

**Vitor Chuva Costa de Almeida Cruz**

**PROTEÍNAS AMILOIDES NO BIOFILME DE BACTÉRIAS  
ANAERÓBIAS ESTRITAS**



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

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
RIO DE JANEIRO  
Dezembro/2024**

**Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Médica, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação do Professor Dr. Leandro Araújo Lobo e co-orientação da Dra. Scarlathe Bezerra da Costa.**

## CIP - Catalogação na Publicação

C957p Cruz, Vitor Chuva Costa de Almeida  
Proteínas amiloides no biofilme de bactérias  
anaeróbias estritas / Vitor Chuva Costa de Almeida  
Cruz. -- Rio de Janeiro, 2024.  
74 f.

Orientador: Leandro Araujo Lobo.

Coorientadora: Scarlathe Bezerra da Costa.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) -  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto  
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:  
Microbiologia e Imunologia, 2024.

1. Bactérias anaeróbias. 2. Biofilme bacteriano.  
3. amiloides funcionais bacterianos. 4. microbiota  
intestinal. 5. eixo intestino-cérebro-microbiota.  
I. Lobo, Leandro Araujo, orient. II. Costa,  
Scarlathe Bezerra da , coorient. III. Título.

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

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

**ALUNO(A): VITOR CHUVA COSTA DE ALMEIDA CRUZ**

**DRE: 121080723**

**BANCA EXAMINADORA:**

Prof. Sérgio Eduardo Longo Fracalanza (Presidente)  
 Prof. Débora Foguel  
 Prof. Karla Rodrigues Miranda  
 Prof. Mariana Fernandes Augusto de Oliveira (Suplente)

**Título da Monografia: "Proteínas amiloides no biofilme de bactérias anaeróbicas estritas"**

**Local: Anfiteatro, no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da UFRJ.**

**Data e hora de início: 13 de dezembro de 2024 às 09:30h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10,2 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 13 de dezembro de 2024.

**NOTA:**

10

Banca Examinadora

  
 Prof. Sérgio Eduardo Longo Fracalanza (Presidente)

10

  
 Prof. Débora Foguel

10

  
 Prof. Karla Rodrigues Miranda

Prof. Mariana Fernandes Augusto de Oliveira (Suplente)

**Aluno(a):**

  
 Vitor Chuva Costa de Almeida Cruz

**Orientador(a)  
 (e coorientador):**

   
 Prof. Leandro Araujo Lobo e Dra. Scarlethe Bezerra da Costa

**Coordenadora de  
 TCC:**

  
 Profa. Marinella Silva Laport

**Dedico este trabalho ao pequeno Vitor, que, ao receber um microscópio de brinquedo, viu nascer seu grande sonho de desvendar os mistérios do universo. E a todos aqueles que, com carinho e apoio, têm caminhado ao seu lado nessa jornada de descobertas.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, aos orixás e guias espirituais por terem me dado a oportunidade de chegar aonde cheguei, sempre me apoiando nas horas boas e ruins dessa caminhada.

Agradeço a minha família por todo apoio e amor que me foi dado durante a minha caminhada. Agradeço aos meus pais pelo apoio a minha curiosidade científica desde pequeno e por todo apoio nessa caminhada. Agradeço minha vó, Sandra, por ter me ensinado a acreditar em mim mesmo e nunca desistir dos meus sonhos. Agradeço a minha tia Carla por me inspirar a carreira acadêmica e prestar vestibular para UFRJ. Agradeço aos meus irmãos, Thales e Yuri, por todo apoio e carinho, mesmo no meio de todas as brigas e desentendimentos de irmãos. Agradeço a todos os outros integrantes da família, Giovanna, Lili, Lucas, Vovó Zezé, tio bola, tio Raul, Enzo, meus falecidos avôs Fernando e Vismar, e todos os outros.

Agradeço ao meu namorado, Igor, por ser um dos meus maiores apoios em meio a toda loucura que foi essa fase de escrita da monografia e por ter me ensinado a verdadeira face do amor. Agradeço a minha segunda família, por todo amor e carinho que recebi deles desde que nos conhecemos, meu cunhado Enzo, meus sogros Ana Paula e Regis por terem me acolhido como um filho, me apoiando e incentivando na vida.

Agradeço ao meu Orientador, Leandro Lobo, por ter me aceitado como aluno, e sempre ter me incentivado e apoiado dentro da carreira acadêmica. Agradeço demais a Scar, você foi uma co-orientadora incrível, sempre me incentivando, ouvindo minhas ideias para o projeto e me auxiliando com todo amor e carinho dentro do laboratório. Você é muito mais do que uma co-orientadora excepcional, você é um exemplo de cientista e uma amiga especial, se hoje escrevo minha monografia e me formo microbiologista pela UFRJ, conquistando um sonho e mais um degrau nessa minha caminhada profissional, saiba que você teve um papel fundamental nessa parte da minha vida e eu serei eternamente grato por ter a sorte de te conhecido. Agradeço a todos os integrantes da família anaeróbios: Juliana, Lohane, Carolzinha, Kelly, Júlia, Isa, Julinha, Chiquinho e Maria Clara por todas as reuniões, ajudas, piadas, almoços, salgadinhos do Big Net, docinhos entre experimento e fofocas. Agradeço à Lili pelas contribuições científicas, as dúvidas tiradas sobre os experimentos e as dicas sobre a vida. Agradeço especialmente a Dede, minha coorientadora reserva, agradeço demais por toda ajuda e conhecimento que você me passou desde a minha entrada no laboratório, agradeço por ser uma amiga incrível que está sempre disponível para me ajudar a qualquer momento, agradeço

pelas festas e lanches na sua casa, por aguentar eu te perturbando todos os dias, você é uma amiga incrível e uma microbiologista brilhante e inspiradora.

Agradeço a minha panelinha da micro, eu não consigo imaginar esses 4 anos de faculdade se não ao lado de todos vocês. Desde o primeiro período formamos esse grupo enorme de amigos, que mesmo com todas as pessoas envolta falando que não iria durar, nossa amizade perdurou e vai perdurar além da graduação. Agradeço a Milena, Gabi furtado, Gabi Tropiano, Luca, Chiquinho, Luiza Limongi, Evelyn, Suyane. Agradeço especialmente as minhas duas melhores amigas nessa vida, Luiza e Maria clara, por todo apoio, amor, carinho, risadas e surtos que passamos juntos.

Por fim, Agradeço Aos Professores do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes por todo o conhecimento passado. Agradeço as agências de fomento FAPERJ, CNPq e CAPES pela luta e incentivo ao desenvolvimento científico brasileiro

***"Oni ije ti ko ni je, ni ki o to wa"***

**(Um pequeno movimento pode nos levar a um grande destino)**

**- Provérbio popular iorubá**



## RESUMO

VITOR CHUVA COSTA DE ALMEIDA CRUZ

### PROTEÍNAS AMILOIDES NO BIOFILME DE BACTÉRIAS ANAERÓBIAS ESTRITAS

Orientador: Leandro Araujo Lobo

Coorientador: Scarlathe Bezerra da Costa

**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.**

O microbioma intestinal é o mais abundante do corpo humano e desempenha, coletivamente, diversas funções no hospedeiro. Estudos sobre a relação microbiota - hospedeiro revelam que a liberação de produtos bacterianos como moléculas análogas a neurotransmissores, LPS e proteínas com características amiloides podem influenciar na homeostase do Sistema Nervoso Central (SNC) por indução de uma resposta imunológica, atravessando a barreira hematoencefálica, ou por sinalização direta através do nervo vago. Baseado nisso, surgiu o termo “eixo cérebro-intestino-microbiota”, no qual a disbiose no microbioma do hospedeiro começou a ser observada em indivíduos com doenças neurodegenerativas (DNS). A agregação de amiloides humanos no SNC leva à perda da homeostase fisiológica do sistema, que se associa a danos cognitivos e a DNS como a Doença de Alzheimer. Desde o descobrimento da fímbria curli em 2002, a descrição e caracterização de amiloides bacterianos vem aumentando gradativamente, identificando diversos amiloides e suas funções para as células como a proteína Curli presente em Enterobactérias, Proteína Fap C e B de *Pseudomonas sp.*, Proteínas TasA de *Bacillus sp.*, Aap e Bap presente em *Staphylococcus sp.* entre outras. Embora em crescimento, a literatura existente sobre amiloides bacterianos presentes na formação do biofilme bacteriano se limita a certos grupos de bactérias sendo majoritariamente relacionado a microrganismos aeróbios. Por isso, o objetivo deste estudo é utilizar abordagens *in silico*, fenotípicas e moleculares para determinar se bactérias anaeróbias estritas da microbiota intestinal são capazes de produzir proteínas de caráter amiloide e se tais proteínas são utilizadas na formação de seus biofilmes. Para analisar a produção de amiloides durante o crescimento de bactérias anaeróbias, foram realizados os ensaios de crescimento em ágar Brucella contendo vermelho do congo e ensaio de depleção de vermelho congo as células bacterianas, onde todas as cepas estudadas apresentaram ligação ao corante, tanto durante o seu crescimento, quando pós crescimento. Para detectar a presença das proteínas amiloides no biofilme dessas bactérias, foram realizados ensaios de formação do biofilme bacteriano com posterior coloração por corantes específicos para amiloides, vermelho congo e Tioflavina T, sendo mensurado em espectrofotômetro, além da análise em microscopia de fluorescência do biofilme, onde foi possível observar a emissão de fluorescência específica indicando a ligação dos corantes com proteínas amiloides. Foi realizado um extrato do biofilme das amostras que apresentarem maior produção dos amiloides, que será marcado por anticorpos anti-fibra e anti-oligômeros, através da técnica de Dot Blot, onde todas as cepas testadas apresentaram ligação de ambos os anticorpos em seus biofilmes. Foram realizadas análise *in silico* do proteoma da cepa de *F. nucleatum* onde 23 possíveis amiloides foram identificados. Esses resultados abrem caminho para entender melhor como a microbiota intestinal pode influenciar o hospedeiro, especialmente em doenças como o Alzheimer, ajudando no desenvolvimento de novas estratégias para tratar essas condições no futuro. Além de auxiliar para melhor compreensão sobre bactérias anaeróbias e sua relação com a saúde.

**Palavras-chave: Microbiota intestinal; Bactérias anaeróbias; Amiloides bacterianos; eixo cérebro-intestino-microbiota; Biofilme bacteriano.**

**ABSTRACT****VITOR CHUVA COSTA DE ALMEIDA CRUZ****AMYLOID PROTEINS IN THE BIOFILM OF STRICT ANAEROBIC BACTERIA****Orientador: Leandro Araujo Lobo****Coorientador: Scarlathe Bezerra da Costa**

**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.**

The gut microbiome is the most abundant in the human body and collectively performs several functions in the host. Studies on the microbiota-host relationship reveal that the release of bacterial products, such as neurotransmitter-like molecules, LPS, and proteins with amyloid-like characteristics, can influence the homeostasis of the Central Nervous System (CNS) by inducing an immune response, crossing the blood-brain barrier, or through direct signaling via the vagus nerve. Based on this, the term "gut-brain-microbiota axis" emerged, highlighting the observation of dysbiosis in the host microbiome of individuals with neurodegenerative diseases (NDs). The aggregation of human amyloids in the CNS disrupts the system's physiological homeostasis, leading to cognitive impairments and NDs such as Alzheimer's disease. Since the discovery of curli fimbriae in 2002, the description and characterization of bacterial amyloids have been gradually increasing, identifying various amyloids and their cellular functions, such as the Curli proteins in enterobacteria, Fap C and B proteins in *Pseudomonas* sp., TasA proteins in *Bacillus* sp., and Aap and Bap proteins in *Staphylococcus* sp., among others. Despite this growth, the existing literature on bacterial amyloids in biofilm formation is limited to specific bacterial groups, mainly focusing on aerobic microorganisms. Therefore, this study aims to use *in silico*, phenotypic, and molecular approaches to determine whether strict anaerobic bacteria from the gut microbiota can produce amyloid-like proteins and whether these proteins are used in biofilm formation. To analyze amyloid production during bacterial growth, growth assays on Brucella agar with Congo red and Congo red depletion assays were performed. All strains studied showed dye binding both during and after growth. To detect the presence of amyloid proteins in the biofilm of these bacteria, biofilm formation assays were conducted, followed by staining with specific amyloid dyes (Congo red and Thioflavin T), quantified using a spectrophotometer and analyzed via fluorescence microscopy. Specific fluorescence emission indicated the binding of dyes to amyloid proteins. Subsequently, biofilm extracts from samples with the highest amyloid production were labeled with anti-fiber and anti-oligomer antibodies using the Dot Blot technique, where all tested species showed antibody binding in their biofilms. An *in silico* analysis of the proteome of *Fusobacterium nucleatum* identified 23 potential amyloids. These results pave the way for a better understanding of how the gut microbiota can influence the host, especially in diseases such as Alzheimer's, contributing to the development of new strategies to treat these conditions in the future. Additionally, they assist in improving our understanding of anaerobic bacteria and their relationship with health.

**Keywords: Gut microbiota; Anaerobic bacteria; Bacterial amyloids; Gut-brain-microbiota axis; Bacterial biofilm.**

## RESUMO PARA LEIGOS

VITOR CHUVA COSTA DE ALMEIDA CRUZ

### PROTEÍNAS VIAJANTES : UMA JORNADA DO INTESTINO AO CÉREBRO

Orientador: Leandro Araujo Lobo

Coorientador: Scarlathe Bezerra da Costa

O microbioma intestinal é o conjunto de bactérias que vivem no nosso intestino e desempenham papéis muito importantes para a saúde. Essas bactérias ajudam na digestão, fortalecem o sistema imunológico e até se comunicam com o cérebro. Estudos mostram que algumas substâncias produzidas por essas bactérias podem afetar o sistema nervoso. Elas conseguem influenciar o cérebro de diferentes formas, como atravessando barreiras naturais do corpo ou enviando sinais do intestino para o cérebro por um nervo que forma uma ponte entre esses dois sistemas. Por causa dessa conexão, conhecida como “eixo cérebro-intestino-microbiota”, cientistas perceberam que mudanças no equilíbrio das bactérias intestinais podem estar ligadas a doenças neurológicas, como o Alzheimer. Uma característica dessas doenças é o acúmulo de proteínas chamadas amiloides no cérebro, que acabam prejudicando o funcionamento do sistema nervoso e causando danos à memória e outras funções. Interessantemente, descobriu-se que algumas bactérias também produzem amiloides. Essas proteínas ajudam as bactérias a formarem biofilmes, que são comunidades de bactérias envoltas por uma película protetora que permite que elas sobrevivam em ambientes não favoráveis. Embora já se saiba bastante sobre amiloides de bactérias aeróbias (que precisam de oxigênio para viver), há pouca informação sobre os amiloides produzidos por bactérias anaeróbicas (que vivem sem oxigênio), como as do intestino. O objetivo deste estudo foi entender se bactérias anaeróbicas do intestino humano conseguem produzir amiloides e usar essas proteínas na formação de seus biofilmes. Para isso, usamos diferentes técnicas de laboratório. Primeiro, cultivamos essas bactérias em um meio especial com um corante chamado vermelho do congo, que se liga a essas proteínas fazendo com que a bactéria cresça com coloração vermelha. Observamos que todas as bactérias testadas apresentaram crescimento vermelho, indicando a presença dessas proteínas. Depois, analisamos os biofilmes dessas bactérias com outro corante chamado Tioflavina T que juntamente com o vermelho congo liberam luz fluorescente quando ligados aos amiloides. Os resultados mostraram fluorescência dos corantes no biofilme das bactérias, comprovando a presença de amiloides ali. Além disso, usamos anticorpos que se ligam as proteínas amiloides para verificar se as proteínas tinham características de fibras (que é quando elas se montam uma em cima da outra como um quebra cabeças) ou formas de pedaços menores (peças separadas desse quebra cabeça). Os anticorpos se ligaram em todas as bactérias anaeróbicas testadas mostrando a presença dessas duas formas da proteína. Finalmente, realizamos uma análise utilizando programas de computador de todas as proteínas conhecidas de uma bactéria anaeróbia chamada *Fusobacterium nucleatum* e identificamos 23 proteínas com potencial para formar amiloides. Esses resultados abrem caminho para entender melhor como as bactérias intestinais podem influenciar o cérebro, especialmente em doenças como o Alzheimer, ajudando no desenvolvimento de novas estratégias para tratar essas condições no futuro. Além de auxiliar para melhor compreensão sobre esse grupo de bactérias e sua relação com a saúde.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Crescimento das cepas controles em ágar Yesca com vermelho congo (100µg/ml) .....	<b>21</b>
<b>Figura 2</b> – Crescimento das cepas de <i>Bacteroides</i> em ágar Brucella vermelho congo (100µg/ml) .....	<b>22</b>
<b>Figura 3</b> - Crescimento de <i>Prevotella</i> spp. e <i>Fusobacterium nucleatum</i> em ágar Brucella vermelho congo (100µg/ml) .....	<b>23</b>
<b>Figura 4</b> - Crescimento de <i>Phocaeicola vulgatus</i> e <i>Clostridioides difficile</i> em ágar Brucella com vermelho congo (100µg/ml) .....	<b>24</b>
<b>Figura 5</b> - Análise visual do ensaio de depleção do vermelho congo .....	<b>25</b>
<b>Figura 6</b> - Leitura da absorbância do sobrenadante com vermelho do congo a 500 nm .....	<b>25</b>
<b>Figura 7</b> - Fluorescência emitida pelos biofilmes corados com Vermelho congo .....	<b>27</b>
<b>Figura 8</b> - Fluorescência emitida pelos biofilmes corados com Tioflavina T.....	<b>27</b>
<b>Figura 9</b> - Microscopia de fluorescência do biofilme de <i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285 em objetiva de 10x .....	<b>28</b>
<b>Figura 10</b> - Microscopia de fluorescência do biofilme de <i>E. coli</i> MC4100 ΔCsg em objetiva de 10x .....	<b>28</b>
<b>Figura 11</b> - Microscopia de fluorescência do biofilme de <i>S. epidermidis</i> ATCC 35984 em objetiva de 10x .....	<b>29</b>
<b>Figura 12</b> - Microscopia de fluorescência do biofilme de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 em objetiva de 10x .....	<b>29</b>
<b>Figura 13</b> - Microscopia de fluorescência do biofilme de <i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25856 em objetiva de 10x .....	<b>30</b>
<b>Figura 14</b> - Microscopia de fluorescência do biofilme de <i>Prevotella melaninogenica</i> ATCC 25845 em objetiva de 10x .....	<b>31</b>

<b>Figura 15</b> - Microscopia de fluorescência do biofilme de <i>Prevotella intermedia</i> ATCC 49046 em objetiva de 10x .....	<b>31</b>
<b>Figura 16</b> - Microscopia de fluorescência do biofilme de <i>Prevotella nigrescens</i> ATCC 33563 em objetiva de 10x .....	<b>32</b>
<b>Figura 17</b> - Microscopia de fluorescência do biofilme de <i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285 em objetiva de 10x .....	<b>33</b>
<b>Figura 18</b> - Microscopia de fluorescência do biofilme de <i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 43859 em objetiva de 10x .....	<b>33</b>
<b>Figura 19</b> - Microscopia de fluorescência do biofilme de <i>Bacteroides fragilis</i> 638R em objetiva de 10x .....	<b>34</b>
<b>Figura 20</b> - Microscopia de fluorescência do biofilme de <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> ATCC 29741 em objetiva de 10x .....	<b>34</b>
<b>Figura 21</b> - Microscopia de fluorescência do biofilme de <i>Phocaeicola vulgatus</i> em objetiva de 10x .....	<b>35</b>
<b>Figura 22</b> - Microscopia de fluorescência do biofilme de <i>Clostridioides difficile</i> NAP-1 em objetiva de 10x .....	<b>36</b>
<b>Figura 23</b> - Dot Blot com anticorpos anti-oligômero A11 .....	<b>37</b>
<b>Figura 24</b> - Dot Blot com anticorpos anti-fibra OC .....	<b>38</b>
<b>Figura 25</b> - Possíveis proteínas amiloides de <i>F. nucleatum</i> ATCC 25586 .....	<b>39</b>
<b>Figura 26</b> - Localização celular de possíveis proteínas amiloides de <i>F. nucleatum</i> ATCC 25586 .....	<b>40</b>
<b>Figura 27</b> - Possível localização celular das proteínas preditas como mais insolúveis no software CamSol .....	<b>40</b>
<b>Figura 28</b> - Nível de confiança da predição estrutural fornecida pelo Alpha Fold .....	<b>42</b>
<b>Figura 29</b> - Predição da estrutura tridimensional obtida no Alpha Fold .....	<b>44</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Amostras utilizadas no estudo .....	<b>15</b>
<b>Tabela 2</b> - Proteínas com maiores características amiloides com base na análise <i>in silico</i> .....	<b>41</b>
<b>Tabela 3</b> - Possível função de proteínas selecionadas na análise <i>in silico</i> de <i>F. nucleatum</i> ....	<b>45</b>

## ÍNDICE

RESUMO .....	ix
ABSTRACT .....	x
RESUMO PARA LEIGOS .....	xi
LISTA DE FIGURAS .....	xii
LISTA DE TABELAS .....	xiv
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 Microbioma intestinal .....	1
1.2 Bactérias anaeróbias como patógenos oportunistas .....	4
1.3 Biofilme Bacteriano e a resistência a antimicrobianos.....	7
1.4 Amiloides funcionais bacterianos .....	8
1.5 Amiloides funcionais bacterianos no biofilme .....	9
1.6 Amiloides funcionais bacterianos no contexto da neurodegeneração .....	11
<b>2 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>13</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>15</b>
4.1 Cepas e condições de cultura .....	15
4.2 Teste de crescimento em ágar vermelho congo .....	16
4.3 Ensaio de depleção do vermelho congo com células .....	16
4.4 Análise da presença de proteínas amiloide no biofilme .....	17
4.4.1 Ensaio de formação de biofilme em placas de 96 poços .....	17
4.4.2 Detecção de amiloides no biofilme bacteriano por microscopia de fluorescência .....	18
4.5 Identificação de proteínas amiloides por Dot blot .....	18

4.5.1 Obtenção do extrato de biofilme bacteriano .....	18
4.5.2 Identificação de fibras e oligômeros amiloides no extrato do biofilme através de Dot Blot. .....	19
4.6 Análises <i>in silico</i> .....	19
5 RESULTADOS .....	21
5.1 Teste de crescimento em ágar vermelho congo .....	21
5.2 Ensaio de ligação do vermelho congo em células após o crescimento .....	24
5.3 Ensaio de formação de biofilme em placas de 96 poços .....	26
5.4 Microscopia de fluorescência do biofilme .....	27
5.4.1 <i>Cepas controle</i> . .....	27
5.4.2 <i>Fusobacterium nucleatum</i> . .....	30
5.4.3 <i>Prevotella sp.</i> .....	30
5.4.4 <i>Bacteroides sp.</i> .....	32
5.4.5 <i>Phocaeicola vulgatus</i> .....	35
5.4.6 <i>Clostridioides difficile</i> .....	36
5.5 Dot Blot .....	37
5.6 Análises <i>in silico</i> .....	39
5.6.1 <i>Fusobacterium nucleatum</i> .....	39
6 DISCUSSÃO .....	46
7 CONCLUSÃO .....	52
8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	53



## 1 Introdução

### 1.1 Microbioma intestinal

O microbioma humano pode ser definido como um conjunto de microrganismos, e seus genomas, que habitam e interagem com diversos sítios do corpo humano, podendo ser interações de simbiose, comensalismo ou patogênicas (Grice e Segre., 2011). Desde o momento do nascimento a microbiota é adquirida, a partir da colonização dos primeiros microrganismos, que são benéficos na maioria das vezes e auxiliam o desenvolvimento do recém-nascido. Esses organismos são transmitidos para o filho através da mãe, possuindo uma grande variação sobre a sua composição dependendo do tipo de parto (Stinson et al., 2017). Durante o parto normal, as primeiras bactérias que entram em contato e colonizam o bebê são provenientes do canal vaginal da mãe, sendo predominantes durante o início da vida do bebê. Pesquisas mostram que os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, provenientes da microbiota vaginal da mãe, apresentando importantes papéis para o recém-nascido, como maturação do sistema imunológico de mucosa e proteção contra agentes patogênicos (Chong et al., 2018; Chu et al., 2017).

Dentre os diversos sítios colonizados, há diferenças na composição das comunidades microbianas que colonizam esses tecidos. Essa variação ocorre não só na diversidade de espécies, mas também na quantidade total de células. O microbioma intestinal se destaca por ser o mais abundante no corpo humano e por desempenhar uma gama de funções benéficas para seu hospedeiro. Estima-se que o microbioma intestinal humano contém cerca de trilhões de microrganismos ao todo, sendo bactérias anaeróbias predominantes, porém esses ambientes ainda são povoados por fungos, arqueas e vírus, sendo em sua maior parte bacteriófagos (Methé et al., 2012). Essa quantidade varia ao longo de todo trato digestivo. Existem aproximadamente células por grama no duodeno, aumentando para aproximadamente células bacterianas no cólon. O intestino então é habitado por cerca de centenas de espécies bacterianas, pertencentes principalmente a 5 diferentes filos: *Bacillota* (75,9%), *Bacteriodota* (20%), *Actinomycetota* (3%), *Pseudomonadota* (1%) e *Verrucomicrobiota* (0,1%) (Smoliński et al., 2021).

Desde o momento da aquisição dos primeiros microrganismos nesse sítio, a microbiota intestinal participa da manutenção de diversas vias metabólicas, auxiliando principalmente a

degradação de macromoléculas complexas derivadas da dieta do hospedeiro (Zhao et al., 2018). O gênero *Bacteroides* possui espécies amplamente estudadas na sua relação com a degradação de carboidratos complexos, em certas espécies aproximadamente 20% do seu genoma é direcionado para a quebra e para o transporte desses compostos (Schwalm & Grosiman, 2017; Wang et al., 2017). Também há a produção de importantes metabólitos, como a produção de vitamina B12 e folato, produzidas principalmente por Bactérias ácido lácticas e do gênero *Bifidobacterium* (Wong et al., 2018). Com a produção de diversos compostos no ambiente intestinal, as células intestinais se beneficiam dessas moléculas, como os ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs do inglês short chain fatty acid) principalmente propionato, acetato e butirato que atuam na expressão gênica, apoptose, diferenciação, proliferação e quimiotaxia dessas células (Peterson & Artis et al., 2014;).

