

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**LAUANA APARECIDA SANTOS**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE *IN VITRO* CONTRA ANTÍGENOS TOTAIS DE  
*Escherichia coli***

Alfenas/MG

2016

**LAUANA APARECIDA SANTOS**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE *IN VITRO* CONTRA ANTÍGENOS TOTAIS DE  
*Escherichia coli***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-graduação em Biociências Aplicadas à Saúde da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador Prof. Dr. Jorge Kleber Chavasco

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Cosme Cotta Malaquias

Alfenas/MG

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Santos, Lauana Aparecida

Avaliação da resposta imune *in vitro* contra antígenos totais de  
Escherichia coli / Lauana Aparecida Santos -- Alfenas/MG, 2016.  
63 f.

Orientador: Jorge Kleber Chavasco.

Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) -  
Universidade Federal de Alfenas, 2016.  
Bibliografia.

1. Escherichia coli. 2. Microbioma Gastrointestinal. 3. Imunidade nas  
Mucosas. I. Chavasco, Jorge Kleber. II. Título.

CDD-579.1

LAUANA APARECIDA SANTOS

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE *IN VITRO* CONTRA ANTÍGENOS  
TOTAIS DE *Escherichia coli*

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde para Universidade Federal de Alfnas. Área de Concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Aprovada em: 20 de maio de 2016

Profª. Drª. Alessandra dos Santos Danziger Silvério  
Instituição: Universidade José do Rosário Vellano

Assinatura:



Prof. Dr. Ivo Santana Caldas  
Instituição: Universidade Federal de Alfnas

Assinatura:



Prof. Dr. Jorge Kleber Chavasco  
Instituição: Universidade Federal de Alfnas

Assinatura:



Dedico aos meus familiares e ao meu namorado Jean Paulo, por me estimularem e me apoiarem nos momentos bons e ruins, ajudando a obter mais uma conquista na minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Á DEUS, meu agradecimento maior, pela minha profissão, pela liberdade de pensar, querer, crescer e optar. Agradeço por não ter me livrado muitas vezes do perigo, mas por ter-me ensinado a enfrentá-lo sem temor.

A Nossa Senhora pela intercessão e por estar na frente em todos os caminhos.

Aos meus pais, Roberto e Walquiria, ao meu irmão, Bruno, ao meu namorado, Jean Paulo e sua família, pelo amor, apoio, confiança, incentivo e orações.

À Universidade Federal de Alfenas e ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Saúde por oferecer a oportunidade de adquirir novos conhecimentos.

Aos professores orientadores Dr. Jorge Kleber Chavasco e Dr. Luiz Cosme Cotta Malaquias, pela paciência, ensinamentos e disponibilidade em trocar informações essenciais para a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho, por sua disponibilidade em ensinar e compartilhar informações e dedicar seu tempo na formação de novos profissionais.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Vacinas e Microbiologia da UNIFAL, Andressa, Alessandra, Bianca, Camila, Gabriel, Fernanda, Isabella, Julianne, Luciana, Luiz Gustavo, Natália, Raissa e Stella pelo amável convívio.

Aos colegas de mestrado por compartilharem suas experiências.

À FAPEMIG pelo fomento à pesquisa.

Estendo os meus agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho.

*“Aquilo que está escrito no coração não necessita de agendas porque a gente não esquece. O que a memória ama fica eterno”.*

(Rubem Alves, 1992)

## RESUMO

Dentre os microrganismos que compõem a microbiota intestinal, sobressai *Escherichia coli*, que possui como principal nicho ecológico o intestino grosso de humanos. Sua importância destaca-se em fazer parte dos microrganismos comensais pioneiros na colonização da mucosa intestinal e também o seu papel patogênico causando doenças intra e extra intestinais. O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta imune contra antígenos totais de *Escherichia coli*. Os resultados desse estudo podem servir como subsídio para o entendimento da resposta imune sistêmica a um microrganismo presente na mucosa. Os antígenos totais de *E. coli* foram obtidos após lise com solução de guanidina a 8M. Realizou-se a diálise e a dosagem de proteínas. Foi realizado a caracterização eletroforética em gel de poliacrilamida e perfil antigênico por Western Blotting. Avaliou-se a presença de anticorpos IgG total e IgA sérica específicos em 30 soros de humanos e também a resposta de células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC) através da metabolização de MTT. Os resultados obtidos demonstraram que a suspensão de antígenos obtida era composta por várias proteínas e o teste de Western Blotting revelou que estas foram reconhecidas por anticorpos presentes nos soros de humanos. Foi possível detectar a presença de anticorpos IgG total e IgA sérica contra os antígenos de *E. coli* por ELISA. No ensaio de viabilidade e proliferação celular pelo MTT, observou-se que houve proliferação celular em diferentes concentrações do antígeno e a viabilidade não foi inferior a 70%. Os resultados sugerem que os antígenos oriundos de *E. coli* podem induzir respostas imunes locais e sistêmicas.

