshimura K, Tobe T, Clarke JM, Topping DL, Suzuki T, Taylor TD, Itoh K, Kikuchi J, Morita H, Hattori M, Ohno H. (2011). *Bifidobacteria* can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature.* 469:543–547
- Gajer, P., Brotman, R.M, Bai, G., Sakamoto, J., Schütte, U.M., Zhong, X., Koenig, S.S., Fu, L., Ma, Z.S., Zhou, X., Abdo, Z., Forney, L.J., Ravel, J. (2012). Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. *Sci. Transl. Med.* 4, 132ra52.
- Gagneux, P., Varki, A. (1999). Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function. *Glycobiology.* 9, 747–55.
- Gutiérrez-Jiménez, J., Arciniega, I. & Navarro-García, F. (2008). The serine protease motif of Pic mediates a dose-dependent mucolytic activity after binding to sugar constituents of the mucin substrate. *Microb. Pathog.* 45, 115–123.
- Gomes, T.A., Elias, W.P., Scaletsky, I.C., Guth, B.E., Rodrigues, J.F., Piazza, R.M., Ferreira, L.C.S., e Martinezd, M.B. (2016). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Braz J Microbiol.* 47, pp. 3-30.
- Gopal P.K., Prasad J., Smart J., Gill H.S. (2001). In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Int. J. Food. Microbiol.* 67:207–216. doi: 10.1016/S0168-1605(01)00440-8.
- Gordon, J.I., Hooper, L.V., McNevin, Ms, Wong, M., Bry, L. (1997). Epithelial cell growth and differentiation. III. Promoting diversity in the intestine: conversations between the microflora, epithelium and diffuse GALT. *Am J Physiol.* 273, G565–70.
- Harrington, S.M., Strauman, M.C., Abe, C.M., Nataro, J.P. (2005a). Aggregative adherence fimbriae contribute to the inflammatory response of epithelial cells infected with enteroaggregative *Escherichia coli*. *Cell. Microbiol.* 7:1565–1578.
- Harrington, S.M., Dudley, E.G., Nataro, J.P. (2005b). Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. *FEMS Microbiol Lett.* 254:12-18
- Hebbelstrup, J.B, Olsen, K.E., Struve, C., Krogfelt, K.A., Petersen, A.M. (2014). Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli*.
- Helmann, J. (2002). The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Adv Microb Physiol.* 46, 47–110.
- Henderson, I.R., Hicks, S., Navarro-Garcia, F., Elias, W.P., Philips, A.D., & Nataro, J.P. (1999). Involvement of the enteroaggregative *Escherichia coli* plasmid-encoded toxin in causing human intestinal damage. *Infect Immun* 67: 5338–5344.
- Hooper, L.V., Midtvedt, T., e Gordon, J.I. (2002). How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu. Rev. Nutr.* 22:283–307.



- Hooper, L.V., Stappenbeck, T.S., Hong, C.V., Gordon, J.I. (2003). Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. *Nat Immunol.* 4, 269–73.
- Itoh, Y., Nagano, I., Kunishima, M., Ezaki, T. (1997). Laboratory investigation of enteroaggregative *Escherichia coli* O untypeable:H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness. *J Clin Microbiol.* 35:2546–2550.
- Iversen, H., Lindbäck, T., L'Abée-Lund, T.M., Roos, N., Aspholm, M., Stenfors-Arnesen, L. (2015). The Gut Bacterium *Bacteroides thetaiotaomicron* Influences the Virulence Potential of the Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O103:H25. *PLoS ONE* 10(2): e0118140.
- Jakobsson, H.E., Abrahamsson, T.R., Jenmalm, M.C., Harris, K., Quince, C., Jernberg, C. et al. (2014). Decreased gut microbiota diversity, delayed *Bacteroidetes* colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by caesarean section. *Gut* 63, 559–566.
- Jiang, Z. D., Greenberg, D., Nataro, J. P., Steffen, R. & DuPont, H. L. (2002). Rate of occurrence and pathogenic effect of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in international travelers. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4185–4190.
- Kamada, N., Kim, Y-G., Sham, H., Vallance, B., Puente, J., Martens, E., Núñez, G. (2012). Regulated virulence controls the ability of a pathogen to compete with the gut microbiota. *Science* 336, 1325–1329.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 123–140.