Embora sejam extensos os benefícios da interação microbiota-hospedeiro, em alguns momentos essa relação pode não ser favorável. Assim, é gerado um desequilíbrio tanto na funcionalidade, como na abundância de espécies desse microbioma que é denominado disbiose (Levy et al., 2017). Esse fenômeno principalmente se associa com a baixa ou perda da integridade da barreira intestinal, o que permitirá a passagem de moléculas exógenas, podendo ser de origem microbiana ou da própria dieta do hospedeiro que em contato com sítios onde não há a tolerância imunológica, podem ser reconhecidas pelo sistema imune e desencadear uma resposta inflamatória. Além disso, com a deterioração da barreira microrganismos daquela comunidade, que se apresentavam na forma benéfica de simbioses, ao atingirem outros sítios podem adquirir um perfil patogênico, conseqüentemente iniciando um processo infeccioso e induzindo uma resposta inflamatória (Bäckhed et al., 2012; Xi et al., 2019).

Diversos fatores podem influenciar no surgimento de um quadro de disbiose, como, a genética do indivíduo, dieta, intervenções médicas, infecções e uso de xenobióticos, se destacando os antimicrobianos. Desta maneira, esses fatores culminam na diminuição da comunidade de microrganismos considerados como benéficos para o hospedeiro, o que resulta na multiplicação de patógenos e na perda de diversidade geral do microbioma (Petersen & Round., 2014; Weiss & Henet., 2017). Um exemplo de disbiose decorrente de alteração de dieta, foi visto no simbiote anaeróbio *Bacteroides thetaiotaomicron*, espécie conhecida pela degradação de fibras dietéticas, que não são digeridas pelo hospedeiro, como sua principal fonte de glicanos. Com a mudança de um dieta rica em fibras, para uma pobre ou sem a presença de fibras, há a alteração da expressão nas enzimas degradadoras de carboidratos, para a degradação e obtenção de glicanos a partir da mucina. Assim, foi observada a perda da

integridade do muco intestinal que consequentemente aumentou a penetração de simbioses e de patógenos invasores, podendo levar a inflamação crônica e colite (Lee et al., 2022).

A disbiose pode resultar no desenvolvimento de uma série de patologias pelo hospedeiro, como, por exemplo, as doenças inflamatórias intestinais. Essas patologias ocorrem devido a uma ativação desregulada do sistema imunológico da mucosa intestinal causada por esse desequilíbrio no microbioma (Podolsky., 2002; Martinez-Guryn et al., 2019). Essas patologias têm como uma das suas principais características o aumento da abundância de anaeróbios facultativos da família Enterobacteriaceae e a diminuição de bactérias produtoras de SCFAs como as pertencentes a ordem *Clostridiales* e as bactérias dos gêneros *Bifidobacterium*, *Ruminococcus* e *Lactobacillus* (Rizzati et al., 2017; Rodiño-Janeiro et al., 2018). Dessa forma, essa comunidade perde diversidade e a quantidade de indivíduos produtores de moléculas anti-inflamatórias, em contrapartida, há um aumento do número de patógenos e moléculas pró-inflamatórias no tecido, o que, dependendo da gravidade, pode gerar estresse, morte celular, perda da função tecidual e desbalanço do sistema fisiológico correspondente que gera a patologia.

Moléculas presentes nas células bacterianas como o lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram negativas podem ser fatores ativadores da resposta imune que se desenvolvem em doenças. Pessoas portadoras da Doença Hepática Gordurosa não Alcoólica (DHGNA) normalmente apresentam quadros de disbiose intestinal (Bousier et al., 2017; Loomba et al., 2018). Observou-se que há aumento na abundância de bactérias dos filos Bacteroidota e Pseudomonadota além de crescimento bacteriano exacerbado no intestino delgado (Aron-Wisnewsky et al., 2020; Villard, Bousier & Andriantsitohaina, 2021). O aumento de LPS proveniente dessa comunidade bacteriana e o aumento da permeabilidade intestinal, que permite a chegada de LPS na circulação sanguínea, foi apontado como um dos fatores ativadores de resposta inflamatória através da indução da via de sinalização via receptor do tipo Toll 4 (TLR4) (Bousier et al., 2017; Rizzati et al., 2017). Além do LPS, outros componentes bacterianos como lipoproteínas, flagelina e DNA são capazes de ativar células do sistema imune inato como os macrófagos, neutrófilos e células dendríticas que produzem citocinas pró inflamatórias como Interleucina 1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) e Interleucina 6 (IL-6). Essas citocinas conseguem alcançar o sistema nervoso e atuar em receptores expressos em neurônios, células da glia e microglia, podendo alterar o estado de ativação da célula (Sampson & Mazmanian, 2016).

Estudos sobre a relação microbiota - hospedeiro revelam que a liberação de produtos bacterianos como moléculas análogas a neurotransmissores, lipopolissacarídeo (LPS) e proteínas com características amiloides podem influenciar na homeostase do Sistema Nervoso Central (SNC). Essa interferência pode acontecer por três vias, através da indução de uma resposta imunológica, atravessando a barreira hematoencefálica, ou por sinalização direta através do nervo vago. Baseado nessas relações, surgiu o termo “eixo cérebro-intestino-microbiota”. Sabe-se que há a liberação, pela microbiota, de uma série de moléculas análogas a neuromoduladores do hospedeiro, além da indução de produção de neurotransmissores como o ácido gama-aminobutírico (GABA), serotonina e acetilcolina (Reigstad et al., 2014). Cerca de 90% da serotonina necessária para desempenhar funções como a modulação do humor, sono e comportamento é produzida no intestino (Rutsch et al., 2020).

### **1.2 Bactérias Anaeróbias como patógenos oportunistas**

As bactérias anaeróbias são microrganismos com pouca ou nenhuma tolerância ao oxigênio. Esses procariotos colonizam diversos tecidos de seus hospedeiros, principalmente mucosas, sendo predominantes na microbiota intestinal e microbiota oral. Sua colonização em mucosas apresenta vantagens, como o impedimento da colonização dos tecidos por patógenos, produção de metabólitos, como vitaminas, que tem diversas funções na fisiologia do hospedeiro, moléculas que auxiliam a maturação do sistema imunológico e contribuem para a tolerância imunológica de mucosas, produção de enzimas que quebram macromoléculas complexas e ajudam a digestão e absorção de nutrientes pelo hospedeiro (Hou *et al.*, 2022; Rizzati *et al.*, 2017; Rodiño-Janeiro *et al.*, 2018). Apesar dessas bactérias contribuírem de forma positiva para saúde do indivíduo, elas também estão associadas a uma série de quadros infecciosos na clínica, desde infecções endógenas, iniciando através dos sítios de mucosas que colonizam, ou exógenas, sendo alguns gêneros bacterianos mais citados em relação ao isolamento de infecções e quadros patológicos.

O gênero *Bacteroides* está associado à diversas patologias em humanos, como bacteremias, infecções abdominais, ginecológicas, infecções necrosantes de tecidos moles e pele, além de algumas espécies terem sido associadas ao desenvolvimento de câncer colorretal. A espécie *Bacteroides fragilis*, pertencente ao gênero, é um importante patógeno intestinal e extraintestinal, sendo um dos anaeróbios mais isolados de infecções endógenas no mundo. Essa característica se dá devido à gama de fatores de virulência que essa espécie pode expressar, sendo os principais adesinas que se ligam a moléculas da matriz extracelular (MEC) e induzindo

a sua degradação através da ativação da via de plasminogênio (Ferreira *et al.*, 2013), produção de cápsula polissacarídica com característica zwitteriônicas que auxilia na evasão imunológica, produção de lipopolissacarídeo (LPS) entre outros (Ho *et al.*, 2017). Essa espécie também é conhecida pela sua alta capacidade de aero tolerância, em relação a outras espécies do gênero, que se deve à presença de uma série de reguladores gênicos e a produção de proteínas associadas à resposta ao estresse oxidativo (Teixeira *et al.*, 2018). Algumas cepas de *B. fragilis* produzem uma toxina (BFT do inglês *Bacteroides Fragilis Toxin*), sendo denominadas *Bacteroides fragilis* Enterotoxigênico (ETBF). Essa toxina é uma metaloprotease dependente de zinco que cliva as junções de E-cadherina das células, diminuindo a integridade do epitélio, além de reorganizar o citoesqueleto de actina das células aumentando a permeabilidade do tecido. Ainda, essa proteína ativa a sinalização nuclear de  $\beta$ -catenina, o que faz dessa espécie uma potente contribuinte para transformações oncogênicas em células intestinais (Pierce & Bernstein, 2016).

As espécies dos gêneros *Porphyromonas* e *Prevotella* normalmente estão associadas a infecções da cavidade oral, infecções orofaciais, pneumonias e infecções ginecológicas. Também sendo associadas a contribuição ou indução de quadros inflamatórios do sistema nervoso, uma vez que seus componentes celulares, como LPS, são encontrados com frequência nesse tecido, visto que muitos desses componentes possuem a capacidade de atravessar várias barreiras biológicas (Beydoun *et al.*, 2020). Espécies de *Prevotella* como *P. melaninogenica*, *P. nigrescens* e *P. intermedia* apresentam um vasto repertório de fatores de virulência, como adesinas a componentes da matriz extracelular, células do hospedeiro e a outras espécies bacterianas. Possuem sistemas de secreção do tipo 6 e 9, responsáveis pela excreção de proteases importantes na invasão de tecidos e evasão imunológica, hemolisinas que degradam eritrócitos e recuperam ferro para o crescimento bacteriano, e exopolissacarídeos que atuam na evasão de fagocitose, produção de LPS, moléculas de quórum sensing que auxiliam a formação e manutenção do biofilme, resistência intrínseca e adquirida aos antimicrobianos através da produção de  $\beta$ -lactamases, bombas de efluxos, alterações ribossomais entre outros (Sharma *et al.*, 2020). As espécies do gênero *Porphyromonas*, como *P. gingivalis* apresentam como fatores de virulências principais: Adesinas a componentes celulares e da MEC como fimbrias, produção de um LPS modificado que auxilia na invasão de tecidos e possui maior imunogenicidade ao ser reconhecido por dois tipos de receptores do tipo *Toll-like* (TLR2 e TLR4), Proteases como a gingipaína, que atua na evasão da resposta imunológica, entre outros fatores (Jia *et al.*, 2019).

As bactérias do gênero *Fusobacterium*, como *Fusobacterium nucleatum*, além de serem associadas também com infecções orofaciais, estão relacionadas a abscessos, bacteremias, processos carcinogênicos e infecções gastrointestinais. A espécie *F. nucleatum* é uma das mais abundantes na cavidade oral, tanto em indivíduos saudáveis, quanto nos acometidos por alguma patologia nessa região. Sendo relacionada a diversas doenças periodontais, como a periodontite crônica, gengivite e periodontite periapical, além de infecções endodônticas como necrose pulpar. Também sendo associada a desordens gastrointestinais (Câncer colorretal, doença inflamatória intestinal e apendicite), infecções de cabeça e pescoço (otites, sinusites, linfadenite cervical), infecções pulmonares, abdominais, ósseas, no cérebro e bacteremias. Para colonizar e causar infecções, essa espécie conta com uma gama de fatores de virulência, sendo esses: Adesinas que ligam a diferentes tipos celulares e componentes da matriz extracelular e proteínas de adesão interespecies que auxiliam na colonização e formação de biofilme bacteriano (Han., 2015). Produção de serino-proteases que degradam a MEC auxiliando na invasão bacteriana nos tecidos do hospedeiro e na evasão do sistema imunológico ao degradar imunoglobulinas e proteínas do sistema complemento (Chen *et al.*, 2022).

Outras espécies de anaeróbios clinicamente importantes, como *Clostridioides difficile*, estão relacionadas a quadros diarreicos associados ao uso de antimicrobianos e colite pseudomembranosa (Moraes *et al.*, 2022). Esta espécie vem sendo considerada uma grave ameaça nos ambientes de assistência à saúde, principalmente devido a sua capacidade de formar esporos que são resistentes a uma série de condições ambientais e substâncias, o que resulta em uma alta dificuldade de eliminar esse patógeno de superfícies (Alves *et al.*, 2017). Ademais, vem sendo estudada a capacidade zoonótica dessa espécie, relacionada principalmente a animais domésticos, o que aumentaria muito o risco de exposição e colonização da população em geral (Leite *et al.*, 2023). Vários fatores de virulência estão relacionados as infecções causadas por *C.difficile*, como a produção de toxinas (A, B e binária) que estão associadas ao rearranjo do citoesqueleto celular, apoptose e morte celular, presença de flagelos que auxiliam na adesão a tecidos, formação de biofilme e internalização celular, sinalização por moléculas de quorum sensing, entre outros (Tijerina-Rodríguez *et al.*, 2019).

As bactérias anaeróbias ao longo de muito tempo vêm se apresentando como ameaças para a saúde humana, porém a investigação sobre anaeróbios dentro da clínica e pesquisa ainda é baixa, embora haja diversas justificativas que demonstram a importância de se pesquisar e entender mais desse grupo de bactérias. Como o fato de que diversos patógenos anaeróbios estão associados a infecções polimicrobianas, algumas espécies como *C. difficile*, estão associadas à doenças graves e potencialmente fatais. Apesar da gravidade de doenças causadas

por bactérias anaeróbias, o isolamento desses microrganismos durante a pesquisa microbiológica da clínica é negligenciado, por tanto não se sabe a verdadeira situação epidemiológica dessas bactérias no Brasil e no mundo. Com a falta de pesquisa clínica, na maioria das vezes os tratamentos antimicrobianos em pacientes são empíricos e não conseguem assegurar a eliminação desses patógenos. Além da eficácia comprometida do tratamento, essa abordagem está diretamente relacionada ao aumento da resistência aos antimicrobianos por anaeróbios que vem crescendo a cada ano, o que as torna ameaças cada vez mais graves para a saúde.

### **1.3 Biofilmes bacterianos e a resistência aos antimicrobianos**

Um evento preocupante para a saúde mundial, que vem se tornando cada vez mais comum, é a resistência a antimicrobianos. Ao passo que o ritmo da pesquisa por novas drogas e alvos terapêuticos para infecções bacterianas vem crescendo de forma lenta, a resistência a antimicrobianos tem crescido de forma rápida. Bactérias possuem a capacidade de formar estruturas complexas, denominadas biofilmes bacterianos, constituídas por células bacterianas, envoltas por uma matriz polimérica extracelular composta por lipídeos, polissacarídeos, proteínas e DNA. Essa estrutura de comunidade confere aos microrganismos ali inseridos proteção contra uma série de fatores ambientais como estresses mecânicos, químicos e biológicos, como bacteriófagos, além de possibilitarem um ambiente de troca genética e de nutrientes para aquela comunidade microbiana (Flemming & Wingender., 2010).

Na construção do biofilme ocorre a formação de multicamadas que oferecem uma maior proteção às células. Essas camadas formadas pela matriz e outros componentes embebidos nela conferem resistência a diversos tipos de estresse que o ambiente possa proporcionar, como, diminuindo a quantidade de moléculas tóxicas, como antimicrobianos que penetram ao longo da matriz, promovendo também uma limitação na disponibilidade de nutrientes, o que na maioria das vezes leva a diminuição do metabolismo das células presentes nas camadas mais profundas, as tornando menos responsivas a essas moléculas até mesmo em altas concentrações. Em conjunto, esses fatores levam à menor ação dos antimicrobianos sobre essas bactérias. Além disso, metabólitos secretados no biofilme, como enzimas, podem degradar as moléculas de antimicrobianos ou alterar sua estrutura, inativando-os (Hall & Mah., 2017). Outra função do biofilme, no contexto da resistência a antimicrobianos, é atuar como o reservatório de genes de resistência. Dessa forma, os microrganismos presentes nessa comunidade, através de métodos de transferência horizontal, apresentam uma troca ativa desses genes. Sendo assim, microrganismos que não possuem genes de resistência, muitas

vezes entram no biofilme, adquirem esses genes e são dispersados com um novo perfil gênico, podendo apresentar um ou mais mecanismos que conferem resistência para uma ou mais classes de antimicrobianos. Assim, mesmo com a eliminação de maior parte do biofilme, as células persistentes conseguem repopular essa estrutura (Zhang, 2014).

#### **1.4 Amiloides Funcionais Bacterianos**

De forma generalizada, o termo “amiloide” indica agregados insolúveis, com predominância de folhas  $\beta$ -pregueadas, que possuem uma orientação perpendicular ao eixo fibrilar. Esses agregados de morfologia fibrilar, composto pelas proteínas amiloides, apresentam uma alta insolubilidade em soluções fisiológicas, além de uma resistência alta à proteólise física, química e enzimática. A alta estabilidade das fibras está relacionada as ligações de ponte de hidrogênio entre as folhas  $\beta$ -pregueadas adjacentes. A cinética de fibrilação de amiloides é iniciada por auto agregação, normalmente induzida por nucleadores, de monômeros em dímeros, oligômeros e posteriormente protofilamentos, que se agregam lateralmente para formar as fibras amiloides maduras. Esse processo acontece principalmente em decorrência da alta presença de aminoácidos aromáticos, que possuem natureza hidrofóbica, e compõe a estrutura de proteínas de caráter amiloide. As proteínas e fibras amiloides ainda apresentam a capacidade de ligar diversos corantes específicos como Vermelho Congo, Tioflavinas T e S, Tiofenos e alguns derivados de curcumina que quando observados em microscopia de fluorescência apresentam diferenças entre os espectros de excitação/emissão dos corantes, o que difere os amiloides de proteínas não amiloides (Schwartz, Kelly & Boles., 2013).

Proteínas amiloides são conhecidas pelo seu papel na patogênese de uma série de distúrbios em mamíferos, que tem como principal causa o mal enovelamento dessas proteínas, resultando na formação de oligômeros - que já desempenham uma série de alterações na fisiologia celular e tecidual – e posteriormente na formação de fibrilas e agregados fibrilares que se depositam nos tecidos, alterando a homeostase fisiológica desse sistema. Nos tecidos esse agregados estão associados principalmente com a citotoxicidade e danos teciduais que geram o quadro patológico (Van gerven *et al.*, 2018). Como é o caso da doença de Parkinson (PD), onde há a acumulação de agregados amiloides da proteína neuronal  $\alpha$ -sinucleína em regiões específicas do cérebro, que levam a inflamação e morte celular de neurônios dopaminérgicos resultando em danos motores (Poewe *et al.*, 2017). Entretanto, já se sabe que o processo de mau enovelamento das proteínas humanas não é o único responsável pela formação e deposição das fibras amiloides. Foi visto que microrganismos podem produzir



estruturas proteicas fibrilares que em seu estado funcional podem estar relacionadas com esse processo de deposição. Isso se deve a identidade estrutural dessas proteínas de microrganismos com os amiloides humanos, que podem induzir a cascata de agregação das fibras amiloides humanas (Miller *et al.*, 2021; Sampson *et al.*, 2020).

A definição de amiloides funcionais foi dada para aquelas proteínas amiloides que possuem seu processo de formação e degradação bem regulados, assim tendo uma função para o organismo que as produz (Otzen, 2010). Amiloides bacterianos funcionais já foram identificados em espécies dos principais filos: Bacillota, Pseudomonadota, Actinomycetota e Bacteriodota. Essas proteínas participam de diferentes processos celulares das células bacterianas como, formação de biofilme e adesão (Dueholm *et al.*, 2010); controle de replicação plasmidial (Molina-García *et al.*, 2016); divisão celular (Claessen *et al.*, 2003); citotoxicidade (Hetz *et al.*, 2002) e na virulência bacteriana (Oh *et al.*, 2007). Também se sabe que proteínas amiloides podem estar envolvidas na resistência bacteriana a antimicrobianos. Cepas de *Escherichia coli* produtoras da fímbria curli, em biofilme, apresentam uma maior dificuldade de eliminação pelos antimicrobianos, consequentemente maior dificuldade de tratamento de suas infecções (Karigoudar *et al.*, 2019).

### 1.5 Amiloides funcionais bacterianos no biofilme

Na sua forma fibrilar, as proteínas amiloides, compõem principalmente o arcabouço desse biofilme, atuando na sua integridade estrutural e conferindo maior elasticidade e consistência. Os amiloides funcionais bacterianos, encontrados nos biofilmes podem ser classificados em duas formas: Amiloides intrínsecos, onde a conformação amiloide representa o estado estrutural e funcional nativo da proteína e amiloides facultativos onde as proteínas têm seu estado nativo em uma forma globular solúvel e em determinadas condições alteram sua conformação para a amiloide. São exemplos de amiloides intrínsecos as proteínas curli de enterobactérias, Fap de *Pseudomonas* spp. e a proteína MTB de *Mycobacterium tuberculosis*. Já exemplos de amiloides facultativos são as modulinas solúveis em fenol (PSMs) de *Staphylococcus aureus* e a proteína TasA produzida por *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus*.

O primeiro amiloide funcional bacteriano descrito foi a fímbria curli em *E. coli*, no ano de 2002, (Chapman *et al.*, 2002). O curli se mostrou essencial para a formação do biofilme bacteriano em diferentes superfícies, como células de planta (Jeter & Maththysse., 2005), aço inoxidável (Ryu & Beuchat., 2005), vidro e plástico (Dueholm *et al.*, 2010) e para a resistência a antimicrobianos. A biogênese dessa proteína se dá através de dois operons *csgBAC* e o *csgDEFG*, onde o primeiro codifica CsgA que é a maior subunidade da proteína e sendo seu

principal amiloide, a porção que formará as fibrilas, CsgB que é uma menor subunidade do curli e um amiloide secundário que possui função nucleadora. Também codifica a proteína CsgC, uma chaperona, que mantém as proteínas fora de seu estado amiloide até que sejam exportadas da célula, evitando estresse celular e citotoxicidade para a bactéria. O segundo operon, possui função reguladora e transportadora. Para que CsgA e CsgB cheguem ao meio extracelular, a proteína CsgG forma poros na membrana externa. Associada a essa proteína, estão CsgE e CsgF que auxiliam a saída das proteínas e posterior agregação da fibra. Além disso, CsgF interage com CsgB garantindo a fixação da subunidade na superfície celular e início da formação fibrilar. CsgD age como regulador positivo, a nível transcricional da expressão do operon *csgBAC* (Barnhart & Chapman., 2010).

No gênero *Pseudomonas* a proteína amiloide mais bem caracterizada é a proteína Fap. Essa proteína tem sua montagem coordenada por componentes de apenas um único operon *fapA-F*, diferentemente do curli que possui dois. Diversas espécies desse gênero expressam a proteína Fap, como a espécie patogênica *Pseudomonas aeruginosa*. Nem todas as espécies patogênicas expressam a proteína, porém as que expressam demonstram um caráter potencializador da virulência de Fap. A proteína FapC é a principal amiloide presente nas fibrilas e FapB a segunda mais presente, sendo secretadas de forma similar ao curli, tendo sua montagem na superfície celular (Dueholm, Otzen & Nielsen., 2013).

As PSMs de *S. aureus* se apresentam como uma importante parte da arquitetura do biofilme dessa bactéria. As PSMs estão relacionadas com diversas funções patogênicas. Esses pequenos peptídeos anfipáticos são codificados por genes que estão localizados nos operons *psmA*, *psm $\beta$*  e no *RNAIII* (Peschel & Otto., 2013). Cepas não produtoras das modulinas  $\alpha/\beta$  apresentaram a formação do seu biofilme prejudicada, o que indica que as PSMs são necessárias para manter a estrutura do biofilme bacteriano da espécie. Além disso, na forma monomérica, ou seja, não fibrilar, as modulinas apresentam uma capacidade pró-inflamatória recrutando, ativando e lisando os neutrófilos. As PSMs são armazenadas no biofilme séssil como fibras inertes até que haja condições favoráveis à sua dissociação, promovendo a desmontagem e aumentando a virulência desse biofilme (Schwartz et al., 2012; Cheung et al., 2014). Na sua forma fibrilar, fortificam o biofilme que é capaz de resistir a estresses tanto químicos quanto mecânicos (Bi & Daggett., 2018). Por fim, foi visto que o aumento da expressão de  $\alpha$ PSMs aumentou a virulência de *Staphylococcus* resistente a meticilina (MRSA) (Wang et al., 2007).

No contexto de biofilme, os amiloides funcionais bacterianos, tanto intrínsecos como extrínsecos, aparentam exercer diferentes funções, porém a adesão e conservação de estrutura

são as mais observadas. Cepas de *P. aeruginosa* com superexpressão de Fap apresentaram um biofilme mais hidrofóbico e espesso, além de apresentar fenótipo mais agregativo e biofilmes mais resistentes em comparação às cepas selvagens (Zeng et al., 2015). Apesar das proteínas amiloides apresentarem um campo de estudo crescente, os estudos em desenvolvimento ou que foram desenvolvidos, focam em microrganismos de metabolismo não anaeróbico. Sabendo que bactérias anaeróbias estritas são a maioria na microbiota intestinal e estão presentes em outros sítios como a boca, estando envolvidas com diversos quadros clínicos, se faz necessário entender a função dessas proteínas também nessa população bacteriana, além de compreender o papel delas na patogênese desses microrganismos a fim de selecionar novos alvos terapêuticos.

Entendendo que as proteínas amiloides têm grande responsabilidade em conferir a resistência da estrutura do biofilme, essas proteínas se apresentam como bons alvos para novos alvos terapêuticos, como antimicrobianos, substâncias anti biofilme, entre outras. Atualmente, existem estudos que propõem o uso de novas substâncias, ou o uso combinado de antimicrobianos já em uso para inibir a formação de fibras amiloides, o que levaria à formação de biofilmes defeituosos ou à prevenção da formação deles. Um exemplo é a epigallocatequina galato (EGCG), essa molécula é um polifenol encontrado no chá-verde que possui a capacidade de inibir a expressão da proteína curli, de *E. coli*, a nível transcricional, além de impedir a sua fibrilação no meio extracelular e a formação de seu biofilme. Essa molécula também demonstrou capacidade de inibir as fibras amiloides humanas, tendo atividade contra o  $\alpha$ -sinucleína e o peptídeo  $\beta$ -amilóide-42 (Feter et al., 2016).

### **1.6 Amiloides funcionais bacterianos no contexto da neurodegeneração**

Um dos grandes desafios para a medicina e ciência modernas são as patologias neurodegenerativas. Inúmeras são as doenças que afetam a saúde neuronal. As mais conhecidas são a Doença de Parkinson (DP), Doença de Alzheimer (DA), Doença de corpos de Lewis (LBD), atrofia múltipla sistêmica (MSA) e a atrofia lateral amiotrófica (ELA). A rápida progressão e a perda de cognição do paciente são fatores em comum dentre essas patologias. É comum também a presença do mau enovelamento, agregação e deposição de certas proteínas no cérebro dos indivíduos afetados. Essas proteínas mal enoveladas formam agregados amiloides no cérebro que estão relacionados a um processo inflamatório local e morte celular, com posterior dano e perda de função tecidual (Walker, Schelle & Jucker, 2016).

