



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Faculdade de Ciências Médicas

Andréa Fonseca Ferreira

**Atividade probiótica de *Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus casei* na imunomodulação e na aderência de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) em células intestinais Caco-2**

Rio de Janeiro

2019

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

F383 Ferreira, Andréa Fonseca.  
Atividade probiótica de *Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus casei* na imunomodulação e na aderência de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) em células intestinais Caco-2 / Andréa Fonseca Ferreira – 2019.  
74 f.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Cláudia de Paula Rosa Ignácio  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Wania Ferraz Pereira Manfro

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Microbiologia.

1. *Escherichia coli* - Teses. 2. *Bifidobacterium animalis*. 3. Probióticos. 4. Imunomodulação. 5. Citocinas - Teses. I. Ignácio, Ana Cláudia de Paula Rosa. II. Manfro, Wania Ferraz Pereira. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 576.851.48

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira  
CRB7/6382

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Andréa Fonseca Ferreira

**Atividade probiótica de *Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus casei* na imunomodulação e na aderência de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) em células intestinais Caco-2**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Cláudia de Paula Rosa Ignácio

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Wania Ferraz Pereira Manfro

Rio de Janeiro

2019

Andréa Fonseca Ferreira

**Atividade probiótica de *Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus casei* na imunomodulação e na aderência de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) em células intestinais Caco-2**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Wania Ferraz Pereira Manfro  
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Aprovada em 31 de outubro de 2019.

Banca Examinadora: \_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Claudia de Paula Rosa Ignacio (Orientadora)  
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Mara Lucia Penna Queiroz  
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Silvia Amaral Gonçalves da Silva  
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Aloysio de Mello Figueiredo Cerqueira  
Universidade Federal Fluminense

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Marco Antônio Lemos Miguel  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro  
2019

## DEDICATÓRIA

Ao meu filho, Angelo José Ferreira Barboza,  
meu único motivo de nunca desistir  
e continuar a querer crescer.  
Te amo!

## AGRADECIMENTOS

À Universidade do Estado do Rio de Janeiro, por ser o local da realização de muitos dos meus sonhos, pelas lições que aqui aprendi e pelas lembranças que levarei ao longo da vida.

Ao Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, em especial a todo o corpo docente e à equipe técnica da Disciplina de Microbiologia e Imunologia por possibilitar a realização deste trabalho e pelo valioso aprendizado.

À minha orientadora Ana Cláudia de Paula Rosa Ignácio por sua orientação, preciosa paciência, infinita gentileza, seu enorme carinho e insubstituível dedicação.

À minha orientadora Wania Ferraz Pereira Manfro, pela grandiosidade de sua atenção e carinho, pelos ensinamentos e pelas horas de dedicação na bancada, cruciais para a realização deste trabalho.

Ao professor Raphael Hirata (*in memoriam*) por todo auxílio, pela cessão de materiais e pelas valiosas dicas e explicações, sempre mergulhadas em gentileza, essenciais para realização dos experimentos.

Ao técnico Vinicius Alves por toda dedicação e paciência no atendimento às necessidades das culturas de células, sempre adequadas às condições experimentais, e pelas conversas e momentos de descontração.

Aos amigos do Laboratório 1, em especial Raquel Rebello, Ricardo Braga e Thays Araújo, sempre essenciais no auxílio técnico, pela ótima convivência no tempo em que estivemos juntos e, principalmente, pelo grande apoio nos momentos mais difíceis.

Aos amigos de outros laboratórios, Alexandre Monteiro, Miriam Ferreira e Sabrina Colodette, pelo suporte emocional, por me ouvirem sempre, por toda ajuda, pelas conversas e também pelos momentos de piadas e risos.

À aluna de Iniciação Científica Maysa Ferreira Andrade pela oportunidade de poder orientar, pelo imprescindível auxílio na realização dos experimentos e pelas conversas descontraídas.

Ao professor Marco Antônio Lemos Miguel, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (UFRJ), por gentilmente ceder cepas probióticas que foram utilizadas nos testes experimentais preliminares, cruciais para nortear o andamento deste trabalho.

Ao CNPq, à CAPES e à SR-2 UERJ, pelo apoio financeiro na execução do projeto.

Aos meus pais, Arlindo e Madalena, pelo incentivo, pelo apoio em minhas escolhas e por serem avós amorosos.

Aos amigos e familiares que, perto ou à distância, sempre me apoiaram, deram suporte para que eu pudesse conciliar a maternidade com dedicação ao trabalho e foram essenciais no enfrentamento de situações adversas.

A todos que conheci ao longo desses 12 anos de UERJ, seja compartilhando bons momentos, aulas, trabalho ou diversão, por sua importância na minha trajetória.

Muito obrigada!

## RESUMO

FERREIRA, Andréa Fonseca. **Atividade probiótica de *Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus casei* na imunomodulação e na aderência de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) em células intestinais Caco-2.** 2019. 74 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

*Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) é um patótipo de *E. coli* que possui o padrão de aderência agregativo em células cultivadas *in vitro*, relacionado principalmente a casos de diarreia persistente infantil. Probióticos são microrganismos vivos não patogênicos que conferem benefícios à saúde. Estes organismos usualmente promovem proteção contra patógenos, vivendo naturalmente na microbiota e são comumente encontrados em alimentos fermentados, como em laticínios. Bactérias probióticas possuem atividade contra patógenos de origem alimentar, sendo capazes de promover redução da formação de biofilme, inibição de adesão e lesão em células cultivadas *in vitro*, prevenção de diarreia de modelos *in vivo* e também imunomodulação. No presente estudo foi avaliada a atividade probiótica de duas espécies bacterianas na virulência de cepas de EAEC. As espécies probióticas *Bifidobacterium animalis* DN 173010 (Danone®) e *Lactobacillus casei* Shirota (Yakult®) foram avaliadas quanto à capacidade de imunomodulação e interferência na aderência das cepas de EAEC 042, 1500, H92/3 e I49 em células da linhagem Caco-2, em ensaios de co-cultivo. As células Caco-2 foram submetidas à infecção por cepas de EAEC, na presença e na ausência de ambos os probióticos, separados e em conjunto. As cepas de EAEC estudadas induziram o intenso aumento da produção de IL-8 pelas células Caco-2 infectadas, o que não foi observado com as outras citocinas. Em condição de sinergismo, as cepas probióticas se mostraram capazes de modular a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10 por células Caco-2 infectadas com EAEC. No entanto, as cepas probióticas não foram capazes de modular a produção de IL-8. O aumento da produção de TNF- $\alpha$ , tanto por células infectadas quanto por não infectadas com EAEC, foi induzido pelos probióticos. Os probióticos reestabeleceram a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 na infecção por EAEC. As cepas de EAEC apresentaram números de aderência quantitativa a células Caco-2 variados quando em co-cultivo com probióticos juntos e separados, tendo sua aderência aumentada ou diminuída em tapetes celulares diferenciados e não diferenciados. As cepas probióticas foram capazes de aderir a células Caco-2 diferenciadas e não diferenciadas de maneira semelhante. Estes resultados sugerem que a presença de probióticos pode interferir de maneiras variadas na infecção por cepas de EAEC distintas. O presente estudo se mostrou importante para elucidar o papel que a atividade probiótica de cepas bacterianas exerce na infecção por EAEC.

Palavras-chave: *Escherichia coli*. EAEC. *Lactobacillus*. *Bifidobacterium*. Probióticos. Imunomodulação. Aderência. Caco-2. Citocinas.



## ABSTRACT

FERREIRA, Andréa Fonseca. ***Bifidobacterium animalis* and *Lactobacillus casei* probiotic activity on immunomodulation and enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) adhesion on Caco-2 intestinal cells.** 2019. 74 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) is an *E. coli* pathotype that characteristically shows aggregative adhesion pattern on *in vitro* cultured cells, mainly related to persistent infant diarrhea cases. Probiotics are non-pathogenic living microorganisms that confer health benefits. These organisms usually provide protection against pathogens, living naturally in microbiota and are often found in fermented foods such as dairy products. Probiotic bacteria have activity against foodborne pathogens, being able to promote biofilm formation reduction, inhibition of adhesion and injury of *in vitro* cultured cells, *in vivo* models diarrhea prevention and also immunomodulation. In this study, two bacterial species probiotic activity on the virulence of EAEC strains was evaluated. Probiotic species *Bifidobacterium animalis* DN 173010 (Danone®) and *Lactobacillus casei* Shirota (Yakult®) were evaluated on immunomodulation ability and interference of EAEC 042, 1500, H92/3 and I49 strains adhesion in Caco-2 cells, under co-cultivation experiments. Caco-2 cells were submitted EAEC strains infection in presence and absence of both probiotics, separately and together. The EAEC strains substantially increased IL-8 production by infected Caco-2 cells, whereas it not occurs with other cytokines. In synergistic condition, probiotic strains proved to be able to modulate pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$  production of Caco-2 cells infected by EAEC. However, probiotic strains did not modulate IL-8 production. Increased TNF- $\alpha$  production by both infected and non-EAEC infected cells was induced by probiotics. Probiotics reestablished the anti-inflammatory cytokine IL-10 production in EAEC infection. EAEC strains showed diverse Caco-2 cell quantitative adherence numbers when co-cultivated with probiotics, which adhesion increased or decreased on differentiated and non-differentiated Caco-2 cells. Probiotic strains adhere similarly on differentiated and non-differentiated Caco-2 cells. These results suggest that probiotics presence may interfere in different ways on infection by distinct EAEC strains. This study helps to clarify the role that probiotic bacterial strains activity plays in EAEC infection.

Keywords: *Escherichia coli*. EAEC. *Lactobacillus*. *Bifidobacterium*. Probiotics. Immunomodulation. Adhesion. Caco-2. Cytokines.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 -	Características envolvidas na virulência de cepas de <i>Escherichia coli</i> diarreio gênicas.....	18
Quadro 2 -	Sorotipos, grupo filogenético, fatores de virulência e padrão de aderência das cepas de EAEC utilizadas.....	33
Figura 1 -	Produção de IL-8 por células Caco-2 expostas a diferentes cepas de EAEC e aos probióticos.....	39
Figura 2 -	Produção de IL-1 $\beta$ por células Caco-2 expostas a diferentes cepas de EAEC e aos probióticos.....	41
Figura 3 -	Produção de IL-6 por células Caco-2 expostas à cepa de EAEC I49 e aos probióticos.....	42
Figura 4 -	Produção de TNF- $\alpha$ por células Caco-2 expostas a diferentes cepas de EAEC e aos probióticos.....	44
Figura 5 -	Produção de IL-10 por células Caco-2 expostas a diferentes cepas de EAEC e aos probióticos.....	45
Figura 6 -	Aderência de cepas de EAEC a células Caco-2 polarizadas e diferenciadas na presença e na ausência de probióticos.....	47
Figura 7 -	Aderência de cepas de EAEC a células Caco-2 indiferenciadas na presença e na ausência de probióticos.....	49
Figura 8 -	Aderência das cepas probióticas <i>Bifidobacterium animalis</i> e <i>Lactobacillus casei</i> a células Caco-2.....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Aderência Agregativa
A/E	Lesões “attaching and effacing”
AAF/I	Fímbria de Aderência Agregativa do tipo I
AAF/II	Fímbria de Aderência Agregativa do tipo II
AAF/III	Fímbria de Aderência Agregativa do tipo III
AAF/IV	Fímbria de Aderência Agregativa do tipo IV
AAF/V	Fímbria de Aderência Agregativa do tipo V
AAF	Fímbria de Aderência Agregativa
AggR	Regulador transcricional global
AIEC	<i>E. coli</i> aderente invasiva
ATCC	“American Type Culture Collection”
<i>Ba</i>	<i>Bifidobacterium animalis</i>
Caco-2	Linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano
DAEC	<i>E. coli</i> de aderência difusa
DEC	<i>Escherichia coli</i> diarreioagênica
DMEM	“Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium”
DNA	Ácido desoxirribonucleico
D.O.	Densidade óptica
DP	Desvio padrão
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
EAST1	“EAEC heat-stable enterotoxin 1”
ECM	Componentes da matriz extracelular
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasora
ELISA	“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogênica
EPM	Erro padrão da média
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigênica
ExPEC	<i>E. coli</i> extra-intestinal patogênica
H	Antígeno flagelar
HEp-2	Linhagem celular de carcinoma de laringe humana

HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IECs	Células epiteliais do intestino
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IVOC	Cultura de órgãos <i>in vivo</i>
LAB	Bactérias ácido-láticas
LB	Luria-Bertani (meio de cultura)
<i>Lc</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mRNA	Ácido ribonucleico - mensageiro
MRS	Man, Rogosa e Sharpe (meio de cultura)
MUC1	Mucina transmembranar 1
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NK	“Natural-Killer”
NMEC	<i>E. coli</i> causadora de meningite neonatal
NO	Óxido nítrico
O	Antígeno somático
OMP	Proteína de membrana externa
OMS	Organização Mundial de Saúde
pAA	Plasmídeo de aderência agregativa
Pic	Proteína envolvida na colonização
PI-IBS	Síndrome do intestino irritável pós-infecciosa
PMN	Leucócitos polimorfonucleares
PRRs	Receptores de Reconhecimento de Padrões
SFB	Soro fetal bovino
SPATE	“Serine Protease Autotransporters of the <i>Enterobacteriaceae</i> ”
STEAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa produtora de toxina Shiga
STEC	<i>E. coli</i> produtora de toxina Shiga
Stx	Toxina Shiga
T84	Linhagem celular de carcinoma de cólon humano
TGI	Trato gastrintestinal
TLRs	Receptores <i>Toll</i> -like

TNF	Fator de necrose tumoral
TSA	“Trypticase Soy Agar”
UFC	Unidades formadoras de colônia
UNICEF	Fundo das Nações Unidas para a Infância
UPEC	<i>E. coli</i> uropatogênica

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
$\pm$	Mais ou menos
$\lambda$	Comprimento de onda
%	Porcentagem
$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{L}$	Microlitro
MDa	Megadalton
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
pg	Picograma
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
1	<b>PATÓGENOS INTESTINAIS E PROBIÓTICOS</b> .....	16
1.1	<i>Escherichia coli</i> <b>diarreiogênicas (DEC)</b> .....	16
1.1.1	<u>Diarreia</u> .....	19
1.2	<i>Escherichia coli</i> <b>enteroagregativa (EAEC)</b> .....	20
1.2.1	<u>Fatores de virulência em EAEC</u> .....	21
1.2.1.1	Aderência e biofilme.....	21
1.2.1.2	Toxinas.....	24
1.2.2	<u>Epidemiologia de EAEC</u> .....	25
1.3	<b>Resposta imune na infecção bacteriana do TGI</b> .....	27
1.3.1	<u>Resposta inflamatória na infecção por EAEC</u> .....	28
1.4	<b>Atividade probiótica contra patógenos de origem alimentar</b> .....	28
1.4.1	<u>Atividade probiótica de <i>Lactobacillus</i> e <i>Bifidobacterium</i></u> .....	29
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	32
2.1	<b>Objetivo geral</b> .....	32
2.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	32
3	<b>METODOLOGIA</b> .....	33
3.1	<b>Cepas bacterianas utilizadas</b> .....	33
3.2	<b>Cultivo e manutenção da linhagem celular Caco-2</b> .....	34
3.3	<b>Teste de imunomodulação</b> .....	34
3.3.1	<u>Infecção de células Caco-2</u> .....	34
3.3.2	<u>Análise da produção de citocinas</u> .....	36
3.4	<b>Teste quantitativo de aderência</b> .....	36
3.4.1	<u>Avaliação da competição na aderência de EAEC</u> .....	36
3.4.2	<u>Avaliação da aderência de probióticos a células Caco-2</u> .....	37
3.5	<b>Análise estatística</b> .....	37
4	<b>RESULTADOS</b> .....	38
4.1	<b>Avaliação da imunomodulação</b> .....	38
4.1.1	<u>Produção de IL-8</u> .....	38
4.1.2	<u>Produção de IL-1<math>\beta</math></u> .....	40
4.1.3	<u>Produção de IL-6</u> .....	41

4.1.4	<u>Produção de TNF-<math>\alpha</math></u> .....	42
4.1.5	<u>Produção de IL-10</u> .....	44
4.2	<b>Avaliação da aderência quantitativa</b> .....	46
4.2.1	<u>Competição na aderência de EAEC a células Caco-2 diferenciadas</u> .....	46
4.2.2	<u>Competição na aderência de EAEC a células Caco-2 não diferenciadas</u> .....	48
4.2.3	<u>Aderência de probióticos a células Caco-2 diferenciadas e não diferenciadas</u> .....	50
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	51
	<b>CONCLUSÕES</b> .....	61
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	62



## INTRODUÇÃO

Os representantes da espécie *Escherichia coli* pertencem à família Enterobacteriaceae e são classificados como bacilos Gram-negativos, anaeróbicos facultativos, normalmente móveis, portadores de flagelos peritríquios, oxidase negativos e não formadores de esporos. A identificação da espécie foi feita pelo médico alemão Theodor Escherich, em 1885. A partir de sua descoberta, *E. coli* tornou-se a espécie bacteriana mais extensivamente estudada, sendo um microrganismo não fastidioso e facilmente cultivável em laboratório. Cepas de *E. coli* são geneticamente manipuláveis e naturalmente adquirem elementos genéticos móveis, justificando a heterogeneidade característica da espécie (Clements *et al.*, 2012; Croxen *et al.*, 2013; Gomes *et al.*, 2016).

*E. coli* é um microrganismo comensal do trato gastrointestinal de mamíferos, fazendo parte da microbiota normal. A colonização da mucosa se inicia naturalmente nas primeiras horas após o nascimento. No cólon, *E. coli* aparece como microrganismo mais abundante na microbiota do animal, comportando-se como comensal e dificilmente se manifesta como um patógeno em indivíduos saudáveis (Kaper *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2016). No entanto, algumas cepas estão envolvidas na ocorrência de doenças em humanos e outros animais. Estas cepas são dotadas de fatores de virulência e mecanismos patogênicos que desencadeiam os sintomas da infecção por patótipos de *E. coli* (Nataro & Kaper, 1998; Clements *et al.*, 2012). Cepas de *E. coli* podem causar infecções diarreio gênicas ou extra intestinais em humanos. As infecções ocasionadas por cepas de *Escherichia coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC) ocorrem principalmente no trato urinário, causadas pela *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC). Em alguns casos, pode ocorrer a meningite bacteriana em recém-nascidos, causada pela *Escherichia coli* da meningite neonatal (NMEC) (Santos *et al.*, 2009; Clements *et al.*, 2012; Nicholson *et al.*, 2016).

# 1 PATÓGENOS INTESTINAIS E PROBIÓTICOS

## 1.1 *Escherichia coli* diarreio gênicas (DEC)

Infecções intestinais causadas por *E. coli* são desencadeadas a partir da infecção por cepas de *Escherichia coli* diarreio g ênica (DEC). As cepas de DEC (Quadro 1) são tradicionalmente classificadas em 6 categorias, baseadas nas características das síndromes clínicas, sintomas, epidemiologia, sorotipos O:H, fatores de virulência e interação com células cultivadas *in vitro*. Os seis patotipos são *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* de aderência difusa (DAEC) (Nataro & Kaper, 1998; Kaper *et al.*, 2004). Mais recentemente, os patotipos *E. coli* aderente-invasiva (AIEC) e *E. coli* enteroagregativa produtora de toxina Shiga (STEAEC) foram descritos, totalizando oito patotipos de DEC (Croxen & Finlay 2010; Frank *et al.*, 2011; Clements *et al.*, 2012; Lima *et al.*, 2018).

EHEC, EPEC e EIEC são cepas que apresentam mecanismos de virulência dependentes do Sistema de Secreção do Tipo III, o que não ocorre com os demais patotipos de DEC (Clements *et al.*, 2012). EHEC é um patógeno de ocorrência comum em países desenvolvidos e em desenvolvimento. O sorotipo O157:H7 possui alta relevância em isolados de cepas fecais em surtos causados por *E. coli*. Este sorotipo é relacionado à produção da toxina Shiga (subtipo *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga - STEC). Na infecção por EHEC/STEC, ocorre a destruição do epitélio intestinal, levando a diarreia sanguinolenta e, em casos mais graves, ao desenvolvimento de complicações como a colite hemorrágica e síndrome hemolítica urêmica (Hartlang & Leong, 2013). Apesar de ser geneticamente relacionada a EHEC, cepas de EPEC não são produtoras de toxina, sendo associadas à diarreia aguda e também à diarreia persistente em crianças de países em desenvolvimento (Nataro & Kaper, 1998; Sherman *et al.*, 2005). EHEC e EPEC são bactérias encontradas na região extracelular, enquanto EIEC se instala no ambiente intracelular. Cepas de EIEC são altamente invasoras e não produzem toxinas. O mecanismo de patogenicidade é, em muitos aspectos, semelhante ao de *Shigella*, causando dano severo à parede intestinal desencadeado pela destruição celular (Lan *et al.*, 2004; Clements *et al.*, 2012).

Cepas de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) são enterotóxicas, produzindo toxinas termolábil e termoestável. Não são invasoras do intestino delgado, sendo seu mecanismo de patogenicidade relacionado à adesão à mucosa e liberação de toxinas. ETEC é comumente associada à doença do viajante (Bourgeois *et al.*, 2016). DAEC é um patotipo de *E. coli* que forma o padrão de aderência difusa em células HEp-2 cultivadas *in vitro*. O desenvolvimento dos sintomas da infecção causada por DAEC pode estar ligado à resposta inflamatória, uma vez que ocorre o estímulo de migração de neutrófilos e secreção de citocinas pró-inflamatórias (Bétis *et al.*, 2003).

AIEC pode ser considerada um patotipo de *E. coli* comensal do intestino semelhante à ExPEC, se comportando como microrganismo oportunista que comumente causa danos intestinais aos portadores da Doença de Crohn, sendo, portanto, relacionada à doença inflamatória crônica (Martinez-Medina *et al.*, 2009; Croxen & Finlay 2010; Gomes *et al.*, 2016). STEAEC é um patotipo híbrido de *E.coli* que possui as características de EAEC O104:H4 produtora de toxina Shiga. Este patotipo foi responsável pelo surto na Alemanha em 2011, ocasião na qual foram relatados casos de síndrome hemolítica urêmica (Frank *et al.*, 2011; Clements *et al.*, 2012, Lima *et al.*, 2018).