Palavras chaves: *Escherichia coli*. Microbiota Gastrointestinal. Resposta imune.

## ABSTRACT

Among the microorganisms that make it up the intestinal microbiota, stands out *Escherichia coli*, which has as main ecological niche, the large human intestine. Its importance stands out in being part of the pioneers commensal microorganisms on the colonization of the intestinal mucosa also his pathogenic role causing extra intra and intestinal diseases. The objective of this study was to evaluate the immune response against total antigens of *Escherichia coli*. The results of this study could aid to understanding systemic immune response to a commensal microorganism that lives in the mucosa. Total *E. coli* antigens were obtained after lysis with 8M guanidine solution. After dialysis, protein assay was carried out. It was performed electrophoretic characterization of the antigens using polyacrylamide gel electrophoresis and the antigenic profile by Western blotting. We evaluated the presence of total IgG and IgA specific antibodies in 30 human sera. It also assessed the human response of peripheral blood mononuclear cell (PBMC) by MTT metabolization. The results obtained demonstrated that the antigens were composed of various proteins and Western Blotting showed that antigen proteins were recognized by antibodies present in human serum. It was possible to detect the presence of total IgG and IgA antibodies against *E. coli* antigens by ELISA. In viability assay evaluated by the MTT metabolization by PBMC, it found that cell proliferation occurred at different antigen concentrations, and viability was not less than 70 %. The results suggest that the antigens from *E. coli* can induce local and systemic responses.

Key words: *Escherichia coli*. Gastrointestinal Microbiota. Immune response.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Estrutura da Mucosa Intestinal.....	12
Figura 2 –	Desequilíbrio microbiano no interior do TGI .....	15
Figura 3 –	<i>Escherichia coli</i> corada pelo método de Gram. ....	16
Figura 4 –	Análise eletroforética por SDS-PAGE. ....	33
Figura 5 –	Análise por Western Blotting.....	35
Figura 6 –	Detecção de IgG sérica em soros de humano .....	36
Figura 7 –	Detecção de IgA sérica em soros de humano .....	37
Figura 8 –	Padronização do ensaio de proliferação celular em células mononucleares de humano .....	38
Figura 9 –	Resposta de proliferação de células mononucleares de humano estimuladas com antígeno total de <i>E. coli</i> e solução de LPS .....	39
Figura 10 –	Viabilidade celular de células mononucleares periféricas de humano.....	40
Figura 11 –	Índice de proliferação celular induzido pelos antígenos totais de <i>E. coli</i> .....	42
Figura 12 –	Viabilidade de células estimuladas com diferentes concentrações dos antígenos totais de <i>E. coli</i> .....	43

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	8
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	10
2.1	O TRATO GASTROINTESTINAL .....	10
2.1.1	<b>Mucosa Intestinal</b> .....	10
2.2	MICROBIOTA INTESTINAL .....	12
2.2.1	<i>Escherichia coli</i> .....	16
2.2.2	<b>Relação da microbiota intestinal com o hospedeiro</b> .....	19
2.3	SISTEMA IMUNE DE MUCOSA .....	20
2.3.1	<b>Tolerância imunológica da microbiota intestinal</b> .....	21
2.3.2	<b>Ativação e regulação da resposta imune pela microbiota</b> .....	23
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	25
3.1	OBJETIVO GERAL .....	25
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	26
4.1	PREPARO DE ANTÍGENOS TOTAIS de <i>E. coli</i> .....	26
4.2	ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA .....	26
4.3	SOLUÇÃO DE LPS (LIPOPOLISSACARIDEO) .....	27
4.4	OBTENÇÃO DE AMOSTRAS DE SOROS HUMANOS .....	27
4.5	TESTE DE WESTERN BLOTTING (WB) .....	28
4.6	ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO POR ELISA (ENZYME LINKED IMMUNO SORBENT ASSAY) PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG TOTAL E IgA SÉRICA ANTI- <i>E. coli</i> .....	29
4.6.1	<b>Ensaio imunoenzimático por ELISA para detecção de anticorpos IgG TOTAL E IgA sérica anti-LPS.</b> .....	29
4.7	REMOÇÃO DO LPS COM POLIMICINA B .....	30
4.8	OBTENÇÃO CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC) E ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR .....	30
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	31
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	33