Os amiloides funcionais bacterianos possuem sua estrutura primária, ou seja, a sua sequência de aminoácidos diferentes dos amiloides de mamíferos como,  $\alpha$ -sinucleína e o peptídeo A $\beta$ -42, entretanto, quando enovelados, em sua estrutura quaternária apresentam similaridade tridimensional com os amiloides humanos. Dessa forma, podendo funcionar como nucleadores, induzindo a cascata de agregação e formação das fibras amiloides humanas.

A microbiota é capaz de produzir uma série de moléculas neuromodulatórias como o GABA, serotonina e acetilcolina que são conhecidos neurotransmissores humanos. Diversos produtos liberados pela microbiota, sistema endócrino e imunológicos em resposta a alguma fonte de estresse podem prejudicar a integridade da mucosa intestinal e a barreira hematoencefálica o que as torna mais permissivas a citocinas e moléculas neuromodulatórias (Pokusaeva et al., 2017). A exposição a amiloides bacterianos promove a produção e agregação de  $\alpha$ -sinucleína tanto no intestino quanto no cérebro de animais, como já foi mostrado. Em *Caenorhabditis elegans* transgênico, que apresenta expressão de  $\alpha$ -sinucleína humana, foi demonstrada que a exposição a *E. coli* produtoras de curli induziu uma maior agregação de  $\alpha$ -sinucleína no tecido muscular, aumento que não foi observado quando o modelo foi exposto a cepas não produtoras da proteína curli. Além disso, amiloides não-ortólogos podem apresentar deposição cruzada devido às suas semelhanças estruturais e físico-químicas. Foi demonstrado que a proteína curli de *E. coli* pode aumentar a agregação de  $\alpha$ -sinucleína, consequentemente induzindo danos motores em camundongos que super expressavam a proteína humana (Sampson et al., 2020).

A capacidade de produção de proteínas amiloides pelo microbioma é possível. Agrupamento cruzado de amiloides não-ortólogos nos tecidos do hospedeiro traz a necessidade de investigação da capacidade dessas proteínas, amiloides bacterianos, serem agravantes da neurodegeneração, tendo em vista que componentes bacterianos têm a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica. Sabe-se também que os amiloides são capazes de induzir uma resposta inflamatória local no tecido cerebral, o que por si só já apresenta um problema para a saúde do hospedeiro.

## 2 Justificativa

Trabalhos recentes indicam que amiloides bacterianos tem um papel importante na virulência e persistência bacteriana em infecções humanas. Também é especulado que esses amiloides possam desempenhar funções na patogênese de doenças neurodegenerativas, porém não há descrito na literatura a presença de amiloides funcionais em anaeróbios estritos da microbiota humana. Investigar a produção de proteínas amiloides por bactérias, principalmente representantes da microbiota humana, pode ser importante para correlacionar as doenças neurodegenerativas e disbiose, o que consequentemente, promove uma maior e importante elucidação sobre a patogenia desses tipos de doenças. Na literatura, membros do gênero *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Prevotella* e *Porphyromonas* foram apontados como possíveis relações no desenvolvimento de neuropatologias degenerativas e disbiose intestinal, pois seus componentes celulares já foram encontrados no cérebro de pacientes acometidos pela Doença de Alzheimer. Por fim, o desenvolvimento dessa linha de pesquisa, assim como as metodologias propostas, permitirá uma maior compreensão das relações microbioma – hospedeiro. Além disso a implantação e desenvolvimento de linhas de pesquisa sobre a microbiota intestinal associada à doença e à saúde poderá ser decisiva para a realização de abordagens multidisciplinares, inseridas no contexto da saúde humana e da busca de novos alvos terapêuticos no tratamento dessas neuropatologias, visto que outras bactérias anaeróbias podem vir a ser estudadas pelas mesmas técnicas que serão validadas nesse projeto.

### 3 Objetivo

O objetivo deste estudo é utilizar uma abordagem que faz integração de metodologias *in silico*, fenotípicas e moleculares para determinar se espécies de bactérias anaeróbias estritas presentes na microbiota intestinal são produtoras de proteínas de caráter amiloide e se tais proteínas são componentes de seus biofilmes.

Para atender ao objetivo as seguintes etapas são propostas:

- I. Identificar cepas produtoras de amiloides através do cultivo em ágar com vermelho congo;
- II. Identificar a presença da produção de amiloides através de ensaio de precipitação com vermelho congo;
- III. Detectar a presença de proteínas amiloides no biofilme das cepas em placas de 96 poços;
- IV. Detectar a produção de proteínas amiloides no biofilme de bactérias selecionadas por microscopia de fluorescência;
- V. Detectar a presença de fibras e oligômeros no biofilme das cepas estudadas através do uso de anticorpos anti-fibra amiloide e anti-oligômero amiloide;
- VI. Identificar possíveis proteínas de caráter amiloide através da *análise in silico* do proteoma das cepas estudadas;

## 4 Metodologia

### 4.1 Cepas bacterianas e Condições de cultivo

As seguintes cepas foram utilizadas no estudo (Tabela 1). Estas amostras fazem parte da coleção de culturas do Laboratório de Biologia de Anaeróbios do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IMPG/UFRJ). As amostras encontravam-se congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  e seu cultivo foi realizado primariamente em Ágar sangue suplementado (ASS) com 5 % de sangue de carneiro desfibrinado, menadiona ( $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ ) e hemina ( $0,5\text{ mg/mL}$ ). Após o crescimento, as amostras foram cultivadas em caldo BHI pré reduzido e esterilizado anaerobicamente (BHI-PRAS) suplementado com menadiona ( $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ ) e hemina ( $0,5\text{ mg/mL}$ ) sob o fluxo de  $\text{CO}_2$ . Todas as Incubações foram realizadas em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  por 72 horas, em atmosfera anaeróbica (80% de  $\text{N}_2$  ; 10% de  $\text{H}_2$  ; 10% de  $\text{CO}_2$ -).

Tabela 1 - Cepas utilizadas no estudo

Amostras	Espécie	Origem	Amiloides bacterianos
ATCC 25285	<i>Bacteroides fragilis</i>	Abscesso	?
ATCC 43859	<i>Bacteroides fragilis</i>	Diarréia infantil	?
638R	<i>Bacteroides fragilis</i>	Bacteremia	?
ATCC 29741	<i>Bacteroides tethaiotaomicron</i>	Espécime clinica	?
R20291 /NAP-1	<i>Clostridioides difficile</i>	Origem humana	?
ATCC 25586	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Lesão cervico-facial	?
ATCC 8482	<i>Phocaeicola vulgatus</i>	Perfuração de apêndice	?
ATCC 49046	<i>Prevotella Intermedia</i>	Bolsa periodontal	?
ATCC 25845	<i>Prevotella melaninogênica</i>	Escarro	?
ATCC 33563	<i>Prevotella nigrescens</i>	Gengivite	?
PAO1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	*	FapC
ATCC 35984	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Sepse por cateter	Aap
MC4100 $\Delta\text{CsgA}$	<i>Escheirichia coli</i>	Mutante da MC4100	Não produz
MC4100	<i>Escheirichia coli</i>	*	Curli

? - Não há produção conhecida; \* Não consta no bando de dados

## 4.2 Análise de produção de proteínas amiloides em ágar com vermelho congo

Para analisar a produção de proteínas de caráter amiloide e a capacidade de seus agregados de se ligar ao corante vermelho congo. As cepas estudadas foram cultivadas em Meio de cultura contendo o corante vermelho congo (“CR” do inglês Congo Red), como descrito por Reichhardt e colaboradores (2015) com modificações para o cultivo de anaeróbios. As cepas foram previamente cultivadas em caldo BHI PRAS a 37°C por 72h, após o cultivo serão inoculadas, com auxílio de alça bacteriológica, em ágar Brucella, suplementado com menadiona (10 µg/mL), hemina (0,5 mg/mL), com vermelho congo (100 µg/ml). Após o processo de autoclavação o meio de cultura foi resfriado até uma temperatura de 55°C e então foi adicionada uma solução de vermelho do congo (1 mg/mL), para uma concentração final de 100µg/ml no meio de cultura. Após a adição do corante ao meio de cultura foi vertido em placas de petri e estocado em geladeira a até ser utilizado para o cultivo bacteriano. As placas então foram incubadas em anaerobiose, a 37°C por 72 h . O crescimento será analisado com auxílio de uma Lupa, para observação das colônias. As cepas produtoras de proteínas amiloides apresentam seu crescimento na cor vermelha e podem apresentar perda da cor do meio de cultura devido a ligação das proteínas ao corante.

## 4.3 Ensaio de depleção do vermelho congo com células

O protocolo foi realizado conforme descrito por Reichhardt e colaboradores (2015), As amostras de bactérias anaeróbias e as cepas controle PAO1 e ATCC 35984 foram cultivadas em ASS a 37°C por 72h e 24h. As cepas de *E. coli* MC4100 e sua mutante foram cultivadas em Ágar Yesca a 28°C por 48h. Foram coletados os crescimentos das cepas com auxílio de uma alça bacteriológica, e preparado uma suspensão com OD 1,0 (600 nm) em PBS gelado. Com as suspensões prontas, foi adicionado o corante vermelho congo para uma concentração final de 10 µg/mL, a partir de uma solução estoque filtrada de 1 mg/mL. As células foram incubadas com o corante por 10 minutos em temperatura ambiente em agitação. Após o período de incubação as células foram levadas a centrifugação a 10.000 g por 5 minutos. Com o material celular depositado foi realizada uma análise visual da sua coloração, em comparação com a cepa controle negativo MC4100 ΔCsg. Foi coletado e despejado 100µl do sobrenadante de cada amostra em placas de 96 poços a absorbância dos sobrenadantes foi lida a 500 nm através do espectrofotômetro Spectramax I3 (Molecular Devices).



#### 4.4 Análise da presença de proteínas amiloides no biofilme bacteriano

##### 4.4.1 Ensaio de formação de Biofilme em placas de 96 poços

O ensaio de formação de biofilme foi realizado no intuito de observar se as proteínas amiloides seriam componentes da matriz extracelular do biofilme das espécies bacterianas estudadas. Após crescimento em placas de ASS como descrito no item 4.1, as amostras foram novamente inoculadas em placas de ágar sangue de carneiro desfibrinado suplementadas com menadiona (10 µg/mL) e hemina (0,5 mg/mL). As placas então foram incubadas em anaerobiose, a 37°C por 72h. Em seguida, as amostras foram recuperadas com auxílio de alça inoculadora estéril e suspensas em 4 mL de tampão PBS 1x. O inóculo foi ajustado conforme escala de McFarland 1 ( $3 \times 10^8$  UFC/mL). A partir do inóculo ajustado, 20 µL das amostras é adicionado em placa de 96 poços de poliestireno junto com 180 µL de BHI caldo com glicose 1% (p/v). A placa então foi incubada a 37°C, em anaerobiose por 72h. Após a incubação, o biofilme foi lavado 3 vezes com tampão PBS e incubado a 60 °C por 1 hora. Em seguida foram realizadas as devidas colorações, Na coloração com o corante Vermelho do Congo, em cada poço da microplaca foram adicionados 150 µL do corante a 10 µg/mL, A placa será incubada por 15 min e lavada três vezes com PBS 1x (Tursi *et al.*,2020). Para a coloração com ThT, 150 µL do corante a 10 µM foram adicionados a cada poço. A placa foi incubada por 15 min, ao abrigo de luz (Gallo *et al.*, 2015). Após a coloração, a placa foi lavada três vezes com PBS 1x, para retirar o excesso de corante, e então foi realizada a solubilização dos corantes ligados ao biofilme e leitura da fluorescência. Para solubilização dos corantes foram adicionados 200 µL de solução descorante (Metanol 33%). A leitura do experimento foi realizada por fluorescência através do espectrofotômetro Spectramax I3 (Molecular Devices). A placa corada por ThT foi submetida a leitura com emissão a 500 nm e excitação a 450nm. Já a placa corada pelo Vermelho do congo, a uma emissão de 610 nm e excitação de 561 nm (Tursi *et al.*,2020).

Como a metodologia busca marcar os amiloides presentes no biofilme com os corantes específicos, para formação de biofilme dos controles foi utilizada a mesma metodologia, porém com meios de cultura e características de incubação diferentes para a melhor produção de biofilme ou expressão da proteínas desejada nas respectivas espécies. Sendo, assim a formação de biofilme das cepas de *E.coli*, MC4100 produtora de curli e MC 41000 não produtora de curli, foi realizada em meio Yesca (10g/L casaminoácidos; 1g/L de extrato de levedura; pH 7,2) por 48h a 28°C para maior produção de curli. Já para formação de biofilme da cepa PAO1 de *Pseudomonas aeruginosa*, foi realizado em meio Luria Bertani (LB), durante 24h a 37°C. Para

a formação do biofilme de *S.epidermidis*, foi utilizado meio TSB suplementado com 1% de glicose, a incubação foi realizada por 24h a 37°C.

#### **4.4.2 Detecção de amiloides no biofilme bacteriano por microscopia de fluorescência**

Para análise da presença de amiloides no biofilme bacteriano por microscopia de fluorescência, foi realizada a formação do biofilme em placas de poliestireno de 24 poços. O ensaio foi realizado conforme descrito no item 4.3.1, com modificações. Nos poços das placas foram adicionados 900 µL de BHI-PRAS com glicose 1%(p/v) e suplementado com menadiona (10 µg/mL) e hemina (0,5 mg/mL), junto com 100 µL do inóculo bacteriano ajustado conforme o item 4.3.1. A placa foi incubada a 37°C numa atmosfera de anaerobiose por 72h. Após a formação do biofilme, os poços foram lavados gentilmente duas vezes com PBS 1x e fixada por 1h a 60°C em estufa. Para coloração foram utilizados soluções de CR e ThT a 20µM, os poços foram corados com 500µL de CR e incubados por 15 minutos, depois da incubação foram lavados gentilmente duas vezes com PBS 1x. A mesma técnica foi aplicada para coloração com ThT. Após as colorações, a placa foi incubada a 37°C para secagem dos poços. Os biofilmes foram analisados por microscopia de fluorescência no microscópio EVOS M5000 Imaging System (Thermo Fischer Scientific), através das objetivas de 10x e 20x, com os filtros de fluorescência RFP (Ex: 530 nm/Em: 593 nm) e GFP (Ex: 470 nm/Em: 525 nm), para o vermelho congo e Thioflavina T respectivamente.

### **4.5 Confirmação da presença de proteínas amiloides por Dot blot**

#### **4.5.1 Obtenção do extrato do biofilme bacteriano**

O ensaio foi realizado com base no protocolo descrito por Zhou e colaboradores (2013) com modificações. O biofilme foi formado em uma placa de 24 poços de poliestireno, conforme descrito no item 4.3.2. Os poços contendo biofilme, foram lavadas duas vezes com  $H_2O$  MiliQ, a biomassa restantes foi suspensa em 500 µL de tampão KPI (Tampão fosfato de potássio 50mM, pH 7.2; feito 28.9 mM  $KH_2PO_4$  e 21.1 mM  $K_2HPO_4$  em  $H_2O$ ). A suspensão foi coletada em microtubos e centrifugada a 16.000 G x 5 min. O sobrenadante foi removido e o material depositado foi suspenso novamente em Tampão KPI e levados para tratamento com ultrassom em sonicador de banho por 30 min, para quebra da matriz do biofilme. Após o sonicador, a amostra foi dividida em 2 grupos, levados para centrifugação a 16.000 G x 5 min. O primeiro grupo foi suspenso diretamente em  $H_2O$  MiliQ, já o segundo grupo foi suspenso em 100 de

uma solução de ácido fórmico 90 %. O grupo tratado com ácido foi levado para secagem em rotaevaporador por 30 min a 45°C e ressuspensos em  $H_2O$  MilliQ.

#### **4.5.2 Detecção de fibras e oligômeros amiloides no extrato do biofilme através de Dot Blot.**

Para a identificação de possíveis amiloides no extrato do biofilme das cepas estudadas, foi realizado um Dot blot utilizando anticorpos anti-fibra amiloide (Anti-Amyloid Fibrils OC Antibody; AB2286; Merck Millipore). e anticorpos anti-oligômeros amiloides (Oligomer A11 Polyclonal Antibody; AHB0052; Invitrogen). Foram feitas as marcações em duas membranas de nitrocelulose, sendo uma para identificação de oligômeros e outra para a identificação de fibras, onde foram adicionados 10 µL de cada amostra. Após a secagem das amostras, na membrana, em temperatura ambiente, foi realizado o bloqueio das membranas adicionando 10 ml de Intercept (TBS) Blocking Buffer (LI-COR biosciences), e incubando por 1h sob agitação. Em seguida foram realizadas duas lavagens de 5 minutos com tampão PBS 1x, seguido da adição dos anticorpos primários à membrana em uma proporção de 1:5000. Foi realizada a incubação dos anticorpos primários durante a noite na geladeira. Logo após o período de incubação, o tampão com anticorpos primários foi retirado e as membranas foram lavadas três vezes por 5 min com PBS 1x e foram adicionados os anticorpos secundários IRDye® 800CW Goat Anti-Rabbit IgG (LI-COR biosciences), as membranas foram incubadas durante 1h em homogenizador, em local protegido da luz. Depois da incubação, foram realizadas mais 3 lavagens de 5 min com tampão PBS 1x. A leitura do resultado foi feita através da fluorescência a 795nm no Leitor ODYSSEY® DLx (LI-COR biosciences).

#### **4.6 Análise *in silico***

A fim de analisar todas as proteínas com possível caráter amiloidogênico, codificadas nos genomas das amostras que serão utilizadas, será realizada uma análise *in silico* em diferentes softwares e servidores. Para tanto, inicialmente será realizada uma busca no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) pertencente ao National Center for Biotechnology Information (NCBI) das sequências FASTA de todas as proteínas das cepas utilizadas. Após esse processo foi utilizado o servidor Pasta 2.0 (<http://protein.bio.unipd.it/pasta2/help.html>). Este analisa a sequência de aminoácidos da estrutura primária das proteínas, prevendo quais partes deste peptídeo tem propensão à

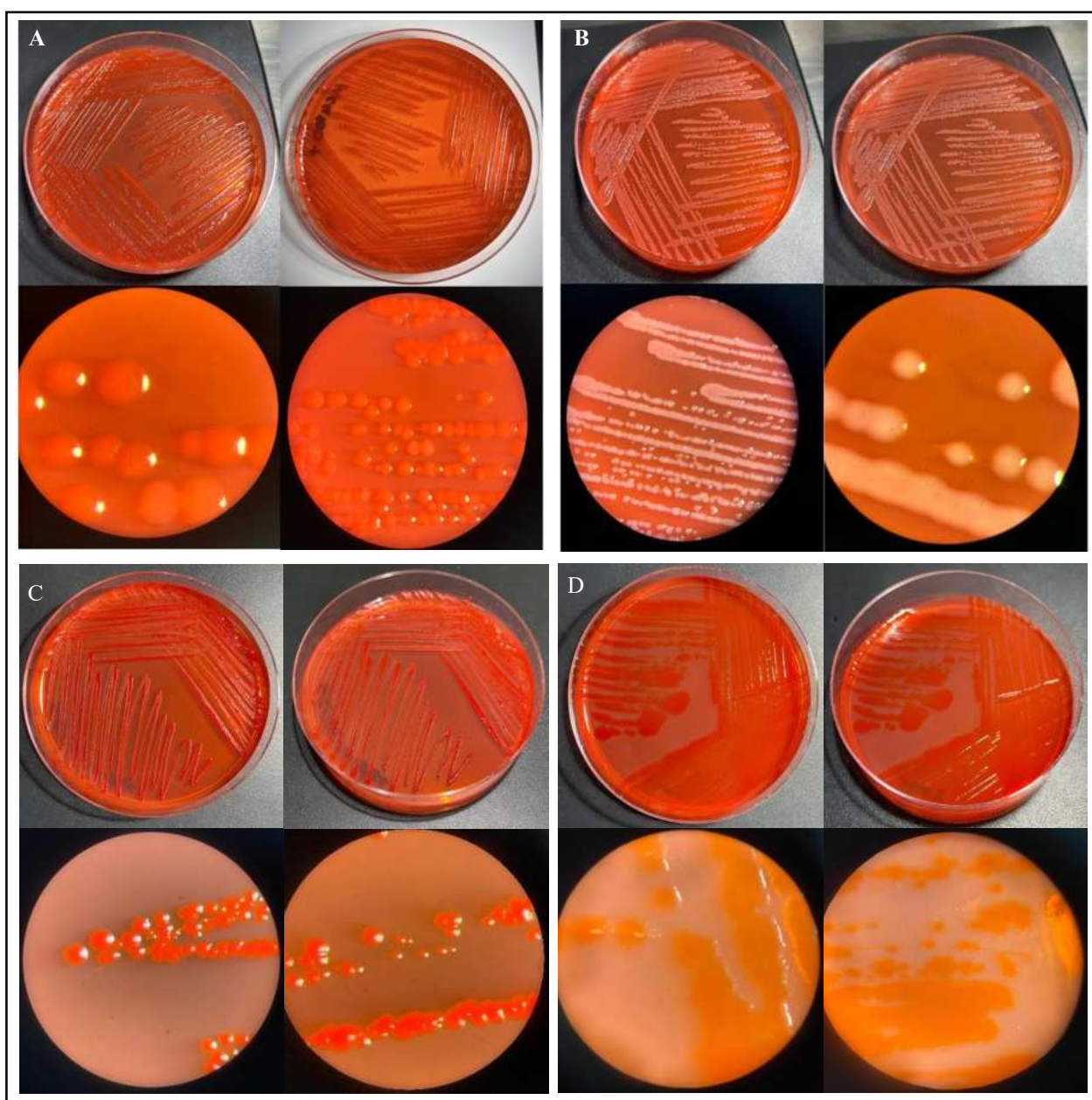
formação de fímbrias amiloides (Walsh et al., 2014). Os resultados gerados no Pasta 2.0 serão adicionados no servidor Cello (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>). Este sistema prediz a localização da referida proteína na célula (Yu, Lin, & Hwang, 2004). Sendo assim, serão selecionadas as proteínas que se localizam no periplasma, na membrana externa e as extracelulares. Posteriormente, esse resultado será analisado pelo servidor Tango (<http://tango.crg.es/protected/correctlogin.jsp>) que prevê a agregação  $\beta$ -cruzada,  $\alpha$ -hélice (Fernandez-Escamilla et al., 2004; Linding et al., 2004; Rousseau, Schymkowitz & Serrano, 2006). Paralelamente, o resultado desta análise também será analisado pelo servidor da Universidade de Cambridge o Vendruscolo Lab - Software, este fornece o cálculo do perfil de solubilidade, visto que os aminoácidos com maiores propensões a formação de amiloides são mais insolúveis. Em seguida, as sequências proteicas serão analisadas em bancos de dados de proteínas: NCBI, UniProt, SwissProt para pesquisa da predição de suas funções (Sormani, Aprile, & Vendruscolo, 2015). Para todas as análises serão utilizadas as sequências de proteínas

Para análise nos softwares de predição de características amiloides, foi estabelecida um cut-off de valores para seleção dos resultados (Tabela 2). Esse valor foi escolhido com base na análise dos resultados de amiloides humanos e bacterianos já caracterizados. Foram utilizados como controle as proteínas: amiloide humano A $\beta$ -42 e a Proteína Curli de *E. coli*. Para o software PASTA 2.0 foi utilizado como cut-off o valor 20 da característica “#Amyloid” que indica o número de regiões de fibras amiloides previstas pelo software, Ambas as proteínas controles tiveram um #Amyloid = 20. No software Tango, Foi utilizado o valor de 100.000 como *cut-off* para seleção dos resultados. As proteínas controles apresentaram os respectivos valores : amiloide humano A $\beta$ -42 (159.846), Proteína Curli de *E. coli* (799.262), Na análise das proteínas pelo software CamSol (Vendruscolo Laboratory), foi considerado que proteínas amiloides são reconhecidas por sua característica extremamente insolúveis e hidrofóbicas. Neste cenário, proteínas que apresentaram valores até 0.9 foram consideradas, tendo em vista que o método utilizado pelo software considera proteínas com valores iguais ou acima de 1 solúveis. Por outro lado, aquelas mais próximas de -1 ou menores do que esse valor são consideradas mais insolúveis. Os valores apresentados pelo amiloide humano A $\beta$ -42 e a proteína curli de *E. coli* foram respectivamente 0.303015 e 0.863488.