Quadro 1 - Características envolvidas na virulência de cepas de *Escherichia coli* diarreio gênicas

Patotipo	Adesinas	Toxinas	Doença
ETEC	Fatores de colonização	Não-SPATE: Toxina termo-lábil (LT) e termo-estável (ST)	Diarreia aquosa aguda (primeira infância)
	Adesina associada a lesões A/E suína (Paa)	Citolisina A (ClyA) SPATE: Autotransportador de ETEC A (EatA)	Diarreia do viajante
EAEC	Fímbrias de aderência agregativa (AAF)	Não-SPATE: Enterotoxina termo-estável de EAEC 1 (EAST1) Enterotoxina de <i>Shigella</i> (ShET)1 Hemolisina E (HlyE)	Diarreia aguda e persistente infantil
	<i>Loci</i> de invasão toxigênica (Tia)	SPATE: Toxina codificada por plasmídeo (Pet) Proteína envolvida na colonização intestinal (Pic) Toxina autotransportadora segregada (Sat) IgA protease-like de <i>Shigella</i> (SigA) Proteína secretada por <i>E. coli</i> (Esp) P	Diarreia do viajante
STEAEC	AAF	Não-SPATE: Toxina Shiga (Stx)	Intoxicação alimentar
	Adesina homóloga IrgA (Iha)	SPATE: Pic; Pet	
DAEC	Adesina afimbrial (Afa) ou fimbrial (Dr)	SPATE: Sat	Diarreia aguda (primeira infância)
AIEC	Pili tipo I	-	Doença de Crohn
	Fímbria polar longa (LPF)		
EHEC/ STEC	Intimina	Não-SPATE: Stx	Intoxicação alimentar
	LPF		
EHEC/ STEC	Fator para aderência de <i>E. coli</i> (Efa)-1	SPATE: EspP	Intoxicação alimentar
	Adesina autoaglutinante (Saa)		
	Proteína ligante de imunoglobulina de <i>E. coli</i> (EibG)		
	Proteína de membrana Externa A (OmpA)		
Iha			
EPEC	Intimina	SPATE: EspC	Diarreia infantil
	Pili de formação de agregados (BFP)		
	Paa		
	LPF		
Iha			
EIEC	-	Não-SPATE: ShET 1/2	Shigelose (virulência e patogenicidade semelhantes)
		SPATE: Proteína extracelular de <i>Shigella</i> (SepA)	
		SigA	

Fonte: Adaptado de Clements *et al.*, 2012, p. 72.

### 1.1.1 Diarreia

Vírus, bactérias, protozoários e helmintos são agentes patogênicos que podem causar a doença diarreica, transmitidos principalmente por via fecal-oral, e onde há condições precárias de higiene e consumo de alimentos e água contaminados (Keusch *et al.*, 2006; Clasen *et al.*, 2015). Patógenos entéricos capazes de superar as defesas naturais do hospedeiro desencadeiam uma infecção que, uma vez estabelecida, leva à alteração do estado de absorção normal de água e de eletrólitos no trato gastrointestinal (TGI), cujo sintoma mais comum é a diarreia (Petri *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2017).

Diretrizes da Organização Mundial de Saúde (OMS) definem diarreia como três ou mais episódios de evacuação de fezes pastosas ou líquidas por dia. Existem três tipos de manifestações diarreicas, fisiologicamente distintas e que demandam cuidados específicos. Por definição, a diarreia aguda corresponde ao aumento abrupto de evacuações e tem duração máxima de 14 dias, sendo potencialmente autolimitada e resultando em variados graus de desidratação. A diarreia persistente tem duração superior a 14 dias e é relacionada à absorção ineficiente de nutrientes. A diarreia sanguinolenta, também chamada de disenteria, é indicativa de dano intestinal severo causado pela inflamação associada à doença (Keusch *et al.*, 2006; WHO & UNICEF, 2013; UNICEF, 2018).

A diarreia aguda ainda possui importante relevância na morbimortalidade nas populações de todas as regiões do planeta independente da faixa etária, sendo a causa de cerca de dois milhões de óbitos por ano. Entre crianças de até cinco anos, a diarreia aguda ocupa a segunda posição entre as causas de morte infantil, perdendo somente para a pneumonia. Mundialmente, nesta idade, há maior o risco de mortalidade decorrente de complicações relacionadas à diarreia. A diarreia também pode gerar outras consequências para as crianças, como a desnutrição, baixa taxa de crescimento e desenvolvimento cognitivo limitado, sobretudo em países mais pobres (Farthing *et al.*, 2013; Chowdhury *et al.*, 2015; Shen *et al.*, 2016; UNICEF, 2018).

De acordo com dados do UNICEF (2018), no ano de 2016 cerca de 8% (mais de 475 mil óbitos) das mortes de crianças na primeira infância em todo o mundo está relacionada a doenças diarreicas. Estes números representam a morte de mais de 1300 crianças por dia. Regiões mais pobres de países da África, América Latina, Ásia e Oriente Médio são as majoritariamente afetadas. No Brasil, o número de óbitos de crianças menores de cinco anos

relacionados à diarreia chegou a 1122, representando cerca de 3% do total de mortes nesta faixa etária (Chowdhury *et al.*, 2015; Salmani *et al.*, 2016; UNICEF, 2018).

Casos de diarreia aguda ou persistente que ocorrem tanto nos países subdesenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento e que são ocasionados principalmente pela infecção por *E. coli* diarreiogênicas (DEC) são um importante problema de saúde pública, sobretudo entre bebês e crianças na que vivem em condições precárias de higiene, saneamento básico e acesso à saúde (Keusch *et al.*, 2006; Farthing *et al.*, 2013; Gomes *et al.*, 2016).

A morbimortalidade da síndrome diarreica está diretamente ligada a casos em que há graus elevados de desidratação e tratamento inadequado para reversão do quadro. A OMS preconiza o tratamento eficaz e promove medidas preventivas à infecção, visando reduzir a mortalidade infantil. Dependendo do quadro, o tratamento envolve a administração de solução oral de eletrólitos para reidratação, suplementação de zinco e uso de antibióticos adequados. Os tratamentos estão associados a medidas preventivas, como o aleitamento materno, imunização contra agentes patogênicos e promoção da higiene e saneamento básico (Keusch *et al.*, 2006; WHO & UNICEF, 2004; WHO & UNICEF, 2013; UNICEF, 2018).

## 1.2 *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC)

*Escherichia coli* enteroagregativa EAEC é um patógeno heterogêneo emergente que está associado à ocorrência de diarreia aguda e persistente em crianças e adultos, sobretudo indivíduos imunocomprometidos, portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e em condições precárias de saneamento básico. EAEC vem sendo cada vez mais reconhecida como um dos principais patógenos causadores de diarreia aguda em crianças que requerem hospitalização e também na doença do viajante, tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos (Navarro-Garcia & Elias, 2011; Estrada-Garcia *et al.*, 2014; Lima *et al.*, 2018). A detecção de EAEC em casos de diarreia sobressaltou a atenção de órgãos de saúde e cientistas para este patótipo de *E. coli*, o que favoreceu inclusive a categorização como organismo de potencial uso em bioterrorismo pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (Huang *et al.*, 2004; Kaur *et al.*, 2010).

A primeira identificação e descrição de EAEC ocorreu em 1987, a partir do isolamento de cepas de *E. coli* provenientes das fezes de crianças com diarreia no Chile. Em ensaios de interação com células HEP-2, provenientes de carcinoma de laringe humana e cultivadas *in*

*vitro*, algumas cepas isoladas no estudo manifestavam um padrão de aderência característico (Nataro *et al.*, 1987; Hebbelstrup Jensen *et al.*, 2014). Assim, EAEC é definida como um patotipo clássico de *E. coli* que não produz as toxinas termolábil e termoestável ocorrentes em ETEC, manifestando fenotipicamente o padrão de aderência agregativo (“tijolos empilhados”) em células HEP-2 (Nataro & Kaper 1998; Clements *et al.*, 2012).

Como caracterização genotípica, cepas de EAEC também podem ser identificadas a partir da detecção de um plasmídeo de alto peso molecular (60-65 MDa) denominado plasmídeo de aderência agregativa (pAA). Este plasmídeo contém genes codificantes para adesinas, toxinas e fimbrias, estruturas essenciais para o estabelecimento da patogênese de EAEC na adesão, invasão celular e produção de um biofilme abundante na mucosa intestinal do hospedeiro infectado (Huang *at al.*, 2004; Estrada-Garcia *et al.*, 2014; Jenkins, 2018).

A infecção por EAEC se desenvolve em três estágios: (i) aderência inicial à mucosa e início da colonização com formação de biofilme; (ii) indução da resposta inflamatória e liberação de toxinas; e (iii) inflamação da mucosa, secreção e dano à mucosa intestinal (Okeke *et al.*, 2011; Da Re *et al.*, 2013; Estrada-Garcia *et al.*, 2014). Estudos empregando linhagens celulares cultivadas *in vitro*, modelos animais *in vivo* e indivíduos infectados foram primordiais no para o conhecimento da patogênese de EAEC. Pesquisadores têm estudado o papel dos fatores de virulência característicos de EAEC e também a resposta do hospedeiro à infecção, no intuito de elucidar os fatores envolvidos nos danos causados ao intestino e o desencadeamento dos sintomas (Huang *et al.*, 2006; Hebbelstrup Jensen *et al.*, 2014; Jenkins, 2018; Lima *et al.*, 2018).

### 1.2.1 Fatores de virulência em EAEC

#### 1.2.1.1 Aderência e biofilme

O pAA é o plasmídeo associado à virulência de EAEC, onde se localiza o regulador transcricional *aggR*, gene importante para as propriedades de aderência e estabelecimento da patogênese. As cepas dotadas deste segmento plasmidial são definidas como EAEC típicas. O *aggR* influencia diretamente na expressão de fatores de virulência, atuando como ativador transcricional de genes tanto cromossômicos quanto plasmidiais, incluindo os codificantes de

AAFs e dispersina (Estrada-Garcia *et al.*, 2014; Hebbelstrup Jensen *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2017).

Cepas de EAEC que não apresentam o gene *aggR* no pAA são denominadas EAEC atípicas. Nestas cepas, o pili do tipo IV, cujo gene codificante está se localiza em um plasmídeo do grupo de incompatibilidade IncII, foi diretamente relacionado ao padrão AA em células HEp-2 e também à formação de biofilme (Dudley *et al.*, 2006).

O padrão de aderência agregativo (AA) é definido principalmente por adesinas, moléculas responsáveis pela fixação da célula bacteriana no epitélio intestinal. Essas adesinas podem estar associadas às fímbrias ou podem ser afímbriais. Fímbrias de aderência agregativa (AAFs) são adesinas fímbriais detectadas em diversas cepas de EAEC. AAFs são fundamentais na patogênese deste patotipo de *E. coli*, uma vez que promovem a colonização da bactéria na superfície intestinal (Estrada-Garcia *et al.*, 2014; Hebbelstrup Jensen *et al.*, 2014; Havt *et al.*, 2017).

O pAA abriga os genes que codificam cinco variantes da principal subunidade estrutural das fímbrias. As cinco subunidades de AAF descritas e seus respectivos genes são: *aggA* (AAF/I), *aafA* (AAF/II), *agg3A* (AAF/III), *agg4A* (AAF/IV) e *agg5A* (AAF/V). A estrutura de AAFs é formada por duas subunidades, sendo uma principal e maior, com carga positiva, e uma acessória menor. Além disso, são também integrantes do grupo de adesinas Afa/Dr. (Nataro *et al.*, 1992; Czczulin *et al.*, 1997; Bernier *et al.*, 2002; Boisen *et al.*, 2008; Jonsson *et al.*, 2015; Boll *et al.*, 2017).

Foi observado que a AAF/V tem fenótipo de adesão significativamente melhor do que AAF/III, embora a primeira apresente deficiência na adesão a proteínas de matriz extracelular do epitélio intestinal (Jonsson *et al.*, 2015; Jonsson *et al.*, 2017a). EAEC portadoras dos genes para AAF/III e AAF/V podem alternar a expressão destas variantes, uma vez que ambas possuem especificidade de ligação às células do hospedeiro e podem poder ter sua expressão favorecida conforme as circunstâncias inerentes ao local de colonização (Jonsson *et al.*, 2017b). Esta característica também foi observada em cepas de UPEC, que quando colonizam o trato urinário inferior expressam a fímbria tipo I, e quando colonizam o trato urinário superior, expressam a fímbria P; ambas as fímbrias atuam em sinergismo para estabelecer a infecção (Melican *et al.*, 2011; Jonsson *et al.*, 2017b).

Em um ensaio otimizado da PCR multiplex AAF, todas as fímbrias de uma coleção de vários isolados clínicos de EAEC foram testadas. Os genes que codificam as duas subunidades de pilina *agg3A* e *agg5A* foram encontrados em seis cepas de um total de 162, estando localizados em novo plasmídeo, o pAA<sup>C700-09</sup>. Este plasmídeo contém um conjunto de genes



AAF/III completo e um outro de genes AAF/V truncado. Também foi constatado que este novo plasmídeo porta, ainda, genes de virulência comumente encontrados no cromossomo (Jonsson *et al.*, 2017b).

A autoagregação bacteriana contribui para a aderência agregativa, uma vez que a aderência a superfícies celulares abrange interações entre bactérias. Os componentes da matriz extracelular (ECM) das células do epitélio intestinal, tais como colagênio tipo IV, citoqueratina 8, fibronectina e laminina, funcionam como receptores de fimbrias (Hebbelstrup Jensen *et al.*, 2014). Contudo, algumas proteínas da ECM, como a laminina e a fibronectina, normalmente estão presentes na membrana basal de células saudáveis. Como as primeiras ligações entre EAEC e o epitélio intestinal são, a priori, restritas às superfícies celulares voltados para o lúmen intestinal, outros receptores podem estar envolvidos no contato inicial bactéria-célula (Yáñez *et al.*, 2016; Boll *et al.*, 2017).

Foi demonstrado que uma alteração estrutural de Agg5A resulta na ineficiência de ligação de AAFs à fibronectina e também a outras proteínas de matriz extracelular, o que envolve propriedades eletrostáticas moleculares. A adesina Agg5A apresenta características específicas diferentes de outras AAFs, o que pode indicar uma capacidade de ligação a um receptor de hospedeiro alternativo, representando uma adaptação evolutiva. (Jonsson *et al.*, 2017a).

A proteína de baixo peso molecular secretada designada dispersina, codificada pelo gene *aap*, está envolvida na colonização e na dispersão de EAEC. Esta proteína induz mudanças eletrostáticas na superfície do lipopolissacarídeo (LPS) e se liga não covalentemente à membrana da bactéria (Sheikh *et al.*, 2002; Harrington *et al.*, 2006; Hebbelstrup Jensen *et al.*, 2014). A dispersina reduz a autoagregação bacteriana e viabiliza sua dispersão pela superfície da mucosa intestinal, desempenhando importante papel na colonização (Jafari *et al.*, 2013; Estrada-Garcia *et al.*, 2014).

Proteínas da membrana externa (OMP) não estruturais têm sido detectadas em diversas cepas de EAEC. Essa categoria de proteínas possui importante papel na patogênese e promovem a colonização, contribuindo para o padrão de aderência agregativo e na formação de biofilmes. A variedade de OMP encontradas em EAEC evidencia a diversidade de adesinas presentes neste grupo de *E. coli* (Monteiro-Neto *et al.*, 2003; Jafari; *et al.*, 2013).

A propriedade de formar biofilme apresentada por cepas de EAEC é amplamente associada à capacidade de aderir e persistir em células intestinais. Estudos relatam que as infecções persistentes causadas por EAEC estão relacionadas à formação de biofilme (Telli *et al.*, 2010; Jafari *et al.*, 2013). As bactérias consolidadas no biofilme e a geração de agrupamentos em

canais preenchidos por líquido neutralizam as defesas do hospedeiro. Essa estruturação também pode impedir que agentes antimicrobianos atuem no interior do biofilme (Philipson *et al.*, 2013; Hebbelstrup Jensen *et al.*, 2014).

A expressão de AAF e de outros fatores codificados pelo pAA têm sido apontados como apontados características cruciais para a formação de biofilme em EAEC. Os genes *aatA*, *set1A* e o regulador *aggR* têm sido associados à produção de biofilme. Os genes *shf*, *yafK* e *fis*, respectivamente codificantes de proteína homóloga de *Shigella flexneri*, YafK proteína e regulador Fis, também influenciam a formação de biofilme em EAEC, ainda que de maneira não totalmente esclarecida, sendo os dois últimos ligados à expressão de fímbrias. (Sheikh *et al.*, 2001; Estrada-Garcia *et al.*, 2014; Hebbelstrup Jensen *et al.*, 2014; Hebbelstrup Jensen *et al.*, 2017).

A patogenicidade de EAEC é, em grande parte, devida à formação de biofilme. Apesar de ocorrer majoritariamente na região do cólon, tem sido demonstrada sua ocorrência no intestino delgado. O estabelecimento do biofilme caracteristicamente leva à secreção exacerbada de muco e é provável que as alterações celulares do hospedeiro durante a infecção desencadeiem a interrupção do balanço de água e íons, o que pode levar à diarreia prolongada (Hicks *et al.*, 1996; Arenas-Hernández *et al.*, 2012; Hebbelstrup Jensen *et al.*, 2014).

#### 1.2.1.2 Toxinas

Uma vez que EAEC está aderida às células e o biofilme estabelecido, os danos causados ao epitélio são devidos à liberação de toxinas, uma importante característica relacionada aos sintomas associados à diarreia e outros sintomas mais graves. A citotoxicidade de EAEC pode ser causada por toxinas SPATEs (*Serine Protease Autotransporters of the Enterobacteriaceae*) e não-SPATEs, com genes codificantes localizados em ilhas de patogenicidade (Henderson *et al.*, 1998; Henderson *et al.*, 1999; Harrington *et al.*, 2006; Nataro *et al.*, 2006; Estrada-Garcia *et al.*, 2014; Hebbelstrup Jensen *et al.*, 2014).

As SPATEs constituem uma ampla família de proteases extracelulares secretadas por enterobactérias, via sistema de secreção do tipo V. Essas toxinas podem ser cromossomais ou plasmidiais, organizadas em duas categorias: SPATEs classe I e SPATEs classe II. SPATEs classe I possuem atividade citotóxica para o epitélio, codificadas pelos genes *pet*, *sigA* e *Sat*. SPATEs classe II, não citotóxicas, apresentam fenótipo diverso, levando a múltiplos efeitos.

Nesta categoria estão incluídas as proteínas codificadas pelo gene *pic* e protease extracelular de *Shigella*, codificada pelo gene *sepA* (Benjelloun-Touimi *et al.*, 1995; Boisen *et al.*, 2012; Hebbelstrup Jensen *et al.*, 2014).

A toxina Pet (*Plasmid encoded toxin*) está localizada no plasmídeo pAA e causa danos na estrutura das células do hospedeiro. Esta toxina cliva a espectrina, proteína de ligação à actina, causando deformação do citoesqueleto, arredondamento e destacamento celular, característica associada a fezes com muco (Eslava *et al.*, 1998; Navarro-Garcia *et al.*, 1999). A toxina Sat (*Secreted autotransporter toxin*) tem sido relacionada à degradação das moléculas do citoesqueleto e de adesão entre as células epiteliais intestinais (IECs), além da vacuolização em células renais e da bexiga (Guyer *et al.*, 2002). A enterotoxina imunogênica SigA, também associada a patogênese de *Shigella flexneri*, é capaz de promover danos ao citoesqueleto, alterando morfológicamente a célula intestinal (Al-Hasani *et al.*, 2009; Philipson *et al.*, 2013). A toxina Pic (*Protein involved in colonization*) possui papel na colonização bacteriana, induzindo a maior produção de muco por células caliciformes e apresentando atividade mucinolítica. Assim, a toxina promove vantagens para o crescimento de EAEC no intestino, uma vez que fornece nutrientes como oligossacarídeos, resultantes da degradação de mucinas (Navarro-Garcia *et al.*, 2010).

O gene *astA* codifica a EAST1 (*EAEC heat-stable enterotoxin 1*), uma toxina não-SPATE que possui propriedades semelhantes à toxina termo-estável de ETEC. Esta toxina tem sido associada à diarreia aquosa por levar ao aumento da secreção de cloreto. Embora descrita como umas das principais toxinas de EAEC, esta não é exclusiva deste grupo, sendo detectada também em EPEC, ETEC e EHEC. Esta toxina também não é detectada em todas as cepas de EAEC (Savarino *et al.*, 1996; Ménard & Dubreuil, 2002; Aslani *et al.*, 2011).

### 1.2.2 Epidemiologia de EAEC

EAEC é o patótipo de *E. coli* mais comumente identificada entre crianças com episódio de diarreia. EAEC tem sido detectada em crianças que necessitaram de hospitalização, tanto em países industrializados quanto em países em desenvolvimento. Em estudos realizados na África, América Latina, Ásia, leste europeu, Estados Unidos (EUA), Europa e Oriente Médio, EAEC foi detectada mais frequentemente do que qualquer outra bactéria patogênica em crianças. Já entre adultos, EAEC é predominante em países industrializados. No Reino Unido e nos EUA,

EAEC está significativamente associada à diarreia na população em geral. Conforme destacado por setores de emergência e clínicas ambulatoriais dos EUA, EAEC tem sido a bactéria mais constantemente detectada nas amostras fecais de adultos. Este patotipo de *E. coli* pode ser, ainda, detectado em portadores assintomáticos (Nataro *et al.*, 2006; Cennimo *et al.*, 2009; Chattaway *et al.*, 2013; Estrada-Garcia *et al.*, 2014; Hebbelstrup Jensen *et al.*, 2014)

Em média, uma criança apresenta 3 episódios de diarreia, com estimativa de que até 20% dos casos sejam correspondentes à diarreia persistente, de duração superior a duas semanas (Zella & Israel, 2012). Segundo dados da OMS, um elevado percentual de crianças menores de cinco anos de idade que vivem em áreas mais pobres têm o desenvolvimento comprometido, onde a ausência do tratamento da água, o saneamento prejudicado e condições de higiene inadequadas levam a ocorrência maciça de patologias intestinais (Lima *et al.*, 1992; Kosek *et al.*, 2013; Estrada-Garcia *et al.*, 2014).