5.1	PERFIL ELETROFORÉTICO DOS ANTÍGENOS TOTAIS DE <i>E. coli</i> .....	33
5.2	PERFIL DE RECONHECIMENTO ANTIGÊNICO POR WESTERN BLOTTING ...	34
5.3	PESQUISA DE IgG TOTAL E IgA SÉRICA EM SORO HUMANO PELO ENSAIO DE ELISA .....	35
5.4	PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR .....	37
5.5	ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR DISCRIMINANDO A RESPOSTA AO ANTÍGENO DE <i>E. coli</i> E LPS .....	38
5.6	ANÁLISE DO ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR DO ANTÍGENO TOTAL DE <i>E. coli</i> .....	41
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	44
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	49
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	50
	<b>ANEXO</b> .....	57

## 1 INTRODUÇÃO

A microbiota intestinal é composta principalmente por microrganismos anaeróbios facultativos e estritos. Estudos relatam que foram detectados no intestino humano mais de 50 filos presentes, mas apenas dois destes são os mais prevalentes, os filos Bacteroidetes e Firmicutes (JIMÉNEZ et al., 2008). As estimativas do número de espécies bacterianas que compõem a microbiota intestinal variam amplamente entre os estudos. Geralmente, é aceito que a mucosa intestinal é colonizada por mais de 1000 espécies de bactérias, podendo compor aos microrganismos colonizadores fungos e vírus (BULL; PLUMMER, 2014; HUURRE et al., 2008).

A colonização do trato-gastrointestinal (TGI) humano se inicia no nascimento. O intestino do feto é considerado estéril, mas após o parto o TGI é rapidamente colonizado. Durante o trabalho de parto, quando o neonato passa através do canal vaginal, este é exposto aos microrganismos presentes na mucosa vaginal materna. Durante os primeiros anos de vida, a composição da microbiota intestinal é variável e após os 2 a 3 anos de idade começa a ser estável, sendo comparada com a de um indivíduo adulto (BULL; PLUMMER, 2014; LEY et al., 2005; MACKIE et al., 1999).

A microbiota intestinal é dominada por microrganismos anaeróbios facultativos, incluindo *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Enterobacteriaceae*. Os microrganismos anaeróbios estritos que dominam o TGI incluem *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus* e *Atopobium*. Estes microrganismos são referidos como simbióticos intestinais em decorrência de sua relação mutualística com o organismo humano (BULL; PLUMMER, 2014; SWIDSINSKI et al., 2005).

Na família *Enterobacteriaceae* destaca-se *Escherichia coli*, bactéria Gram negativa, anaeróbica facultativa e de crescimento ótimo a 37°C. Apresenta-se em distintos perfis na natureza, desde comensais a patogênicas. Segundo Ferreira; Konbl, 2009 (apud Elsas et al., 2011), *E. coli* pertence ao grupo de microrganismos que iniciam a colonização da mucosa intestinal.

A microbiota intestinal está em constante contato com as células do tecido linfóide associado à mucosa intestinal (GALT). O GALT inclui células apresentadoras de antígeno, linfócitos B e T, células epiteliais e outras. Nos mamíferos, as placas de Peyer desempenham um

papel fundamental no controle da interação do sistema imunológico do hospedeiro e microbiota intestinal. Nestas, as células dendríticas apresentam os antígenos excretados pela microbiota intestinal e induz as células a produzirem uma resposta imune (GEUKING et al., 2014).