## 5 Resultados

### 5.1 Teste de crescimento em ágar vermelho congo

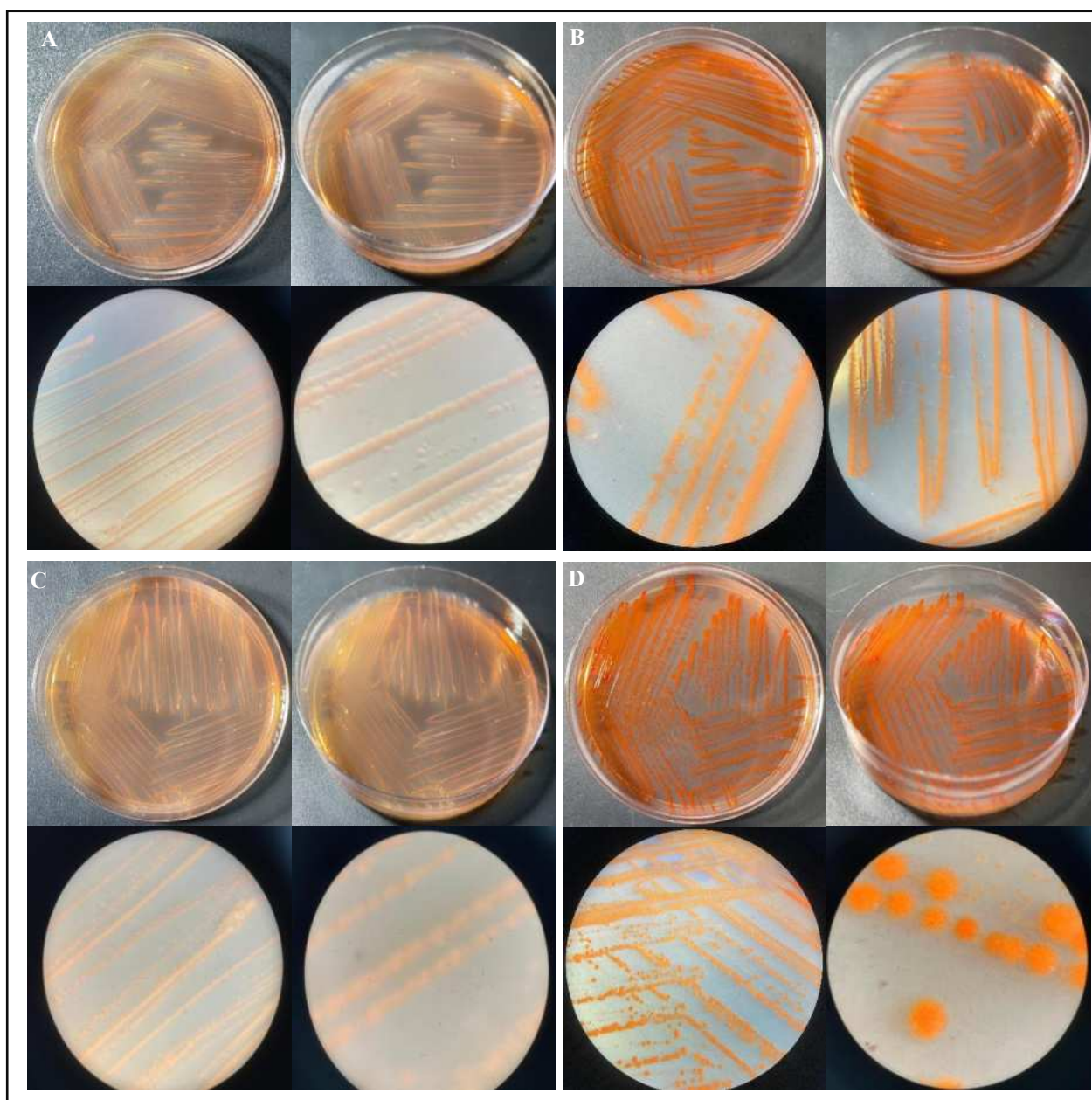
As cepas produtoras de amiloide utilizadas como controle positivo PAO1 de *Pseudomonas aeruginosa* e ATCC 35984 *Staphylococcus epidermidis* e MC4100 de *Escherichia coli* apresentaram colônias com uma coloração avermelhada, indicando a presença de amiloides e ligação do corante em suas colônias, enquanto a cepa MC4100  $\Delta$ Csg apresentou colônias com coloração branca, indicando a não produção de amiloides durante seu crescimento (Fig. 1).



**Figura 1- Crescimento das cepas controles em ágar Yesca com vermelho congo (100 $\mu$ g/ml). A. *E. coli* MC4100 Produtora da fímbria curli. B. *E. coli* MC4100  $\Delta$ CsgA, não produtora de Fímbria Curli. C. *S. epidermidis* ATCC 35984, produtor da proteína amiloide Aap. D. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 produtora de FapC.**

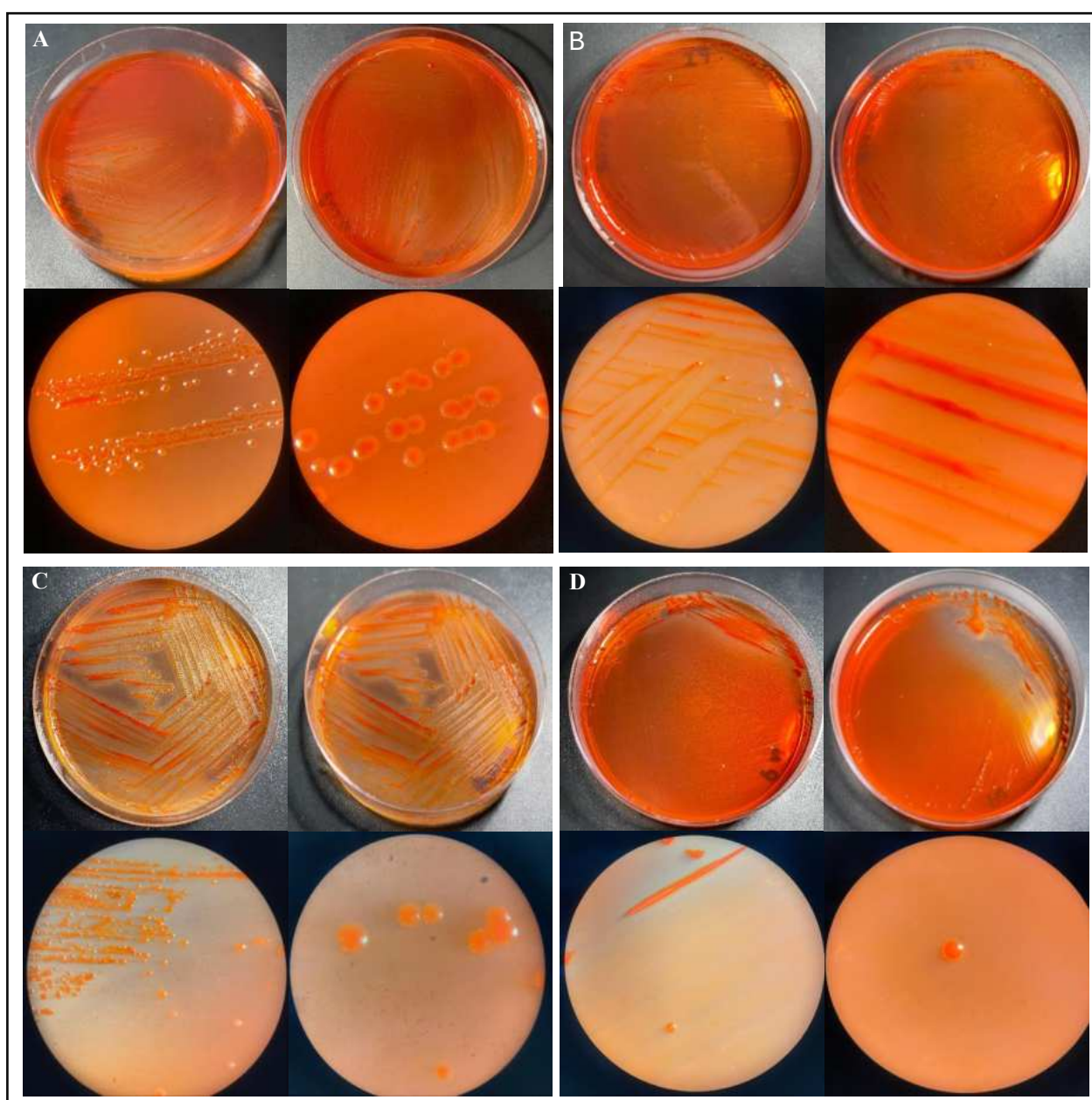


As cepas de *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 e 638R apresentaram um crescimento de coloração alaranjada fraca, indicando uma adsorção do corante em suas colônias, embora visivelmente mais fraca que em comparação com as cepas controle positivo. Já a ATCC 43859 possuiu um crescimento de cor avermelhada, mais forte que as outras cepas da espécie, apresentando toda a sua colônia com ligação ao corante. Todas as cepas do gênero *Bacteroides* apresentaram uma mudança na coloração do meio de cultura de um meio avermelhado para uma coloração azul translúcida com a presença de precipitados (Fig. 2).



**Figura 2 - Crescimento de *Bacteroides* spp. em ágar Brucella com vermelho congo (100µg/ml).** A. Crescimento de *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 B. Crescimento de *Bacteroides fragilis* ATCC 43859. C. Crescimento de *Bacteroides fragilis* 638R. D. Crescimento de *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29741.

Foi observada uma forte ligação do corante nas colônias das cepas do gênero *Prevotella* e da espécie *F. nucleatum* ATCC 25586. As cepas de *P. melaninogenica* e *P. nigrescens*, apresentaram o crescimento de cor vermelha, além de uma descoloração do meio de cultura ao redor do crescimento. Observou-se também uma dificuldade de crescimento da cepa de *P. intermedia* no meio de cultura. Embora pouco o crescimento ainda apresentou coloração vermelha intensa. A descoloração do meio também pode ser observada no crescimento de *F. nucleatum*, embora em menor quantidade. Enquanto as cepas do gênero *Prevotella* apresentaram colônias inteiramente coradas de vermelho, *F. nucleatum* apresentou o centro de suas colônias coradas, enquanto as bordas não apresentaram coloração (Fig. 3).

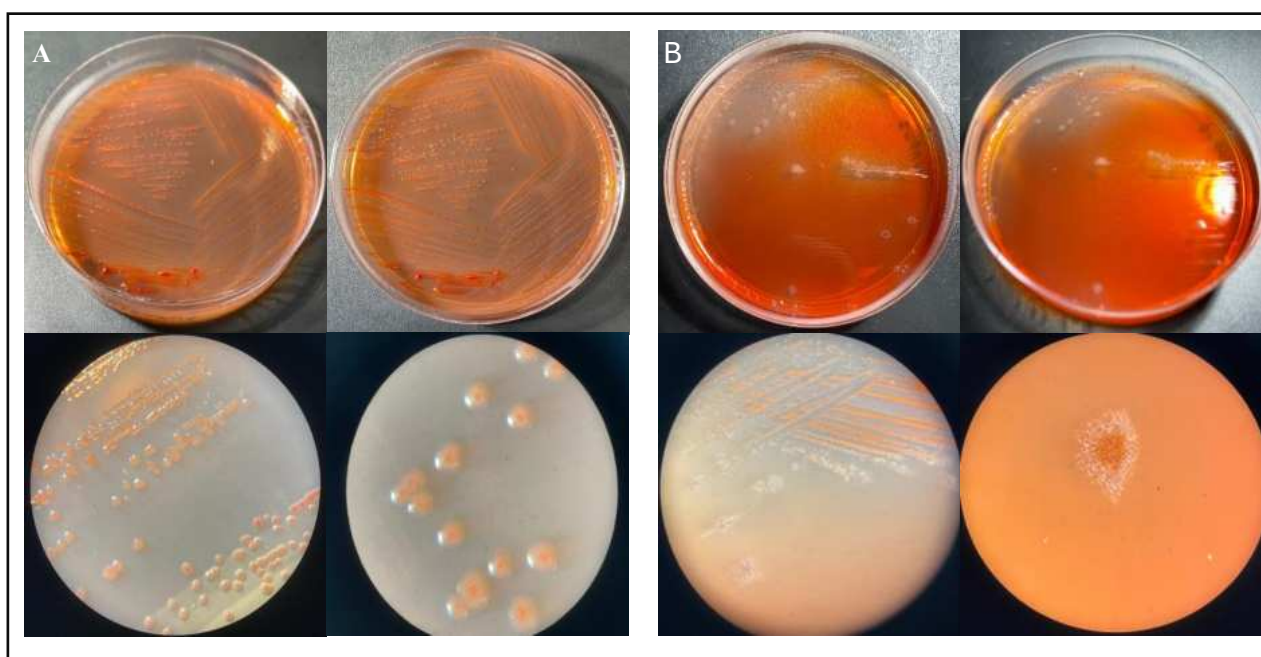


**Figura 3 - Crescimento de *Prevotella* spp. e *Fusobacterium nucleatum* em ágar Brucella com vermelho congo (100µg/ml).** A. Crescimento de *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 (B) Crescimento de *Prevotella intermedia* ATCC 49046. C. Crescimento de *Prevotella melaninogenica* ATCC 25845 (D) Crescimento de *Prevotella nigrescens* ATCC 33563 .



O crescimento de *Phocaeicola vulgatus* ATCC 8482 apresentou coloração alaranjada, e suas colônias apresentaram um acúmulo de corante no centro de suas colônias de cor vermelha, enquanto a parte exterior da colônia apresentou uma coloração laranja fraco. Essa cepa ainda apresentou descoloração do meio de cultura, que passou de vermelho para um laranja fraco (Fig.4).

A cepa de *Clostridioides difficile* NAP-1 apresentou um crescimento de coloração alaranjada, onde havia maior crescimento bacteriano. As colônias apresentaram um interior corado com vermelho do congo, enquanto o exterior possuía uma coloração esbranquiçada, característica do crescimento dessa espécie (Fig.4)



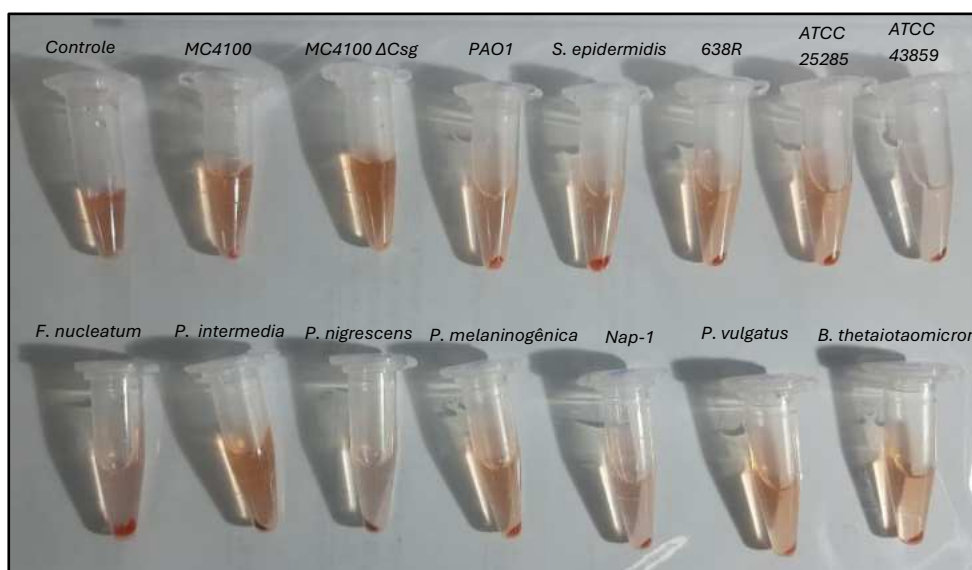
**Figura 4 - Crescimento de *Phocaeicola vulgatus* e *Clostridioides difficile* em ágar Brucella com vermelho congo (100µg/ml). A. Crescimento de *Phocaeicola vulgatus* ATCC 8482. B. Crescimento de *Clostridioides difficile* R20291.**

## 5.2 Ensaio de ligação do vermelho congo em células após o crescimento

Foi feita uma análise primária visual do ensaio, observando a coloração do material depositado, onde todas as cepas, menos MC4100  $\Delta$ Csg, apresentaram coloração vermelha intensa. Ainda, foi possível observar visualmente a diferença entre os sobrenadantes de cada amostras, em comparação ao controle, tendo todas as cepas, menos MC4100  $\Delta$ Csg, apresentado diferença visível, com destaque para as cepas *F. nucleatum*, *P. nigrescens*, *C.*

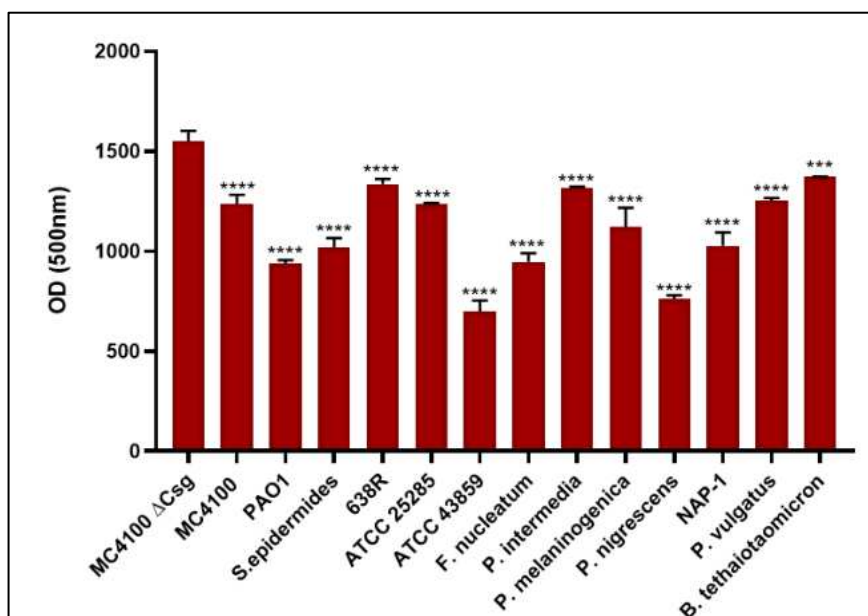


*difficile* e *B. fragilis* ATCC 43859 que apresentaram grande diferença de coloração nos sobrenadantes (Fig. 5).



**Figura 5 – Análise visual do ensaio de depleção do vermelho congo.** Observação da coloração do sobrenadante e material depositado nos microtubos após a centrifugação.

Na detecção de absorbância do vermelho do congo no sobrenadante (Fig.6), foi possível observar uma menor absorbância de todas as cepas, em comparação com controle negativo, o que demonstra uma maior absorção do corante pelo material celular depositado. Na análise estatística todas as cepas apresentaram valor estatístico de  $p < 0,0001$ /\*\*\*\* na sua diferença de absorbância, somente a cepa de *B. thetaiotaomicron* apresentou um valor de  $p = 0,0003$ /\*\*\*.

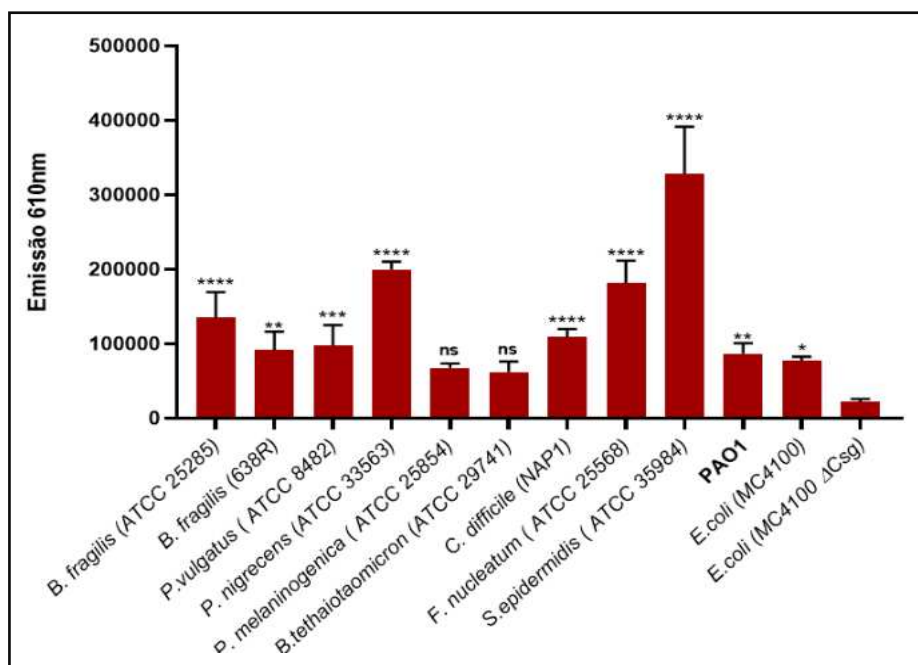


**Figura 6 – Leitura da absorbância do sobrenadante com vermelho do congo a 500 nm.** Observou-se uma maior retirada de corante do sobrenadante por todas as cepas quando comparadas ao controle negativo *E. coli* MC4100 ΔCsg ( \*\*\*  $p=0,003$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).

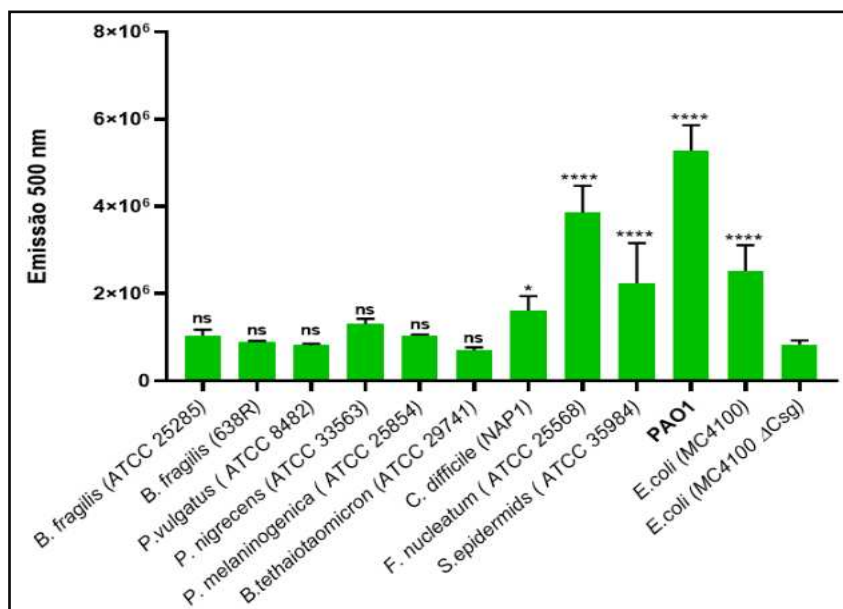
### 5.3 Ensaio de formação de biofilme em placas de 96 poços

Na coloração com corante Vermelho Congo (Fig.7), foi possível observar a maior fluorescência em comparação com controle negativo, tendo maior significância as amostras: *E. coli* MC4100 ( $p<0.185/*$ ), *B. fragilis* 638R e *P. aeruginosa* PAO1 ( $p<0,0018/**$ ), *P. vulgatus* ATCC 8482 ( $p<0,0006/***$ ), *C. difficile* NAP-1, *B. fragilis* ATCC 25285, *S. epidermidis* ATCC 35984, *P. nigrescens* ATCC 33563 e *F. nucleatum* ATCC 25568 ( $p<0,0001/****$ ).

No ensaio com coloração por Tioflavina T (Fig.8) as cepas que apresentaram maior significância na fluorescência foram: *C.difficile* NAP-1 ( $p<0,03/*$ ), *F. nucleatum* ATCC 25568, *P. aeruginosa* PAO1, *E. coli* MC4100 e *S. epidermidis* ATCC 35984 ( $p<0,0001/****$ ).



**Figura 7 - Fluorescência emitida pelos biofilmes corados com Vermelho congo.** Observou-se uma maior fluorescência no biofilme formado pelas cepas de *P. nigrescens*, *C. difficile*, *Bacteroides fragilis* 638R, *F. nucleatum* quando comparadas ao controle negativo *E. coli* MC4100 ΔCsg (\*  $p<0,185$ ; \*\*  $p<0,0018$ ; \*\*\*\*  $p<0,0001$ ).

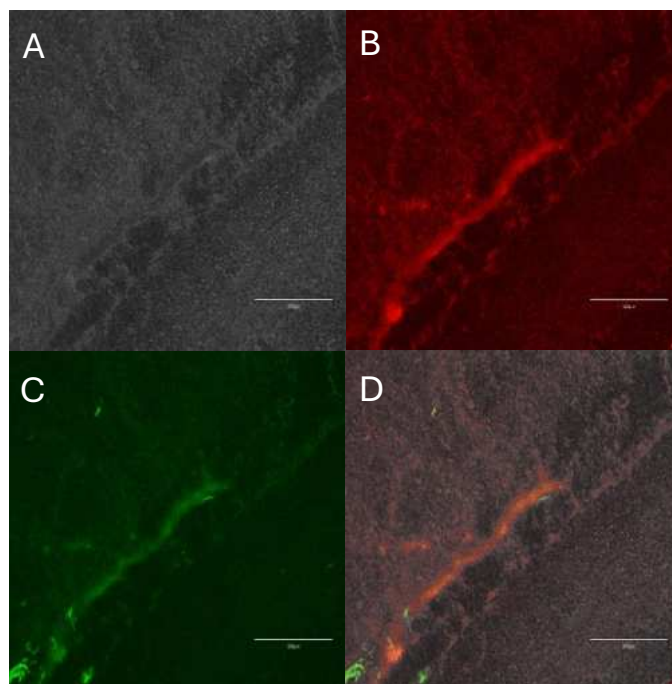


**Figura 8 - Fluorescência emitida pelos biofilmes corados com Tioflavina T.** Observou-se uma maior fluorescência no biofilme formado pelas espécies *P. nigrescens*, *C. difficile* e *F. nucleatum* quando comparadas ao controle negativo *E. coli* MC4100 ΔCsg (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).

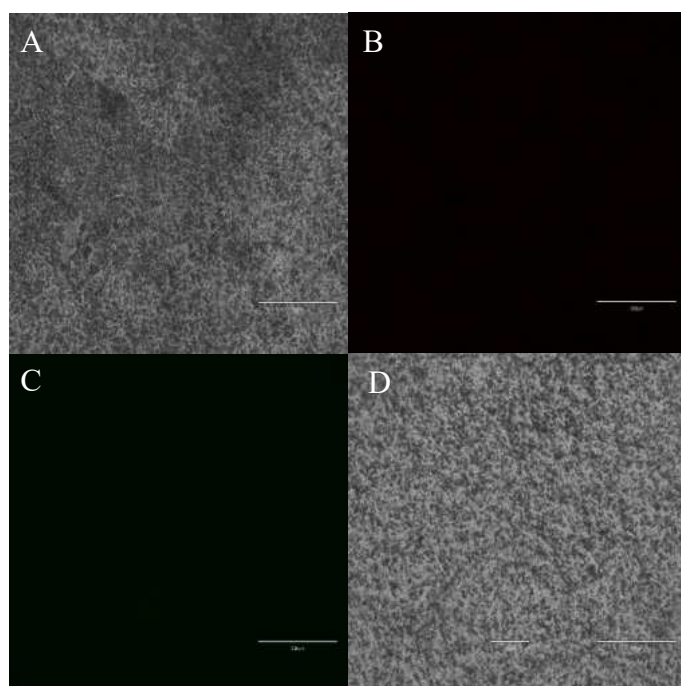
## 5.4 Microscopia de fluorescência do biofilme bacteriano.