A diarreia persistente causada por EAEC possui considerável impacto sobre crianças de regiões mais precárias, sobretudo se malnutridas. A duração da diarreia persistente está relacionada ao atraso no crescimento (Z-score inferior a 2) que ocorre na primeira infância, sendo este atraso não totalmente reversível e que leva, num âmbito coletivo, à perda progressiva de potencial humano. A baixa estatura infantil é frequente tanto entre crianças de países pobres, quanto em crianças de regiões marginalizadas e de favelas de países em desenvolvimento, onde a miséria é prevalente (Lima *et al.*, 1992; WHO & UNICEF, 2009; Kosek *et al.*, 2013; Estrada-Garcia *et al.*, 2014; Platts-Mills *et al.*, 2017).

A diarreia do viajante normalmente ocorre nas três primeiras semanas da viagem e pode ser acompanhada por náuseas e vômitos, sendo fortemente relacionada à ingestão de alimentos e bebidas contaminados. Na maioria dos casos os indivíduos afetados manifestam doença autolimitada. No entanto, ocasionalmente os sintomas podem se tornar impeditivos, causando impacto negativo no roteiro de viagem por um a dois dias. Uma parcela menor que 1% dos viajantes precisa ser hospitalizada e complicações raras podem ocorrer, onde parte dos pacientes acometidos desenvolve síndrome do intestino irritável pós-infecciosa (PI-IBS) (Steffen, 2005; Pawlowski *et al.*, 2009; Vila *et al.*, 2016; Card *et al.*, 2018).

A infecção por EAEC é a segunda causa bacteriana mais comum de diarreia do viajante, sendo superada apenas por ETEC. Sua prevalência em tem sido bem reconhecida em estudos epidemiológicos (Clements *et al.*, 2012). O risco de ocorrência de diarreia do viajante varia de acordo com o destino da viagem. As regiões de maior risco são África subsaariana, América Latina, Oriente Médio, sudeste asiático e locais com áreas que possuem condições de higiene mais precárias. Algumas características intrínsecas ao viajante também constituem fatores de

risco complementares, como idade, condições do sistema imunológico, susceptibilidade genética, histórico de gastrite, úlcera e doença inflamatória intestinal (Yates, 2005; Vila *et al.*, 2016; Tribble, 2017).

O reservatório de EAEC ainda não foi determinado. A detecção deste patótipo em humanos é rara, embora ocorra mais frequentemente em pacientes doentes e assintomáticos do que em animais. EAEC dificilmente é isolada de outros sítios além de mamíferos e não há dados que indiquem que outros animais possam ser reservatórios e transmiti-los ao homem (Oundo *et al.*, 2008; Gomes *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017).

### 1.3 Resposta imune na infecção bacteriana do TGI

O lúmen intestinal abriga uma microbiota normal, que consiste em uma gama de microrganismos que coloniza de maneira benéfica a superfície do epitélio intestinal. Neste sentido, a associação entre a barreira epitelial e a microbiota representa o início da defesa contra microrganismos patogênicos, seguida da capacidade de rápida resposta a patógenos. A disbiose, caracterizada pela composição alterada do TGI, está ligada a patogênese de doenças infecciosas. (Thursby & Juge, 2017).

Células epiteliais do intestino (IECs) desempenham importante papel na regulação da resposta à microbiota através de receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), moléculas conservadas evolutivamente e expressas nas superfícies microbianas. Entre os PRRs estão os receptores Toll-like (TLRs), que podem estar expressos tanto na membrana da superfície apical como na membrana basolateral das células epiteliais. O reconhecimento bacteriano pelos PRRs induz a ativação das IECs, levando à produção de diferentes citocinas que, por sua vez, vão coordenar o curso da infecção e a resposta inflamatória (Kawai & Akira, 2011; Kinnebrew & Pamer, 2012, Braga *et al.*, 2018).

Algumas citocinas, como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$  atuam ativando diferentes células, norteando uma via pró-inflamatória de resposta imunológica. Por outro lado, citocinas como IL-10 agem em via anti-inflamatória, reduzindo a resposta imune inata, sendo um importante mecanismo para a manutenção da homeostase intestinal (Onyiah & Colgan, 2016).

### 1.3.1 Resposta inflamatória na infecção por EAEC

O recrutamento e transmigração de leucócitos polimorfonucleares (PMN), incluindo neutrófilos, é promovido pela infecção por EAEC, resultando em danos ao tecido que podem propiciar o sucesso da adesão à superfície da mucosa. Em conjunto com o recrutamento de PMN, a produção de citocinas está positivamente implicada na patogênese de EAEC, sendo este um atributo comum da diarreia infecciosa (Estrada-Garcia *et al.*, 2014; Braga *et al.*, 2018). A resposta inflamatória é uma característica inerente à patogenicidade de EAEC, sendo fortemente ligada à aderência e invasão celular de enterócitos. Estudos têm demonstrado que a inflamação causada pela infecção por EAEC está ligada ao aumento dos níveis de secreção de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , lactoferrina e também estimula a migração de leucócitos, o que sugere uma resposta inflamatória substancial do TGI (Abe *et al.*, 2001; Hebbelstrup Jensen *et al.*, 2014; Braga *et al.*, 2018). Cepas de EAEC podem induzir a produção de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$  pelas células do epitélio intestinal, conforme demonstrado em estudos que utilizaram modelos *in vitro* e análises de pacientes infectados (Greenberg *et al.*, 2002; Goyal *et al.*, 2010; Khan *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2016; Braga *et al.*, 2018). No entanto, não tem sido demonstrada a indução da produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 (Braga *et al.*, 2018).

Níveis elevados das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-8, IFN- $\gamma$ , e de marcadores inflamatórios nas fezes como muco abundante, lactoferrina, leucócitos e sangue oculto estão correlacionados a certos fatores de virulência, como AggR, AAFs, dispersina e flagelina (Steiner *et al.*, 1998; Steiner *et al.*, 2000; Cennimo *et al.*, 2009; Mercado *et al.*, 2011; Estrada-Garcia *et al.*, 2014; Hebbelstrup Jensen *et al.*, 2014). Citocinas e lactoferrina, em níveis aumentados foram encontradas em fezes de crianças com diarreia e de portadores de EAEC assintomáticos, o que não ocorreu em pessoas não infectadas, sugerindo que EAEC possui potencial patogênico mesmo na ausência de sintomas da doença (Steiner *et al.*, 1998; Opintan *et al.*, 2010).

### 1.4 **Atividade probiótica contra patógenos de origem alimentar**

Patógenos de origem alimentar é o grupo que inclui uma diversidade de microrganismos comumente associados às manifestações de doenças intestinais. Enteropatógenos bacterianos

incluem os patótipos de DEC, o grupo de bactérias causadoras de doenças intestinais mais comum no mundo (Kaper *et al.*, 2004; Boisen *et al.*, 2013).

Probióticos são microrganismos vivos não patogênicos que conferem benefícios a saúde do hospedeiro, sendo algumas espécies de bactérias e fungos representantes desse grupo. São também frequentemente encontrados em alimentos fermentados, como os laticínios. Em humanos, bactérias probióticas promovem proteção contra patógenos, vivendo naturalmente na microbiota urogenital e gastrointestinal. Em condições patológicas intestinais, cepas probióticas administradas são capazes de produzir moléculas com atividade terapêutica, como ácidos graxos de cadeia curta, aminoácidos, vitaminas, bacteriocinas, enzimas e compostos imunomoduladores. (Reid *et al.*, 2003; Liévin-Le Moal & Servin, 2014; Lee *et al.*, 2017; Indira *et al.*, 2019).

#### 1.4.1 Atividade probiótica de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*

Os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* fazem parte do grupo das bactérias ácido-láticas (LAB). São microrganismos Gram-positivos, sendo *Lactobacillus* bastonetes anaeróbios facultativos ou microaerófilos e *Bifidobacterium* células em formato de Y anaeróbias estritas (Makarova *et al.*, 2006; Barbosa *et al.*, 2011). As espécies pertencentes a estes gêneros são as mais utilizadas em pesquisas com probióticos. Estudos destacam sua atividade probiótica contra DEC e outros patógenos de origem alimentar, o que inclui a capacidade de redução da formação de biofilme bacteriano, inibição da aderência e danos a células cultivadas *in vitro*, prevenção de diarreia em modelos *in vivo*, atividade antimicrobiana e imunomodulação. O foco da maioria dos estudos de atividade probiótica raramente se dá sobre cepas de bactérias probióticas contra EAEC e outras DEC, sendo estes estudos direcionados à análise de uma variedade de outros enteropatógenos (Saad, 2006; Ferreira *et al.*, 2017).

A espécie *Lactobacillus acidophilus* é uma das mais estudadas quanto à sua atividade probiótica, devido à sua frequente presença na microbiota normal em mucosas (Saad, 2006). *L. acidophilus* foi capaz de reduzir a aderência de *E. coli* O157:H7 (EHEC) e de *E. coli* O127:H6 (EPEC) a células intestinais T84, provenientes de carcinoma colorretal (metástase). A espécie também se mostrou capaz de reduzir a formação do biofilme de *Listeria monocytogenes*, que por sua vez se mostrou também suscetível a outras cepas de *Lactobacillus* (Sherman *et al.*, 2005; Woo & Ahn, 2013). Comparado ao uso de antibióticos, *L. acidophilus* mostrou intensa

inibição do crescimento de cepas de *Campylobacter jejuni*, *E. coli* O157 e *Salmonella typhimurium*. Além disso, *in vivo*, *L. acidophilus* reduziu ou preveniu a diarreia em ratos albinos em condição de coinfeção com *Campylobacter jejuni* (Abd El-Moez *et al.*, 2010). Em condição de sinergismo com *L. plantarum*, *L. acidophilus* apresentou melhor atividade antimicrobiana dose-dependente contra cepas de EAEC multirresistentes quando comparada à condição não sinérgica, sendo esta última condição eficaz na redução da contagem de EAEC em fezes de camundongos infectados (Kumar *et al.*, 2016).

Outra espécie também comumente estudada, *L. plantarum* pode ser encontrada em leite materno, possivelmente fazendo parte dos estágios iniciais da colonização do TGI para formação da microbiota intestinal do bebê amamentado (Lara-Viloslada *et al.*, 2007). Uma cepa isolada de leite materno mostrou atividade antimicrobiana contra uma diversidade de enteropatógenos bacterianos, incluindo *Listeria monocytogenes*, *Shigella sonnei*, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *E. coli* O157:H7. Além disso, *L. plantarum* promoveu a redução da aderência pelas cepas de *S. aureus*, *Salmonella* e *E. coli* O157:H7 a células Caco-2, aumentou a expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 e reduziu a expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-8, e TNF- $\alpha$  pelas células quando em co-cultivo com *Salmonella* (Jiang *et al.*, 2016). Por outro lado, em um estudo anterior *L. plantarum* não mostrou efeito sobre a adesão ou invasão de *E. coli* O157:H7 em células Caco-2, enquanto uma outra espécie, *L. rhamnosus* mostrou potencial de aderência às células, inibindo assim a invasão por *E. coli* (Hirano *et al.*, 2003).

A espécie *L. rhamnosus* pode ser isolada de fezes de bebês saudáveis submetidos ao aleitamento materno exclusivo (Davoodabadi *et al.*, 2015). *L. rhamnosus* foi capaz de promover uma redução dose-dependente da adesão de *E. coli* O157:H7 a células HEp-2 e T84, diminuindo o número de focos de rearranjo do citoesqueleto, estes relacionados a lesões do tipo *attaching and effacing* (A/E) (Sherman *et al.*, 2005) e também se mostrou capaz de diminuir drasticamente a formação de biofilme de *Listeria monocytogenes* (Woo & Ahn, 2013). Outro estudo também já havia demonstrado resultados semelhantes, onde células MDCK-I e T84 polarizadas pré-tratadas com *L. rhamnosus* reduziram modificações morfológicas e diminuíram o número de lesões A/E induzidas pela infecção por *E. coli* O157:H7 (Johnson-Henry *et al.*, 2008).

Outras espécies de *Lactobacillus* também podem ser facilmente encontradas como fermento láctico utilizado na produção de laticínios, como *L. casei* e *L. paracasei*, sendo estas estreitamente relacionadas a *L. rhamnosus* (Hill *et al.*, 2018). Uma cepa comercial de *L. casei* foi capaz de promover resposta imune específica contra as citotoxinas de *E. coli* O157:H7 e



facilitar a eliminação destas bactérias do trato intestinal de coelhos infectados (Ogawa *et al.*, 2001). *L. casei* também foi capaz de se apresentar como um carreador de antígenos heterólogos de EPEC, estimulando a produção de anticorpos que inibem a aderência de EPEC a células HEp-2, atuando assim como vacina de mucosa (Ferreira *et al.*, 2008). O consumo de leite fermentado contendo *L. paracasei* foi capaz de promover a melhora da inflamação, os sintomas presentes e consequentemente a qualidade de vida de pacientes portadores da infecção por *Helicobacter pylori* (Yoon *et al.*, 2019).

*Bifidobacterium* são microrganismos predominantemente presentes na microbiota de mucosas humanas, como cólon, vagina e cavidade bucal, sendo também utilizados na indústria de laticínios (Barbosa *et al.*, 2011). Existe uma menor quantidade de estudos sobre a atividade probiótica de *Bifidobacterium* spp. contra patógenos bacterianos, quando em comparação a estudos com lactobacilos, e normalmente estes envolvem avaliação conjunta a outras espécies (Ferreira *et al.*, 2017).

*B. breve* se mostrou capaz de promover proteção contra a infecção intestinal causada por *E. coli* O157:H7 em camundongos, além de inibir a produção de Shiga-toxina por STEC cultivada *in vitro*. Caracteristicamente, *B. breve* modifica o pH do meio devido à produção de altos níveis de ácido acético (Asahara *et al.*, 2004). *B. lactis* e *B. longum* apresentaram atividade antimicrobiana contra *Shigella sonnei* e, adicionalmente, possuem propriedades protetivas contra a infecção de UPEC (Hütt *et al.*, 2006). Uma cepa de *B. lactis* propiciou proteção contra a infecção por *Salmonella* em camundongos, aumentando a taxa de sobrevivência e reduzindo o deslocamento bacteriano para o baço e fígado destes animais (Shu *et al.*, 2000). *B. animalis* e *B. lactis* também são capazes de promover a imunomodulação de mucosa, aumentando o número de células IgA+ (Ashraf & Shah, 2014). A elevação na produção de citocinas e da atividade de células *Natural Killers* (NK) pode ser promovida em condição da atuação conjunta de *B. animalis* e *Lactobacillus* sp. Essa propriedade imunológica está indiretamente relacionada ao consumo de iogurtes, uma vez que este alimento é fonte de múltiplas espécies probióticas (Lee *et al.*, 2017).

Foi demonstrado que bactérias probióticas possuem potencial terapêutico e podem ser utilizadas como tratamento alternativo de doenças gastrintestinais. Uma série de cepas diferentes das espécies probióticas mais estudadas possuem atividade contra uma vasta gama de enteropatógenos, atuando por diversas vias. O papel de probióticos contra patótipos de *E. coli*, ainda é pouco conhecido. Neste sentido, há demanda de novos estudos que levem ao entendimento do papel da atividade probiótica contra DEC (Ferreira *et al.*, 2017).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a capacidade de cepas de EAEC induzirem a produção de citocinas por células Caco-2, a capacidade de modulação da resposta inflamatória pelas espécies probióticas e a influência dos probióticos na aderência de EAEC aos tapetes de células intestinais Caco-2.

### 2.2 Objetivos específicos

- a) Investigar a indução da produção das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$  por células Caco-2 polarizadas e diferenciadas infectadas por EAEC;
- b) Avaliar a capacidade das cepas probióticas modularem a resposta imunológica de células Caco-2 na infecção por EAEC;
- c) Avaliar a influência de cepas probióticas na aderência de EAEC a células Caco-2 polarizadas e diferenciadas e também não diferenciadas;
- d) Quantificar a aderência das cepas probióticas *Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus casei* a células Caco-2 diferenciadas e não diferenciadas.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Cepas bacterianas utilizadas

Para os ensaios realizados, foram selecionadas 4 cepas de EAEC (Quadro 2). Estas cepas foram previamente caracterizadas genotípica e fenotipicamente quanto ao sorotipo, grupo filogenético, fatores de virulência e padrão de aderência em células cultivadas *in vitro* (Braga *et al.*, 2017). A cepa 042 é a cepa protótipo, primariamente isolada de crianças com diarreia em um surto ocorrido no Peru (Nataro *et al.*, 1985). As cepas I49 e H92/3 foram isoladas de crianças menores de dois anos de idade com diarreia aguda, na área urbana da cidade do Rio de Janeiro (França *et al.*, 2013). A cepa 1500 foi isolada de paciente com diarreia prolongada portador de HIV, internado em hospital na cidade do Rio de Janeiro. As cepas probióticas utilizadas neste estudo são *Bifidobacterium animalis* DN 173 010 (Activia - Danone®) e *Lactobacillus casei* Shirota (Yakult®), identificadas respectivamente como *Ba* e *Lc*.

As cepas de EAEC utilizadas foram mantidas em suspensões-estoque a -20°C e -80°C, em meio LB (Difco Laboratories) suplementado com 20% (v/v) de glicerol (Merck). As cepas probióticas foram gentilmente cedidas pelo Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (UFRJ) ou obtidas a partir do produto comercial e mantidas em placas de Petri contendo MRS ágar (Difco Laboratories), além do estoque em MRS caldo (Difco Laboratories), suplementado com 20% (v/v) de glicerol a -80 °C.

Quadro 2 - Sorotipos, grupo filogenético, fatores de virulência e padrão de aderência das cepas de EAEC utilizadas

Cepas	Sorotipo <sup>a</sup>	Grupo Filogenético	Fatores de Virulência <sup>b</sup>	Padrão de Aderência <sup>c</sup>
042	O44:H18	D	pAA*, <i>aafA</i> , <i>aggR</i> , <i>aap</i> , <i>astA</i> , <i>fyuA</i> , <i>irp2</i> , <i>pet</i> , <i>pic</i>	AA
I49	O26:H27	A	pAA*, <i>agg3A</i> , <i>aggR</i> , <i>aap</i> , <i>astA</i> , <i>irp2</i> , <i>pet</i> , <i>pic</i>	AA
H92/3	O86:H18	D	pAA*, <i>aggA</i> , <i>aggR</i> , <i>aap</i> , <i>fyuA</i> , <i>irp2</i> , <i>pic</i>	AA
1500	ND	ND	pAA*	AA

<sup>a</sup> O, polissacarídeo antígeno somático; H, antígeno flagelar

<sup>b</sup> pAA, plasmídeo de aderência agregativa; *aggA*, fimbria de aderência agregativa I; *aggR*, regulador transcricional; *aap*, dispersina; *fyuA* e *irp2*, genes envolvidos na captação de ferro; *pic*, proteína envolvida na colonização; *agg3A*, fimbria de aderência agregativa III; *astA*, proteína termoestável; *pet*, toxina codificada em plasmídeo; *aafA*, fimbria de aderência agregativa II.

<sup>c</sup> AA, aderência agregativa.

\* detecção por hibridação com sonda de DNA. ND = não disponível.

### 3.2 Cultivo e manutenção da linhagem celular Caco-2

No presente estudo foram utilizadas células da linhagem celular Caco-2 (ATCC HTB37), originária de adenocarcinoma de intestino humano (cólon). Células Caco-2 polarizadas e diferenciadas, com 14 dias de cultivo, foram utilizadas nos testes de imunomodulação e aderência. O tapete celular não diferenciado de células Caco-2, com cerca de 3 dias de cultivo, foi utilizado nos testes de aderência.

As células Caco-2 foram cultivadas em frascos plásticos com faces planas (Lab Tek, Nunc), contendo 10 mL de meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, Invitrogen) suplementado com antibióticos (gentamicina 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; fungizona 2,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e 10% de soro fetal bovino (SFB), sendo mantidas em estufa, a 37°C e em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> por cerca de 4 a 5 dias, até atingir a confluência. A troca do meio foi realizada a cada 48 horas e o subcultivo a cada 3-4 dias.

Para montagem das placas utilizadas nos ensaios, os tapetes celulares foram tripsinizados utilizando solução de tripsina-EDTA (tripsina 0,2% [Sigma]; EDTA 0,02% [Merck] em PBS-D [solução salina fosfatada modificada por Dulbecco, pH 7,2]). A seguir, foi removida a solução de tripsina-EDTA do frasco e as células foram desprendidas da superfície lisa por pipetagem com meio de manutenção. A suspensão resultante foi quantificada e fracionada em placas de 24 orifícios (TPP) sem lamínula, contendo 1 mL de DMEM suplementado com antibióticos e 2% de SFB. Os tapetes celulares foram mantidos em estufa, a 37 °C e em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Células não diferenciadas foram utilizadas ao atingir a confluência, com três dias de cultivo. Para células Caco-2 polarizadas e diferenciadas, o tapete foi mantido por até 14 dias em cultivo, com troca de meio realizada a cada 48 horas.