A microbiota intestinal é uma fonte importante de antígenos e de manutenção de um estado de homeostasia. Antígenos provenientes da microbiota estimulam o desenvolvimento dos órgãos linfóides associados às mucosas (GALT) e estes constituem uma parte da imunidade do indivíduo, pois a mucosa representa a porta de entrada de vários microrganismos (ZEUTHEN et al., 2010).

A ação do sistema imune associado à mucosa está integrada ao sistema imune como um todo. Dados obtidos mostraram que o soro de animais e de humanos possuem anticorpos IgG específicos contra antígenos de *Escherichia coli*, sugerindo uma grande associação entre a mucosa e outros compartimentos do sistema imune. No entanto, a influência de antígenos provenientes da mucosa sobre a imunidade sistêmica e principalmente na avaliação da resposta celular permanece pobremente estudada (ZEUTHEN et al., 2010).

A barreira epitelial intestinal tem como função impedir a passagem de antígenos ao ambiente interno do organismo. No entanto, este mecanismo nem sempre é suficiente, sendo necessária a atuação do sistema imune. A interação da microbiota intestinal, a via oral, idade do indivíduo e as células presentes na barreira epitelial podem também gerar a tolerância imunológica (ROMERO et al., 2015).

Neste estudo trabalhou-se com antígenos totais de *E. coli*. A escolha se deve ao fato de *E. coli* ser uma bactéria pioneira na colonização da mucosa intestinal, também causar doenças intra e extra intestinal e dentro deste contexto, o trabalho avaliou a resposta imune contra antígenos totais de *E. coli*.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

Atualmente há inúmeros estudos a respeito da relação microbiota intestinal com o sistema imunológico dos organismos. Após uma análise sistemática de diversas publicações, são descritas informações neste capítulo que foram pertinentes para o desenvolvimento deste trabalho.

### **2.1 O TRATO GASTROINTESTINAL**

O trato gastrointestinal humano possui uma superfície de contato de aproximadamente 200 m<sup>2</sup>. Este sistema é uma rede complexa e dinâmica de interações entre várias células da mucosa do intestino, sistema imunológico, alimentos ingeridos e a microbiota. Atua como uma camada semipermeável permitindo a absorção de nutrientes e macromoléculas necessárias ao metabolismo humano. Por outro lado, protege o indivíduo de microrganismos que podem ser potencialmente invasivos. Estas funções são efetuadas em um ambiente colonizado por diversos microrganismos comensais (LOPETUSO et al., 2014).

#### **2.1.1 Mucosa Intestinal**

Milhares de microrganismos e compostos nutrientes entram em contato com a mucosa intestinal. Promover o equilíbrio dessa interação requer um sistema complexo, que exerça várias funções como a proteção contra agentes patogênicos, regulação da absorção de nutrientes, interação entre a microbiota intestinal e a interação mucosa e sistema imune (VIGGIANO et al., 2015).

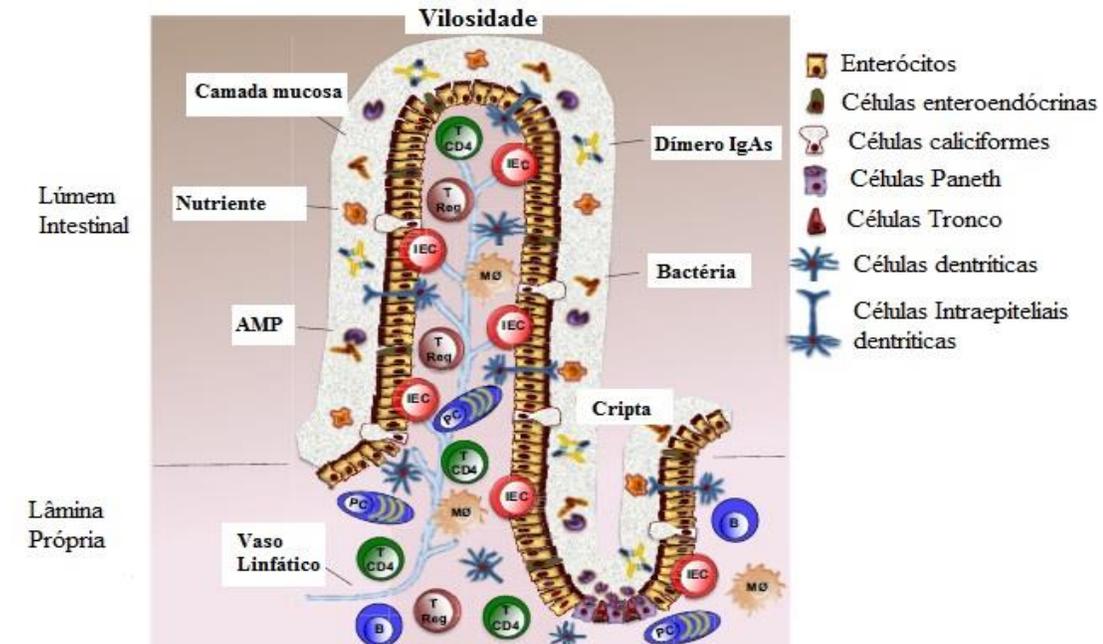
A mucosa intestinal é composta por componentes celulares e extracelulares. A parte celular é definida por um epitélio intestinal e uma lâmina própria adjacente (DE SANTIS et al.,