- Kelly D, Campbell JI, King TP, Grant G, Jansson EA, Coutts AG, et al. (2004). Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR- $\gamma$  and RelA. *Nat Immunol.* 5:104–12. 10.1038/ni1018
- Konar, M., Sachin, O., Priya, A., Ghosh, S. (2012). Identification of key proteins of cultured human intestinal cells involved in interaction with enteroaggregative *Escherichia coli*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 66:177–190.
- Kotloff, K.L., Nataro, J.P., Blackwelder, W., Nasrin, D., Farag, T.H., Panchalingam, S., Wu, Y., Sow, S.O., Sur, D., Breiman, R.F., Faruque, A.S., Zaidi, A.K., Saha, D., Alonso, P.L., Tamboura, B., Sanogo, D., Onwuchekwa, U., Manna, B., Ramamurthy, T., Kanungo, S., Ochieng, J.B., Omere, R., Oundo, J.O., Hossain, A., Das, S.K., Ahmed, S., Qureshi, S., Quadri, F., Adegbola, R.A., Antonio, M., Hossain, M.J., Akinsola, A., Mandomando, I., Nhampossa, T., Acácio, S., Biswas, K., O'Reilly, C.E., Mintz, E.D., Berkeley, L.Y., Muhsen, K., Sommerfelt, H., Robins-Browne, R.M., e Levine, M.M. (2013). Burden and etiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicentre Study, GEMS): a prospective, case–control study. *Lancet.* 382(9888):209–222.
- Kuo SC, Koshland DE. (1987). Roles of cheY and cheZ gene products in controlling flagellar rotation in bacterial chemotaxis of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 169:1307–1314. doi: 10.1128/jb.169.3.1307-1314.1987
- Kuusela, P. (1978). Fibronectin binds to *Staphylococcus aureus*. *Nature* 276:718–720.
- Lee, S.M., Donaldson, G.P., Mikulski, Z., Boyajian, S., Ley, K., e Mazmanian, S.K. (2013). Bacterial colonization factors control specificity and stability of the gut microbiota. *Nature.* 501, 426–429.
- Lehrer RI, Ganz T (1992). Defensins: endogenous antibiotic peptides from human leukocytes. *Ciba Found Symp* 171:276–290.
- Levine, M.M., Kotloff, K.L., Nataro, J.P., Muhsen, K. (2012). The Global Enteric Multicenter Study (GEMS): impetus, rationale, and genesis. *Clin. Infect. Dis.* 55(Suppl 4):S215–S224.

- Liévin-Le Moal V., Servin A.L. (2006). The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. *Clin Microbiol Rev.* 19:315–337
- Lima, A.A., Guerrant, R.L. (1992). Persistent diarrhea in children: epidemiology, risk factors, pathophysiology, nutritional impact, and management. *Epidemiol Rev.* 14:222-242
- Lima, A.A., Moore, S.R., Barboza, M.S. Jr., Soares, A.M., Schleupner, M.A., Newman, R.D., Sears, C.L., Nataro, J.P., Fedorko, D.P., Wuhib, T., Schorling, J.B., e Guerrant, R.L. (2000). Persistent diarrhea signals a critical period of increased diarrhea burdens and nutritional shortfalls: a prospective cohort study among children in northeastern Brazil. *J Infect Dis.* 181, 1643–1651.
- López-Boado, Y.S., Wilson, C.L., Hooper, L.V., Gordon, J.I., Hultgren, S.J., Parks, W.C. (2000). Bacterial exposure induces and activates matrilysin in mucosal epithelial cells. *J Cell Biol.* 148, 1305–1315
- Luckey, T. (1972). Introduction to intestinal microecology. *Am. J. Clin. Nutr.* 25, 1292–1294.
- Lustri B.C., Sperandio V. and Moreira C.G. (2017) Bacterial chat: intestinal metabolites and signals in host-microbiota-pathogen interactions. *Infect. Immun.*
- Macpherson, A.J., Harris, N.L. (2004). Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nature Reviews Immunology.* 4, 478–485.
- Marques CNH, Davies DG, Sauer K (2015) Control of biofilms with the fatty acid signaling molecule cis-2-decenoic acid. *Pharmaceuticals* 8:816–835
- Marre, A.T.O. (2017). Aderência de bactérias do gênero *Prevotella* a componentes da matriz extracelular humana. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia) - Instituto do Microbiologia Professor Paulo de Góes, Universidade Federal do rio de Janeiro, 117f.