### 5.4.1 Cepas controle

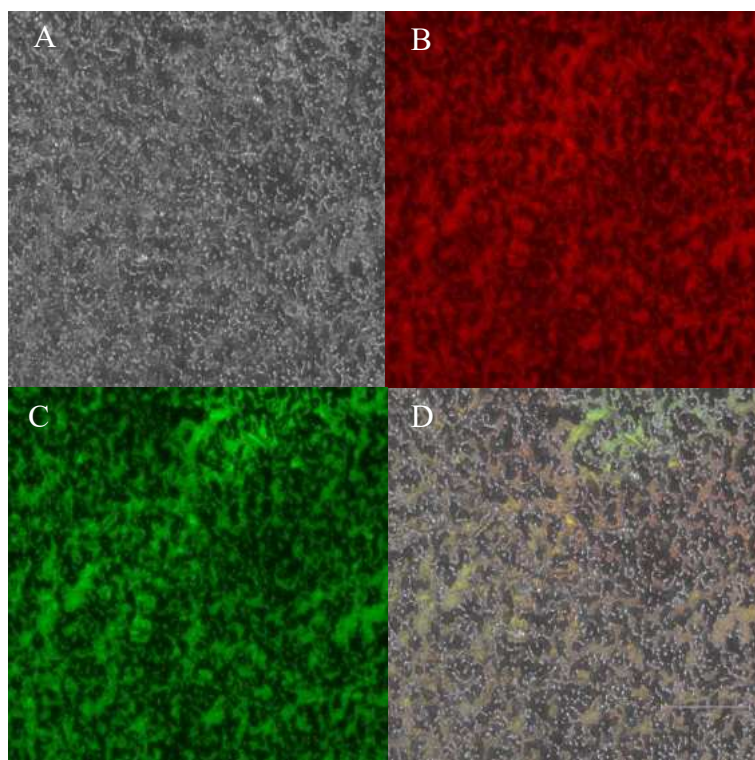
Na marcação com os corantes fluorescentes ThT e CR no biofilme das cepas controle, foi observado a fluorescência dos dois corantes nas cepas MC4100 (Fig.9), ATCC 35984 (Fig.11) e PAO1 (Fig.12). Pode-se observar marcação fluorescente dos corantes nos locais somente onde o biofilme foi formado, quando as imagens foram sobrepostas. Foi possível ainda observar a sobreposição dos corantes nas mesmas áreas. A cepa controle negativo MC4100 ΔCsg, apresentou formação de biofilme, porém não foi detectada fluorescência no biofilme (Fig.10).



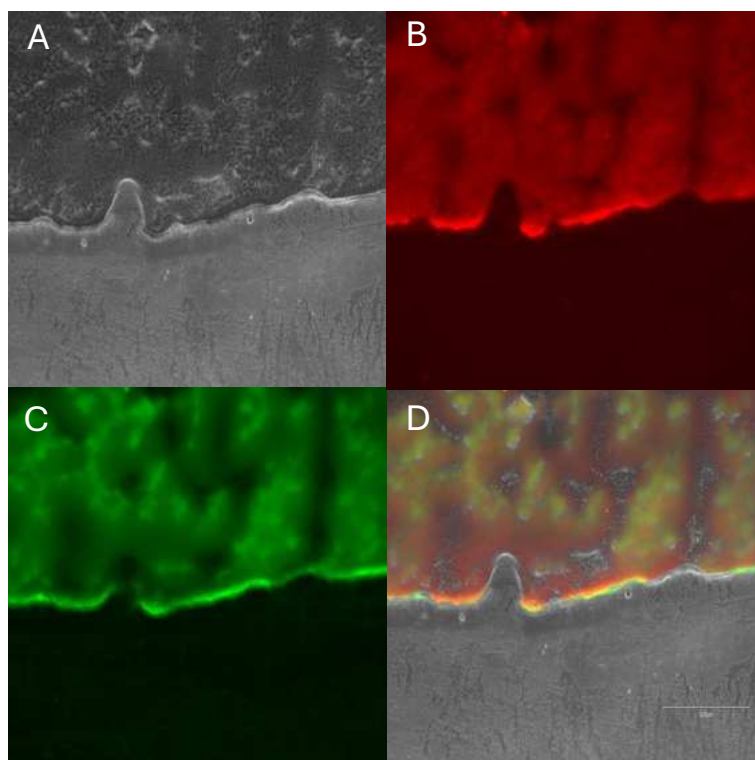
**Figura 9** – Microscopia de fluorescência do biofilme de *E. coli* MC4100 em objetiva de 10x. **A.** Biofilme em Luz branca (Trans); **B.** Fluorescência do vermelho do congo no biofilme; **C.** Fluorescência de Tioflavina T no biofilme; **D.** Sobreposição das imagens (trans, ThT e CR).



**Figura 10** – Microscopia de fluorescência do biofilme de *E. coli* MC4100  $\Delta$ Csg em objetiva de 10x. **A.** Biofilme em Luz branca (Trans); **B.** Fluorescência do vermelho do congo no biofilme; **C.** Fluorescência de Tioflavina T no biofilme; **D.** Sobreposição das imagens (trans, ThT e CR).



**Figura 11** – Microscopia de fluorescência do biofilme de *S. epidermidis* ATCC 35984 em objetiva de 10x. **A.** Biofilme em Luz branca (Trans); **B.** Fluorescência do vermelho do congo no biofilme. **C.** Fluorescência de Tioflavina T no biofilme **D.** Sobreposição das imagens (trans, ThT e CR).

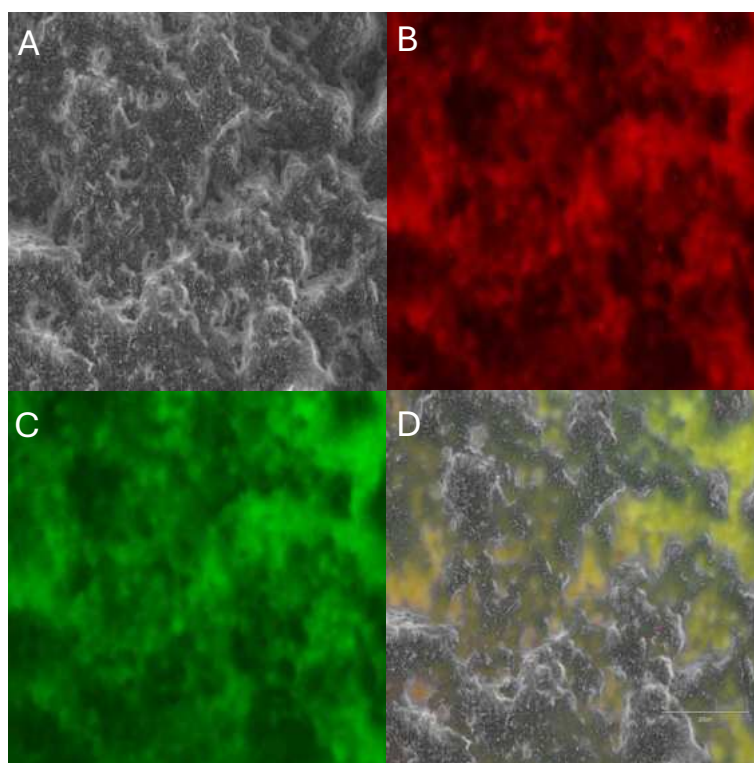


**Figura 12** – Microscopia de fluorescência do biofilme de *P. aeruginosa* PAO1 em objetiva de 10x. **A.** Biofilme em Luz branca (Trans); **B.** Fluorescência do vermelho do congo no biofilme. **C.** Fluorescência de Tioflavina T no biofilme **D.** Sobreposição das imagens (trans, ThT e CR).



#### 5.4.2 *Fusobacterium nucleatum*

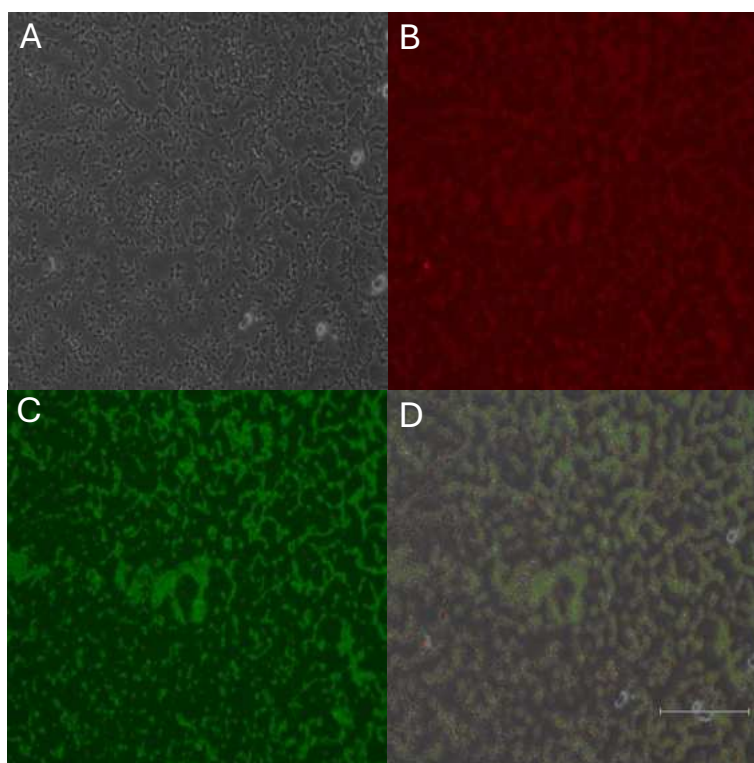
Foi observada a formação do biofilme de *F. nucleatum*, que apresentou um biofilme espesso, com detecção da fluorescência para ambos os corantes. Pode-se observar a marcação de fluorescência em certas áreas do biofilme, nessas mesmas áreas foi possível observar a sobreposição de ambos os corantes (Fig. 13).



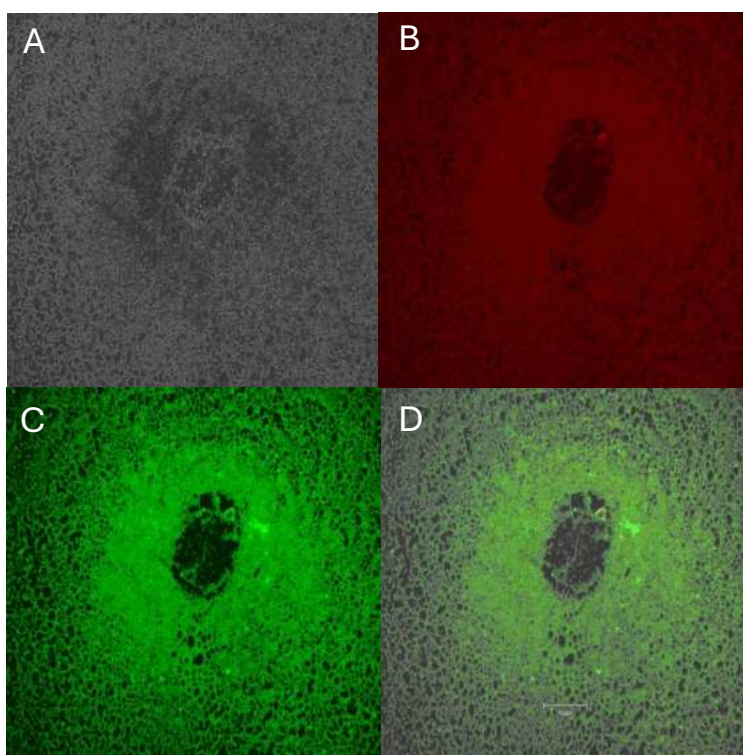
**Figura 13 – Microscopia de fluorescência do biofilme de *F. nucleatum* ATCC 25586 em objetiva de 10x.**  
**A.** Biofilme em Luz branca (Trans); **B.** Fluorescência do vermelho do congo no biofilme. **C.** Fluorescência de Tioflavina T no biofilme **D.** Sobreposição das imagens (trans, ThT e CR).

#### 5.4.3 *Prevotella* sp.

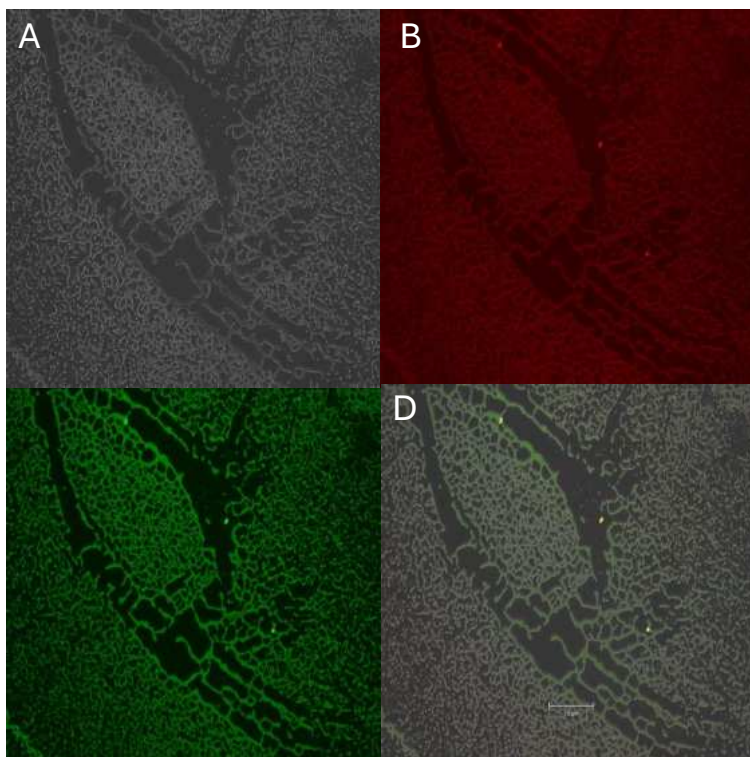
Todas as cepas do gênero *Prevotella* formaram biofilme, que apresentou fluorescência para ambos os corantes. Na cepa de *P. melaninogenica* pode-se observar a detecção de fluorescência onde houve a formação do biofilme, locais onde também foi observada a sobreposição dos corantes (Fig. 14). Para cepa de *P. intermedia* (Fig. 15) e *P. nigrescens* (Fig. 16) observou-se também a fluorescência por toda a área em que houve a formação do biofilme, com sobreposição dos corantes por toda extensão dos biofilme.



**Figura 14 – Microscopia de fluorescência do biofilme de *Prevotella melaninogenica* em objetiva de 10x. A.** Biofilme em Luz branca (Trans); **B.** Fluorescência do vermelho do congo no biofilme. **C.** Fluorescência de Tioflavina T no biofilme **D.** Sobreposição das imagens (trans, ThT e CR).



**Figura 15 – Microscopia de fluorescência do biofilme de *Prevotella intermedia* ATCC 49046 em objetiva de 10x. A.** Biofilme em Luz branca (Trans); **B.** Fluorescência do vermelho do congo no biofilme. **C.** Fluorescência de Tioflavina T no biofilme **D.** Sobreposição das imagens (trans, ThT e CR).

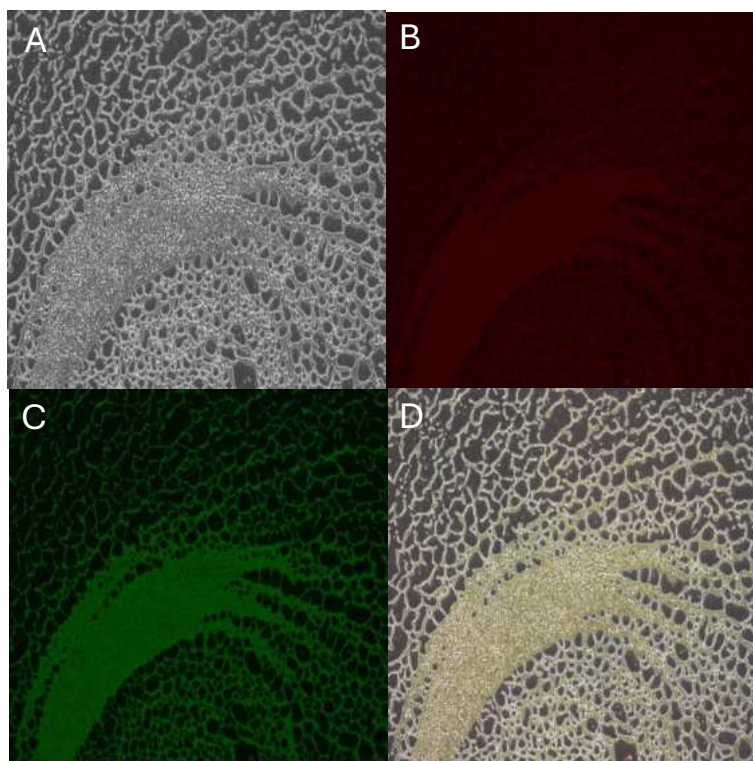


**Figura 16 – Microscopia de fluorescência do biofilme de *Prevotella nigrescens* ATCC 33563 em objetiva de 10x. A.** Biofilme em Luz branca (Trans); **B.** Fluorescência do vermelho do congo no biofilme. **C.** Fluorescência de Tioflavina T no biofilme **D.** Sobreposição das imagens (trans, ThT e CR).

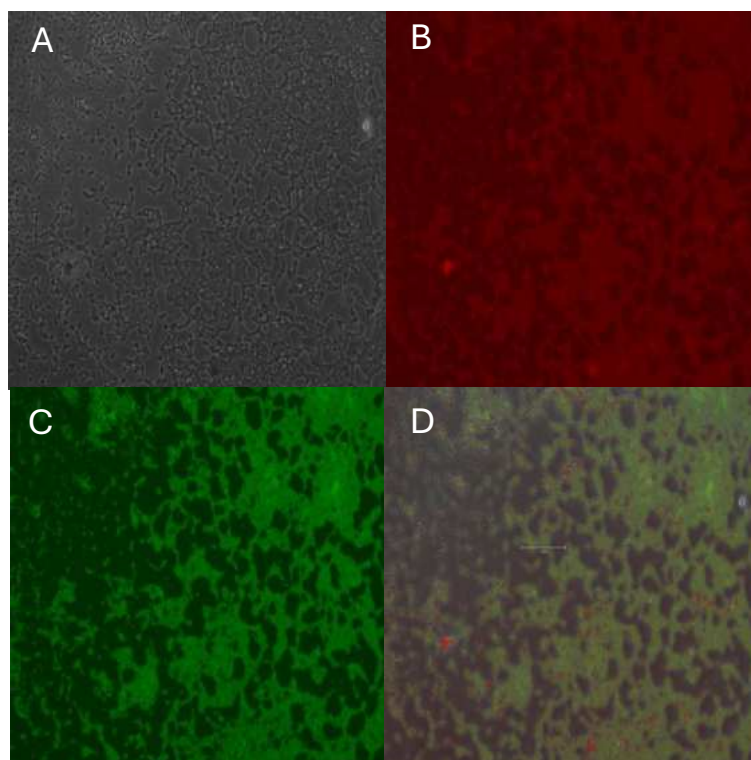
#### 5.4.4 *Bacteroides* sp.

As três cepas de *Bacteroides fragilis* apresentaram detecção da fluorescência com ambos os corantes em seu biofilme. As cepas ATCC 25285 (Fig.17) e ATCC 43859 (Fig.18), apresentaram fluorescência em toda extensão do seu biofilme, juntamente com a sobreposição da fluorescência dos corantes. Já a cepa 638R, embora tenha apresentado uma menor formação de biofilme quando em comparação com as outras cepas da mesma espécie, ainda apresentou fluorescência quando corada com ambos os corantes, com ênfase na fluorescência de Tioflavina T, a fluorescência dos dois corantes também apresentou sobreposição em alguns pontos do biofilme (Fig.19). No biofilme de *Bacteroides thetaiotaomicron* foi detectada a fluorescência tanto na coloração com Tioflavina T, quanto com vermelho congo, apresentando também a sobreposição da fluorescência dos corantes no biofilme (Fig. 20).

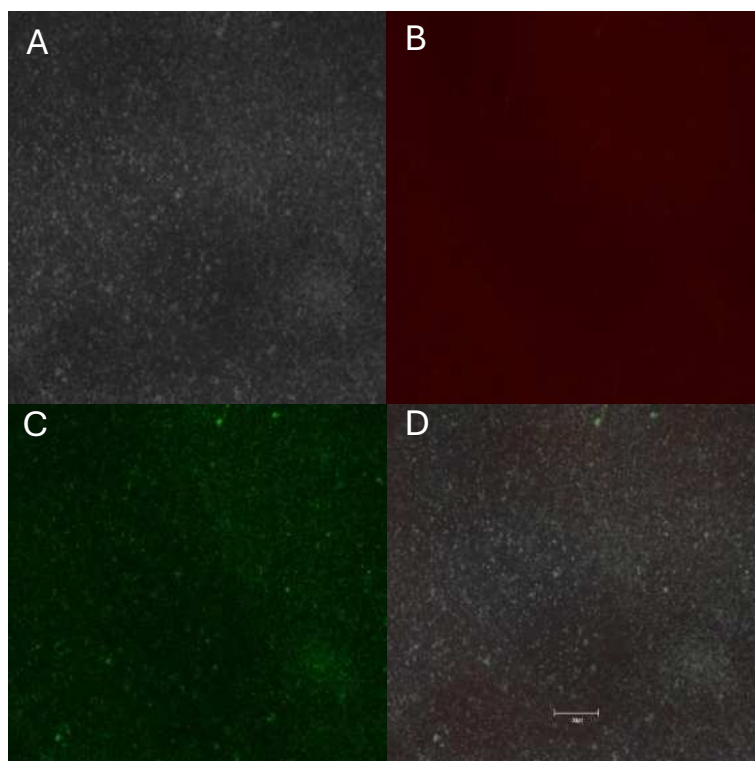




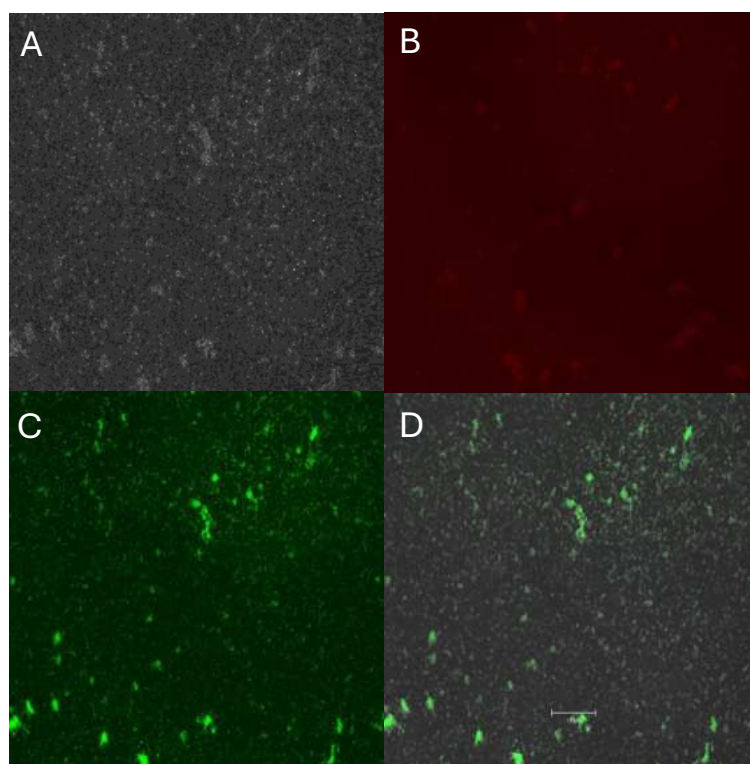
**Figura 17 – Microscopia de fluorescência do biofilme de *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 em objetiva de 10x. A.** Biofilme em Luz branca (Trans); **B.** Fluorescência do vermelho do congo no biofilme. **C.** Fluorescência de Tioflavina T no biofilme **D.** Sobreposição das imagens (trans, ThT e CR).



**Figura 18 – Microscopia de fluorescência do biofilme de *Bacteroides fragilis* ATCC 43859 em objetiva de 10x. A.** Biofilme em Luz branca (Trans); **B.** Fluorescência do vermelho do congo no biofilme. **C.** Fluorescência de Tioflavina T no biofilme **D.** Sobreposição das imagens (trans, ThT e CR).



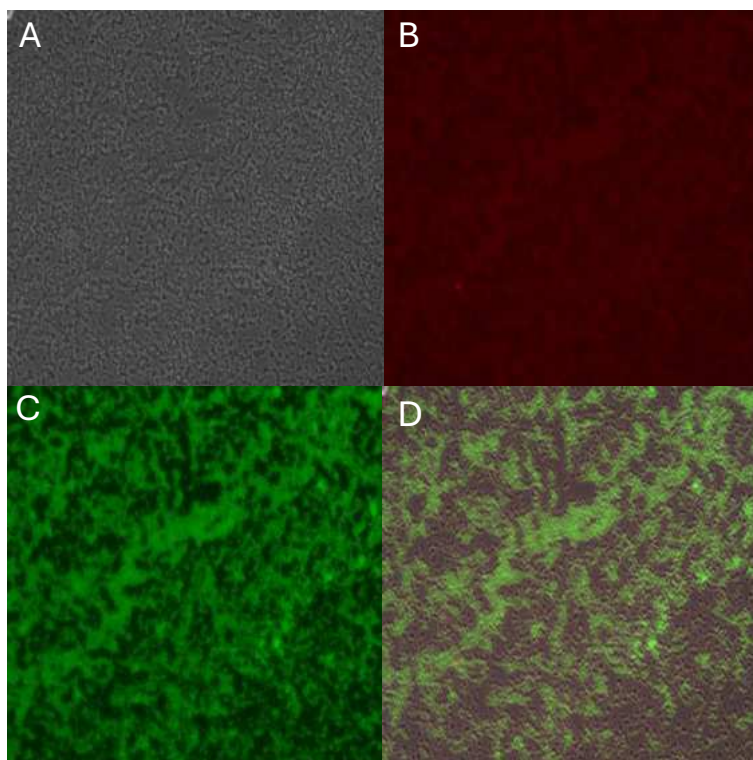
**Figura 19 – Microscopia de fluorescência do biofilme de *Bacteroides fragilis* 638R em objetiva de 10x.** A. Biofilme em Luz branca (Trans); B. Fluorescência do vermelho do congo no biofilme. C. Fluorescência de Tioflavina T no biofilme D. Sobreposição das imagens (trans, ThT e CR).



**Figura 20 – Microscopia de fluorescência do biofilme de *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29741 em objetiva de 10x.** A. Biofilme em Luz branca (Trans); B. Fluorescência do vermelho do congo no biofilme. C. Fluorescência de Tioflavina T no biofilme D. Sobreposição das imagens (trans, ThT e CR).