2015; TURNER, 2009). O epitélio intestinal contém cinco tipos distintos de células; células-tronco, com células de Paneth interpostas produzindo peptídios antimicrobianos, enterócitos absorptivos, células caliciformes produtoras de muco e células enteroendócrinas (DE SANTIS et al., 2015; KRAEHENBUHL et al., 1997) (FIGURA 01).

Na lâmina intestinal contém células dendríticas (DC), células intra-epiteliais (IEDCs), macrófagos, linfócitos intra-epiteliais, células T reguladoras (T Regs), linfócitos TCD4+ e linfócitos B (DE SANTIS et al., 2015; RESCIGNO, 2011; SCHENK; MUELLER, 2008) (FIGURA 01).

Os componentes extracelulares são representados pelo muco que é secretado pelas células caliciformes (DE SANTIS et al., 2015). O muco representa a primeira barreira física contra os microrganismos exercendo um papel importante, como proteção do epitélio intestinal pela ação de enzimas digestivas que estão presentes no lúmen intestinal, evitando a adesão de bactérias às células epiteliais e impedindo a invasão da mucosa. Tal função é complementada pela ação de imunoglobulinas secretoras, destacando a IgA. Também facilita a passagem de nutrientes para o organismo e lubrificante para a motilidade intestinal (FIGURA 01).

Figura1- Estrutura da Mucosa Intestinal.



Fonte: Adaptado de DE SANTIS et al., 2015.

O muco é composto por duas camadas. Uma interna, fortemente aderida às células epiteliais e outra externa, sendo mais espessa, flexível e menos aderente. A mucina altamente glicosilada desempenha um papel de constituição da camada de muco. A função do muco vai além do que exercer uma barreira. O seu conteúdo em glicanos e mucina serve de alimento para os microrganismos, favorece a ligação destes a mucosa e provavelmente de seleção de espécies microbianas que são específicas e essenciais para a manutenção da integridade e homeostase intestinal (OUWERKERK et al., 2013; VIGGIANO et al., 2015).

## 2.2 MICROBIOTA INTESTINAL

A microbiota intestinal consiste em um conjunto de microrganismos presentes no intestino cuja composição varia ao longo do TGI e entre o lúmen e mucosa intestinal, como é descrito por Bedani; Rossi (2009). Segundo Moraes et al. (2014), o TGI humano apresenta composições bacterianas distintas, sendo definidas geneticamente ou determinadas por

características individuais e ambientais, como o modo de nascimento, idade, hábitos alimentares e genética que contribuem para uma variabilidade intra e interindividual.

O trato gastrointestinal é um complexo ecossistema podendo também abrigar bactérias, vírus e fungos. A maior parte é colonizada por bactérias compreendendo  $10^{14}$  microrganismos, distribuídos em mais de 1000 espécies (SAMUELSON et al., 2015; NUDING et al., 2013). A microbiota intestinal inclui microrganismos que são autóctones (microrganismos permanentes) e alóctones (microrganismos transitórios). Aproximadamente 60% dos microrganismos comensais da microbiota intestinal não são cultiváveis em técnicas de cultura convencionais (SAMUELSON et al., 2015).