- Matsumiya, Y., Kato, N., Watanabe, K. & Kato, H. (2002). Molecular epidemiological study of vertical transmission of vaginal *Lactobacillus* species from mothers to newborn infants in Japanese, by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *J. Infect. Chemother.* 8, 43–49.
- Menard, L. P. & Dubreuil, J. D. (2002). Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1): a new toxin with an old twist. *Crit. Rev. Microbiol.* 28, 43–60 .
- Mohamed, J. A., Huang, D. B., Jiang, Z. D., DuPont, H. L., Nataro, J. P., Belkind-Gerson, J., e Okhuysen, P.C. (2007). Association of putative enteroaggregative *Escherichia coli* virulence genes and biofilm production in isolates from travelers to developing countries. *J. Clin. Microbiol.* 45, 121–126.
- Montalto, M., D'Onofrio, F., Gallo, A., Cazzato, A., Gasbarrini, G. (2009). Intestinal microbiota and its functions. *Dig Liver Dis Suppl.* 3: 30-34.
- Monteiro-Neto, V., Bando, S., Moreira-Filho, C.A. & Giron, J.A. (2003) Characterization of an outer membrane protein associated with haemagglutination and adhesive properties of enteroaggregative *Escherichia coli* 0111:H12. *Cell Microbiol* 5:533–547
- Morabito, S., Karch, H., Mariani-Kurkdjian, P., Schmidt, H., Minelli, F., Bingen, E., e Caprioli, A. (1998). Enteroaggregative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111:H2 associated with an outbreak of hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol.* 36(3):840-2.
- Musso, G., Gambino, R. e Cassader, M. (2010). Obesity, diabetes, and gut microbiota: The hygiene hypothesis expanded? *Diabetes Care* 33,2277–2284.
- Nataro, J. P., I. C. Scaletsky, J. B. Kaper, M. M. Levine, and L. R. Trabulsi. (1985). Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 48:378–383.

- Nataro J. P., Kaper J. B., Robins-Browne R., Prado V., Vial P., Levine M. M. (1987). Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Pediatr Infect Dis J* 6, 829–831 10.1097/00006454-198709000-00008.
- Nataro, J. P., Y. Deng, D. R. Maneval, A. L. German, W. C. Martin, and M. M. Levine. (1992). Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. *Infect. Immun.* 60:2297–2304.
- Nataro, J.P., Yikang, D., Yingkang, D., Walker, K. (1994). AggR, a transcriptional activator of aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 176:4691–4699.
- Nataro, J.P., Yikang, D., Cookson, S., Cravioto, A., Savarino, S.J., Guers, L.D., Levine, M.M., Tacket, C.O. (1995) Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated in volunteers. *J Infect Dis* 171: 465–468.
- Nataro, J.P., Kaper, J.B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 11(1):142–201.
- Navarro-Garcia, F., Eslava, C., Villaseca, J.M., López-Revilla, R., Czczulin, J.R., Srinivas, S., Nataro, J.P., e Cravioto, A. (1998). In vitro effects of a high-molecular-weight heat-labile enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* 66:3149–3154.
- Navarro-Garcia F, Gutierrez-Jimenez J, Garcia-Tovar C, Castro LA, Salazar-Gonzalez H, Cordova V. (2010a). Pic, an autotransporter protein secreted by different pathogens in the *Enterobacteriaceae* family, is a potent mucus secretagogue. *Infect Immun* ;78:4101–9.
- Navarro-Garcia. F., Sonnested, M., Teter, K. (2010b). Host-toxin interactions involving EspC and Pet, two serine protease autotransporters of the *Enterobacteriaceae*. *Toxins* 2:1134–1147.
- Nezarieh, R., Shakibaie, M. R., Nave, H. H., Norouzi, A., Salajegheh, G., and Hayatbakhsh, M. (2015). Distribution of virulence genes, enterotoxin and biofilm formation among enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) strains isolated from stools of children with diarrhea in South East Iran. *Arch. Ped. Infec. Dis.* 3:e29745.