### 3.3 Teste de imunomodulação

#### 3.3.1 Infecção de células Caco-2

A infecção de células Caco-2 com EAEC e cepas probióticas foi realizada como descrito anteriormente por Rosa *et al.* (2001) e Braga *et al.* (2018), com modificações. As cepas de

EAEC foram semeadas em 3 mL de LB (Luria Broth, Life Technologies) em tubos 13×100 e cultivadas por 18-24 horas a 37 °C, em condições de aerobiose. As cepas probióticas foram cultivadas em 3 mL de caldo MRS em tubo 13×100 e cultivadas por 36-48 horas a 37 °C, em condições de anaerobiose. Após o período de incubação, 1 mL de cada suspensão bacteriana foi transferido para microtubos de 1,5 mL, centrifugados a 14000 g por 3 minutos e ressuspendidos em 1 mL de PBS-D. O processo se repetiu por mais duas vezes, para remoção de resíduos do meio de cultura. A seguir, alíquotas da suspensão bacteriana foram transferidas para tubos de vidro 13×100 contendo PBS-D. A partir desta suspensão bacteriana, foi feita a padronização em espectrofotômetro ( $\lambda=680\text{nm}$ , D.O. = 0,14). As suspensões bacterianas das cepas probióticas e de EAEC foram ajustadas a fim de se obter  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

O meio de cultura foi removido dos orifícios contendo células Caco-2 diferenciadas e estes foram lavados duas vezes com 500  $\mu\text{L}$  de PBS-D. Aos tapetes celulares foram adicionadas alíquotas das suspensões bacterianas padronizadas e ajustadas, em triplicata, aos poços contendo 500  $\mu\text{L}$  de DMEM suplementado com 2% de SFB e 1% de D-manose, obtendo-se assim uma concentração final de cerca de  $10^7$  UFC (unidades formadoras de colônia) por poço. Foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  da suspensão de EAEC e de cada probiótico, além de alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  de cada probiótico nos mesmos orifícios. Nas mesmas condições, foi realizado o co-cultivo de EAEC + probióticos separados e em conjunto. As placas foram então centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos a 15 °C na etapa de sincronização.

As células Caco-2 infectadas foram incubadas a 37°C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, por 3 horas. Em seguida, os tapetes celulares foram lavados três vezes com 500  $\mu\text{L}$  de PBS-D e aos poços foram adicionados 550  $\mu\text{L}$  de DMEM suplementado com 2% de SFB e 1% de D-manose contendo antibiótico (amicacina 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  [Teuto]). As placas foram novamente incubadas por mais 21 horas a 37°C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, totalizando 24 horas de interação. Após o tempo total de co-cultivo, o sobrenadante de cada poço foi coletado e transferido para microtubos. Após a centrifugação a 14000 rpm por 3 minutos, o sobrenadante foi coletado cuidadosamente, transferido para outro microtubo e congelado a -20 °C.

### 3.3.2 Análise da produção de citocinas

A produção das citocinas IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10 foi dosada a partir do sobrenadante do cultivo de células Caco-2 infectadas e não infectadas por ELISA “sanduíche”, utilizando um kit comercial da R&D Systems (Wiesbaden, Germany) de acordo com as instruções do fabricante. O kit contém dois anticorpos monoclonais específicos para cada citocina, sendo um deles biotinizado. A reação se deu com a enzima estreptavidina-peroxidase, usando como substrato o 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina (TMB [BD]).

### 3.4 **Teste quantitativo de aderência**

#### 3.4.1 Avaliação da competição na aderência de EAEC

As condições de cultivo das cepas bacterianas, padronização da suspensão, cultivo de células Caco-2 e condições iniciais de co-cultivo são as mesmas descritas no item 3.3.1, sendo os experimentos realizados em duplicata com células não diferenciadas (3 dias de cultivo) e com células diferenciadas (14 dias de cultivo). Nos testes utilizando tapetes não diferenciados, as suspensões bacterianas foram diminuídas na razão  $10^{-1}$ , obtendo-se  $10^6$  UFC por poço.

Após 3 horas de interação célula-bactéria, o sobrenadante foi removido, as células foram lavadas três vezes com 500  $\mu$ L de PBS-D e tratadas com 1 mL da solução de lise (1% de Triton X-100 [Riedel] em PBS-D) por 30 minutos. Após a homogeneização, alíquotas de 200 $\mu$ L do lisado foram transferidas para microplacas de 96 orifícios e diluídas na razão 10 ( $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ ) em PBS-D. Volumes de 10 $\mu$ L das diluições foram semeados em meio TSA (meio para crescimento somente das cepas de EAEC) em duplicata, através da técnica de microgotas. Após 12-14 horas de incubação a 37°C, as colônias formadas foram contabilizadas e o número de UFC.mL $^{-1}$  do lisado, ou seja, por tapete celular, foi obtido.

### 3.4.2 Avaliação da aderência de probióticos a células Caco-2

As condições de cultivo das cepas probióticas, padronização da suspensão, cultivo de células Caco-2, interação célula-bactéria e ajustes experimentais são as mesmas descritas no item 3.3.1 e 3.4.1. As células Caco-2 diferenciadas e não diferenciadas foram expostas somente aos probióticos separados. As diluições do lisado celular foram semeadas em ágar MRS (adequado apenas para o crescimento das cepas probióticas) e as placas mantidas em anaerobiose a 37 °C por 24-36 horas, para posterior contagem de colônias.

### 3.5 **Análise estatística**

Nos resultados do ELISA (proveniente do sobrenadante dos testes de imunomodulação), as concentrações de citocinas foram expressas como a média e erro padrão da média (EPM) de três experimentos realizados de maneira independente. A análise estatística foi realizada utilizando one-way ANOVA seguido de comparação múltipla com correção de erro de Tukey. Resultados dos ensaios de competição (aderência quantitativa) foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão (DP) de três a quatro experimentos realizados independentemente e pós-teste de Tukey. Os resultados dos ensaios quantitativos de aderência de probióticos foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão (DP) de três experimentos realizados independentemente, utilizando teste t não pareado. O *software* utilizado para as análises foi Graph-Pad Prism versão 7.0. Resultados estatisticamente significantes foram considerados quando  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Avaliação da imunomodulação

#### 4.1.1 Produção de IL-8

Todas as cepas de EAEC (042, 1500, I49 e H92/3) foram capazes de induzir significativamente aumento da produção de IL-8 pelas células Caco-2. Os tapetes de células expostos somente aos probióticos *Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus casei* em conjunto não aumentaram ou diminuíram significativamente a produção de IL-8 (Figura 1). Não houve alteração significativa da produção desta citocina por células expostas a cada um dos probióticos e também às EAEC na presença de cada probiótico separadamente, quando comparada à produção basal por células Caco-2 não infectadas (dados não mostrados).

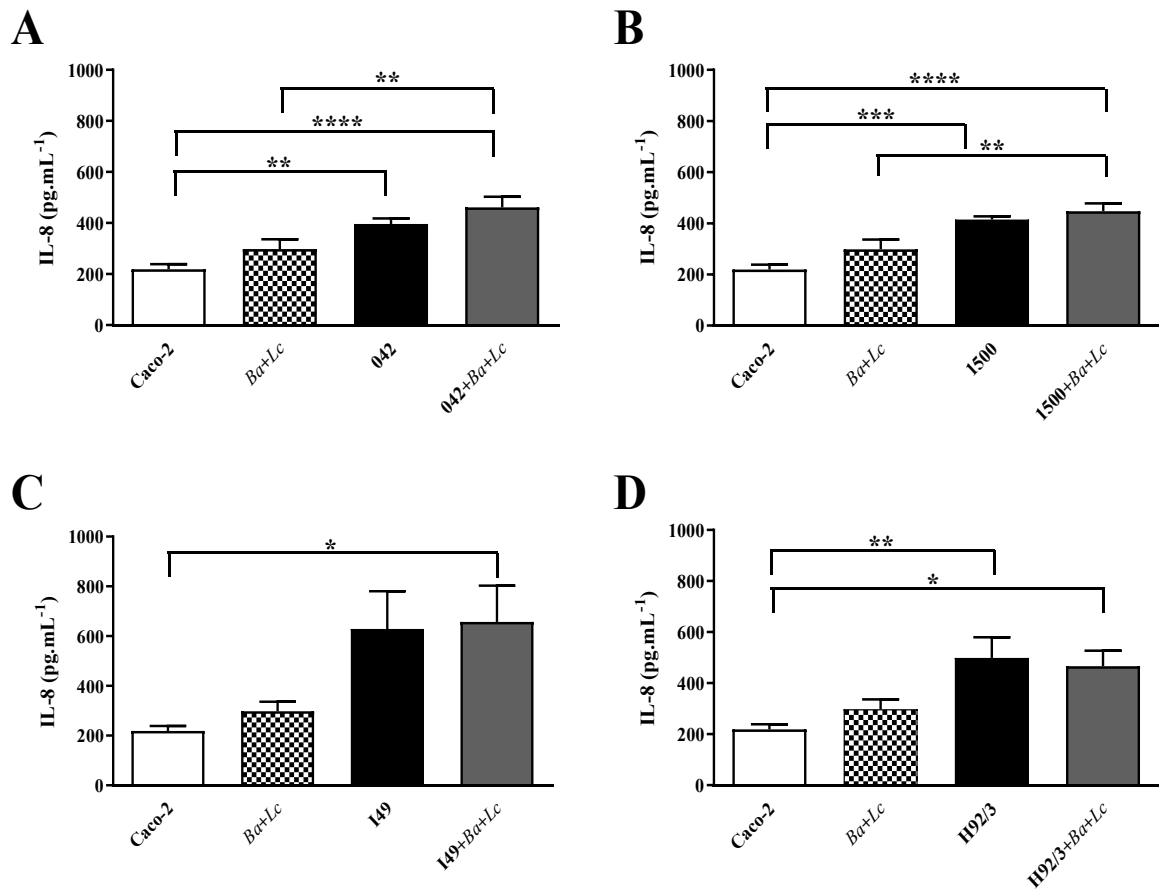
A infecção dos tapetes celulares com a cepa 042 induziu aumento significativo na produção de IL-8 ( $p = 0,0035$ ), quando comparado à concentração basal da citocina em células não infectadas. Células expostas à cepa 042 e aos probióticos em conjunto também aumentaram significativamente a produção de IL-8 ( $p < 0,0001$ ) quando comparado aos valores basais da produção desta citocina por células Caco-2 e a induzida pelos probióticos em conjunto ( $p = 0,0075$ ) (Figura 1A).

Similar ao ocorrido com tapetes celulares expostos à cepa 042, a infecção das células com a cepa 1500 induziu significativamente o aumento da produção de IL-8 ( $p = 0,0005$ ). Essa produção também foi aumentada para células expostas a EAEC com ambos os probióticos em comparação à concentração basal ( $p < 0,0001$ ) e em comparação aos tapetes expostos somente aos probióticos em conjunto ( $p = 0,0084$ ) (Figura 1B).

A cepa H92/3 também foi capaz de induzir aumento significativo da produção de IL-8 pelas células Caco-2 ( $p = 0,0053$ ) e também na presença de ambos os probióticos ( $p = 0,0156$ ) (Figura 1D). Por outro lado, a cepa I49 só induziu aumento significativo dos níveis de IL-8 na presença de ambos os probióticos, em relação à produção basal ( $p = 0,033$ ) (Figura 1C).



Figura 1 - Produção de IL-8 por células Caco-2 expostas a diferentes cepas de EAEC e aos probióticos



Legenda: Produção de IL-8 por células Caco-2 não infectadas (produção basal), expostas a ambos os probióticos e às cepas de EAEC 042 (A), 1500 (B), I49 (C) e H92/3 (D) na presença e na ausência de ambas as cepas probióticas (*Ba+Lc*). As concentrações da citocina foram expressas como a média e EPM de três experimentos realizados de maneira independente. A análise estatística foi realizada utilizando one-way ANOVA seguido de comparação múltipla com correção de erro de Tukey. *Ba* - *Bifidobacterium animalis* DN 173 010; *Lc* - *Lactobacillus casei* Shirota. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,0005; \*\*\*\* p < 0,0001.

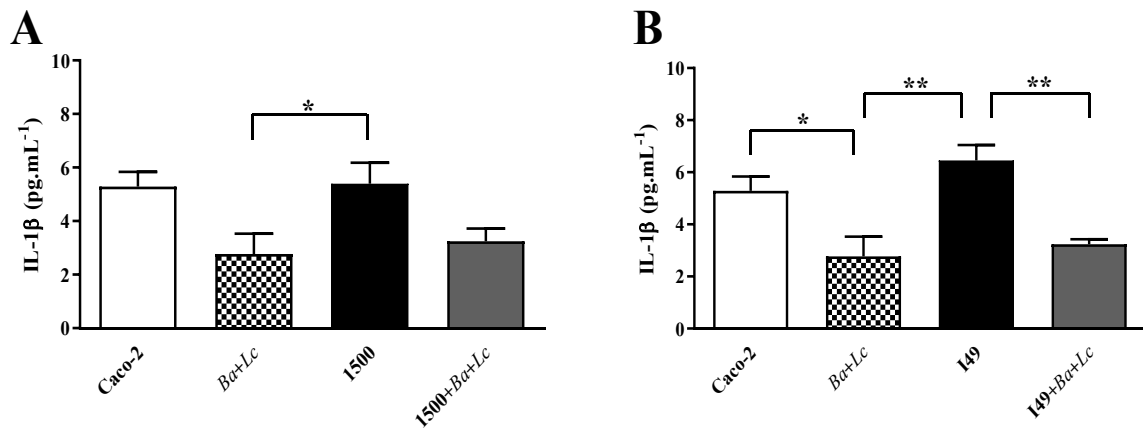
#### 4.1.2 Produção de IL-1 $\beta$

A Figura 2 mostra os resultados da produção da citocina IL-1 $\beta$  por células Caco-2 não infectadas, expostas a ambos os probióticos e infectadas com as cepas 1500 e I49 na presença e na ausência dos probióticos em conjunto. As cepas de EAEC 042 e H92/3, assim como os probióticos em conjunto ou em separado, não interferiram significativamente na produção desta citocina (dados não mostrados).

Em comparação aos tapetes celulares não infectados, as cepas de EAEC não induziram aumento da concentração de IL-1 $\beta$  pelas células Caco-2. No entanto, a exposição das células a ambos probióticos em conjunto induziu menor produção de IL-1 $\beta$  quando comparado à produção pelos tapetes infectados somente pela cepa 1500 ( $p = 0,049$ ) (Figura 2A), pela cepa I49 ( $p = 0,0023$ ) (Figura 2B) e à produção basal de tapetes não infectados ( $p = 0,0201$ ) (Figura 2B).

A produção de IL-1 $\beta$  também foi significativamente reduzida nos tapetes infectados por I49 na presença de ambos os probióticos, em relação às células apenas infectadas com a cepa de EAEC ( $p = 0,0073$ ), sendo a concentração média semelhante à induzida somente pelos probióticos em conjunto (Figura 2B). Semelhante ao ocorrido com a cepa I49, foi observada uma redução na produção de IL-1 $\beta$  induzida pelos probióticos com a cepa 1500, embora não tenha havido diferença estatística (Figura 2A).

Figura 2 - Produção de IL-1 $\beta$  por células Caco-2 expostas a diferentes cepas de EAEC e aos probióticos

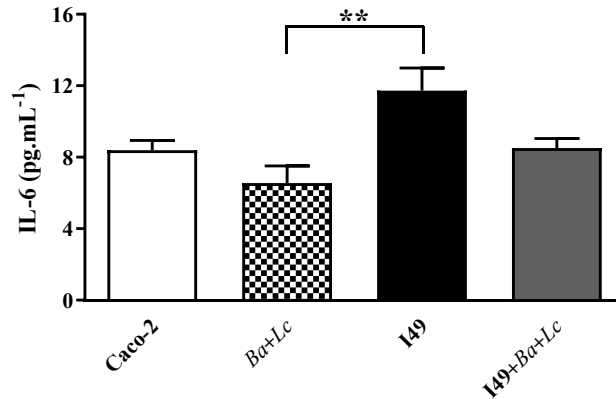


Legenda: Produção de IL-1 $\beta$  por células Caco-2 não infectadas (produção basal), expostas a ambos os probióticos e às cepas de EAEC 1500 (A) e I49 (B) na presença e na ausência de ambas as cepas probióticas (*Ba+Lc*). As concentrações da citocina foram expressas como a média e EPM de dois experimentos realizados de maneira independente. A análise estatística foi realizada utilizando one-way ANOVA seguido de comparação múltipla com correção de erro de Tukey. *Ba* - *Bifidobacterium animalis* DN 173 010; *Lc* - *Lactobacillus casei* Shirota. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01.

#### 4.1.3 Produção de IL-6

A concentração média de IL-6 produzida pelas células expostas aos probióticos em conjunto foram significativamente menores em comparação aos valores da produção por células infectadas com a cepa I49 (p = 0,003). Células Caco-2 infectadas com a cepa I49 na presença de ambos os probióticos mostraram níveis mais baixos de IL-6 quando comparado ao observado nas células infectadas apenas com a cepa I49, atingindo valores próximos à concentração basal, embora sem diferença estatística (Figura 3). As demais cepas de EAEC, assim como os probióticos em conjunto ou em separado, não interferiram significativamente na produção desta citocina (dados não mostrados).

Figura 3 - Produção de IL-6 por células Caco-2 expostas à cepa de EAEC I49 e aos probióticos



Legenda: Produção de IL-6 por células Caco-2 não infectadas (produção basal), expostas a ambos os probióticos e à cepa de EAEC I49 na presença e na ausência de ambas as cepas probióticas (*Ba+Lc*). As concentrações da citocina foram expressas como a média e EPM de dois experimentos realizados de maneira independente. A análise estatística foi realizada utilizando one-way ANOVA seguido de comparação múltipla com correção de erro de Tukey. *Ba* - *Bifidobacterium animalis* DN 173 010; *Lc* - *Lactobacillus casei* Shirota. \*\*  $p < 0,01$ .

#### 4.1.4 Produção de TNF- $\alpha$

A infecção por cepas de EAEC não foi capaz de induzir aumento da produção de TNF- $\alpha$  pelos tapetes de células Caco-2. No entanto, células expostas somente aos dois probióticos em conjunto aumentaram significativamente sua produção (Figura 4). A modulação da produção da citocina por células expostas a cada um dos probióticos ou EAEC na presença de cada probiótico não foi significativa, quando comparada à produção basal pelos tapetes de células Caco-2 não infectadas (dados não mostrados).

Os tapetes celulares expostos somente aos probióticos em conjunto apresentaram uma produção significativamente mais alta de TNF- $\alpha$  quando comparada à observada nas células expostas somente à cepa 042 ( $p = 0,0047$ ). Células infectadas com a cepa 042 e na presença dos probióticos em conjunto apresentaram produção de TNF- $\alpha$  significativamente aumentada quando comparada à concentração da citocina produzida por tapetes celulares infectados somente por esta cepa de EAEC ( $p = 0,0118$ ), sendo esta produção semelhante aos das células expostas somente aos probióticos. Além disso, quando comparada com a produção basal de células não expostas a bactérias, uma maior produção de TNF- $\alpha$  foi induzida tanto por células

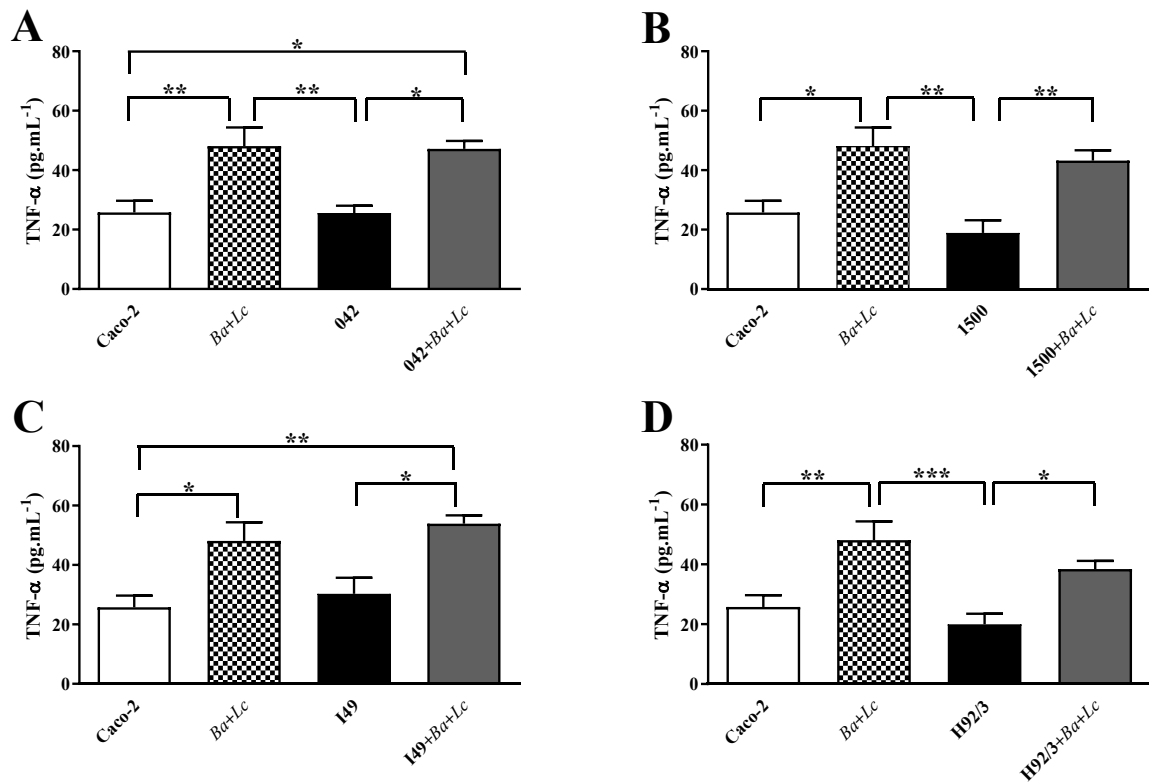
Caco-2 expostas somente aos probióticos ( $p = 0,0061$ ) quanto por células infectadas pela cepa 042 e expostas aos probióticos ( $p = 0,0126$ ) (Figura 4A).

Semelhante ao ocorrido com a cepa 042, a produção de TNF- $\alpha$  pelos tapetes celulares infectados com a cepa 1500 na presença dos probióticos foi significativamente mais alta do que a produção detectada pelas células infectadas somente com a cepa de EAEC ( $p = 0,0096$ ). Esses valores foram próximos aos apresentados pelas células expostas somente aos probióticos, sendo este último significativamente mais alto do que o observado nas células infectadas somente com a cepa 1500 ( $p = 0,0012$ ) bem como pelas células não infectadas ( $p = 0,0129$ ) (Figura 4B).

A coinfeção das células Caco-2 pela cepa I49 e pelos probióticos em conjunto induziu maior produção de TNF- $\alpha$  quando comparado à produção pelas células infectadas somente com a cepa I49 ( $p = 0,0118$ ) e semelhante à produção dos tapetes expostos somente aos probióticos. A exposição aos probióticos também induziu maior produção de TNF- $\alpha$  quando comparado à produção basal da citocina, quando as células foram expostas somente a estes ( $p = 0,0175$ ) quanto nas condições de coinfeção ( $p = 0,0026$ ) (Figura 4C).