Através de técnicas de cultura, de biologia molecular, análises filogenéticas e de metagenômica em biópsias de mucosa humana, conteúdo gástrico e fezes, foi possível identificar os filos de microrganismos colonizadores do intestino. Os estudos mostraram que os quatro grandes filos são: Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria e Actinobacteria, representam 98% da microbiota intestinal (LOPETUSO et al., 2014; MANSON et al., 2008).

McLoughlin; Mills (2011) descrevem que há uma estimativa de 30-40 espécies de bactérias que dominam o ecossistema da microbiota intestinal. Compreendendo os gêneros *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Clostridium* e *Lactobacillus*.

Na mucosa saudável a microbiota não é somente distribuída ao longo do TGI exercendo suas funções, mas também entre a mucosa e o lúmen intestinal (SAMUELSON et al., 2015; MCLOUGHLIN; MILLS, 2011). Em particular, na mucosa gástrica, há uma concentração de  $10^3$  unidades formadoras de colônias (CFU)/mL. Por sua vez o intestino delgado compreende entre  $10^2$  a  $10^9$  (CFU)/mL e por fim, no intestino grosso uma concentração de  $10^4$  a  $10^{12}$  (CFU)/mL. A elevada concentração de microrganismos no intestino grosso pode ser explicada pelo trânsito lento intestinal e neste local a microbiota é mais estável quando comparada aos demais (LOZUPONE et al., 2012).

O trato gastrointestinal de mamíferos é colonizado por microrganismos benéficos, como bactérias comensais, destacando a *Escherichia coli*, que coletivamente influencia na fisiologia intestinal do hospedeiro (LEY; TURNBAUGH, 2006). Originalmente era considerado que *E. coli* fosse o microrganismo na fase adulta mais predominante, mas estudos de metagenômica tem revelado que há outros microrganismos também podem ser predominantes dependendo do modo de vida do hospedeiro (CASTELLO et al., 2015).

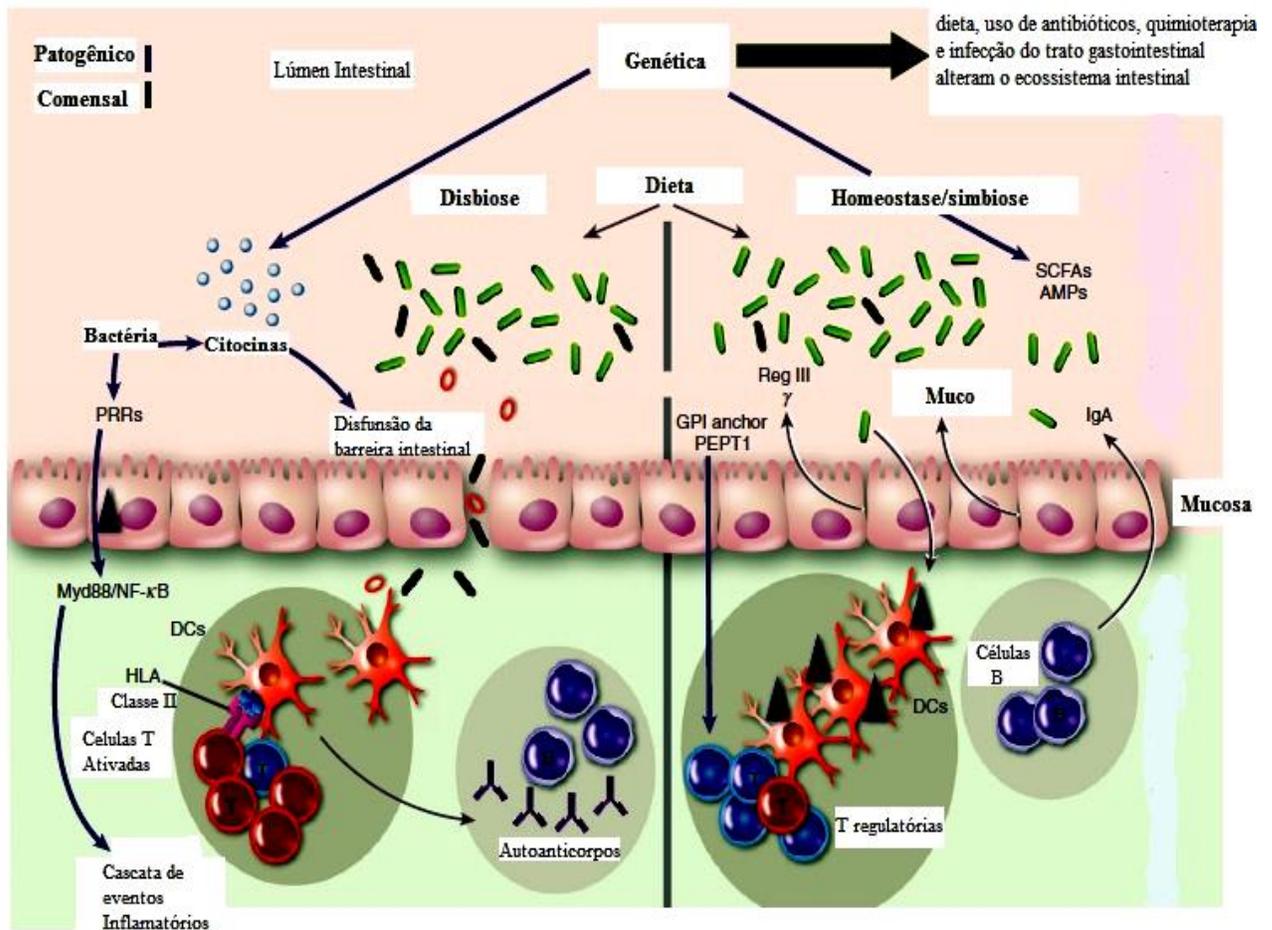
A microbiota intestinal tem a capacidade de conservar e promover o bem estar e a ausência de doenças. Ela é capaz de formar uma barreira contra os microrganismos invasores, potencializando os mecanismos de defesa, melhorando a imunidade e estimulando as respostas imunes (SANTOS, 2010).