- Ng, K.M., Ferreyra, J.A., Higginbottom, S.K., Lynch, J.B., Kashyap, P.C., Gopinath, S., Naidu, N., Choudhury, B., Weimer, B.C., Monack, D.M., e Sonnenburg, J.L. (2013). Microbiota-liberated host sugars facilitate post-antibiotic expansion of enteric pathogens. *Nature.* 502:96–9.
- Noverr, M.C., Huffnagle, G.B. (2004). Does the microbiota regulate immune responses outside the gut? *Trends Microbiol.* 12, 562–8.
- Okhuysen, P.C., DuPont, H.L. (2010) Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC): A Cause of Acute and Persistent Diarrhea of Worldwide Importance, *The Journal of Infectious Diseases*, Volume 202, Issue 4, 503-505
- Pacheco, A.R., Curtis, M.M., Ritchie, J.M., Munera, D., Waldor, M.K., Moreira, C.G., Sperandio, V. (2012). Fucose sensing regulates bacterial intestinal colonization, *Nature.* 492 113e117.
- Pankov, R., e Yamada, K. M. (2002). Fibronectin at a glance. *J. Cell Sci.* 115:3861–3863.
- Rolhion N., Chassaing B. When pathogenic bacteria meet the intestinal microbiota. *Philos. Trans. Soc. B Biol. Sci.* 2016;371:20150504.
- Ruiz-Perez, F., Nataro, J.P. (2014). Bacterial serine proteases secreted by the autotransporter pathway: classification, specificity, and role in virulence. *Cell Mol Life Sci.* 71:745–770.
- Salminen, S. (2004). Influence of mode of delivery on gut microbiota composition in seven year old children. *Gut* 53, 1388–1389.

- Samie A, Nkgau TF. (2012). Biofilm production and antibiotic susceptibility profile of *Escherichia coli* isolates from HIV and AIDS patients in the Limpopo Province. *Afr J Biotechnol*;1(34):8560–70.
- Savarino, S.J., Fasano, A., Robertson, D.C., Levine, M.M. (1991). Enteroaggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an in vitro rabbit intestinal model. *J Clin Invest*. 87:1450–1455.
- Savarino, S.J., Fasano, A., Watson, J., Martin, B.M., Levine, M.M., Guandalini, S., e Guerry, P. (1993). Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of E. coli heat-stable toxin. *Proc Natl Acad Sci USA*;90:3093–3097.
- Savarino, S.J., Fox, P., Yikang, D., and Nataro, J.P. (1994). Identification and characterization of a gene cluster mediating enteroaggregative *Escherichia coli* aggregative adherence fimbria I biogenesis. *J. Bacteriol*176:4949 – 4957.
- Savarino, S.J., McVeigh, A., Watson, J., Cravioto, A., Molina, J., Echeverria, P., Bhan, M.K., Levine, M.M., Fasano, A. (1995) Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative E. coli. *J Infect Dis* 173: 1019–1022.
- Scaletsky, I.C., Silva, M.L., Trabulsi, L.R. (1984). Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect Immun*. 45(2):534–536.
- Scaletsky, I. C. A., Silva, M. L. M., Toledo, M. R. F., Davis, B. R., Blake, P. A., e Trabulsi, L. R.. (1985). Correlation between adherence to HeLa cells and serogroups, serotypes, and bioserotypes of *Escherichia coli*. *Infect. Immun*. 49:528-532.
- Selvarangan, R., P. Goluszko, J. Singhal, C. Carnoy, S. Moseley, B. Hudson, S. Nowicki, and B. Nowicki. (2004). Interaction of Dr adhesin with collagen type IV is a critical step in *Escherichia coli* renal persistence. *Infect. Immun*. 72:4827–4835.
- Sender, R., Fuchs, S. e Milo, R. (2016). Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLoS Biology*, 14(8), 1–14.
- Sheikh, J., Hicks, S., Dall’Agnol, M., Phillips, A. D., Nataro, J. P. (2001). Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol*. 41 983–997. 10.1046/j.1365-2958.2001.02512.x
- Sheikh, J., Czczulin, J.R., Harrington, S., Hicks, S., Henderson, I.R., Le Bouguéneq, C., Gounon, P., Phillips, A., Nataro, J.P. (2002). A novel dispersin protein in enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Clin Invest*.110:1329-1337.