A infecção das células Caco-2 pelos probióticos em conjunto induziu aumento na produção de TNF- $\alpha$  quando comparado à produção basal ( $p = 0,008$ ) e quando comparado à indução da infecção pela cepa H92/3 ( $p = 0,0009$ ). A concentração da citocina produzida pelos tapetes infectados pela cepa de EAEC na presença de ambos os probióticos também foi significativamente maior em relação aos tapetes expostos somente à H92/3 ( $p = 0,0317$ ), embora os valores sejam ligeiramente menores que os apresentados pelas células expostas somente aos probióticos (Figura 4D).

Figura 4 - Produção de TNF- $\alpha$  por células Caco-2 expostas a diferentes cepas de EAEC e aos probióticos



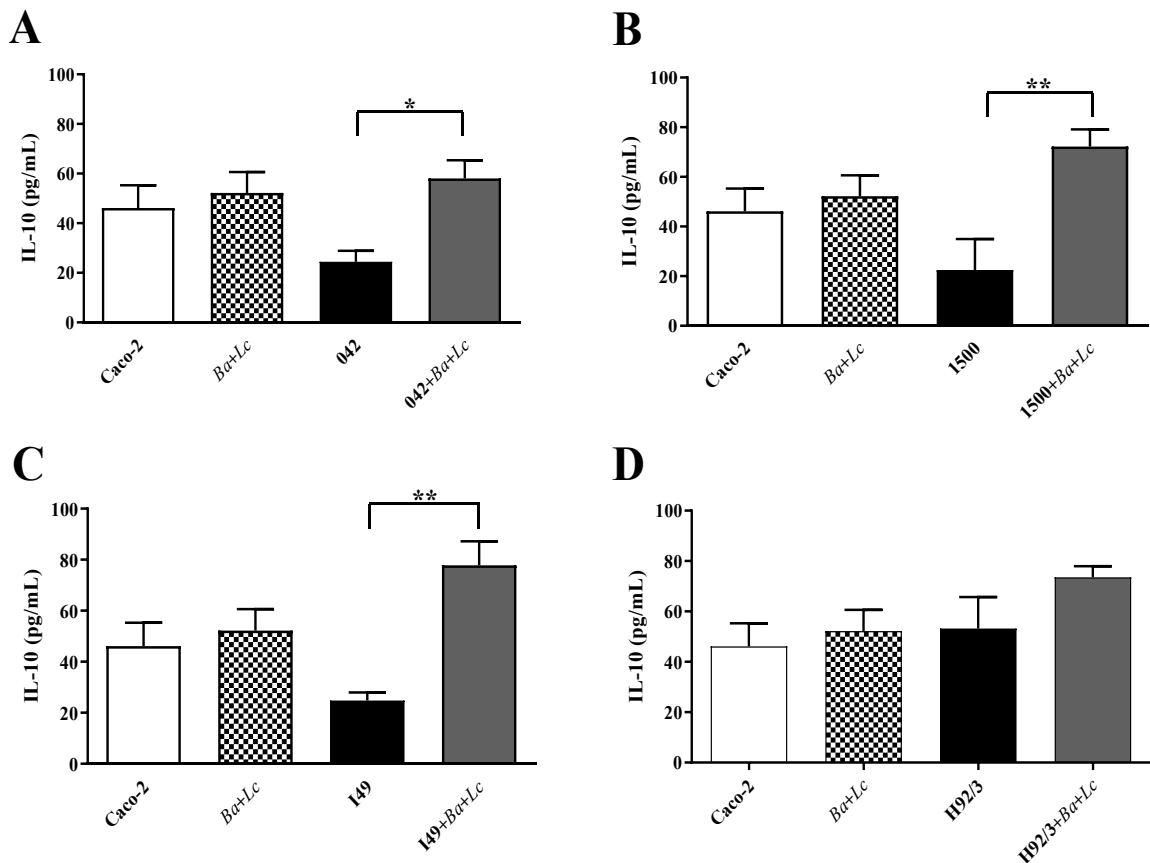
Legenda: Produção de TNF- $\alpha$  por células Caco-2 não infectadas (produção basal), expostas a ambos os probióticos e às cepas de EAEC 042 (A), 1500 (B), I49 (C) e H92/3 (D) na presença e na ausência de ambas as cepas probióticas (*Ba+Lc*). As concentrações da citocina foram expressas como a média e EPM de dois experimentos realizados de maneira independente. A análise estatística foi realizada utilizando one-way ANOVA seguido de comparação múltipla com correção de erro de Tukey. *Ba* - *Bifidobacterium animalis* DN 173 010; *Lc* - *Lactobacillus casei* Shirota. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001.

#### 4.1.5 Produção de IL-10

À exceção da cepa H92/3, as cepas de EAEC reduziram a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 pelas células Caco-2. Os tapetes de células expostos somente aos dois probióticos em conjunto mantiveram os valores de produção da citocina similares aos da produção basal (Figura 5). Não houve alteração significativa da produção de IL-10 por células expostas a cada um dos probióticos ou a cepas de EAEC na presença de cada probiótico, quando comparada à produção basal por células Caco-2 não infectadas (dados não mostrados).

Quando comparado à produção por células infectadas somente pelas cepas de EAEC, a exposição a ambos os probióticos induziu um aumento significativo da produção de IL-10 pelos tapetes celulares também infectados pelas cepas 042 ( $p = 0,0186$ ) (Figura 5A), 1500 ( $p = 0,0066$ ) (Figura 5B) e I49 ( $p = 0,0013$ ) (Figura 5C), levando a níveis de produção mais altos que os basais. Por outro lado, não foi observada nenhuma modulação pela cepa H92/3 na presença ou ausência dos probióticos (Figura 5D).

Figura 5 - Produção de IL-10 por células Caco-2 expostas a diferentes cepas de EAEC e aos probióticos



Legenda: Produção de IL-10 por células Caco-2 não infectadas (produção basal), expostas a ambos os probióticos e às cepas de EAEC 042 (A), 1500 (B), I49 (C) e H92/3 (D) na presença e na ausência de ambas as cepas probióticas (*Ba+Lc*). As concentrações da citocina foram expressas como a média e EPM de dois experimentos realizados de maneira independente. A análise estatística foi realizada utilizando one-way ANOVA seguido de comparação múltipla com correção de erro de Tukey. *Ba* - *Bifidobacterium animalis* DN 173 010; *Lc* - *Lactobacillus casei* Shirota.

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

## 4.2 Avaliação da aderência quantitativa

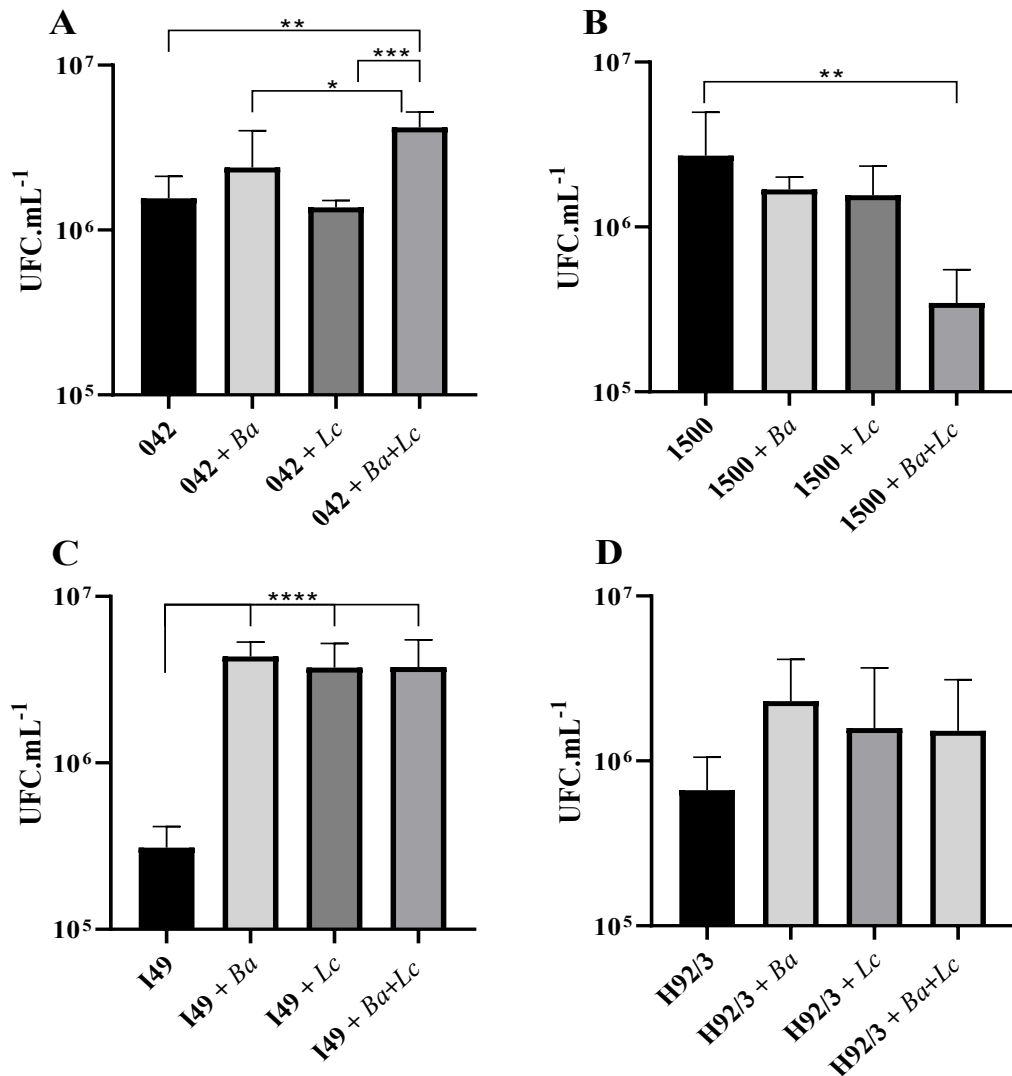
### 4.2.1 Competição na aderência de EAEC a células Caco-2 diferenciadas

O número de UFC.mL<sup>-1</sup> da cepa EAEC 042 aderida às células Caco-2 aumentou significativamente quando a mesma foi colocada em co-cultivo com ambos os probióticos, em comparação ao grupo controle ( $p = 0,0015$ ). Também houve diferença estatisticamente significativa entre as condições de co-cultivo de EAEC com probióticos separados e em conjunto. Quando comparadas ao tratamento com ambos os probióticos, houve menor quantidade de células de EAEC aderidas aos tapetes de Caco-2 diferenciados em condições de co-cultivo com *Ba* ( $p = 0,0239$ ) e *Lc* ( $p = 0,0004$ ) (Figura 6A).

O número de UFC.mL<sup>-1</sup> da cepa 1500 aderida diminuiu significativamente quando a interação se deu com os dois probióticos em conjunto ( $p = 0,0095$ ). O mesmo não foi observado com os probióticos em separado, o que sugere ação sinérgica mais efetiva dos probióticos na diminuição da aderência desta cepa de EAEC (Figura 6B). A interação da cepa I49 tanto com os probióticos separados quanto em conjunto levou a um aumento significativo de bactérias aderidas ( $p < 0,0001$ ), sem diferença entre os tratamentos (Figura 6C). A cepa H92/3 não apresentou aumento ou diminuição estatisticamente significativa da aderência a células Caco-2 diferenciadas em nenhum dos tratamentos (Figura 6D).



Figura 6 - Aderência de cepas de EAEC a células Caco-2 polarizadas e diferenciadas na presença e na ausência de probióticos



Legenda: Aderência das cepas de EAEC 042 (A), 1500 (B), I49 (C) e H92/3 (D) a células Caco-2 diferenciadas na presença e na ausência das cepas probióticas *Ba* e *Lc* separadas e em conjunto. As quantidades de unidades formadoras de colônia (UFC) foram expressas como a média ± desvio padrão de três experimentos realizados de maneira independente. A análise estatística foi realizada utilizando one-way ANOVA seguido de comparação múltipla com correção de erro de Tukey. *Ba* - *Bifidobacterium animalis* DN 173 010; *Lc* - *Lactobacillus casei* Shirota. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,0005; \*\*\*\* p < 0,0001.

#### 4.2.2 Competição na aderência de EAEC a células Caco-2 não diferenciadas

Em comparação ao grupo controle, no tapete de células Caco-2 não diferenciadas houve aumento significativo do número de UFC.mL<sup>-1</sup> da cepa EAEC 042 aderida quando submetido ao tratamento com os probióticos *Ba* e *Lc* em separado ( $p < 0,0001$ ). Também houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos. Não houve recuperação de quantidade suficiente de bactérias aderidas ( $< 100$  UFC) nos tapetes celulares submetidos ao tratamento com ambos os probióticos (Figura 7A), sugerindo que a atividade sinérgica das cepas probióticas inibiu a adesão da cepa 042 às células.

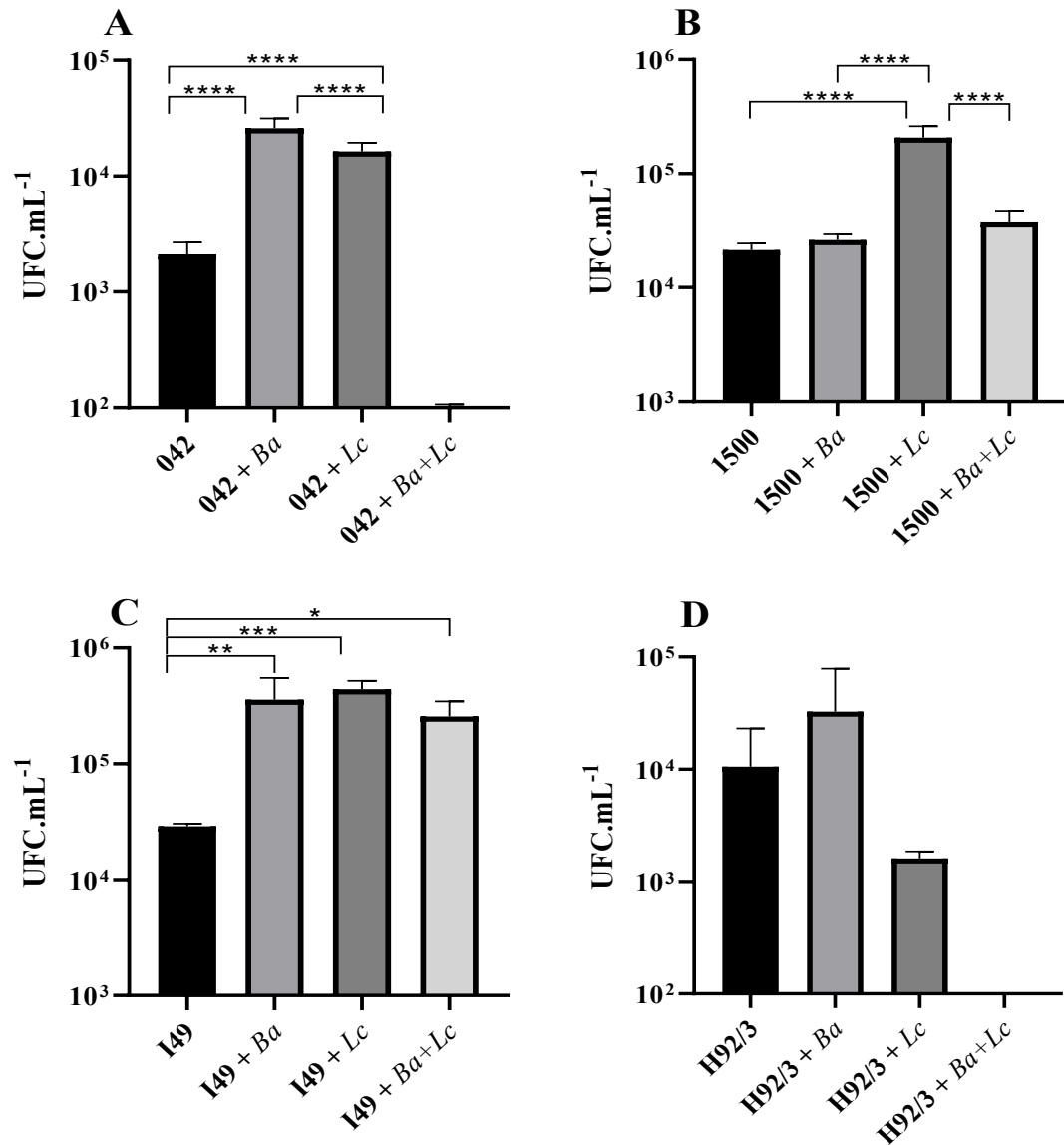
O número de UFC.mL<sup>-1</sup> da cepa EAEC 1500 se apresentou significativamente aumentado quando em co-cultivo com o probiótico *Lc*, em comparação ao controle, ao tratamento com o probiótico *Ba* e ao tratamento com ambos os probióticos ( $p < 0,0001$ ), sugerindo interferência desse probiótico na aderência desta cepa de EAEC (Figura 7B). O co-cultivo da cepa 1500 com *Ba* ou com *Ba* e *Lc* em conjunto não apresentou diferença significativa na aderência desta cepa de EAEC às células.

A cepa I49 apresentou significativo aumento na aderência a células Caco-2 quando submetida aos tratamentos com os probióticos *Ba* ( $p = 0,0017$ ), *Lc* ( $p = 0,0001$ ) e com os probióticos em conjunto ( $p = 0,0487$ ), sem diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos (Figura 7C).

Não houve aumento ou diminuição significativa do número de bactérias da cepa H92/3 aderidas aos tapetes celulares quando submetidas ao tratamento com os probióticos em conjunto ou separado. Similar ao ocorrido com a cepa 042, também não houve recuperação de quantidade suficiente de bactérias aderidas aos tapetes celulares submetidos ao tratamento com ambos os probióticos (Figura 7D), indicando uma possível inibição da aderência desta cepa pela atividade sinérgica dos probióticos.

Semelhante ao ocorrido com os testes utilizando tapetes celulares diferenciados (item 4.2.1), as cepas de EAEC apresentaram um quantitativo de aderência variado entre si quando em co-cultivo com probióticos em conjunto e separados. Além disso, não houve recuperação das cepas 042 e H92/3 aderidas aos tapetes submetidos ao tratamento com ambos os probióticos.

Figura 7 - Aderência de cepas de EAEC a células Caco-2 não diferenciadas na presença e na ausência de probióticos

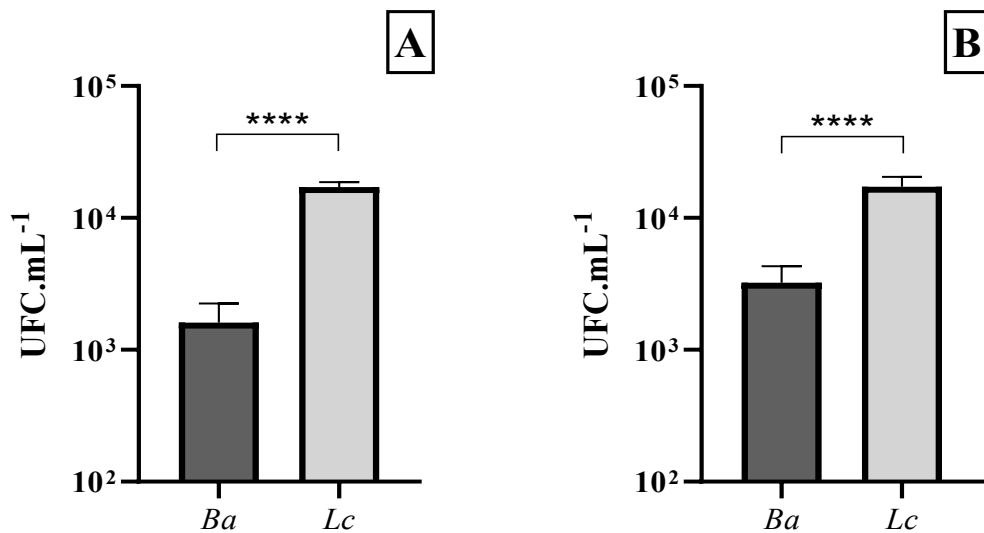


Legenda: Aderência das cepas de EAEC 042 (A), 1500 (B), I49 (C) e H92/3 (D) a células Caco-2 não diferenciadas na presença e na ausência das cepas probióticas *Ba* e *Lc* separadas e em conjunto. As quantidades de unidades formadoras de colônia (UFC) foram expressas como a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos realizados de maneira independente. A análise estatística foi realizada utilizando one-way ANOVA seguido de comparação múltipla com correção de erro de Tukey. *Ba* - *Bifidobacterium animalis* DN 173 010; *Lc* - *Lactobacillus casei* Shirota. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,0005$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

#### 4.2.3 Aderência de probióticos a células Caco-2 diferenciadas e não diferenciadas

As cepas probióticas apresentaram um quantitativo de aderência semelhante tanto a tapetes de células Caco-2 diferenciados quanto não diferenciado. A cepa probiótica *Lc* apresentou aderência significativamente mais elevada ( $p < 0,0001$ ) em relação à cepa probiótica *Ba*, em ambas as condições dos tapetes celulares (Figura 8).

Figura 8 - Aderência das cepas probióticas *Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus casei* a células Caco-2



Legenda: Aderência das cepas probióticas *Bifidobacterium animalis* DN 173 010 e *Lactobacillus casei* Shirota a células Caco-2 polarizadas e diferenciadas (A) e não diferenciadas (B). As quantidades de unidades formadoras de colônia (UFC) foram expressas como a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos realizados de maneira independente. A análise estatística foi realizada utilizando teste t não pareado. *Ba* - *Bifidobacterium animalis* DN 173 010; *Lc* - *Lactobacillus casei* Shirota. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

## 5 DISCUSSÃO

Enteropatógenos bacterianos desempenham importante papel entre os causadores da diarreia infecciosa. Dentre estes, patótipos do grupo das *Escherichia coli* diarreiogênicas (DEC) se destacam como os causadores mais comuns das infecções intestinais em escala global. Uma característica comum entre as cepas de DEC é a capacidade de colonizar a mucosa intestinal aderindo às EICs, frequentemente escapando das defesas do hospedeiro e causando injúria tecidual. Entre os seis patótipos clássicos de DEC está a *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC), o patótipo mais frequentemente detectado em casos de diarreia aguda e persistente em crianças no planeta (Nataro & Kaper, 1998; Keusch *et al.*, 2006; Edwards *et al.*, 2011; Boisen *et al.*, 2013; Clasen *et al.*, 2015; Braga *et al.*, 2018).