#### 5.4.5 *Phocaeicola vulgatus*

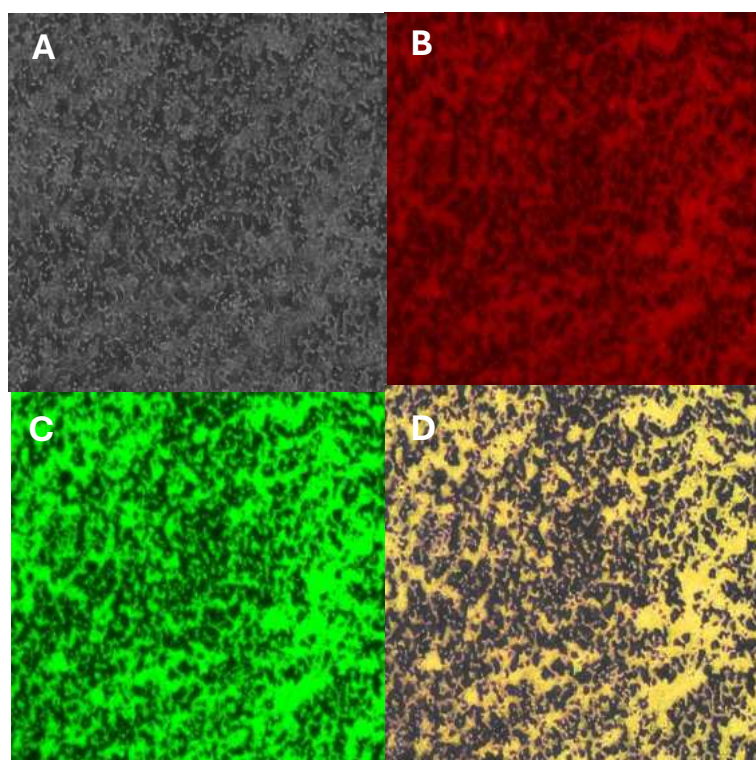
Foi detectada a fluorescência tanto de Tioflavina T, quanto de Vermelho do congo no biofilme de *P. vulgatus*, sendo detectada nas regiões onde há presença de biofilme bacteriano. Observou-se a fluorescência em toda a extensão do biofilme, além da sobreposição das fluorescência dos corantes (Fig.21).



**Figura 21 – Microscopia de fluorescência do biofilme de *Phocaeicola vulgatus* ATCC 8482 em objetiva de 10x. A.** Biofilme em Luz branca (Trans); **B.** Fluorescência do vermelho do congo no biofilme. **C.** Fluorescência de Tioflavina T no biofilme **D.** Sobreposição das imagens (trans, ThT e CR).

#### 5.4.6 *Clostridioides difficile*

Foi detectada a fluorescência tanto de Tioflavina T, quanto de Vermelho do congo no biofilme da cepa NAP-1, sendo detectada nas regiões onde há presença de biofilme bacteriano. Observou-se a fluorescência em toda a extensão do biofilme, além da sobreposição das fluorescência dos corantes (Fig.2).

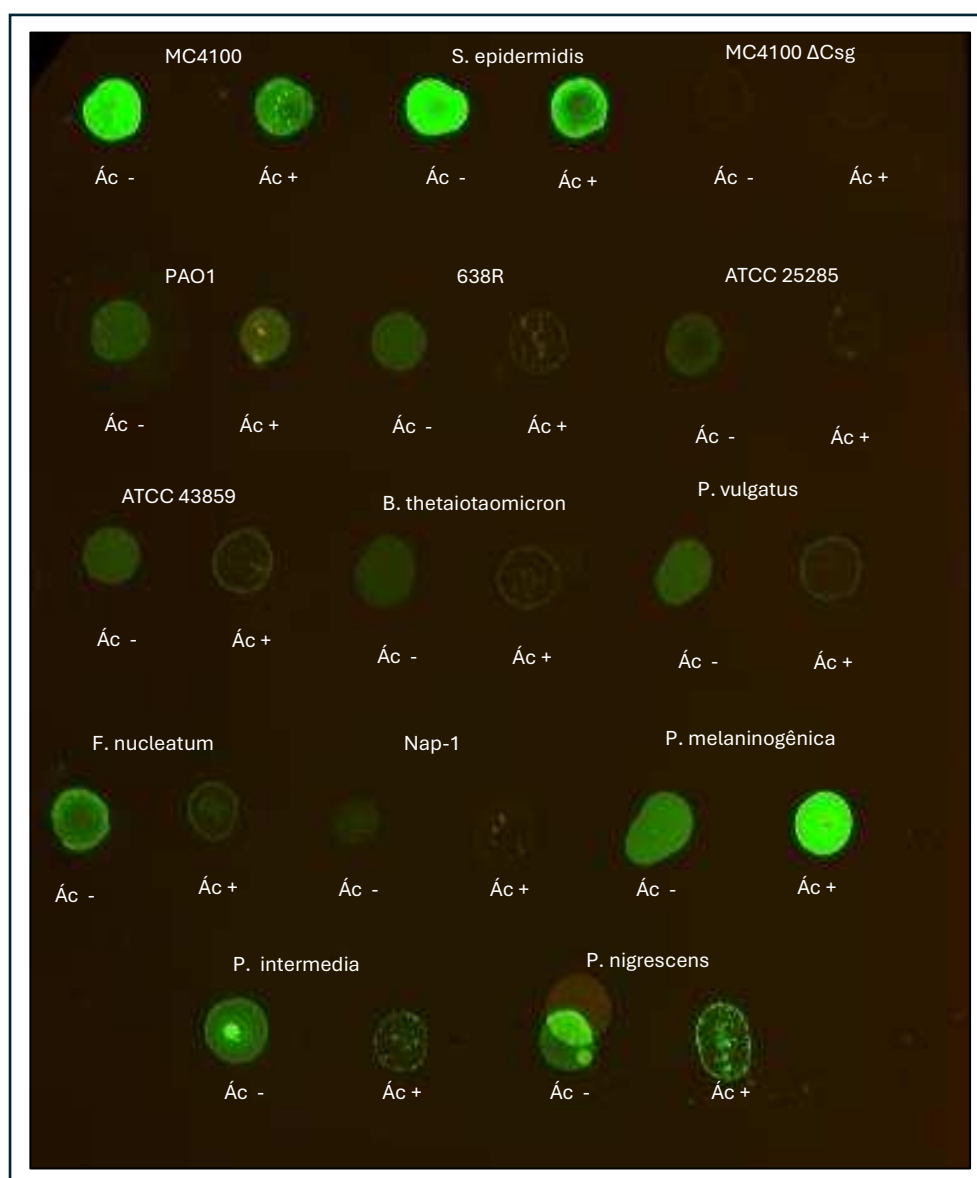


**Figura 22 – Microscopia de fluorescência do biofilme de *Clostridioides difficile* em objetiva de 10x. A.** Biofilme em Luz branca (Trans); **B.** Fluorescência do vermelho do congo no biofilme. **C.** Fluorescência de Tioflavina T no biofilme **D.** Sobreposição das imagens (trans, ThT e CR).



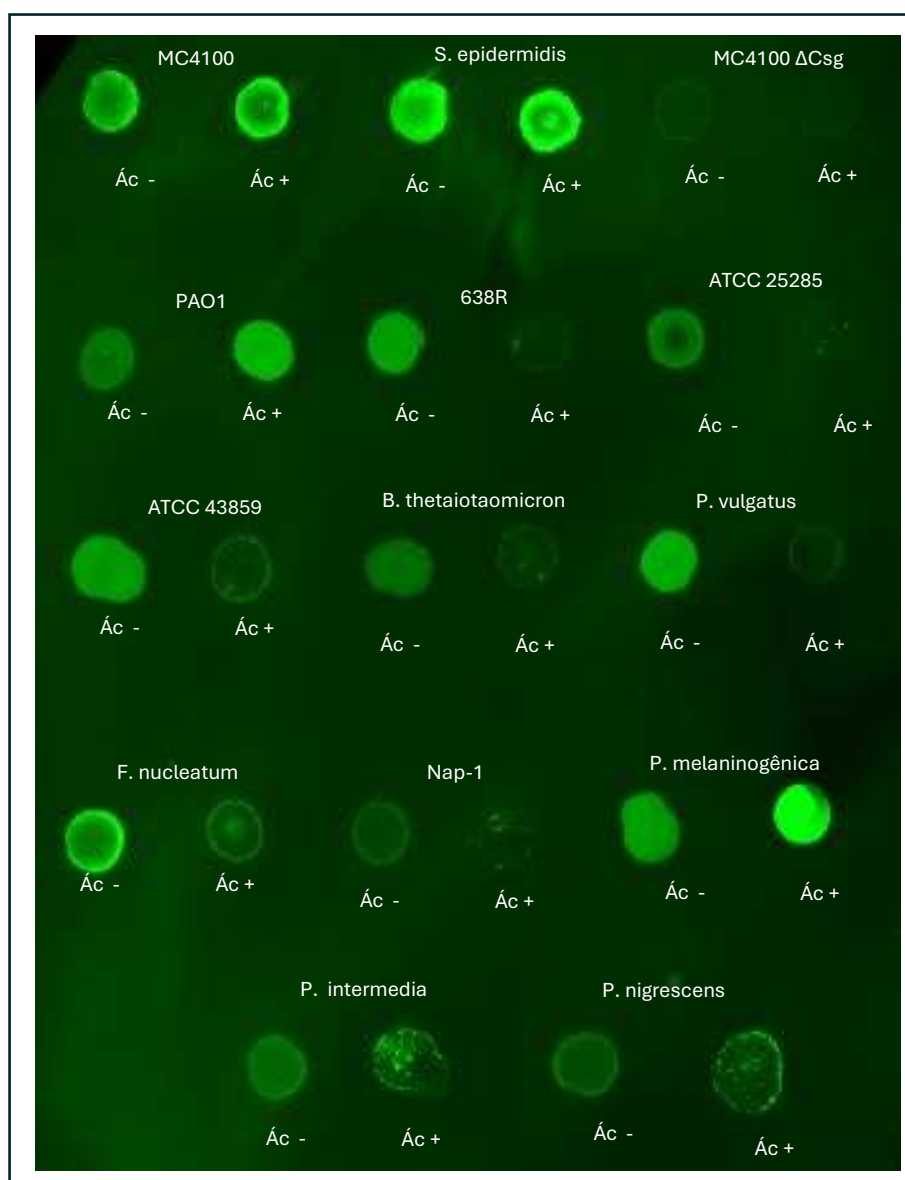
### 5.5 Dot blot

Na detecção de oligômeros através de anticorpos específicos, todas as cepas, menos MC4100  $\Delta$ Csg, apresentaram marcação dos anticorpos nos extratos dos seus biofilmes que não foram tratados com ácido fórmico 90% (Fig. 23). As cepas *E. coli* MC4100, *S. epidermidis* ATCC 35984, *P. melaninogenica* ATCC, *P. nigrescens* ATCC, *P. intermedia* ATCC, *F. nucleatum* ATCC 25586 apresentaram maior detecção em comparação com as outras cepas. Ainda, Nap-1 apresentou menor marcação em ambos os grupos (tratado e não tratado com ácido fórmico 90%). Na maioria das amostras o grupo tratado com ácido fórmico apresentou uma fluorescência mais baixa, em comparação com o não tratado. Somente *P. melaninogenica* apresentou maior detecção de oligômeros na amostra tratada com ácido.



**Figura 23 - Dot Blot com anticorpo anti-oligômero A11.** Os grupos de amostras foram posicionados em pares, sendo na esquerda o biofilme não tratado e na direita o extrato tratado com ácido fórmico 90%.

Na detecção de fibras amiloides no extrato de biofilme, MC 4100  $\Delta$ Csg não apresentou fluorescência em nenhum dos grupos de tratamento. Foram detectadas fibras, no grupo não tratado com ácido fórmico, em todas as cepas testadas. Com maior fluorescência as cepas MC 4100, *S. epidermidis* ATCC 35984, 638R, *P. melaninogenica* ATCC 25845, *F. nucleatum* ATCC 25586. Os grupos tratados com ácido fórmico 90% apresentaram menor fluorescência na maioria das cepas, menos em *P. melaninogenica* ATCC 25845 e PAO1 de *P. aeruginosa* (Fig. 24).

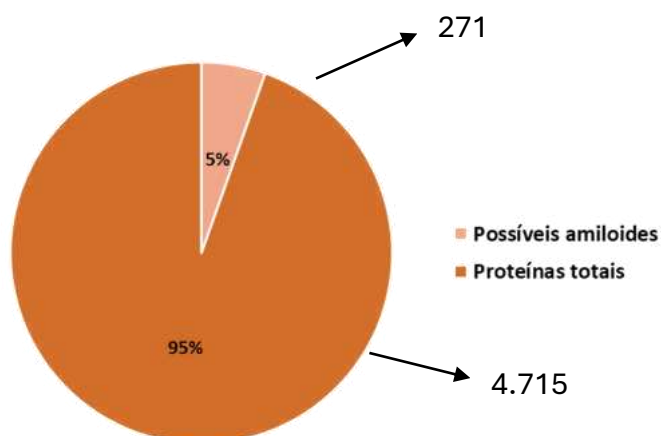


**Figura 24 - Dot Blot com anticorpos anti-fibra OC.** Os grupos de amostras foram posicionados em pares, sendo na esquerda o biofilme não tratado e na direita o extrato tratado com ácido fórmico 90%.

## 5.6 Análise in silico

### 5.6.1 *Fusobacterium nucleatum*

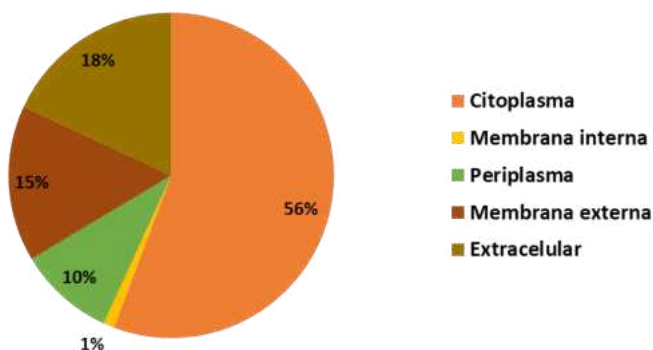
Utilizando a base de dados no NCBI foi possível resgatar a sequência de 4.986 proteínas de *F. nucleatum* ATCC 25586. Todas as sequências foram analisadas no software PASTA 2.0. Proteínas que apresentaram esse valor maior ou igual a 20 foram utilizadas nas análises seguintes. Um total de 271 (Fig. 25) proteínas apresentaram essa característica, correspondendo a 5% do total de proteínas resgatadas no NCBI. No PASTA 2.0, além do coeficiente de propensão amiloide, foi possível recuperar o valor energético (*best energy*). Proteínas amiloides costuma ter uma assinatura exotérmica, ou seja, de liberação de calor. Neste caso valores energéticos exotérmicos são representados com sinal negativo. Desta forma, foram selecionadas proteínas que apresentaram valores negativos de energia. Por fim, nesta análise foi também predita a porcentagem que regiões de folha  $\beta$  na proteína, também sendo uma característica conhecida de proteínas amiloides (Tabela 2).



**Figura 25: Possíveis proteínas amiloides de *F. nucleatum* ATCC 25586.** Após pesquisa no banco de dados do NCBI foram resgatadas um total de 4.986 sequências proteicas. Após análise no software PASTA 2.0, 271 (5%) proteínas apresentaram valor de propensão amiloide igual ou acima de 20

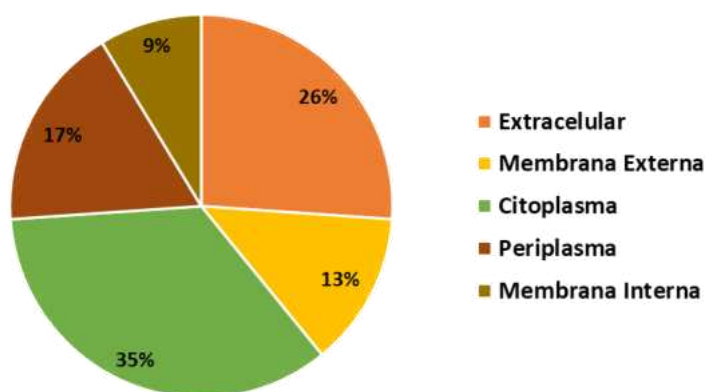
As 271 proteínas com possível propriedade amiloide foram submetidas a análise no software Cello, que realiza a predição da localização celular de cada proteína. O resultado obtido sugere que 151 proteínas (56%) estejam localizadas no citoplasma celular, 26 (10%) estejam localizadas no periplasma, 42 (15%) estejam localizadas na membrana externa e 49

(18%) sejam extracelulares e por fim, à membrana interna foram relacionadas três proteínas (1%) (Fig. 26).



**Figura 26 : Localização celular de possíveis proteínas amiloides de *F. nucleatum* ATCC 25586.** Após submeter as sequências proteicas de possíveis amiloides no software Cello foi possível determinar a predição de suas localizações celular. A maior parte das proteínas está localizada no citoplasma, seguidos de proteínas extracelulares, membrana externa e periplasma.

Em seguida, essas 271 proteínas com propensão amiloide segundo o software PASTA 2.0 foram submetidas a análise de propensão de agregação de folhas  $\beta$  no software Tango, que Baseado no resultado obtido a partir da análise no software Tango e CamSol 114 proteínas foram selecionadas. Entretanto, entre estas 114 proteínas, 23 apresentaram perfil de insolubilidade igual ou menor que -1. Estas foram selecionadas, por apresentarem as características mais compatíveis com amiloides (Tabela 2). Além disso, foram divididas conforme sua possível localização celular (Fig. 27).



**Figura 27: Possível localização celular das proteínas preditas como mais insolúveis no software CamSol.** Das 23 proteínas, 8 tem sua localização predita no citoplasma (35%), 6 são de localização extracelular (26%), 3 de membrana externa (13%), 2 de membrana interna (9%) e 4 localizadas no periplasma (17%).



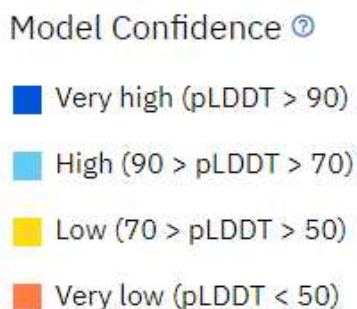
Tabela 2: Proteínas com maiores características amiloides com base na análise *in silico*

Número de acesso	Localização celular	% resíduos em regiões de folha beta	Índice energético ( <i>best energy</i> )	Índice de insolubilidade	Índice de agregação de folhas $\beta$
AVQ16019.1	Extracelular	45.22%	-14.018.093	-0.886443	510.813
AVQ15931.1	Membrana Externa	41.09%	-10.293.984	-0.339926	-
AVQ15896.1	Citoplasma	38.09%	-1.585.252	-0.321110	198.015
AVQ15788.1	Periplasma	38.13%	-6.281.451	-0.186643	782.366
AVQ15611.1	Membrana Externa	41.35%	-23580157	-0.633628	-
AVQ15376.1	Citoplasma	56.1%	-20391389	-1.174238	173.380
AVQ15310.1	Periplasma	44.44%	-6.990.634	-0.021518	109.528
AVQ14819.1	Citoplasma	42.31%	-19967173	-0.140471	159.733
AVQ14741.1	Extracelular	39.1%	-89.319	-0.213333	-
AVQ14477.1	Extracelular	40.47%	-7.951.439	-0.090315	-
AVQ14392.1	Citoplasma	0%	-9.767.214	-2.375036	135.816
AVQ14090.1	Extracelular	46.77%	-8.187.674	-0.292685	-
AAL95487.1	Extracelular	42.58%	-14.018.093	-0.273462	376.188
AAL95390.1	Periplasma	73.53%	-2177936	-2.76031	295.861
AAL95217.1	Citoplasma	56.1%	-20391389	-1.174238	173.380
AAL95108.1	Membrana Interna	0%	-32.755.659	-6.070214	977.277
AAL94775.1	Membrana Externa	41.09%	-10.293.984	-0.339926	-
AAL94726.1	Citoplasma	42.31%	-15.594.639	-0.608497	110.821
AAL94555.1	Citoplasma	38.89%	-1.585.252	-0.32111	198.015
AAL94550.1	Citoplasma	42.31%	-19967173	-0.140471	159.733
AAL94460.1	Extracelular	43.41%	-89.319	-0.04818	-
AAL94324.1	Membrana Interna	54.08%	-20143729	-3.031934	305.342
AAL93762.1	Periplasma	17.27%	-6.281.451	-0.186643	782.366

O nº de acesso foi recuperado no banco de dados do NCBI; A localização celular foi predita no software Cello; a % de resíduos em regiões de folha  $\beta$  e o índice energético foram obtidos através da predição no software Pasta 2.0; o índice de solubilidade foi predito através do software CamSol e o índice de agregação de folhas  $\beta$  foi predito através do software Tango. (-) proteínas com tamanho além do permitido para análise no software Tango.

As proteínas com maiores propensões a serem proteínas amiloides, segundo a análise *in silico* realizada, foram submetidas no banco de dados de estruturas proteicas, Alpha Fold, que possui um algoritmo acurado de predição da estrutura tridimensional proteica. Para a determinação da estrutura tridimensional da proteína, o Alpha Fold compara a sequência com proteínas cuja estrutura já foi elucidada, dessa forma, em alguns casos a confiança de

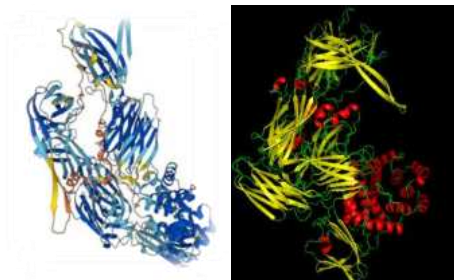
identidade obtida não é de 100%, e ainda é gerado uma legenda do grau de confiabilidade da predição (Fig. 32).



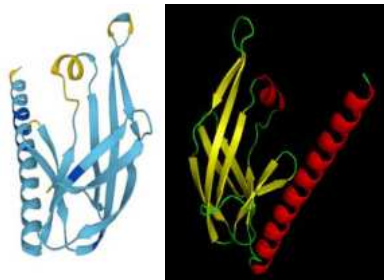
**Figura 28 - Nível de confiança da predição estrutural fornecida pelo Alpha Fold.** A cor azul escuro se refere a predição com grau muito alto de confiança, a cor azul claro com predição de alto grau de confiança, amarela uma predição com baixa confiança e a cor laranja se refere a uma predição com grau muito baixo de confiança.

Na Figura 29 estão relacionadas a predição da estrutura tridimensional das proteínas selecionadas na etapa final da análise *in silico*. O *output* disponibilizado no Alpha Fold pode ser utilizado em programas de análise estrutural proteica, dessa forma o formato de arquivo PDB foi recuperado e analisado no programa PyMOL 2.4.0, onde as estruturas em  $\alpha$ -hélice foram coloridas de vermelho, as folhas  $\beta$  de amarelo e as alças de verde, para fins de melhor visualização. De forma geral, a confiança da predição obtida foi muito alta, entretanto, para as proteínas AVQ15376.1, AAL95390.1 e AAL95217.1 essa predição não foi considerada confiável. Além disso, a proteína AAL94726.1 teve sua estrutura predita como uma única  $\alpha$  hélice, o que seria contraditório com as características descritas na literatura quando se trata de proteína amiloides. Ademais, a maioria das sequências submetidas tiveram sua estrutura predita com 100% de identidade com depósitos disponíveis no banco de dados, com exceção das proteínas AVQ15931.1 (94%), AVQ14741.1 (93%), AVQ14477.1 (76%), AVQ14090.1 (61%), AAL94775.1 (94%) e AAL94460.1 (94%), cuja identidade encontrada estão relacionadas entre parênteses.