- Song, H., Zhang, J., Qu, J. Liu, J., Yin, P., Zhang, G., Shang, D. (2019). *Lactobacillus rhamnosus* GG microcapsules inhibit *Escherichia coli* biofilm formation in coculture. *Biotechnol Lett*.
- Sonnenburg, J.L., Xu, J., Leip, D.D., Chen, C.H., Westover, B.P., Weatherford, J., Buhler, J.D., Gordon, J.I. (2005). Glycan foraging in vivo by an intestine-adapted bacterial symbiont. *Science*. 307:1955–9.
- Steiner, T.S., Lima, A.A., Nataro, J.P., Guerrant, R.L. (1998). Enteroaggregative *Escherichia coli* produce intestinal inflammation and growth impairment and cause interleukin-8 release from intestinal epithelial cells. *J Infect Dis*.177:88–96.
- M. C. Strauman, J.M.Harper, S. M.Harrington, E. J. Boll, and J. P. Nataro, “Enteroaggregative *Escherichia coli* disrupts epithelial cell tight junctions,” *Infection and Immunity*, vol. 78, no. 11, pp. 4958–4964, 2010.
- Tokuda K, Nishi J, Imuta N, Fujiyama R, Kamenosono A, ManagoK, et al. Characterization of typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli* in Kagoshima, Japan: biofilm formation and acid resistance. *Microbiol Immunol* 2010;54:320–9.

- Vial, P.A., Robins-Browne, R., Lior, H., Prado, V., Kaper, J.B., Nataro, J.P., Maneval, D., Elsayed, A., Levine, M.M. (1988). Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. *J Infect Dis* 158: 70–79.
- Vijay D, Dhaka P, Vergis J, Negi M, Mohan V, Kumar M, et al. (2015). Characterization and biofilm forming ability of diarrhoeagenic enteroaggregative *Escherichia coli* isolates recovered from human infants and young animals. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* ;38:21–31
- Vogt, S.L., Pena-Diaz, J., Finlay, B.B. (2015). Chemical communication in the gut: effects of microbiota-generated metabolites on gastrointestinal bacterial pathogens. *Anaerobe.* 34:106–15.
- Walia, B., F. E. Castaneda, L. Wang, V. L. Kolachala, R. Bajaj, J. Roman, D. Merlin, A. T. Gewirtz, and S. V. Sitaraman. (2004). Polarized fibronectin secretion induced by adenosine regulates bacterial-epithelial interaction in human intestinal epithelial cells. *Biochem. J.* 382:589–596.
- Wang L, Li J, March JC et al (2005). luxS-dependent gene regulation in *Escherichia coli* K-12 revealed by genomic expression profiling. *J Bacteriol* 187:8350–8360
- Westerlund, B., Kuusela, P., Risteli, J., Risteli, L., Vartio, T., Rauvala, H., Virkola, R. e Korhonen, T.K. (1989). The O75X adhesin of uropathogenic *Escherichia coli* is a type IV collagen-binding protein. *Mol. Microbiol.* 3:329-337.
- Wexler, A.G., Goodman, A.L. (2017). An insider’s perspective: *Bacteroides* as a window into the microbiome. *Nature Microb.* 2(5):17026.
- Wexler, H.M. (2017). *Bacteroides*: the good, the bad and the nitty-gritty. *Rev. Clinical microbiology.* p. 593-621. 10.1128/CMR. 00008-07.
- Willing, B. P., Vacharaksa, A., Croxen, M., Thanachayanont, T. & Finlay, B. B. (2011). Altering host resistance to infections through microbial transplantation. *PLoS ONE* 6, e26988.
- Xu, J., Bjursell, M.K., Himrod, J., Deng, S., Carmichael, L.K., Chiang, H.C., Hooper, L.V., Gordon, J.I. (2003). A genomic view of the human–*Bacteroides thetaiotaomicron* symbiosis. *Science.* 299:2074–6.
- Zanetti M, Gennaro R, Romeo D. (1995). Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett.* 374(1):1–5. doi:10.1016/0014-5793(95)01050-O
- Zocco, M.A., Ainora, M.E., Gasbarrini, G., Gasbarrini, A. (2007). *Bacteroides thetaiotaomicron* in the gut: molecular aspects of their interaction. *Dig Liver Dis.* 39:707–12.