EAEC representa uma categoria heterogênea de bactérias diarreiogênicas e o entendimento de sua patogenicidade é essencial para prevenir casos de diarreia aguda e persistente, tanto em crianças quanto em adultos em situação de imunossupressão. Além de ser um patógeno comum em crianças com diarreia, EAEC também está relacionada a casos de diarreia persistente em pacientes portadores do HIV (Lima *et al.*, 2018).

No presente trabalho, uma cepa de EAEC (1500) isolada de paciente infectado pelo HIV com diarreia persistente foi selecionada para estudo. No trabalho de Durrer e colaboradores (2000), realizado na Suíça, 31 pacientes soropositivos para HIV apresentaram episódios de diarreia causada por EAEC, detectada por PCR para AggR ou pelo fenótipo agregativo em células HeLa. Quatro destes pacientes sofreram o agravante do desenvolvimento de diarreia crônica e intermitente. Em outro estudo, realizado no Senegal, Gassama-Sow e colaboradores (2004) detectaram a presença de EAEC em 19,6% dos pacientes soropositivos com diarreia. Nestes dois estudos, EAEC também foi detectada em amostras de pacientes assintomáticos. No estudo de Samie e colaboradores (2007), realizado na África do Sul, foi observada a associação da infecção de EAEC com outros enteropatógenos, na sua maioria protozoários parasitas, em pacientes soropositivos. Também foi detectada a presença de sangue oculto nas fezes de pacientes com diarreia e infectados somente com EAEC. Até o presente momento não foram realizados estudos avaliando a resposta inflamatória causada por EAEC isoladas de indivíduos HIV soropositivos diarreicos.

A resposta inflamatória é um fator primordial no dano intestinal e consequente sintomatologia associada à infecção (Hebbelstrup Jensen *et al.*, 2014). Alguns trabalhos têm demonstrado a associação da presença de fatores de virulência, como adesinas e antígenos

flagelares, com o estímulo à produção de citocinas na infecção por EAEC (Steiner *et al.*, 1998; Steiner *et al.*, 2000; Mercado *et al.*, 2011; Estrada-García *et al.*, 2014; Braga *et al.*, 2018).

Vários estudos têm adotado o modelo de infecção em células *in vitro* para investigar a produção de citocinas induzida na infecção por EAEC. Na pesquisa de Braga e colaboradores (2018), foram estudadas três das quatro cepas utilizadas neste trabalho (042, I49 e H92/3). Foi observado que todas as cepas de EAEC foram capazes de induzir a produção de IL-8 por células T84 diferenciadas, sendo essa linhagem representativa do cólon intestinal humano. Outros trabalhos também demonstram que células Caco-2 também produzem IL-8 *in vitro* na infecção por EAEC (Steiner *et al.*, 2000; Estrada-García *et al.*, 2014). A citocina IL-8 está envolvida na resposta inflamatória da infecção por EAEC. Esta citocina é a principal molécula relacionada à quimiotaxia de leucócitos e está associada a várias outras citocinas pró-inflamatórias (Estrada-García *et al.*, 2014). No presente estudo, cepas de EAEC foram avaliadas quanto à indução da produção de citocinas em células Caco-2 polarizadas e diferenciadas. Todas as cepas de EAEC estudadas induziram intensa produção da citocina pró-inflamatória IL-8, o que corrobora estudos anteriores (Steiner *et al.*, 1998; Braga *et al.*, 2018).

A detecção de citocinas na infecção por EAEC também pode ser realizada por outras ferramentas metodológicas, com modelos que podem se aproximar às condições que ocorrem no organismo. Fazendo uso de cultura de órgãos *in vivo* (IVOC), Gupta e colaboradores (2016) analisaram a resposta inflamatória contra EAEC de biópsias de mucosas provenientes da região duodenal. Os autores observaram que a infecção por EAEC induziu a elevação da expressão das citocinas IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , bem como de TLR-5.

Além das citocinas, outros marcadores inflamatórios também são característicos da infecção por EAEC. Steiner e colaboradores (1998) detectaram marcadores de inflamação nas fezes de crianças com diarreia persistente residentes em uma comunidade carente brasileira, dentre eles PMNs e lactoferrina, além de IL-1 $\beta$ . Greenberg e colaboradores (2002) também detectaram altos níveis destes marcadores inflamatórios em fezes de viajantes de vários locais do mundo que manifestaram sintomas de diarreia. Nas amostras de fezes foram detectados diversos enteropatógenos, incluindo EAEC. Entre os indivíduos infectados por EAEC, foram encontrados altos níveis de lactoferrina, IL-8 e IL-1 $\beta$ .

A resposta inflamatória mediada por IL-8 tem sido ligada a fatores de virulência, dentre eles o flagelo. Steiner e colaboradores (2000), utilizando ensaio *in vitro* com células Caco-2, observaram que a produção de IL-8 pode ser, em parte, relacionada à proteína FliC (flagelina), uma vez que essa produção não foi observada na infecção por cepas de EAEC mutantes aflagelares. Outros trabalhos também apontam que a presença de AggR, AAFs e dispersina

também estão ligados ao estímulo à produção de IL-8 (Mercado *et al.*, 2011; Estrada-García *et al.*, 2014). As cepas utilizadas neste estudo possuem estes fatores de virulência e estimulam a produção de altos níveis de IL-8, dados que corroboram os resultados de estudos anteriores.

As cepas de EAEC 042, I49 e H92/3 utilizadas neste estudo possuem as AAFs e o regulador transcricional *aggR*, o que poderia explicar associação com a alta produção de IL-8 por células Caco-2 infectadas, conforme já relatado em estudos com outras cepas que também expressam o gene (Steiner *et al.*, 1998; Steiner *et al.*, 2000; Braga *et al.*, 2018). Cennimo e colaboradores (2009) verificaram que células de adenocarcinoma de cólon humano HCT-8 infectadas por cepas de EAEC *aggR*-positivas tiveram a produção de IL-8 e de outras citocinas aumentada, quando comparadas às células infectadas por cepas *aggR*-negativas. Também foi observada a maior chance de detecção de marcadores inflamatórios nas fezes de indivíduos infectados com EAEC que apresentam, além do *aggR*, os genes *aap*, *aatA*, *astA* e *set1A*. Os autores concluíram que estes achados indicam que possivelmente um ou mais desses genes podem ser marcadores de virulência relacionado à resposta inflamatória na diarreia causada por EAEC.

Na etapa de aderência de EAEC, moléculas receptoras de fimbrias nas células intestinais podem estar relacionadas à resposta inflamatória da infecção. Em um estudo recente, Boll e colaboradores (2017) verificaram que AAFs se ligam a mucinas, proteínas transmembrana que se comportam como receptoras para adesinas. A mucina MUC1 tem sua expressão aumentada pelas células inflamadas no curso da infecção por EAEC, uma vez que, em condições normais, MUC1 tem uma expressão menos relevante. O aumento da expressão de MUC1 pode ser um fator fundamental na mediação das respostas inflamatórias do organismo, atuando como uma espécie de sensor de AAFs na infecção bacteriana e viabilizando a migração de neutrófilos para o sítio de infecção (Boll *et al.*, 2017).

A produção de outras citocinas, além da IL-8, tem sido relatada em alguns trabalhos. Utilizando a linhagem de células HCT-8 cultivadas *in vitro*, Cennimo e colaboradores (2009), em imunoensaio multiplex, detectaram o aumento na produção de IL-8, IL-6, e TNF- $\alpha$ . Utilizando a mesma linhagem celular e avaliando a produção de mRNA, Medeiros e colaboradores (2013) observaram que a cepa EAEC 042 induziu a expressão de IL-8 e TNF- $\alpha$ , o que não ocorreu com IL-6, além de ter reduzido a expressão de TGF- $\beta$ .

Braga e colaboradores (2018) também observaram o estímulo à produção de IL-6 e TNF- $\alpha$  por células T84 infectadas pelas cepas de EAEC 042 e I49. No entanto, não foi detectado o estímulo à produção de IL-1 $\beta$ , tampouco houve mudança significativa na produção da citocina anti-inflamatória IL-10. Já neste trabalho não foi observado aumento da produção de IL-1 $\beta$ , IL-

6 e TNF- $\alpha$  pelas células Caco-2 infectadas pelas mesmas cepas de EAEC, o que pode estar associado à baixa expressão de TLR na membrana apical de IECs (de Kivit *et al.*, 2014). No entanto, foi observada uma menor produção de IL-10, ainda que não significativa, induzida por 3 das 4 cepas estudadas. Embora a produção de IL-1 $\beta$  seja relacionada à infecção por EAEC e detectada em indivíduos infectados, esta citocina não parece ser comumente detectada em ensaios *in vitro*, já que a expressão de TLR é induzida por bactérias comensais, ausentes neste modelo de estudo (de Kivit *et al.*, 2014, Braga *et al.*, 2018).

Probióticos são microrganismos capazes de colonizar mucosas e conferir benefícios ao hospedeiro. Desde a década de 1970 diversos estudos relatam tais benefícios. Estes microrganismos têm seu uso profilático ou terapêutico relacionado ao combate da disbiose intestinal, sobretudo diarreia associada ao uso de antibióticos e diarreia infecciosa. Além disso, também tem sido relatado o uso de probióticos para alergias, intolerância à lactose, vaginites, diabetes e câncer (Goldin, 1998; Ritchie & Romanuk, 2012).

Bactérias probióticas, sobretudo cepas de espécies pertencentes aos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, podem ter efeito direto sobre outras bactérias patogênicas, podendo inibir o crescimento, a produção de toxinas e a expressão de fatores de virulência. Tem sido relatada a atividade antimicrobiana de cepas probióticas provenientes de diferentes fontes contra diversos patógenos relevantes, como *Campylobacter jejuni*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* e patótipos de DEC (Asahara *et al.*, 2004; Abd El-Moez *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2016).

A condição de sinergismo multicepas e multiespécies também possui importância na ação de probióticos contra microrganismos patogênicos. Kumar e colaboradores (2016) verificaram que duas cepas probióticas das espécies *L. acidophilus* e *L. plantarum* foram capazes de demonstrar ação antimicrobiana dose-dependente contra cepas de EAEC resistentes a múltiplas drogas. Quando ambos os probióticos estiveram em co-cultivo apresentaram sua ação antimicrobiana amplificada, demonstrando um sinergismo da atividade probiótica dessas cepas. Essa condição foi ainda destaque na diminuição da contagem de EAEC nas fezes de camundongos infectados. Lee e colaboradores (2017) demonstraram que o consumo de iogurtes contendo *B. animalis*, *L. paracasei* e *L. plantarum* em conjunto está relacionado à maior ação de células NK, sugerindo que uma fonte de múltiplos probióticos podem ter efeito positivo no desenvolvimento imunológico do hospedeiro.

Alguns estudos *in vivo* têm relatado a relevância do uso de probióticos na profilaxia ou na melhora da diarreia e outras doenças causada por diversos patógenos do TGI. No estudo de Ogawa e colaboradores (2001), coelhos infectados por STEC (*E. coli* O157:H7) tiveram os



sintomas associados à diarreia severa diminuídos após o tratamento com *L. casei* Shirota, embora a administração do probiótico não tenha atrasado o surgimento ou eliminado totalmente os sintomas. No trabalho de Asahara e colaboradores (2004), camundongos BALB/c infectados com STEC apresentaram perda de peso corporal e morte associados à diarreia severa. Os animais doentes submetidos ao tratamento com o probiótico *B. breve* apresentaram inibição desses marcadores associados à complicação da doença diarreica causada por STEC. Abd El-Moez e colaboradores (2010) observaram que ratos albinos adultos infectados por *Campylobacter jejuni* tratados com *L. acidophilus* tiveram redução dos sintomas diarreicos, menor contagem de *C. jejuni* nas fezes e menores lesões inflamatórias de órgãos internos, quando comparados ao grupo não tratado. Recentemente, em um estudo com pacientes de dois hospitais coreanos, Yoon e colaboradores (2019) associaram o consumo de leite fermentado com *L. paracasei* associado com *Glycyrrhiza glabra* (alcaçuz) à diminuição da inflamação estomacal crônica e dos sintomas gástricos característicos da infecção por *Helicobacter pylori*.

Outros modelos de estudos, inclusive utilizando células cultivadas *in vitro*, também têm sido utilizados na avaliação da inibição da virulência de enteropatógenos por cepas probióticas. Sherman e colaboradores (2005) verificaram que duas cepas probióticas de *Lactobacillus* foram capazes de apresentar redução dose-dependente da adesão de *E. coli* O157:H7 e de cepas de EPEC a células HEp-2 e T84 cultivadas *in vitro* pré-tratadas com os probióticos. Os autores verificaram, por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), que as cepas probióticas são capazes de aderir à superfície das células T84. Ainda no mesmo estudo, foi observado por imunofluorescência indireta que a presença das cepas probióticas inibiu as lesões A/E causadas por EPEC, não sendo observados focos de alfa-actina relacionados ao rearranjo do citoesqueleto característicos dessas lesões. Estes achados foram corroborados em estudos posteriores, uma vez que também foi verificado, em outras linhagens celulares, a diminuição do aparecimento de lesões A/E em células infectadas por EHEC e tratadas com probióticos (Johnson-Henry et al., 2008).

Hirano e colaboradores (2003) observaram que a presença do probiótico *L. rhamnosus* não foi capaz de inibir a aderência de *E. coli* O157:H7 a células C2BBel (um subtipo de células Caco-2 polarizadas). No entanto, a presença do probiótico foi capaz de inibir a internalização de EHEC nas células. Os autores também observaram que *L. rhamnosus* foi a única cepa capaz de aderir às células da linhagem utilizada. Outras três cepas probióticas de lactobacilos (*L. gasseri*, *L. casei* e *L. plantarum*) não interferiram na aderência e na internalização de EHEC, o que pode estar relacionado com o fato destas cepas não aderirem ao tipo celular utilizado.

Alguns fatores podem estar relacionados à adesão de cepas probióticas às células do hospedeiro e também às células cultivadas *in vitro*. Greene e Klaenhammer (1994) estudaram fatores que influenciaram a adesão de três cepas probióticas isoladas de humanos (duas cepas de *L. acidophilus* e uma de *L. gasseri*) a células Caco-2 polarizadas e diferenciadas. Os autores verificaram que a aderência é dose-dependente, melhor em pH ácido e o tratamento com protease e a oxidação de carboidratos da superfície celular podem diminuir a aderência em intensidades variadas entre as cepas. Os autores inferiram que a aderência de cepas probióticas às células *in vitro* envolve uma variada combinação de fatores de superfície celulares. Outros estudos apontam estruturas da superfície celular bacteriana, como proteínas de ligação ao muco, às junções celulares e à superfície de células, envolvidas na aderência de probióticos à mucosa *in vivo* e a células cultivadas *in vitro*. Existe uma gama de combinações de estruturas envolvidas, portanto, na colonização de diferentes probióticos (Sengupta et al., 2013; Westermann et al., 2016).

Microrganismos com atividade probiótica também atuam modulando a resposta imunológica inata e adquirida. Ogawa e colaboradores (2001) identificaram altos níveis de IgA anti-Stx 1 e 2 em coelhos infectados por STEC após a administração do tratamento com *L. casei*, diminuindo a concentração da toxina no intestino dos animais. Ashraf e Shah (2014) também associaram mecanismos imunológicos, incluindo maior número de células IgA<sup>+</sup> no intestino de animais, à administração das bactérias probióticas *B. animalis*, *L. johnsonii* e *B. lactis* e do fungo *Saccharomyces boulardii*. De acordo com estes achados, probióticos desempenham importante papel no desenvolvimento da imunidade de mucosas.

A propriedade de imunomodulação de probióticos tem sido ligada às vias de ação de TLR 2, TLR 4 e NF- $\kappa$ B. Karlsson e colaboradores (2012) verificaram que uma cepa de *L. rhamnosus* aumenta a expressão de NF- $\kappa$ B de células de bexiga infectadas com UPEC via ativação de TLR 4, sendo observado o aumento da produção de TNF. Jung e colaboradores (2015) verificaram que uma cepa de *L. sakei* aumentou a atividade fagocítica e induziu expressão e a produção de óxido nítrico (NO), IL-6 e TNF- $\alpha$  por macrófagos expostos ao probiótico, através da ativação de NF- $\kappa$ B. A estimulação inflamatória está correlacionada à ativação de TLR 2, uma vez que os autores observaram que a produção de NO foi inibida na presença de anticorpos anti-TLR 2. Rocha-Ramírez e colaboradores (2017) também obtiveram achados semelhantes, em que cepas de lactobacilos levaram à ativação de NF- $\kappa$ B e produção de citocinas relacionadas por macrófagos ativadas, em efeito inflamatório TLR 2-dependente.

Jiang e colaboradores (2016) avaliaram a expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$  e da citocina anti-inflamatória IL-10 por células Caco-2 infectadas com

Salmonella tratadas e não tratadas com *L. plantarum*. Os autores verificaram que as citocinas pró-inflamatórias tiveram sua expressão reduzida quando as células infectadas foram tratadas com a cepa probiótica e que a presença da mesma aumentou os níveis de expressão de IL-10 em comparação aos tapetes infectados sem tratamento com probiótico. Recentemente, Kim e colaboradores (2019) verificaram que *L. acidophilus* reduziu a expressão de TNF- $\alpha$  e também induziu a expressão de IL-10, sendo a redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias relacionadas à supressão de NF- $\kappa$ B.

No presente estudo, as cepas probióticas Ba e Lc foram capazes de modular a produção de algumas citocinas envolvidas na resposta inflamatória à infecção por EAEC. Essa modulação se deu na condição de sinergismo, com a exposição de células Caco-2 infectadas por cepas de EAEC a ambos os probióticos, uma vez que o tratamento com cada um dos probióticos não surtiu efeito significativo. As cepas de EAEC induziram a produção de IL-8, mas, ainda que em conjunto, os probióticos não foram capazes de reduzir a produção desta citocina. Os probióticos induziram menor produção de IL-1 $\beta$  em relação a células Caco-2 não infectadas e também de células infectadas pelas cepas de EAEC 1500 e I49. Ainda, os probióticos foram capazes de reduzir substancialmente os níveis de IL-1 $\beta$  induzida pela cepa I49. Células expostas somente aos probióticos tiveram níveis de produção de IL-6 significativamente mais baixos do que os tapetes infectados pela cepa de EAEC I49 sem tratamento com probióticos. Curiosamente, os tapetes celulares de Caco-2 infectados e não infectados por EAEC e expostos aos probióticos produziram maiores concentrações de TNF- $\alpha$ .

A não diminuição dos níveis de IL-8 e a indução da produção de TNF- $\alpha$  pelas células Caco-2 expostas aos probióticos estão em desacordo com os resultados de estudos anteriores utilizando modelos *in vitro* de co-cultivo (Jiang et al., 2016; Kim et al., 2019). Por outro lado, outros estudos apontaram o estímulo à produção de TNF- $\alpha$ , em consequência da ativação de NF- $\kappa$ B e da indução de expressão de TLR pelas EIC expostas a cepas probióticas. O maior aumento da produção de TNF por células Caco-2 infectadas e expostas aos probióticos pode estar relacionado à via de sinalização de TLRs, responsivos aos probióticos e a moléculas de superfície presentes em enterobactérias, como o LPS (Vizoso Pinto et al., 2009; Karlsson et al., 2012; de Kivit et al., 2014; Jung et al., 2015; Rocha-Ramirez et al., 2017).

A citocina IL-10 tem função reguladora da resposta imunológica, inibindo as vias de sinalização pró-inflamatórias. Células Caco-2 infectadas por três das quatro cepas de EAEC e tratadas com as cepas probióticas tiveram maior produção de IL-10 em relação a células infectadas sem tratamento, restaurando os níveis de produção da citocina, o que corrobora achados de estudos anteriores (Jiang et al., 2016; Kim et al., 2019).

As cepas probióticas utilizadas neste estudo, em conjunto, foram capazes de modular a resposta inflamatória de células intestinais infectadas por EAEC. Os resultados obtidos neste estudo sugerem, portanto, que bactérias probióticas podem atuar por diversas vias na modulação da resposta imunológica a bactérias patogênicas.

No presente estudo, também foi avaliada a influência das cepas probióticas Ba e Lc na aderência de cepas de EAEC a tapetes celulares de Caco-2 não diferenciados (3 dias de cultivo) e polarizados e diferenciados (14 dias de cultivo). As células Caco-2 não diferenciadas são fenotipicamente representativas de tapetes de enterócitos em fase de diferenciação, semelhantes aos encontrados nas criptas das vilosidades ou em células danificadas em processo de reparação. Células Caco-2 com 14 dias de cultivo apresentam outras características, com a presença de microvilosidades e expressão de enzimas funcionais como sucrase-isomaltase e dipeptidilpeptidase (Chantret et al., 1988). Ainda que oriundas de intestino grosso, tais células diferenciadas assumem o perfil fenotípico de enterócitos do intestino delgado (Pinto et al., 1983). Foi observada uma maior adesão de EAEC aos tapetes indiferenciados, sendo necessário o ajuste experimental e a diminuição em 10 vezes do inóculo inicial bacteriano. As cepas de EAEC apresentaram padrão variado quando em co-cultivo com Ba e Lc separados e em conjunto, tendo sua aderência aumentada ou diminuída. O número de bactérias da cepa de EAEC I49 recuperadas dos tapetes celulares, em ambos os estágios de diferenciação, foi significativamente maior quando os probióticos estiveram presentes. A cepa 1500 teve sua aderência às células diferenciadas diminuída, quando em co-cultivo com os probióticos em conjunto, ao passo que sua aderência ao tapete indiferenciado foi aumentada na presença do probiótico Lc. Também não foi recuperada uma quantidade significativa de bactérias das cepas EAEC 042 e H92/3 dos tapetes de Caco-2 indiferenciados, quando em co-cultivo com ambos os probióticos. Também não foi observada uma correlação direta destes resultados com a capacidade de imunomodulação dos probióticos.