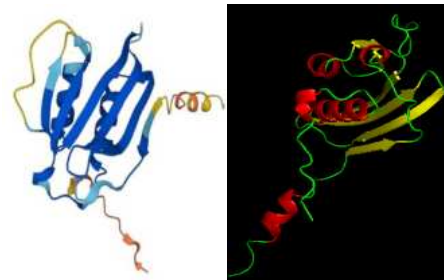
AVQ15931.1



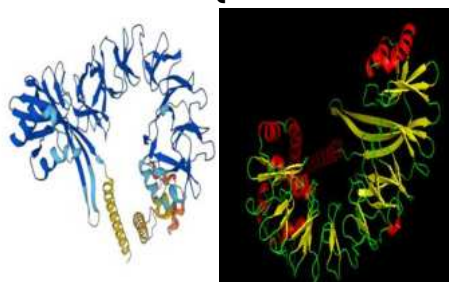
AVQ15896.11



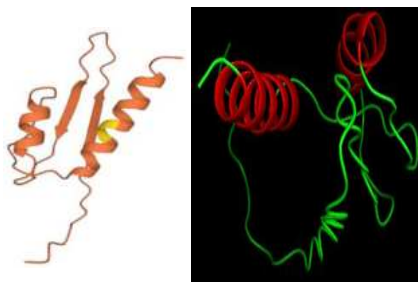
AVQ15788.1



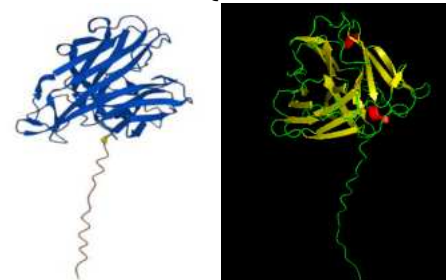
AVQ15611.1



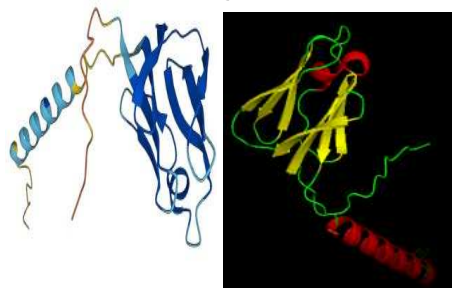
AVQ15376.1



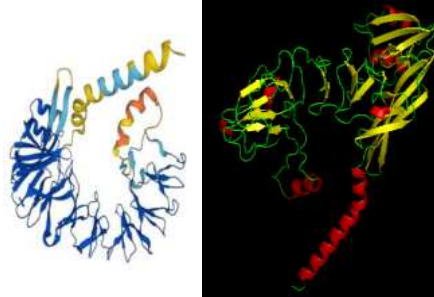
AVQ15310.1



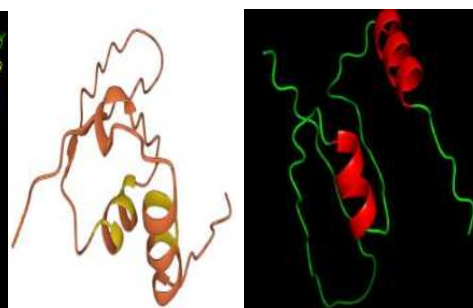
AVQ14819.1



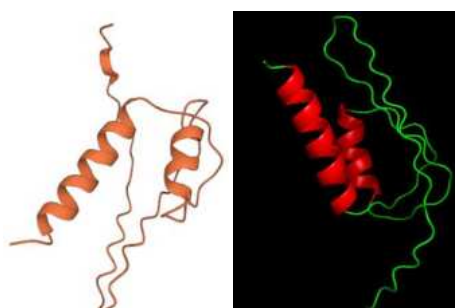
AAL95487.1



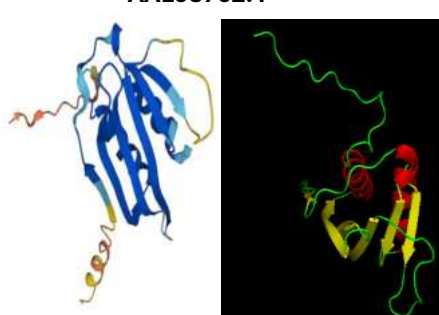
AAL95390.1



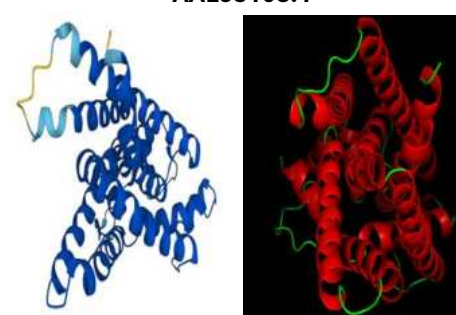
AAL95217.1



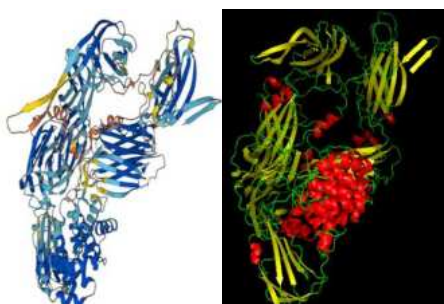
AAL93762.1



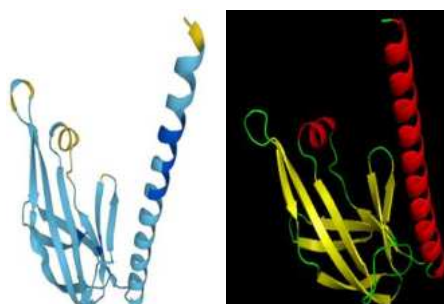
AAL95108.1



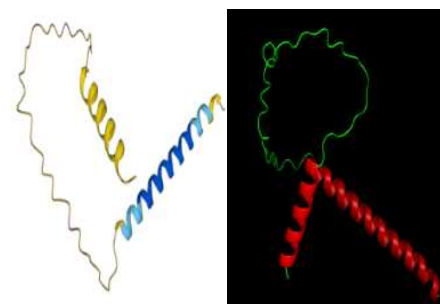
AAL94775.1

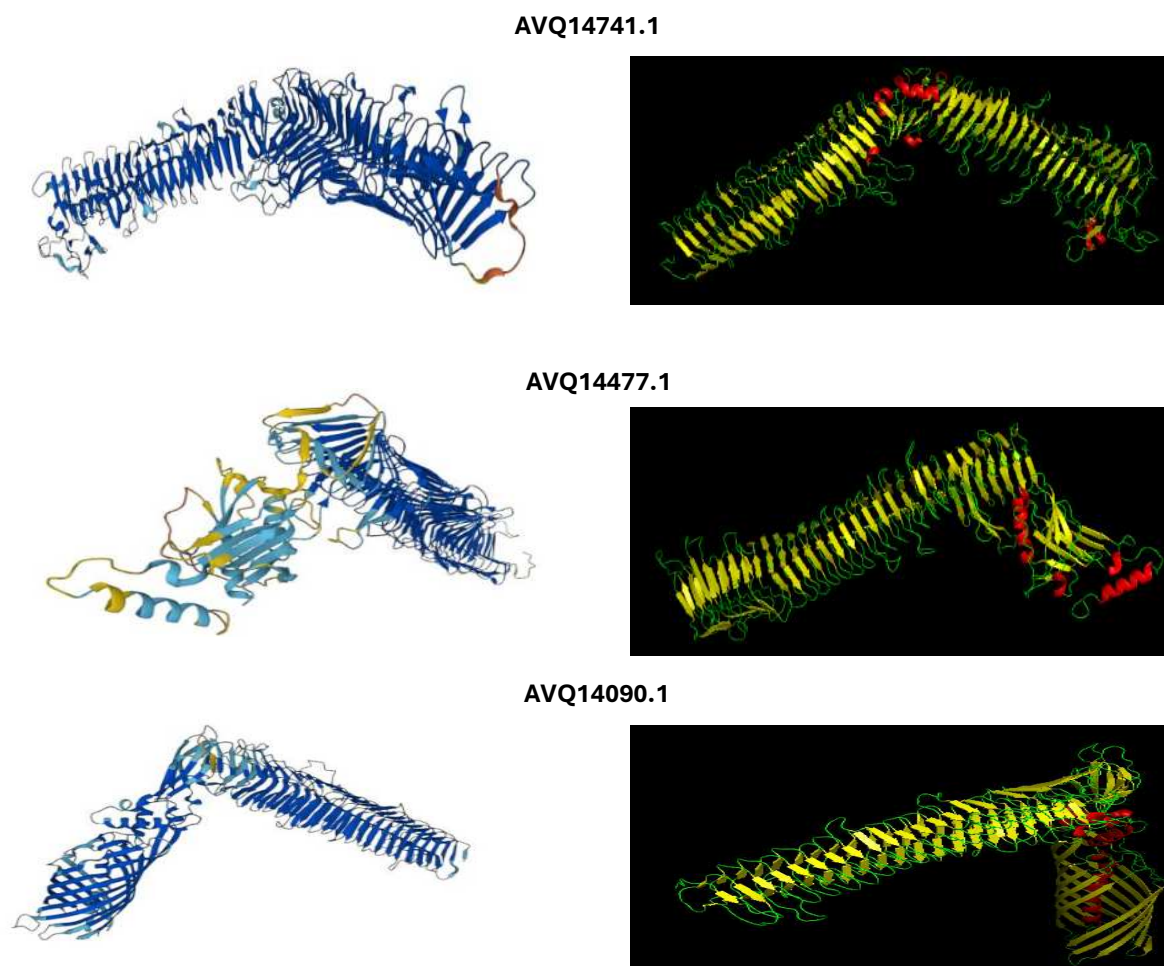


AAL94555.1



AAL94324.1





**Figura 29: Predição da estrutura tridimensional obtida no Alpha Fold.** As proteínas que apresentaram características mais semelhantes com proteínas amiloides foram submetidas no banco de dados Alpha Fold. De forma geral as predições tiveram alta confiabilidade, entretanto, para as proteínas AVQ15376.1, AAL95390.1 e AAL95217.1 a predição apresentou um grau muito baixo de confiança. As imagens estão dispostas em pares, em fundo branco a imagem obtida no Alpha Fold e com fundo escuro a imagem obtida a partir do programa PyMOL.

Além da predição estrutural, o resultado gerado no Alpha Fold se conecta com outros bancos de dados proteicos, como Uniprot, KEGG e Pfam. Em todos eles são depositadas informações sobre a possível função da proteína investigada (Tabela 3).

**Tabela 3: Possível função de proteínas selecionadas na análise *in silico* de *F. nucleatum*.**

Número do NCBI	Uniprot	Pfam	Possível função
AVQ16019.1	UPI000D115D43	UPI000D115D43	Proteína com domínio NusG. Esse domínio é encontrado em proteínas NusG. Essas proteínas atuam como fatores na síntese do RNA. Podem interagir com ácidos nucleicos e proteínas auxiliares. Podem suprimir ou promover a transcrição.
AVQ15931.1	Q8RFV3	PF21142	Proteínas com domínio MG2 que é comum em proteínas denominadas de $\alpha$ -2-macroglobulinas. São proteínas extracelulares, ancoradas na membrana que realizam a captura de proteases e as inativa. Além do seu papel principal, esta classe de proteínas consegue também ligar a citocinas e moléculas do complemento.
AVQ15896.1	Q8RGE8	-	Proteína com função desconhecida, mas com características de proteína transmembranar.
AVQ15788.1	A0A223AV92	-	Possível lipoproteína. Lipoproteínas podem estar envolvidas em diversos processos, como formato da célula, motilidade, transporte de diferentes substâncias, transdução de sinais entre outros.
AVQ15611.1	D5REU2	PF13644	Proteína com domínio DKNYY. Proteínas com esse domínio são abundantes em fusobactérias. Podem possuir diversas repetições KNXXYY espaçadas por um intervalo de 35 aminoácidos. A função dessas proteínas ainda permanece desconhecida.
AVQ15376.1	Q8RES3	-	Proteína hipotética de citosol. De acordo com o banco de dados <i>KEGG orthology</i> (KO), essa proteína é ortóloga a ATPases transportadoras de cálcio.
AVQ15310.1	A0A0M4SAT2	PF10670	Transportador do tipo ABC com domínio de Transtirretina. Em vertebrados a transtirretina é uma proteína tetramérica que se liga a hormônios da tireoide. Em bactérias proteínas com esse domínio podem ser encontradas compondo a estrutura do sistema de secreção do tipo VI. Esses domínios podem formar estruturas que interagem entre si. Em humanos, a doença amiloidose por transtirretina acontece quando há má formação da proteína que se aglomera de forma desorganizada e se deposita em diferentes tecidos. Ademais, transportadores ABC podem estar envolvidos na resistência a múltiplas drogas.
AVQ14819.1	Q8RGF3	PF07009	Idem AVQ16019.1
AVQ14741.1	Q7P2K3	-	Proteína pertencente à família de proteínas de membrana externa de <i>Fusobacterium</i> , sem função predita.
AVQ14477.1	X8I4A8	-	Proteína com função de autotransportador. Em bactérias, autotransportadores podem estar envolvidos em adesão, autoagregação, invasão, formação de biofilme, citotoxicidade entre outros processos.
AVQ14392.1	Q8RH83	-	Proteína de função desconhecida.
AVQ14090.1	A0A2C6BJG5	-	Idem AVQ14477.1
AAL95487.1	Q8RE37	PF13644	Idem AVQ15611.1
AAL95390.1	Q8REB5	-	Proteína de função desconhecida.
AAL95217.1	A0A0M4RZG7	-	Transportador do tipo ABC de cálcio com atividade ATPase.
AAL95108.1	Q8R666	PF02654	Enzima Adenosil-GDP-cobinamida ribazoltransferase. Realiza a transferência $\alpha$ -ridazolol 5'-fosfato para adenosil-GDP-cobinamida gerando 5-fosfato de adenosilcobalamina. Esta é a etapa final na síntese da vitamina B12 realizada por procariotos. Esta proteína é da família da enzima cobalamina-5-fosfatase sintase (CobS) presente em diversas espécies bacterianas, como <i>E. coli</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .
AAL94775.1	F9EP46	PF00207	Proteína de membrana externa com região de ligação da família das $\alpha$ -macroglobulinas. Idem AVQ15931.1
AAL94726.1	Q8R6I0	-	Proteína não caracterizada
AAL94555.1	Q8RGE8	-	Proteína não caracterizada
AAL94550.1	Q8RGF3	PF07009	Idem AVQ16019.1
AAL94460.1	Q7P2K3	-	Proteína pertencente à família de proteínas de membrana externa de <i>Fusobacterium</i> , sem função predita.
AAL94324.1	Q8RH06	-	Proteína não caracterizada
AAL93762.1	Q8RIF3	-	Idem AVQ15788.1

## 6 Discussão

A identificação e a descrição de amiloides bacterianos é um processo complexo e minucioso, principalmente quando os dados disponíveis na literatura estão limitados a grupos específicos de bactérias, como aeróbios e enterobactérias. Aliado com a dificuldade de cultivar e estudar microrganismos anaeróbios, esse processo se torna ainda mais complexo. Ao estabelecer um meio de cultura com vermelho do congo que permitisse o crescimento de bactérias anaeróbias, conseguimos observar diferentes cenários de ligação do corante vermelho do congo a esses microrganismos. Diferentes espécies apresentam múltiplas formas e colorações em suas colônias, além de diferentes características metabólicas que implicam diretamente nas condições e tempos de crescimento necessários para se obter um resultado. Todos esses fatores dificultam uma identificação uniforme por meio deste método, embora tenhamos conseguido observar a adsorção do corante as cepas testadas.

Entre os diversos corantes que se ligam a proteínas amiloides, o vermelho do congo vem sendo amplamente utilizado nos diversos protocolos para identificação dessas proteínas, devido a capacidade do vermelho do congo de ligação proteínas de caráter amiloide e proteínas hidrofóbicas. Embora o seu uso tenha se disseminado, os estudos recentes vem demonstrando ligações do vermelho do congo a outras moléculas hidrofóbicas, como alguns carboidratos e proteínas, podendo afetar o resultados dos protocolos que utilizam o corante, devido a essas ligações inespecíficas (Yakupova *et al*, 2019). A cepa MC4100  $\Delta$ Csg, por ser não produtora de amiloides, pode ser utilizada como um controle comparativo a fim de minimizar falsos positivos sendo possível excluir marcações inespecíficas nos protocolos estudados.

No cultivo das cepas estudadas em ágar Brucella contendo vermelho do congo as cepas do gênero *Prevotella*, assim como a cepa de *F. nucleatum* (Fig.3), apresentaram aspectos do seu crescimento condizentes com os controles positivos, como a coloração vermelha em suas colônias, juntamente com uma descoloração do meio de cultura nos locais com maior quantidade crescimento, o que demonstra a retirada do corante do meio e ligação a proteínas da colônia bacteriana, indicando a produção de proteínas amiloides (Reichhardt *et al*, 2015). Em paralelo, as cepas do gênero *Bacteroides* (Fig.2) apresentaram uma coloração alaranjada, embora todo o meio de cultura onde foram cultivados tenha sua cor alterada para um meio azulado com a presença de precipitados. Sabe-se que mudanças no pH podem afetar não só a coloração, mas podendo afetar a estrutura do corante o que resulta na sua precipitação (Csillag, *et al*, 2023). Ainda, o ágar Brucella apresenta em sua composição glicose em uma



concentração de 1%. Sabendo que o gênero *Bacteroides* tem a capacidade de produzir ácidos a partir da metabolização de glicose consequentemente diminuindo o pH do meio (Rios *et al*, 2016), essa relação metabólica pode explicar o problema de coloração dessas espécies no meio de cultura proposto.

Algumas cepas apresentaram a coloração com vermelho congo no centro da colônia, como *F. nucleatum* (Fig.3), *Clostridioides difficile* e *Phocaeicola vulgatus* (Fig.4), indicando a presença de amiloides no seu interior, enquanto nas regiões mais externas não houve ligação do corante. Essa característica pode estar relacionada com a fase de produção das proteínas, sendo essas proteínas possivelmente produzidas após determinado tempo de desenvolvimento daquela comunidade microbiana, a expressão dessas proteínas e consequentemente ligação do vermelho congo só ocorrerão em regiões com tempo maior de desenvolvimento, como o centro das colônias, visto que a distribuição durante o crescimento bacteriano tende a ser radial, onde as células mais antigas se encontram no centro e as células mais novas se distribuem pelas extremidades da colônia (Cao, *et al*, 2021).

Sabe-se que células produtoras de amiloides, como curli, apresentaram capacidade de ligar ao vermelho congo, após a incubação com solução do corante (Gophna *et al*. 2001 ; Cherny *et al*, 2005; Reichhardt *et al*, 2015). Ainda, a ligação do corante às células retira o vermelho congo da solução inicial, permitindo uma análise da absorbância do corante em suspensão após a incubação com as diferentes amostras. Sendo assim, esse protocolo permite uma análise não somente qualitativa, observando a coloração do material celular depositado, quanto quantitativa da retirada do corante vermelho congo da solução. O ensaio de depleção de vermelho congo então pode ser utilizado para detectar de forma rápida a presença de proteínas amiloides em crescimento bacteriano, quando em comparação com um controle não produtor.

No ensaio de precipitação com vermelho do congo, foi observado que todas as cepas de bactérias anaeróbias e cepas controles positivo apresentaram ligação ao corante, indicando a presença de produção de amiloides por essas cepas. Foi possível observar a coloração avermelhada do material depositado em todas as cepas citadas, menos o controle negativo MC 4100  $\Delta$ Csg que apresentou material depositado branco, ou seja, sem ligação ao corante. Ainda foi possível observar a coloração dos sobrenadantes, após a centrifugação das amostras, onde novamente todas as amostras, menos MC4100, apresentaram diferença do controle composto somente por corante em tampão PBS. Apresentando uma maior descoloração do sobrenadante as cepas de *F. nucleatum*, *Clostridioides difficile*, *Prevotella nigrescens*, *Bacteroides fragilis*

ATCC 43859 (Fig. 5). No intuito de minimizar quaisquer ligações inespecíficas do vermelho congo em componentes do crescimento bacteriano, as análises quantitativas do corante no sobrenadante foram realizadas em comparação com MC4100  $\Delta$ Csg. Nesse ensaio então observamos que todas as cepas apresentaram significância nas análises estatísticas, tendo apresentado um valor de  $p = 0,003/**$  na cepa de *Bacteroides thetaiotaomicron*, enquanto as outras amostras estudadas apresentaram valor de  $p < 0,0001/****$  (Fig.6). Dessa forma, confirmando de forma mais precisa que a análise visual, a presença de amiloides durante o crescimento em colônias dessas espécies.

O uso de corantes fluorescentes representa uma das técnicas mais eficazes na detecção de agregados proteicos patogênicos. Sabe-se que proteínas amiloides possuem afinidade por diversos corantes como Tioflavinas, Vermelho do congo, Proteostat, Tiofenos e derivados de curcumina (Lee D. *et al*, 2019). A ligação de Tioflavina T e vermelho do congo a proteínas amiloides, induz uma mudança nos espectros de emissão de excitação de sua fluorescência, o que implica na sua utilização como marcadores para detecção de amiloides em diversas amostras (Xue, C. , *et al*, 2017; Giryh, M. *et al*, 2016).

Dessa forma, utilizando dessas característica dos corantes, essas moléculas foram utilizadas para corar os biofilmes formados em placas de 96 poços. A fluorescência de vermelho congo obtida no ensaio, apresentou significância estatística nas amostras de *Bacteroides fragilis* 638R e *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ( $p < 0,0018/**$ ), *Phocaeicola vulgatus* ( $p < 0,0001/****$ ), *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, *Staphylococcus epidermidis*, *Clostridioides difficile*, *Fusobacterium nucleatum* e *Prevotella nigrescens* ( $p < 0,0001/****$ ), quando comparadas com MC 4100  $\Delta$ Csg (Fig.7). Já no ensaio com coloração de Tioflavina T (Fig.8), apresentaram significância as cepas de *Clostridioides difficile* ( $p < 0,05/*$ ), *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Prevotella nigrescens* ( $p < 0,0001/****$ ). Como cepas e espécies diferentes apresentam diversos perfis de formação do seu biofilme, essa ensaio não pode ser considerado um ensaio quantitativo, pois espécies conhecidas como produtoras de um biofilme forte como *Staphylococcus epidermidis* e *Fusobacterium nucleatum* normalmente apresentarão maior fluorescência devido a maior produção de biomassa no biofilme.

Ainda, o uso do perfil de fluorescência dos corantes foi aplicado a microscopia de fluorescência do biofilme das espécies estudadas. O protocolo para microscopia de fluorescência desenvolvido neste trabalho foi testado primariamente com as cepas controles,



onde *S. epidermidis* (Fig.11), *E. coli* MC4100 (Fig. 9) e *P. aeruginosa* PAO1 (Fig. 12) apresentaram fluorescência com ambas as marcações, sendo marcadas somente nos locais onde foi observada a presença de biofilme. Já em MC 4100  $\Delta$ Csg, foi possível observar a formação do biofilme, embora não tenha apresentado fluorescência nas marcações do corante (Fig.10). Esses dados demonstram a eficácia desse protocolo na marcação de amiloides em biofilmes bacterianos, além da especificidade ao se ligar a proteínas amiloides nesse biofilmes. Para as cepas de bactérias anaeróbias, o protocolo foi igualmente eficiente, onde todas as espécies testadas apresentaram fluorescência com ambos os corantes, em seus biofilmes (Fig. 13 a 22). Ainda, foi possível observar a sobreposição da marcação fluorescente de Tioflavina T e Vermelho Congo nas imagens de microscopia, fortificando a ideia de que as marcações apresentam especificidade para amiloides presentes no biofilme.

Desde seu descobrimento, a ligação antígeno-anticorpo vem sendo amplamente utilizada em diversas técnicas como forma de detecção específica de moléculas. Pensando nisso, foram utilizados anticorpos anti-fibra amiloide e anti-oligômeros para detecção dessas formas de amiloides no biofilme bacteriano. O anticorpo anti-oligômero (Oligomer A11 Polyclonal Antibody; AHB0052; Invitrogen) tem a capacidade de reconhecer oligômeros amiloides independente da sequência de aminoácidos, além de não apresentar o reconhecimento de monômeros e fibras maduras. Já o anticorpo anti-fibra (Anti-Amyloid Fibrils OC Antibody; AB2286; Merck Millipore) consegue reconhecer epítomos genéricos presentes em fibras amiloides, não reconhecendo oligômeros pré fibrilares nem proteínas em sua forma nativa. Devido a essas características, esses anticorpos foram escolhidos para identificar a presença de amiloides bacterianos ainda não identificados.

Assim, como descrito anteriormente o uso das cepas controles se fez importante para padronização do protocolo, visto que os anticorpos utilizados foram caracterizados e comercializados para uso em amiloides não bacterianos. Foi detectada ligação dos anticorpos anti-fibra (Fig.24 ) e anti- oligômero (Fig.23) nos extratos do biofilme das cepas controle positivo, *S. epidermidis* ATCC 35984, *E. coli* MC4100 e *P. aeruginosa* PAO1. Enquanto a cepa MC4100  $\Delta$ Csg, não apresentou ligação com nenhum dos anticorpos utilizados.

Na membrana tratada com anticorpos anti-oligômero, todas as cepas de bactérias anaeróbias apresentaram ligação aos anticorpos, apresentando uma maior fluorescência as cepas de *F. nucleatum*, *P. melaninogenica*, *P. intermedia* e *P. nigrescens*. Na membrana com

anticorpos anti-fibra amiloide, também foi possível observar a detecção nas cepas de bactérias anaeróbias testadas, tendo apresentado maior fluorescência as cepas de *F. nucleatum*, *P. melaninogenica*, *Bacteroides fragilis* 638R. Observou-se também uma tendência na maioria das cepas, em apresentar menor ligação dos anticorpos nos grupos tratados com ácido fórmico, o que pode estar relacionado com a capacidade do ácido fórmico em modificar e dissolver fibras amiloides (Klunk, W. E., Pettegrew, J. W., 1990).

Realizar uma identificação *in silico* exata de novas proteínas amiloides no proteoma de organismos apresenta grandes dificuldades, visto que os softwares existentes para esse tipo de análise não conseguem realizar uma separação de proteínas amiloidogênicas de não-amiloidogênicas. Esses softwares analisam uma série de fatores que podem estar relacionados com esse tipo de proteína, como nível de desordem, insolubilidade, regiões de maior propensão a agregação, sequências específicas de aminoácidos hidrofóbicos. Sendo então uma análise multifatorial, baseando em *cutoff* gerados por análises de amiloides já caracterizados, uma melhor opção para esse tipo de análise.

Na análise *in silico* de *F. nucleatum* foi possível chegar a 23 possíveis proteínas amiloides (Tabela 2), essas proteínas foram analisadas softwares como AlphaFold e PyMOL para predição de suas estruturas, além da comparação das predições para maior confiabilidade do resultado (Fig.10). Em relação a função das proteínas, foi possível ver que algumas proteínas selecionadas pela análise *in silico* podem apresentar funções que poderiam estar envolvidas na resistência a antimicrobianos. Proteínas NusG tem sido relacionada com a ativação de proteínas relacionadas a resistência a antimicrobianos em *B. subtilis* (Takada *et al*, 2022). Os transportadores da família ABC também são relacionados ao efluxo de drogas levando a um fenômeno de resistência a múltiplas drogas em bactérias (Orelle.C., Mathieu K., Jault J., 2019). Além disso, moléculas que compõem a célula bacteriana podem fazer parte de sistemas de resistência, como lipoproteínas e outras moléculas (MacDermott-Oneskin H.I., Gupta V., O'mara M. L., 2022). Ainda, entre as proteínas recuperadas foi encontrada a proteína AVQ15310.1 que possui domínio de Transtirretina. Em humanos a proteína transtirretina possui capacidade de se ligar à hormônios da tireoide, transpassar a barreira hematoencefálica, além de ser responsável por amiloidoses.

Com esse estudo, esperamos aumentar o entendimento sobre bactérias anaeróbias e seu papel na relação entre o microbioma e doenças neurodegenerativas, além de enriquecer a pesquisa sobre amiloides funcionais bacterianos demonstrando a presença dessas proteínas em

novas espécies, além das já caracterizadas na literatura. Para isso, continuaremos as análises *in silico* com as outras cepas do estudo, além de métodos de purificação e identificação desses amiloides, para então caracterizar essas proteínas e suas funções para célula bacteriana, sua patogênese e relação com o hospedeiro.