Em ensaios de infecção utilizando células cultivadas *in vitro* como modelo, o grau de diferenciação e de maturação celular também pode afetar a aderência bacteriana, influenciando na concentração de receptores. As diferenças na expressão destes ligantes podem ter um papel crucial na determinação da região de ligação de EAEC (Kang et al., 2001). Células Caco-2 são derivadas de adenocarcinoma de cólon. Apesar de sua origem associada ao intestino grosso, quando cultivadas *in vitro* por cerca de 14 dias, as células formam tapetes polarizados e diferenciados, com características fenotípicas semelhantes às células de intestino delgado (Pinto et al., 1983; Hidalgo et al., 1989; Rosa et al., 2001).

Alguns estudos têm demonstrado que cepas de EAEC tem maior afinidade por aderir a células do epitélio do intestino grosso, apresentando pouca ou nenhuma aderência a células de regiões do intestino delgado. Yamamoto e colaboradores (1991), Knutton e colaboradores (1992) e Nataro e colaboradores (1996) estudaram a aderência de cepas de EAEC em modelos *in vitro* e *in vivo*. Os resultados dos três estudos são condizentes e observaram um maior número de bactérias aderentes às células derivadas de cólon do que aderentes a células derivadas de jejuno e íleo. Andrade e colaboradores (2011) e Braga e colaboradores (2017), utilizando modelo *ex vivo*, observaram, por MEV, a adesão de cepas de EAEC em íleo e cólon no padrão clássico de aderência agregativa de “tijolos empilhados”, com maior abundância na região colônica. Os achados destes estudos inferem que a predileção pelo intestino grosso como sítio de adesão de EAEC e a baixa aderência ao intestino delgado é sugestiva de uma provável deficiência de receptores para EAEC nas células de jejuno e íleo.

Alguns estudos de atividade probiótica contra patógenos *in vitro* têm utilizado três estratégias metodológicas básicas na avaliação da formação de biofilme e aderência a células, visando simular as condições ocorridas em comunidades bacterianas. As estratégias são (i) inibição, em que probióticos são adicionados ao sistema antes da formação de biofilme ou aderência do patógeno; (ii) competição, onde os probióticos e o patógeno são adicionados simultaneamente; (iii) destacamento, onde os probióticos são adicionados após a formação de biofilme ou aderência inicial do patógeno, com melhores resultados relacionado à atividade probiótica nas condições de inibição (Woo et al., 2013; Jiang et al., 2015). No presente estudo, os resultados obtidos acerca da capacidade de imunomodulação e de interferência na aderência pelas duas cepas probióticas utilizadas, durante a infecção de células Caco-2 por cepas de EAEC, são provenientes das condições metodológicas semelhantes à estratégia de competição.

O uso de probióticos tem indicação como tratamento adjuvante da enterocolite necrosante em recém nascidos prematuros ou a termo (Baucells et al., 2016; Kutylowski & Yahia, 2019; Wang et al., 2019). Baucells e colaboradores (2016), em seu trabalho de revisão, analisaram alguns trabalhos acerca do benefício do uso de probióticos, observando que o uso sinérgico de dois ou mais probióticos é mais vantajoso na redução da mortalidade, embora haja situações em que não há diferença significativa do uso de probióticos no desfecho de alguns casos. Em estudo de revisão mais recente, Kutylowski e Yahia (2019) concluíram que o sucesso do uso de probióticos depende de uma série de fatores, como modo de administração, duração do tratamento e condições do neonato. Wang e colaboradores (2019), ainda, verificaram que, em casos mais graves, o uso de probióticos não é capaz de prevenir a progressão dos estágios de enterocolite necrosante.

Em uma análise mais ampla sobre o uso de probióticos no tratamento de disbiose intestinal, Gurevich e colaboradores (2019) concluíram que apesar do largo uso de probióticos na profilaxia e no tratamento de doenças intestinais, ainda há uma gama de questionamentos sobre a escolha de qual ou quais cepas deverão ser administradas ao paciente, fazendo uma análise caso a caso para estabelecer a duração da terapia e a dosagem correta, visando a melhora efetiva da doença. Embora benefícios à saúde do hospedeiro tenham sido amplamente atribuídos ao uso profilático e terapêutico do uso de probióticos, alguns estudos apontam ressalvas na sua utilização, discutindo fatores que influenciam na eficácia da atividade probiótica desses microrganismos.

No presente estudo, as cepas probióticas *Bifidobacterium animalis* DN 173 010 e *Lactobacillus casei* Shirota foram testadas quanto a sua capacidade de imunomodulação de células Caco-2 infectadas por quatro cepas de EAEC. Foi verificado que a imunomodulação significativa se deu a partir da análise da produção de citocinas, somente quando houve tratamento com ambos os probióticos, sugerindo uma ação sinérgica. Os mesmos probióticos foram avaliados quanto a capacidade de interferir na aderência de cepas de EAEC a células Caco-2 diferenciadas e indiferenciadas, com um padrão de resultado variado e sem relação direta com a imunomodulação. Estes resultados sugerem que a presença de probióticos pode interferir de diversas maneiras na infecção por cepas de EAEC distintas.

## CONCLUSÕES

- a) As cepas de EAEC foram capazes de induzir a secreção de IL-8, porém não aumentaram significativamente os níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6, e TNF- $\alpha$  produzidas por células Caco-2;
- b) Os probióticos separados não foram capazes de modular significativamente a produção de citocinas, o que indica uma atuação sinérgica de ambos os probióticos na imunomodulação;
- c) À exceção de IL-8, os probióticos foram capazes de modular a produção das citocinas pró-inflamatórias de células Caco-2 infectadas e não infectadas por EAEC;
- d) A produção da citocina anti-inflamatória IL-10 por células Caco-2 infectadas com EAEC foi restabelecida no tratamento com os probióticos;
- e) Não foi observada correlação da influência de probióticos na resposta inflamatória e na aderência de EAEC a células Caco-2;
- f) As cepas de EAEC apresentaram padrão variado na aderência a células Caco-2 diferenciadas e não diferenciadas quando em co-cultivo com probióticos juntos e separados, sugerindo que a presença dos probióticos pode interferir de maneiras variadas na infecção por cepas de EAEC;
- g) Os probióticos foram capazes de aderir a células Caco-2 diferenciadas e não diferenciadas de maneira semelhante, com *Lc* apresentando aderência quantitativamente mais elevada;
- h) O presente estudo se mostrou importante para elucidar o papel que a atividade probiótica de cepas bacterianas exerce na infecção por EAEC.

## REFERÊNCIAS

- Abd El-Moez SI, Ahmed FY, Samy AA, Ali AR. Probiotic Activity of *L. acidophilus* against Major Food-borne Pathogens Isolated from Broiler Carcasses. *Nat. Sci.* 2010; 8: 69-78.
- Abe CM, Knutton S, Pedroso MZ, Freymüller E, Gomes TAT. An enteroaggregative *Escherichia coli* strain of serotype O111:H12 damages and invades cultured T84 cells and human colonic mucosa. *FEMS Microbiol. Lett.* 2001; 203: 199-205.
- Al-Hasani K, Navarro-Garcia F, Huerta J, Sakellaris H, Adler B. The immunogenic SigA enterotoxin of *Shigella flexneri* 2a binds to HEp-2 cells and induces fodrin redistribution in intoxicated epithelial cells. *PloS One* 2009; 4(12): e8223.
- Andrade JAB, Freymüller E, Fagundes-Neto U. Adherence of enteroaggregative *Escherichia coli* to ileal and colonic mucosa: an in vitro study utilizing the scanning electron microscopy. *Arq. Gastroenterol.* 2011; 48(3): 199-204.
- Arenas-Hernández MMP, Martínez-Laguna Y, Torres AG. Clinical implications of enteroadherent *Escherichia coli*. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 2012; 14(5): 386-394.
- Asahara T, Shimizu K, Nomoto K, Hamabata T, Ozawa A, Takeda Y. Probiotic bifidobacteria protect mice from lethal infection with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* 2004; 72(4): 2240-2247.
- Ashraf R & Shah NP. Immune system stimulation by probiotic microorganisms. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 2014; 54(7): 938-956.
- Aslani MM, Alikhani MY, Zavari A, Yousefi R, Zamani AR. Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) clinical isolates and their antibiotic resistance pattern. *Int. J. Infect. Dis.* 2011; 15: e136–e139.
- Barbosa FHF, Silva AM, Lima LPJ, Nicoli JR. O gênero *Bifidobacterium*: dominância à favor da vida. *Ciência Equatorial* 2011; 1(2): 15–25.
- Baucells BJ, Hally MM, Sánchez ATA, Aloy JF. Probiotic associations in the prevention of necrotising enterocolitis and the reduction of late-onset sepsis and neonatal mortality in preterm infants under 1,500g: A systematic review. *An. Pediatr. (Barc)* 2016; 85(5): 247-255.
- Benjelloun-Touimi Z, Sansonetti PJ, Parsot C. SepA, the major extracellular protein of *Shigella flexneri*: autonomous secretion and involvement in tissue invasion. *Mol. Microbiol.* 1995; 17: 123–135.
- Bernier C, Gounon P, Le Bouguenec C. Identification of an aggregative adhesion fimbriae (AAF) type III-encoding operon in enteroaggregative *Escherichia coli* as a sensitive probe for detecting the AAF-encoding operon family. *Infect. Immun.* 2002; 70: 4302-4311.
- Bétis F, Brest P, Hofman V, Guignot J, Kansau I, Rossi B, Servin A, Hofman P. Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* infection in T84 cell monolayers induces increased neutrophil transepithelial migration, which in turn promotes cytokine-dependent upregulation



of decay-accelerating factor (CD55), the receptor for Afa/Dr adhesins. *Infect. Immun.* 2003; 71: 1774–1783.

Boisen N, Struve C, Scheutz F, Krogfelt KA, Nataro JP. New adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/ AAF family. *Infect. Immun.* 2008; 76: 3281-3292.

Boisen N, Scheutz F, Rasko DA, Redman JC, Persson S, Simon J, Kotloff KL, Levine MM, Sow S, Tamboura B, Toure A, Malle D, Panchalingam S, Krogfelt KA, Nataro JP. Genomic characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* from children in Mali. *J. Infect. Dis.* 2012; 205: 431–444.

Boisen N, Krogfelt KA, Nataro JP. Enteroaggregative *Escherichia coli*. In: Michael Donnenberg (Ed.), *Escherichia coli: Pathotypes and Principles of Pathogenesis*. (2nd ed), Chapter 8, Academic Press, London, UK, p. 247-273, 2013.

Boll EJ, Ayala-Lujan J, Szabady RL, Louissaint C, Smith RZ, Krogfelt KA, Nataro JP, Ruiz-Perez F, McCormick BA. Enteroaggregative *Escherichia coli* adherence fimbriae drive inflammatory cell recruitment via interactions with epithelial MUC1. *MBio* 2017; 8(3) pii: e00717-17.

Bourgeois AL, Wierzba TF, Walker RI. Status of vaccine research and development for enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Vaccine* 2016; 34(26): 2880-2886.

Braga RLL, Pereira ACM, Santos PA, Freitas-Almeida AC, Rosa ACP. Ex vivo model of rabbit intestinal epithelium applied to the study of colonization by enteroaggregative *Escherichia coli*. *Arq. Gastroenterol.* 2017; 54(2): 130-134.

Braga RLL, Pereira ACM, Ferreira AF, Rosa ACP, Pereira-Manfro WF. Intracellular persistence of enteroaggregative *Escherichia coli* induces a proinflammatory cytokines secretion in intestinal epithelial T84 cells. *Arq. Gastroenterol.* 2018; 55(2): 133-137.

Card T, Enck P, Barbara G, Boeckxstaens GE, Santos J, Azpiroz F, Mearin F, Aziz Q, Marshall J, Spiller R. Post-infectious IBS: Defining its clinical features and prognosis using an internet-based survey. *United European Gastroenterol. J.* 2018; 6(8): 1245–1253.

Cennimo D, Abbas A, Huang DB, Chiang T. The prevalence and virulence characteristics of enteroaggregative *Escherichia coli* at an urgent-care clinic in the USA: a case-control study. *J. Med. Microbiol.* 2009; 58(4): 403-407.

Chantret I, Barbat A, Dussaulx E, Brattain MG, Zweibaum A. Epithelial Polarity, Villin Expression, and Enterocytic Differentiation of Cultured Human Colon Carcinoma Cells: A Survey of Twenty Cell Lines. *Cancer Research* 1988; 48: 1936-1942.

Chattaway MA, Harris R, Jenkins C, Tam C, Coia JE, Gray J, Iturriza-Gomara M, Wain J. Investigating the link between the presence of enteroaggregative *Escherichia coli* and infectious intestinal disease in the United Kingdom, 1993 to 1996 and 2008 to 2009. *Euro Surveill.* 2013; 18(37) pii: 20582.

Chowdhury F, Khan IA, Patel S, Siddiq AU, Saha NC, Khan AI, Saha A, Cravioto A, Clemens J, Qadri F, Ali M. Diarrheal illness and healthcare seeking behavior among a population at high risk for diarrhea in Dhaka, Bangladesh. *PLoS One* 2015; 10: e0130105.

Clasen TF, Alexander KT, Sinclair D, Boisson S, Peletz R, Chang HH, Majorin F, Cairncross S. Interventions to improve water quality for preventing diarrhoea. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2015; 10: CD004794.

Clements A, Young JC, Constantinou N, Frankel G. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes* 2012; 3(2): 71-87.

Croxen MA & Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010; 8(1): 26-38.

Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin. microbial. rev.* 2013; 26(4): 822-880.

Czeczulin JR, Balepur S, Hicks S, Phillips A, Hall R, Kothary MH, Navarro-Garcia F, Nataro JP. Aggregative adherence fimbriae II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 1997; 65: 4135-4145.

Da Re S, Valle J, Charbonnel N, Beloin C, Latour-Lambert P, Faure P, Turlin E, Le Bouguéne C, Renaud-Mongé G, Davoodabadi A, Dallal MMS, Lashani E, Ebrahimi MT, Forestier C, Ghigo JM. Identification of commensal *Escherichia coli* genes involved in biofilm resistance to pathogen colonization. *PLoS One* 2013; 8: e61628.

Davoodabadi A, Dallal MMS, Lashani E, Ebrahimi MT. Antimicrobial Activity of *Lactobacillus* spp. Isolated From Fecal Flora of Healthy Breast-Fed Infants Against Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Jundishapur J. Microbiol.* 2015; 8(12): e27852.

Dudley EG, Abe C, Ghigo JM, Latour-Lambert P, Hormazabal JC, Nataro JP. An IncII plasmid contributes to the adherence of the atypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain C1096 to cultured cells and abiotic surfaces. *Infect. Immun.* 2006; 74: 2102-2114.

Durrer P, Zbinden R, Fleisch F, Altwegg M, Ledergerber B, Karch H, Weber R. Intestinal infection due to enteroaggregative *Escherichia coli* among human immunodeficiency virus-infected persons. *J. Infect. Dis.* 2000; 182(5): 1540-1544.

Edwards LA, Bajaj-Elliott M, Klein NJ, Murch SH, Phillips AD. Bacterial-epithelial contact is a key determinant of host innate immune responses to enteropathogenic and enteroaggregative *Escherichia coli*. *PLoS One* 2011; 6(10): e27030.

Eslava C, Navarro-García F, Czeczulin JR, Henderson IR, Cravioto A, Nataro JP. Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 1988; 66: 3155-3163.

Estrada-Garcia T, Perez-Martinez I, Bernal-Reynaga R, Zaidi MB. Enteroaggregative *Escherichia coli*: a pathogen bridging the north and south. *Curr. Trop. Med. Rep.* 2014; 1(2): 88-96.

Farthing M, Salam MA, Lindberg G, Dite P, Khalif I, Salazar-Lindo E, Ramakrishna BS, Goh KL, Thomson A, Khan AG, Krabshuis J, LeMair A, WGO. Acute diarrhea in adults and children: a global perspective. *J. Clin. Gastroenterol.* 2013; 47: 12-20.

Ferreira AF, Pereira-Manfro WF, Rosa ACP. Diarrheagenic *Escherichia coli* and Probiotic Activity against Foodborne Pathogens: A Brief Review. *Gastroenterol. Hepatol. Open Access* 2017; 7(5): 00248.

Ferreira PC, Campos IB, Abe CM, Trabulsi LR, Elias WP, Ho PL, Oliveira ML. Immunization of mice with *Lactobacillus casei* expressing intimin fragments produces antibodies able to inhibit the adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to cultivated epithelial cells. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2008; 54(2): 245-254.

França FLS, Wells TJ, Browning DF, Nogueira RT, Sarges FS, Pereira AC, Cunningham AF, Lucheze K, Rosa ACP, Henderson IR, Luna MG. Genotypic and Phenotypic Characterisation of Enteraggregative *Escherichia coli* from Children in Rio de Janeiro, Brazil. *Plos One* 2013; 8(7): 1-9.

Frank C, Werber D, Cramer JP, Askar M, Faber M, An Der Heiden M, Bernard H, Fruth A, Prager R, Spode A, Wadl M, Zoufaly A, Jordan S, Kemper MJ, Follin P, Müller L, King LA, Rosner B, Buchholz U, Stark K, Krause G. Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *N. Engl. J. Med.* 2011; 365: 1771–1780.

Gassama-Sow A, Sow PS, Guèye M, Guèye-N'diaye A, Perret JL, M'boup S, Aïdara-Kane A. Characterization of pathogenic *Escherichia coli* in human immunodeficiency virus-related diarrhea in Senegal. *J. Infect. Dis.* 2004; 189(1): 75-78.

Goldin BR. Health benefits of probiotics. *Br. J. Nutr.* 1998; 80: S203-S207.

Gomes TAT, Elias WP, Scaletsky ICA, Guth BEC, Rodrigues JFR, Piazza RMF, Ferreira LCS, Martinez, MB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Braz. J. Microbiol.** 2016; 47s: 3-30.

Goyal A, Konar M, Setia A, Narang A, Ghosh S. Galactose specific adhesin of enteroaggregative *E. coli* induces IL-8 secretion via activation of MAPK and STAT-3 in INT-407 cells. *Biochim. Biophys. Acta* 2010; 1800: 574-579.

Greenberg DE, Jiang ZD, Steffen R, Verenker MP, Dupont HL. Markers of inflammation in bacterial diarrhea among travelers, with a focus on enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenicity. *J. Infect. Dis.* 2002; 185: 944-949.

Greene JD & Klaenhammer TR. Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994; 60: 4487-4494.

Gupta D, Sharma M, Sarkar S, Thapa BR, Chakraborti A. Virulence determinants in enteroaggregative *Escherichia coli* from North India and their interaction in in vitro organ culture system. *FEMS Microbiol. Lett.* 2016; 363(17): fnw189.

Gurevich KG, Nikonov EL, Zaborova VA, Shelekhova TY, Zolnikova OY. Probiotic using as a part of complex therapy of disbiotic violations at some intestinal diseases. *Vopr. Pitan.* 2019; 88(1): 77-84.

Guyer DM, Radulovic S, Jones F, Mobley HLT. Sat, the secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*, is a vacuolating cytotoxin for bladder and kidney epithelial cells. *Infect. Immun.* 2002; 70: 4539-4546.

Harrington, SM, Dudley EG, Nataro JP. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. *FEMS Microbiol. Lett.* 2006; 254: 12-18.

Hartland EL & Leong JM. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *E. coli*: ecology, pathogenesis, and evolution. *Front Cell. Infect. Microbiol.* 2013; 3: 15.

Havt A, Lima IF, Medeiros PH, Clementino MA, Santos AK, Amaral MS, Veras HN, Prata MM, Lima NL, Di Moura A, Leite AM, Soares, AM, Filho JQ, Houpt ER, Nataro JP, Guerrant RL, Lima AA. Prevalence and virulence gene profiling of enteroaggregative *Escherichia coli* in malnourished and nourished Brazilian children. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2017; 89(2): 98-105.

Hebbelstrup Jensen B, Olsen KE, Struve C, Krogfelt KA, Petersen AM. Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2014; 27(3): 614-630.

Hebbelstrup Jensen, B, Poulsen A, Hebbelstrup-Rye-Rasmussen S, Struve C, Engberg JH, Friis-Møller A, Boisen N, Jønsson R, Petersen RF, Petersen AM, Krogfelt KA. Genetic virulence profile of enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from Danish children with either acute or persistent diarrhea. *Front Cell. Infect. Microbiol.* 2017; 7: 230.

Henderson IR, Navarro-García F, Nataro JP. The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol.* 1998; 6: 370-378.

Henderson IR, Czczulin J, Eslava C, Noriega F, Nataro JP. Characterization of pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 1999; 67(11): 5587-96.

Hicks S, Candy DC, Phillips AD. Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa in vitro. *Infect. Immun.* 1996; 64: 4751-4760.

Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 1989; 96(3): 736-749.

Hill D, Sugrue I, Tobin C, Hill C, Stanton C, Ross RP. The *Lactobacillus casei* Group: History and Health Related Applications. *Front Microbiol.* 2018; 9: 2107.

Hirano, J, Yoshida T, Sugiyama T, Koide N, Mori I, Yokochi T. The effect of *Lactobacillus rhamnosus* on enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection of human intestinal cells in vitro. *Microbiol. Immunol.* 2003; 47(6): 405-409.

Huang DB, Koo H, Dupont HL. Enteroaggregative *Escherichia coli*: an emerging pathogen. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 2004; 6(2): 83-86.

Huang DB, Mohanty A, Dupont HL, Okhuysen PC, Chiang T. A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.* 2006; 55: 1303-1311.

Hütt P, Shchepetova J, Lõivukene K, Kullisaar T, Mikelsaar M. Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacterial against entero- and uropathogens. *J. Appl. Microbiol.* 2006; 100(6): 1324-1332.

Indira M, Venkateswarulu TC, Abraham Peele K, Nazneen Bobby M, Krupanidhi S. Bioactive molecules of probiotic bacteria and their mechanism of action: a review. *3 Biotech* 2019; (8): 306.

Jafari A, Aslani MM, Bouzari S. Enteroaggregative *Escherichia coli*, a heterogenous, underestimated and under-diagnosed *E. coli* pathotype in Iran. *Gastroenterol. Hepatol. Bed Bench* 2013; 6(2): 71-79.

Jenkins C. Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2018; 416: 27-50.

Jiang M, Zhang F, Wan C, Xiong Y, Shah NP, Wei H, Tao X. Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* WLPL04 isolated from human breast milk. *J. Dairy Sci.* 2016; 99(3): 1736-1746.

Johnson-Henry KC, Donato KA, Shen-Tu G, Gordanpour M, Sherman PM. *Lactobacillus rhamnosus* strain GG prevents enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7-induced changes in epithelial barrier function. *Infect. Immun.* 2008; 76(4): 1340-1348.

Jonsson R, Struve C, Boisen N, Mateiu RV, Santiago AE, Jenssen H, Nataro JP, Krogfelt KA. Novel aggregative adherence fimbria variant of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 2015; 83: 1396-1405.

Jonsson R, Liu B, Struve C, Yang Y, Jørgensen R, Xu Y, Jenssen H, Krogfelt KA, Matthews S. Structural and functional studies of *Escherichia coli* aggregative adherence fimbriae (AAF/V) reveal a deficiency in extracellular matrix binding. *Biochim. Biophys. Acta* 2017a; 1865(3): 304-311.

Jonsson R, Struve C, Boll EJ, Boisen N, Joensen KG, Sørensen CA, Jensen BH, Scheutz F, Jenssen H, Krogfelt KA. A novel pAA virulence plasmid encoding toxins and two distinct variants of the fimbriae of Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Front Microbiol.* 2017b; 8: 263.

Jung JY, Shin JS, Lee SG, Rhee YK, Cho CW, Hong HD, Lee KT. *Lactobacillus sakei* K040706 evokes immunostimulatory effects on macrophages through TLR 2-mediated activation. *Int. Immunopharmacol.* 2015; 28(1): 88-96.

Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004; 2: 123-140.

Karlsson M, Scherbak N, Reid G, Jass J. *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 enhances NF-kappaB activation in *Escherichia coli*-stimulated urinary bladder cells through TLR4. *BMC Microbiol.* 2012; 12: 15.

Kaur P, Chakraborti A, Asea A. Enteroaggregative *Escherichia coli*: An Emerging Enteric Food Borne Pathogen. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* 2010; 2010: 254159.

Kawai T & Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 2011; 34: 637-650.

Keusch GT, Fontaine O, Bhargava A, Boschi-Pinto C, Bhutta AZ, Gotuzzo E, Rivera J, Chow J, Shahid-Salles S, Laxminarayan R. Diarrheal Diseases. In: Jamison DT, Breman JG, Measham AR, Alleyne G, Claeson M, Evans DB, Jha P, Mills A, Musgrove P. (Eds). *Disease Control Priorities in Developing Countries*. 2nd edition. Chapter 19. Washington (DC): The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank, 2006.

Khan K, Konar M, Goyal A, Ghosh S. Enteroaggregative *Escherichia coli* infection induces IL-8 production via activation of mitogen-activated protein kinases and the transcription factors NF-kappaB and AP-1 in INT-407 cells. *Mol. Cell. Biochem.* 2010; 337: 17-24.

Kim DH, Kim S, Lee JH, Kim JH, Che X, Ma HW, Seo DH, Kim TI, Kim WH, Kim SW, Cheon JH. *Lactobacillus acidophilus* suppresses intestinal inflammation by inhibiting endoplasmic reticulum stress. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2019; 34(1): 178-185.

Kinnebrew MA & Pamer EG. Innate immune signaling in defense against intestinal microbes. *Immunol. Rev.* 2012; 245: 113-131.

de Kivit S, Tobin MC, Forsyth CB, Keshavarzian A, Landay AL. Regulation of Intestinal Immune Responses through TLR Activation: Implications for Pro- and Prebiotics. *Front Immunol.* 2018; 5: 60.

Knutton S, Shaw RK, Bhan MK, Smith HR, McConnell MM, Cheasty T, Williams PH, Baldwin TJ. Ability of enteroaggregative *Escherichia coli* strains to adhere in vitro to human intestinal mucosa. 1992; *Infect. Immun.* 60: 2083-2091.

Kosek M, Haque R, Lima A, Babji S, Shrestha S, Qureshi S, Amidou S, Mduma E, Lee G, Yori PP, Guerrant RL, Bhutta Z, Mason C, Kang G, Kabir M, Amour C, Bessong P, Turab A, Seidman J, Olortegui MP, Quetz J, Lang D, Gratz J, Miller M, Gottlieb M. Fecal markers of intestinal inflammation and permeability associated with the subsequent acquisition of linear growth deficits in infants. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2013; 88(2): 390-396.

Kumar M, Dhaka P, Vijay D, Vergis J, Mohan V, Kumar A, Kurkure NV, Barbuddhe SB, Malik SV, Rawool DB. Antimicrobial effects of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus* against multidrug-resistant enteroaggregative *Escherichia coli*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2016; 48(3): 265-270.

Kutyłowksi J & Yahia N. Types, Frequency, Duration, and Dosage of Probiotics to Prevent Necrotizing Enterocolitis in Preterm Infants Among Countries. *Adv. Neonatal Care* 2019; 19(3): 188-197.

- Lara-Villoslada F, Olivares M, Sierra S, Rodríguez JM, Boza J, Xaus J. Beneficial effects of probiotic bacteria isolated from breast milk. *Br. J. Nutr.* 2007; 1: S96-100.
- Lan R, Alles MC, Donohoe K, Martinez MB, Reeves PR. Molecular evolutionary relationships of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *Infect. Immun.* 2004; 72(9): 5080-5088.
- Lee A, Lee YJ, Yoo HJ, Kim M, Chang Y, Lee DS, Lee JH. Consumption of Dairy Yogurt Containing *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*, *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* and Heat-Treated *Lactobacillus plantarum* Improves Immune Function Including Natural Killer Cell Activity. *Nutrients* 2017; 9(6): 558-566.
- Liévin-Le Moal V & Servin AL. Anti-infective activities of *Lactobacillus* strains in the human intestinal microbiota: from probiotics to gastrointestinal anti-infectious biotherapeutic agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 2014; 27(2): 167-199.
- Lima AA, Fang G, Schorling JB, Albuquerque L, Mcauliffe JF, Mota S, Leite R, Guerrant RL. Persistent diarrhea in northeast Brazil: etiologies and interactions with malnutrition. *Acta Paediatr. Suppl.* 1992; 381: 39-44.
- Lima AAM, Medeiros PHQS, Havt A. Enteroaggregative *Escherichia coli* subclinical and clinical infections. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2018; 31(5): 433-439.
- Makarova K, Slesarev A, Wolf Y, Sorokin A, Mirkin B, Koonin E, Pavlov A, Pavlova N, Karamychev V, Polouchine N, Shakhova V, Grigoriev I, Lou Y, Rohksar D, Lucas S, Huang K, Goodstein DM, Hawkins T, Plengvidhya V, Welker D, Hughes J, Goh Y, Benson A, Baldwin K, Lee JH, Díaz-Muñiz I, Dosti B, Smeianov V, Wechter W, Barabote R, Lorca G, Altermann E, Barrangou R, Ganesan B, Xie Y, Rawsthorne H, Tamir D, Parker C, Breidt F, Broadbent J, Hutkins R, O'sullivan D, Steele J, Unlu G, Saier M, Klaenhammer T, Richardson P, Kozyavkin S, Weimer B, Mills D. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006; 103(42): 15611-15616.
- Martinez-Medina M, Mora A, Blanco M, López C, Alonso MP, Bonacorsi S, Nicolas-Chanoine MH, Darfeuille-Michaud A, Garcia-Gil J, Blanco J. Similarity and divergence among adherent-invasive *Escherichia coli* and extraintestinal pathogenic *E. coli* strains. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47(12):3968-3979.
- Medeiros P, Bolick DT, Roche JK, Noronha F, Pinheiro C, Kolling GL, Lima A, Guerrant RL. The micronutrient zinc inhibits EAEC strain 042 adherence, biofilm formation, virulence gene expression, and epithelial cytokine responses benefiting the infected host. *Virulence* 2013; 4(7): 624-633.
- Melican K, Sandoval RM, Kader A, Josefsson L, Tanner GA, Molitoris BA, Richter-Dahlfors A. Uropathogenic *Escherichia coli* P and Type 1 fimbriae act in synergy in a living host to facilitate renal colonization leading to nephron obstruction. *PLoS Pathog* 2011; 7(2):e1001298.
- Ménard LP & Dubreuil JD. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1): a new toxin with an old twist. *Crit. Rev. Microbiol.* 2002; 28: 43-60.

Mercado EH, Ochoa TJ, Ecker L, Cabello M, Durand D, Barletta F, Molina M, Gil AI, Huicho L, Lanata CF, Cleary TG. Fecal leukocytes in children infected with diarrheagenic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49(4): 1376-1381.

Monteiro-Neto V, Bando SY, Moreira-Filho CA, Girón JA. Characterization of an outer membrane protein associated with haemagglutination of adhesive properties of enteroaggregative *Escherichia coli* O111:H12. *Cell. Microbiol.* 2003; 5: 533-547.

Nataro JP, Scaletsky ICA, Kaper JB, Levine MM, Trabulsi LR. Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 1985; 48: 378-383.

Nataro JP, Kaper JB, Robins-Browne R, Prado V, Vial P, Levine MM. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1987; 6: 829-831.

Nataro JP, Deng Y, Maneval DR, German AL, Martin WC, Levine MM. Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. 1992; *Infect. Immun.* 60: 2297-2304.

Nataro JP, Hicks S, Phillips AD, Vial PA, Sears CL. T84 cells in culture as a model for enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. *Infect. Immun.* 1996; 64: 4761-4768.

Nataro JP & Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998; 11(1): 142-201.

Nataro JP, Mai V, Johnson J, Blackwelder WC, Heimer R, Tirrell S, Edberg SC, Braden CR, Glenn Morris J Jr, Hirshon JM. Diarrheagenic *Escherichia coli* infection in Baltimore, Maryland, and New Haven, Connecticut. *Clin. Infect. Dis.* 2006; 43: 402-407.

Navarro-García F, Sears C, Eslava C, Cravioto A, Nataro JP. Cytoskeletal effects induced by pet, the serine protease enterotoxin of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 1999; 67: 2184-2192.

Navarro-Garcia F, Gutierrez-Jimenez J, Garcia-Tovar C, Castro LA, Salazar-Gonzalez H, Cordova V. Pic, an autotransporter protein secreted by different pathogens in the Enterobacteriaceae family, is a potent mucus secretagogue. *Infect. Immun.* 2010; 78: 4101-4109.

Navarro-Garcia F & Elias WP. Autotransporters and virulence of enteroaggregative *E. coli*. *Gut Microbes* 2011; 2(1): 13-24.

Nicholson BA, Wannemuehler YM, Logue CM, Li G, Nolan LK. Complete genome sequence of the neonatal meningitis-causing *Escherichia coli* strain NMEC O18. *Genome Announc.* 2016; 4(6): e01239-16.

Ogawa M, Shimizu K, Nomoto K, Takahashi M, Watanuki M, Tanaka R, Tanaka T, Hamabata T, Yamasaki S, Takeda Y. Protective effect of *Lactobacillus casei* strain Shirota on Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 infection in infant rabbits. 2001; *Infect. Immun.* 69(2): 1101-1108.



Okeke IN, Macfarlane-Smith LR, Fletcher JN, Snelling AM. IS3 profiling identifies the enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O-island 62 in a distinct enteroaggregative *E. coli* lineage. *Gut Pathog.* 2011; 3: 4.

Onyiah JC & Colgan SP. Cytokine responses and epithelial function in the intestinal mucosa. *Cell. Mol. Life Sci.* 2016; 73(22): 4203-4212.

Opintan JA, Newman MJ, Ayeh-Kumi PF, Affrim R, Gepi-Attee R, Sevilleja JE, Roche JK, Nataro JP, Warren CA, Guerrant RL. Pediatric diarrhea in southern Ghana: etiology and association with intestinal inflammation and malnutrition. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2010; 83: 936-943.

Oundo JO, Kariuki SM, Boga HI, Muli FW, Iijima Y. High incidence of enteroaggregative *Escherichia coli* among food handlers in three areas of Kenya: a possible transmission route of travelers' diarrhea. *J. Travel. Med.* 2008; 15: 31-38.

Pawlowski SW, Warren CA, Guerrant R. Diagnosis and treatment of acute or persistent diarrhea. *Gastroenterology* 2009; 136: 1874-1886.

Petri WA Jr, Miller M, Binder HJ, Levine MM, Dillingham R, Guerrant RL. Enteric infections, diarrhea, and their impact on function and development. *J. Clin. Invest.* 2008; 118(4): 1277-1290.

Philipson CW, Bassaganya-Riera J, Hontecillas R. Animal models of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. *Gut Microbes* 2013; 4(4): 281-291.

Platts-Mills JA, Taniuchi M, Uddin MJ, Sobuz SU, Mahfuz M, Gaffar SA, Mondal D, Hossain MI, Islam MM, Ahmed AS, Petri WA, Haque R, Houpt ER, Ahmed T. Association between enteropathogens and malnutrition in children aged 6-23 mo in Bangladesh: a case-control study. *Am. J. Clin. Nutr.* 2017; 105(5): 1132-1138.

Pinto M, Robine-Leon S, Appay MD, Kedinger M, Triadou N, Dussaulx E, Lacroix B, Simon-Assmann P, Haffen K, Fogh J, Zweibaum A. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol. Cell.* 1983; 47: 323-330.

Reid G, Jass J, Sebulsky MT, McCormick JK. Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin. Microbiol. Rev.* 2003; 16(4): 658-672.

Ritchie ML & Romanuk TN. A meta-analysis of probiotic efficacy for gastrointestinal diseases. *PLoS One* 2012; 7(4): e34938.

Rocha-Ramírez LM, Pérez-Solano RA, Castañón-Alonso SL, Moreno Guerrero SS, Ramírez Pacheco A, García Garibay M, Eslava C. Probiotic *Lactobacillus* Strains Stimulate the Inflammatory Response and Activate Human Macrophages. *J. Immunol. Res.* 2017; 2017: 4607491.

Rosa ACP, Vieira MA, Tibana A, Gomes TA, Andrade JR. Interactions of *Escherichia coli* strains of non-EPEC serogroups that carry *eae* and lack the *EAF* and *stx* gene sequences with

undifferentiated and differentiated intestinal human Caco-2 cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 2001; 200(1): 117-122.

Saad SMI. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Ver. Bra. Cienc. Farm.* 2006; 42(1): 1-16.

Salmani H, Azarnezhad A, Fayazi MR, Hosseini A. Pathotypic and phylogenetic study of diarrheagenic *E. coli* and uropathogenic *E. coli* using multiplex polymerase chain reaction. *Jundishapur J. Microbiol.* 2016; 9(2): e28331.

Samie A, Obi CL, Dillingham R, Pinkerton RC, Guerrant RL. Enteroaggregative *Escherichia coli* in Venda, South Africa: distribution of virulence-related genes by multiplex polymerase chain reaction in stool samples of human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative individuals and primary school children. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2007; 77: 142-150.

Santos ACM, Zidko ACM, Pignatari ACC, Gales AC, Silva RM. A virulência de *Escherichia coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC) em relação à idade e ao sexo do hospedeiro. *O Mundo da Saúde* 2009; 33(4): 392-400.

Savarino SJ, Mcveigh A, Watson J, Cravioto A, Molina J, Echeverria P, Bhan MK, Levine MM, Fasano A. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *E. coli*. *J. Infect. Dis.* 1996; 173: 1019-1022.

Sengupta R, Altermann E, Anderson RC, McNabb WC, Moughan PJ, Roy NC. The Role of Cell Surface Architecture of Lactobacilli in Host-Microbe Interactions in the Gastrointestinal Tract. *Mediators Inflamm.* 2013; 2013: 237921.

Sheikh J, Hicks S, Dall'agnol M, Phillips AD, Nataro JP. Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 2001; 41: 983-999.

Sheikh J, Czeczulin JR, Harrington S, Hicks S, Henderson IR, Le Bouguéne C, Gounon P, Phillips A, Nataro JP. A novel dispersin protein in enteroaggregative *Escherichia coli*. *J. Clin. Invest.* 2002; 110: 1329-1337.

Shen H, Zhang J, Li Y, Xie S, Jiang Y, Wu Y, Ye Y, Yang H, Mo H, Situ C, Hu Q. The 12 gastrointestinal pathogens spectrum of acute infectious diarrhea in a sentinel hospital, Shenzhen, China. *Front Microbiol.* 2016; 7: 1926.

Sherman PM, Johnson-Henry CK, Yeung HP, Ngo PSC, Goulet J, Tompkins TA. Probiotics Reduce Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7- and Enteropathogenic *E. coli* O127:H6-Induced Changes in Polarized T84 Epithelial Cell Monolayers by Reducing Bacterial Adhesion and Cytoskeletal Rearrangements. *Infect. Immun.* 2005; 73(8): 5183-5188.

Shu Q, Lin H, Rutherford KJ, Fenwick SG, Prasad J, Gopal PK, Gill HS. Dietary *Bifidobacterium lactis* (HN019) enhances resistance to oral *Salmonella typhimurium* infection in mice. *Microbiol. Immunol.* 2000; 44(4): 213-222.

Steffen R. Epidemiology of traveler's diarrhea. *Clin. Infect. Dis.* 2005; 41(Suppl 8): S536-S540.

Steiner TS, Lima AA, Nataro JP, Guerrant RL. Enteroaggregative *Escherichia coli* produce intestinal inflammation and growth impairment and cause interleukin-8 release from intestinal epithelial cells. *J. Infect. Dis.* 1998; 177: 88-96.

Steiner TS, Nataro JP, Poteet-Smith CE, Smith JA, Guerrant RL. Enteroaggregative *Escherichia coli* expresses a novel flagellin that causes IL-8 release from intestinal epithelial cells. *J. Clin. Invest.* 2000; 105: 1769-1777.

Telli M, Guiral E, Martínez JA, Almela M, Bosch J, Vila J, Soto SM. Prevalence of enterotoxins among *Escherichia coli* isolates causing bacteraemia. *FEMS Microbiol. Lett.* 2010; 306: 117-121.

Thursby E & Juge N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J.* 2017; 474(11): 1823-1836.

Tribble DR. Resistant pathogens as causes of traveller's diarrhea globally and impact(s) on treatment failure and recommendations. *J. Travel. Med.* 2017; 24 (1): S6-S12.

UNICEF Data: Monitoring the Situation of Children and Women. Diarrhoeal disease. [updated: jun 2018]. Disponível em: <<https://data.unicef.org/topic/child-health/diarrhoeal-disease/>>. Acesso em 16 abril de 2019.

Vila J, Oliveira I, Zboromyrska Y, Gascon J. Diarrhea del viajero. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2016; 34(9): 579-584.

Vizoso Pinto MG, Rodriguez Gomez M, Seifert S, Watzl B, Holzapfel WH, Franz CM. Lactobacilli stimulate the innate immune response and modulate the TLR expression of HT29 intestinal epithelial cells in vitro. *Int. J. Food. Microbiol.* 2009; 133(1–2): 86-93.

Wang L, Zhang S, Zheng D, Fujihara S, Wakabayashi A, Okahata K, Suzuki M, Saeki A, Nakamura H, Hara-Kudo Y, Kage-Nakadai E, Nishikawa Y. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in foods and fecal specimens obtained from cattle, pigs, chickens, asymptomatic carriers, and patients in Osaka and Hyogo, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2017; 70(4): 464-469.

Wang ZL, Liu L, Hu XY, Guo L, Li QY, An Y, Jiang YJ, Chen S, Wang XQ, He Y, Li LQ. Probiotics may not prevent the deterioration of necrotizing enterocolitis from stage I to II/III. *BMC Pediatr.* 2019; 19(1): 185.

Westermann C, Gleinser M, Corr SC, Riedel CU. A Critical Evaluation of Bifidobacterial Adhesion to the Host Tissue. *Front Microbiol.* 2016; 7: 1220.

WHO & UNICEF. Joint Statement: Clinical Management of Acute Diarrhoea. WHO/FCH/CAH/04.7. Geneva: WHO / New York: UNICEF, 2004.

WHO & UNICEF. WHO child growth standards and the identification of severe acute malnutrition in infants and children. Geneva: WHO / New York: UNICEF, 2009.

WHO & UNICEF. Ending Preventable Child Deaths from Pneumonia and Diarrhoea by 2025: The integrated Global Action Plan for Pneumonia and Diarrhoea (GAPPD). Geneva: WHO / New York: UNICEF, 2013.

Woo J & Ahn J. Probiotic-mediated competition, exclusion and displacement in biofilm formation by food-borne pathogens. *Lett. Appl. Microbiol.* 2013; 56(4): 307-313.

Yamamoto T, Endo S, Yokota T, Echeverria P. Characteristics of adherence of enteroaggregative *Escherichia coli* to human and animal mucosa. *Infect. Immun.* 1991; 59(10): 3722-3739.

Yáñez D, Izquierdo M, Ruiz-Perez F, Nataro JP, Girón JA, Vidal RM, Farfan MJ. The role of fibronectin in the adherence and inflammatory response induced by enteroaggregative *Escherichia coli* on epithelial cells. *Front Cell. Infect. Microbiol.* 2016; 6: 166.

Yang SC, Lin CH, Aljuffali IA, Fang JY. Current pathogenic *Escherichia coli* foodborne outbreak cases and therapy development. *Arch. Microbiol.* 2017; 199(6): 811-825.

Yates J. Traveler's Diarrhea. *Am. Fam. Physician* 2005; 71(11): 2095-2100.

Yoon JY, Cha JM, Hong SS, Kim HK, Kwak MS, Jeon JW, Shin HP. Fermented milk containing *Lactobacillus paracasei* and *Glycyrrhiza glabra* has a beneficial effect in patients with *Helicobacter pylori* infection: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Medicine (Baltimore)* 2019; 98(35): e16601.

Zella GC, Israel EJ. Chronic Diarrhea in Children. *Pediatr. Rev.* 2012; 33(5): 207-218.