## 7 Conclusão

- Foi detectada a produção de proteínas amiloides no crescimento das bactérias anaeróbias estritas estudadas, através do corante Vermelho do congo;
- Ensaio do biofilme detectaram a presença de proteínas amiloides no biofilme das bactérias anaeróbias estritas estudadas;
- Foi possível padronizar um protocolo para detecção de amiloides bacterianos no biofilme através de microscopia de fluorescência com corantes específicos Tioflavina T e vermelho congo;
- Proteínas amiloides foram detectadas em extrato bruto do biofilme das cepas de bactérias anaeróbias estudadas;
- Detecção de amiloides bacterianos no biofilme com o uso de anticorpos anti-oligômeros A11 e anti-fibra OC.
- Análises *in silico* da cepa *Fusobacterium nucleatum* evidenciaram 23 possíveis proteínas amiloides, que apresentam funções na patogenicidade, resistência a antimicrobianos e outras funções celulares;
- Análise *in silico* de *Fusobacterium nucleatum* evidenciou como possível amiloide a proteína AVQ15310.1 que possui domínio transtirretina, que em humanos está associado a amiloidoses;

## 8 Referências bibliográficas

- Alves, J., Peres, S., Gonçalves, E., & Mansinho, K. (2017). Bactérias Anaeróbias com Relevância Clínica: Classificação Taxonómica e Morfológica, Presença na Microbiota Humana e Diagnóstico Microbiológico. *Acta Médica Portuguesa*, 30(5), 409–417. <https://doi.org/10.20344/amp.8098>
- Aron-Wisnewsky, Judith, Vigliotti, C., Witjes, J., Le, P., Holleboom, A. G., Verheij, J., Clément, K. (2020). Gut microbiota and human NAFLD: disentangling microbial signatures from metabolic disorders. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 17(5), 279–297. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-0269-9>
- Bäckhed, F., Fraser, C. M., Ringel, Y., Sanders, M. E., Sartor, R. B., Sherman, P. M., Versalovic, J., Young, V., & Finlay, B. B. (2012). Defining a Healthy Human Gut Microbiome: Current Concepts, Future Directions, and Clinical Applications. *Cell Host & Microbe*, 12(5), 611–622. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.10.013>
- Barnhart, M. M., & Chapman, M. R. (2006). Curli Biogenesis and Function. *Annual Review of Microbiology*, 60(1), 131–147. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.60.080805.142106>
- Beydoun, M. A., Beydoun, H. A., Hossain, S., El-Hajj, Z. W., Weiss, J., & Zonderman, A. B. (2020). Clinical and Bacterial Markers of Periodontitis and Their Association with Incident All-Cause and Alzheimer's Disease Dementia in a Large National Survey. *Journal of Alzheimer's Disease*, 75(1), 157–172. <https://doi.org/10.3233/JAD-200064>
- Bi, T. M., & Daggett, V. (2018). The Role of  $\alpha$ -sheet in Amyloid Oligomer Aggregation and Toxicity. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 91(3), 247–255.
- Biancalana, M., & Koide, S. (2010). Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1804(7), 1405–1412. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.04.001>
- Boursier, Jérôme, Mueller, O., Barret, M., Machado, M., Fizanne, L., Araujo-perez, F., Diehl, A. M. (2017). The severity of NAFLD is associated with gut dysbiosis and shift in the metabolic function of the gut microbiota. *Hepatology*, 63(3), 764–775. <https://doi.org/10.1002/hep.28356>
- Branda, S. S., Chu, F., Kearns, D. B., Losick, R., & Kolter, R. (2006). A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Molecular Microbiology*, 59(4), 1229–1238. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.05020.x>
- Cao, Y., Neu, J., Blanchard, A. E., Lu, T., & You, L. (2021). Repulsive expansion dynamics in colony growth and gene expression. *PLOS Computational Biology*, 17(3), e1008168. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1008168>
- Chapman, M. R., Robinson, L. S., Pinkner, J. S., Roth, R., Heuser, J., Hammar, M., Normark, S., & Hultgren, S. J. (2002). Role of *Escherichia coli* Curli Operons in Directing Amyloid Fiber Formation. *Science*, 295(5556), 851–855. <https://doi.org/10.1126/science.1067484>
- Chen, Y., Huang, Z., Tang, Z., Huang, Y., Huang, M., Liu, H., Ziebolz, D., Schmalz, G., Jia, B., & Zhao, J. (2022). More Than Just a Periodontal Pathogen –the Research Progress on *Fusobacterium nucleatum*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.815319>
- Cherny, I., Rockah, L., Levy-Nissenbaum, O., Gophna, U., Ron, E. Z., & Gazit, E. (2005). The Formation of *Escherichia coli* Curli Amyloid Fibrils is Mediated by Prion-like Peptide Repeats. *Journal of Molecular Biology*, 352(2), 245–252. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.07.028>
- Claessen, D., Rink, R., de Jong, W., Siebring, J., de Vreugd, P., Boersma, F. G. H., Dijkhuizen, L., & Wösten, H. A. B. (2003). A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in *Streptomyces coelicolor* by forming amyloid-like fibrils. *Genes & Development*, 17(14), 1714–1726. <https://doi.org/10.1101/gad.264304>
- Csillag, K., Emri, T., Rangel, D. E. N., & Pócsi, I. (2023). pH-dependent effect of Congo Red on the growth of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus niger*. *Fungal Biology*, 127(7–8), 1180–1186. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2022.05.006>
- Driks, A. (2011). Tapping into the biofilm: insights into assembly and disassembly of a novel amyloid fibre in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 80(5), 1133–1136. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07666.x>
- Dua P., Zhao. Y. (2015). Microbial Sources of Amyloid and Relevance to Amyloidogenesis and Alzheimer's Disease (AD). *Journal of Alzheimer's Disease & Parkinsonism*, 05(01). <https://doi.org/10.4172/2161-0460.1000177>

- Dueholm, M. S., Otzen, D., & Nielsen, P. H. (2013). Evolutionary Insight into the Functional Amyloids of the Pseudomonads. *PLoS ONE*, 8(10), e76630. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076630>
- Dueholm, M. S., Petersen, S. v., Sønderkær, M., Larsen, P., Christiansen, G., Hein, K. L., Enghild, J. J., Nielsen, J. L., Nielsen, K. L., Nielsen, P. H., & Otzen, D. E. (2010). Functional amyloid in *Pseudomonas*. *Molecular Microbiology*, 77(4), 1009–1020. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07269.x>
- Ferreira, E. de O., Teixeira, F. L., Cordeiro, F., Araujo Lobo, L., Rocha, E. R., Smith, J. C., & Domingues, R. M. C. P. (2013). The Bfp60 surface adhesin is an extracellular matrix and plasminogen protein interacting in *Bacteroides fragilis*. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(8), 492–497. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.06.008>
- Feter, N., Leite, J. S., Caputo, E. L., Cardoso, R. K., & Rombaldi, A. J. (2021). Who are the people with Alzheimer's disease in Brazil? Findings from the Brazilian Longitudinal Study of Aging. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 24. <https://doi.org/10.1590/1980-549720210018>
- Flemming, H.-C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2416>
- Gallo, P. M., Rapsinski, G. J., Wilson, R. P., Oppong, G. O., Sriram, U., Goulian, M., Buttaro, B., Caricchio, R., Gallucci, S., & Tükel, Ç. (2015). Amyloid-DNA Composites of Bacterial Biofilms Stimulate Autoimmunity. *Immunity*, 42(6), 1171–1184. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.06.003>
- Giry, M., Gorbenko, G., Maliyov, I., Trusova, V., Mizuguchi, C., Saito, H., & Kinnunen, P. (2016). Combined thioflavin T-Congo red fluorescence assay for amyloid fibril detection. *Methods and Applications in Fluorescence*, 4(3). <https://doi.org/10.1088/2050-6120/4/3/034010>
- Gophna, U., Barlev, M., Seijffers, R., Oelschlager, T. A., Hacker, J., & Ron, E. Z. (2001). Curli Fibers Mediate Internalization of *Escherichia coli* by Eukaryotic Cells. *Infection and Immunity*, 69(4), 2659–2665. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.4.2659-2665.2001>
- Grice, E. A., & Segre, J. A. (2011). The skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 9(4), 244–253. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2538>
- Hall, C. W., & Mah, T.-F. (2017). Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3), 276–301. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux010>
- Han, Y. W. (2015). *Fusobacterium nucleatum*: a commensal-turned pathogen. *Current Opinion in Microbiology*, 23, 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.11.014>
- Hetz, C., Bono, M. R., Barros, L. F., & Lagos, R. (2002). Microcin E492, a channel-forming bacteriocin from *Klebsiella pneumoniae*, induces apoptosis in some human cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(5), 2696–2701. <https://doi.org/10.1073/pnas.052709700>
- Hou, K., Wu, Z.-X., Chen, X.-Y., Wang, J.-Q., Zhang, D., Xiao, C., Zhu, D., Koya, J. B., Wei, L., Li, J., & Chen, Z.-S. (2022). Microbiota in health and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 135. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00974-5>
- Jeter, C., & Matthyse, A. G. (2005). Characterization of the Binding of Diarrheagenic Strains of *E. coli* to Plant Surfaces and the Role of Curli in the Interaction of the Bacteria with Alfalfa Sprouts. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18(11), 1235–1242. <https://doi.org/10.1094/MPMI-18-1235>
- Jia, L., Han, N., Du, J., Guo, L., Luo, Z., & Liu, Y. (2019). Pathogenesis of Important Virulence Factors of *Porphyromonas gingivalis* via Toll-Like Receptors. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00263>
- Karigoudar, R. M., Karigoudar, M. H., Wavare, S. M., & Mangalgi, S. S. (2019). Detection of biofilm among uropathogenic *Escherichia coli* and its correlation with antibiotic resistance pattern. *Journal of Laboratory Physicians*, 11(01), 017–022. [https://doi.org/10.4103/JLP.JLP\\_98\\_19](https://doi.org/10.4103/JLP.JLP_98_19)
- Klunk, W. E., & Pettegrew, J. W. (1990). Alzheimer's  $\beta$ -Amyloid Protein Is Covalently Modified when Dissolved in Formic Acid. *Journal of Neurochemistry*, 54(6), 2050–2056. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1990.tb04910.x>
- Leite, S., Cotias, C., Rainha, K. C., Santos, M. G., Penna, B., F.Moraes, R. F., Harmanus, C., Smits, W. K., & Ferreira, E. de O. (2023). Prevalence of *Clostridioides difficile* in dogs (*Canis familiaris*) with gastrointestinal disorders in Rio de Janeiro. *Anaerobe*, 83, 102765. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2023.102766>

- Levy, M., Kolodziejczyk, A. A., Thaïss, C. A., & Elinav, E. (2017). Dysbiosis and the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 17(4), 219–232. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.8>
- Loomba, R., Seguritan, V., Li, W., Long, T., Klitgord, N., Bhatt, A., ... Diego, S. (2018). Gut microbiome based metagenomic signature for non-invasive detection of advanced fibrosis in human nonalcoholic fatty liver disease. 25(5), 1054–1062. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.04.001>.
- MacDermott-Opeskin, H. I., Gupta, V., & O'Mara, M. L. (2022). Lipid-mediated antimicrobial resistance: a phantom menace or a new hope? *Biophysical Reviews*, 14(1), 145–162. <https://doi.org/10.1007/s12551-021-00912-8>
- Martinez-Guryn, K., Hubert, N., Frazier, K., Urlass, S., Musch, M. W., Ojeda, P., Pierre, J. F., Miyoshi, J., Sontag, T. J., Cham, C. M., Reardon, C. A., Leone, V., & Chang, E. B. (2018). Small Intestine Microbiota Regulate Host Digestive and Absorptive Adaptive Responses to Dietary Lipids. *Cell Host & Microbe*, 23(4), 458-469.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.03.012>
- Methé, B. A., Nelson, K. E., Pop, M., Creasy, H. H., Giglio, M. G., Huttenhower, C., Gevers, D., Petrosino, J. F., Abubucker, S., Badger, J. H., Chinwalla, A. T., Earl, A. M., Fitzgerald, M. G., Fulton, R. S., Hallsworth-Pepin, K., Lobos, E. A., Madupu, R., Magrini, V., Martin, J. C., White, O. (2012b). A framework for human microbiome research. *Nature*, 486(7402), 215–221. <https://doi.org/10.1038/nature11210>
- Miller, A. L., Bessho, S., Grando, K., & Tükel, Ç. (2021). Microbiome or Infections: Amyloid-Containing Biofilms as a Trigger for Complex Human Diseases. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.638868>
- Mirzaei, R., Mirzaei, H., Alikhani, M. Y., Sholeh, M., Arabestani, M. R., Saidijam, M., Karampoor, S., Ahmadyousefi, Y., Moghadam, M. S., Irajian, G. R., Hasanvand, H., & Yousefimashouf, R. (2020). Bacterial biofilm in colorectal cancer: What is the real mechanism of action? *Microbial Pathogenesis*, 142, 104052. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104053>
- Molina-García, L., Gasset-Rosa, F., Moreno-del Álamo, M., Fernández-Tresguerres, M. E., Moreno-Díaz de la Espina, S., Lurz, R., & Giraldo, R. (2016). Functional amyloids as inhibitors of plasmid DNA replication. *Scientific Reports*, 6(1), 25425. <https://doi.org/10.1038/srep25426>
- Morais, M. L. G. dos S., Santos, M. G. C., Costa, C. L., Martins, C. S., Leitão, R. F. de C., de Melo Pacífico, D., Quesada-Gómez, C., Castelo Branco, D., Ferreira, E. de O., & Brito, G. A. de C. (2022). Comparative biofilm-forming ability between *Clostridioides difficile* strains isolated in Latin America and the epidemic NAP1/027 strain. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1033698>
- Murugesan, S., Hansen, E., Perera, S., Flores, P., Tukel, C., & White, A. (2022). Purification of the Bacterial Amyloid “Curli” from *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* and Detection of Curli from Infected Host Tissues. *BIO-PROTOCOL*, 12(10). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.4420>
- Nichols, E., Szeke, C. E. I., Vollset, S. E., Abbasi, N., Abd-Allah, F., Abdela, J., Aichour, M. T. E., Akinyemi, R. O., Alahdab, F., Asgedom, S. W., Awasthi, A., Barker-Collo, S. L., Baune, B. T., Béjot, Y., Belachew, A. B., Bennett, D. A., Biadgo, B., Bijani, A., bin Sayeed, M. S., Murray, C. J. L. (2019). Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology*, 18(1), 88–106. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30403-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30403-4)
- O'Nuallain, B., & Wetzel, R. (2002). Conformational Abs recognizing a generic amyloid fibril epitope. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(3), 1485–1490. <https://doi.org/10.1073/pnas.022662599>
- Oh, J., Kim, J.-G., Jeon, E., Yoo, C.-H., Moon, J. S., Rhee, S., & Hwang, I. (2007). Amyloidogenesis of Type III-dependent Harpins from Plant Pathogenic Bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 282(18), 13601–13609. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602576201>
- Orelle, C., Mathieu, K., & Jault, J.-M. (2019). Multidrug ABC transporters in bacteria. *Research in Microbiology*, 170(8), 381–391. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2019.06.001>
- Otzen, D. (2010). Functional amyloid. *Prion*, 4(4), 256–264. <https://doi.org/10.4161/pri.4.4.13677>
- Peschel, A., & Otto, M. (2013). Phenol-soluble modulins and staphylococcal infection. *Nature Reviews Microbiology*, 11(10), 667–673. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3110>
- Petersen, C., & Round, J. L. (2014). Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cellular Microbiology*, 16(7), 1024–1033. <https://doi.org/10.1111/cmi.12308>
- Peterson, L. W., & Artis, D. (2014). Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nature Reviews Immunology*, 14(3), 141–153. <https://doi.org/10.1038/nri3608>

- Pierce, J. v., & Bernstein, H. D. (2016). Genomic Diversity of Enterotoxigenic Strains of *Bacteroides fragilis*. PLOS ONE, 11(6), e0158171. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158172>
- Podolsky, D. K. (2002). Inflammatory Bowel Disease. New England Journal of Medicine, 347(6), 417–429. <https://doi.org/10.1056/NEJMra020831>
- Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C. M., Halliday, G. M., Brundin, P., Volkmann, J., Schrag, A.-E., & Lang, A. E. (2017). Parkinson disease. Nature Reviews Disease Primers, 3(1), 17013. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.14>
- Pokusaeva, K., Johnson, C., Luk, B., Uribe, G., Fu, Y., Oezguen, N., Matsunami, R. K., Lugo, M., Major, A., Mori-Akiyama, Y., Hollister, E. B., Dann, S. M., Shi, X. Z., Engler, D. A., Savidge, T., & Versalovic, J. (2017). GABA producing *Bifidobacterium dentium* modulates visceral sensitivity in the intestine. Neurogastroenterology & Motility, 29(1). <https://doi.org/10.1111/nmo.12904>
- Reichhardt, C., Jacobson, A. N., Maher, M. C., Uang, J., McCrate, O. A., Eckart, M., & Cegelski, L. (2015). Congo Red Interactions with Curli-Producing *E. coli* and Native Curli Amyloid Fibers. PLOS ONE, 10(10), e0140388. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140389>
- Reigstad, C. S., Salmons, C. E., III, J. F. R., Szurszewski, J. H., Linden, D. R., Sonnenburg, J. L., Farrugia, G., & Kashyap, P. C. (2015). Gut microbes promote colonic serotonin production through an effect of short-chain fatty acids on enterochromaffin cells. The FASEB Journal, 29(4), 1395–1403. <https://doi.org/10.1096/fj.14-259598>
- Rios-Covian, D., Cuesta, I., Alvarez-Buylla, J. R., Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., & de los Reyes-Gavilán, C. G. (2016). *Bacteroides fragilis* metabolises exopolysaccharides produced by *bifidobacteria*. BMC Microbiology, 16(1), 150. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0773-9>
- Rizzatti, G., Lopetuso, L. R., Gibiino, G., Binda, C., & Gasbarrini, A. (2017). Proteobacteria: A Common Factor in Human Diseases. BioMed Research International, 2017, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2017/9351507>
- Rodiño-Janeiro, B. K., Vicario, M., Alonso-Cotner, C., Pascua-García, R., & Santos, J. (2018). A Review of Microbiota and Irritable Bowel Syndrome: Future in Therapies. Advances in Therapy, 35(3), 289–310. <https://doi.org/10.1007/s12325-018-0673-5>
- Romero, D., Aguilar, C., Losick, R., & Kolter, R. (2010) Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107(5), 2230–2234.
- Rousseau, F., Schimkowitz, J., & Serrano, L. (2006). Protein aggregation and amyloidosis: confusion of the kinds? Current Opinion in Structural Biology, 16(1), 118–126. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2006.01.011>
- Rutsch, A., Kantsjö, J. B., & Ronchi, F. (2020). The Gut-Brain Axis: How Microbiota and Host Inflammasome Influence Brain Physiology and Pathology. Frontiers in Immunology, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.604179>
- Ryu, J.-H., & Beuchat, L. R. (2005). Biofilm Formation by *Escherichia coli* O157:H7 on Stainless Steel: Effect of Exopolysaccharide and Curli Production on Its Resistance to Chlorine. Applied and Environmental Microbiology, 71(1), 247–254. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.247-254.2005>
- Sampson, T. R & Mazmanian, S. K. (2016). Control of Brain Development, Function, and Behavior by the Microbiome. Physiology & Behavior, 176(3), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.04.011>
- Schwalm, N. D., & Groisman, E. A. (2017). Navigating the Gut Buffet: Control of Polysaccharide Utilization in *Bacteroides spp.* Trends in Microbiology, 25(12), 1005–1015. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.06.010>
- Schwartz, K., & Boles, B. R. (2013). Microbial amyloids – functions and interactions within the host. Current Opinion in Microbiology, 16(1), 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.12.002>
- Sharma, G., Garg, N., Hasan, S., & Shirodkar, S. (2022). Prevotella: An insight into its characteristics and associated virulence factors. Microbial Pathogenesis, 169, 105673. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105674>
- Silva, J. O., Martins Reis, A. C., Quesada-Gómez, C., Pinheiro, A. Q., Freire, R. S., Oriá, R. B., & de Carvalho, C. B. M. (2014). In vitro effect of antibiotics on biofilm formation by *Bacteroides fragilis* group strains isolated from intestinal microbiota of dogs and their antimicrobial susceptibility. Anaerobe, 28, 24–28. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.04.010>
- Sormanni, P., Aprile, F. A., & Vendruscolo, M. (2015). The CamSol Method of Rational Design of Protein Mutants with Enhanced Solubility. Journal of Molecular Biology, 427(2), 478–490. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.09.026>



- Stinson, L. F., Payne, M. S., & Keelan, J. A. (2017). Planting the seed: Origins, composition, and postnatal health significance of the fetal gastrointestinal microbiota. *Critical Reviews in Microbiology*, 43(3), 352–369. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1211089>
- Takada, H., Mandell, Z. F., Yakhnin, H., Glazyrina, A., Chiba, S., Kurata, T., Wu, K. J. Y., Tresco, B. I. C., Myers, A. G., Aktinson, G. C., Babitzke, P., & Hauryliuk, V. (2022). Expression of *Bacillus subtilis* ABCF antibiotic resistance factor VmlR is regulated by RNA polymerase pausing, transcription attenuation, translation attenuation and (p)ppGpp. *Nucleic Acids Research*, 50(11), 6174–6189. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac497>
- Teixeira, F. L., Pauer, H., Costa, S. B., Smith, C. J., Domingues, R. M. C. P., Rocha, E. R., & Lobo, L. A. (2018). Deletion of BmoR affects the expression of genes related to thiol/disulfide balance in *Bacteroides fragilis*. *Scientific Reports*, 8(1), 14405. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32880-8>
- Tijerina-Rodríguez, L., Villarreal-Treviño, L., Morfin-Otero, R., Camacho-Ortiz, A., & Garza-González, E. (2019). Virulence Factors of *Clostridioides* ( *Clostridium* ) *difficile* Linked to Recurrent Infections. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 2019, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2019/7127851>
- Trindade, C. N. R., Domingues, R. M. C. P., & Ferreira, E. O. (2019). The epidemiology of *Clostridioides difficile* infection in Brazil: A systematic review covering thirty years. *Anaerobe*, 58, 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.03.002>
- Tursi, S. A., Puligedda, R. D., Szabo, P., Nicastro, L. K., Miller, A. L., Qiu, C., ... Tükel, Ç. (2020). *Salmonella Typhimurium* biofilm disruption by a human antibody that binds a pan-amyloid epitope on curli. *Nature Communications*, 11(1), 1–13. 2020
- Van Gerven, N., van der Verren, S. E., Reiter, D. M., & Remaut, H. (2018). The Role of Functional Amyloids in Bacterial Virulence. *Journal of Molecular Biology*, 430(20), 3657–3684. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.07.011>
- Villard, A., Boursier, J., & Andriantsitohaina, R. (2021). Bacterial and eukaryotic extracellular vesicles and nonalcoholic fatty liver disease: new players in the gut-liver axis? *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 320(4), G485–G495. <https://doi.org/10.1152/AJPGI.00362.2020>
- Walker, L. C., Schelle, J., & Jucker, M. (2016). The Prion-Like Properties of Amyloid- $\beta$  Assemblies: Implications for Alzheimer's Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(7), a024398. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a024398>
- Walsh, I., Seno, F., Tosatto, S. C. E., & Trovato, A. (2014). PASTA 2.0: an improved server for protein aggregation prediction. *Nucleic Acids Research*, 42(W1), W301–W307. <https://doi.org/10.1093/nar/gku399>
- Wang, B. et al (2017). The Human Microbiota in Health and Disease. *Engineering*, 3(1), 71– 82, 2017
- Wang, R. et al (2007). Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. *Nature Medicine*, 13(12), 1510–1514. <https://doi.org/10.1038/nm1656>
- Wong, C. B., Sugahara, H., Odamaki, T., & Xiao, J. Z. (2018). Different physiological properties of human-residential and non-human-residential bifidobacteria in human health. *Beneficial Microbes*, 9(1), 111–122. <https://doi.org/10.3920/BM2017.0031>
- Wu, S., Rhee, K.-J., Albesiano, E., Rabizadeh, S., Wu, X., Yen, H.-R., Huso, D. L., Brancati, F. L., Wick, E., McAllister, F., Housseau, F., Pardoll, D. M., & Sears, C. L. (2009). A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nature Medicine*, 15(9), 1016–1022. <https://doi.org/10.1038/nm.2015>
- Xi, Y., Yan, J., Li, M., Ying, S., & Shi, Z. (2019). Gut microbiota dysbiosis increases the risk of visceral gout in goslings through translocation of gut-derived lipopolysaccharide. *Poultry Science*, 98(11), 5361–5373. <https://doi.org/10.3382/ps/pez358>
- Xue, C., Lin, T. Y., Chang, D., & Guo, Z. (2017). Thioflavin T as an amyloid dye: Fibril quantification, optimal concentration and effect on aggregation. *Royal Society Open Science*, 4(1). <https://doi.org/10.1098/rsos.160696>
- Yakupova, E. I., Bobyleva, L. G., Vikhlyantsev, I. M., & Bobylev, A. G. (2019). Congo Red and amyloids: history and relationship. *Bioscience Reports*, 39(1). <https://doi.org/10.1042/BSR20181415>
- Yano, J. M., Yu, K., Donaldson, G. P., Shastri, G. G., Ann, P., Ma, L., Nagler, C. R., Ismagilov, R. F., Mazmanian, S. K., & Hsiao, E. Y. (2015). Indigenous Bacteria from the Gut Microbiota Regulate Host Serotonin Biosynthesis. *Cell*, 161(2), 264–276. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.047>

- Yu, B., Li, S., Chen, C., Xu, J., Qiu, W., Wu, X., & Chen, R. (2017). Prediction subcellular localization of Gram-negative bacterial proteins by support vector machine using wavelet denoising and Chou's pseudo amino acid composition. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 167, 102–112. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2017.05.009>
- Zeng, G., Vad, B. S., Dueholm, M. S., Christiansen, G., Nilsson, M., Tolker-Nielsen, T., Nielsen, P. H., Meyer, R. L., & Otzen, D. E. (2015). Functional bacterial amyloid increases *Pseudomonas* biofilm hydrophobicity and stiffness. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01099>
- Zhang, Y. (2014). Persisters, persistent infections and the Yin–Yang model. *Emerging Microbes & Infections*, 3(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/emi.2014.3>
- Zhao, L., Zhang, F., Ding, X., Wu, G., Lam, Y. Y., Wang, X., Fu, H., Xue, X., Lu, C., Ma, J., Yu, L., Xu, C., Ren, Z., Xu, Y., Xu, S., Shen, H., Zhu, X., Shi, Y., Shen, Q., Zhang, C. (2018). Gut bacteria selectively promoted by dietary fibers alleviate type 2 diabetes. *Science*, 359(6380), 1151–1156. <https://doi.org/10.1126/science.aao5775>
- Zhou, Y., Smith, D. R., Hufnagel, D. A., & Chapman, M. R. (2013). Experimental Manipulation of the Microbial Functional Amyloid Called Curli (pp. 53–75). [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-245-2\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-245-2_4)