Ao analisar a microbiota do recém-nascido é possível verificar que contém poucas ou quase nenhuma espécie de bactérias. Porém, no adulto forma-se um complexo ecossistema que contém cerca de centenas de diferentes espécies de bactérias (SANTOS, 2010). No momento do parto começa a influenciar a colonização do TGI do recém-nascido. O período de lactação também desempenha um papel importante. Nos recém-nascidos a microbiota intestinal apresenta uma maior variabilidade da composição microbiana. Aos 2 a 3 anos de idade a microbiota passa a ser estável e comparável ao de um adulto, que é dominado pelos filos Bacteroidetes e Firmicutes.

Nos indivíduos adultos podem ocorrer variações na proporção de microrganismos em consequência de alterações ambientais ou patológicas. No envelhecimento observam-se uma redução na população de Bacteroides. Tal fato explica-se, pela menor ingestão de alimentos devido à perda de paladar e olfato (MORAES et al., 2014).

Mudanças na dieta, o uso de antibióticos, quimioterapia antineoplásica e infecção do TGI podem alterar transitoriamente ou permanentemente o ecossistema intestinal. Essas alterações levam a disbiose intestinal (desequilíbrio microbiano no interior do TGI) (HOOPER et al., 2012; HOOPER; MACPHERSON, 2010; ROUND; MAZMANIAN, 2009; SAMUELSON et al., 2015) (FIGURA 02). A disbiose é caracterizada pela perda ou diminuição significativa na quantidade de bactérias que são benéficas e/ou deslocamento da composição microbiana, ou seja, favorecimento do aumento de microrganismos patogênicos. A disbiose também pode alterar o perfil metabólico intestinal e/ou aumento da inflamação da mucosa do hospedeiro (SAMUELSON et al., 2015).

Figura 2 – Desequilíbrio microbiano no interior do TGI.



Fonte: Adaptado de MARIETTA et al., 2015.

As bactérias comensais da microbiota intestinal e os agentes patogênicos requerem nichos ecológicos semelhantes para colonizar e proliferar no intestino. As bactérias comensais exercem um papel importante na produção de bacteriocinas, toxinas proteicas que inibem especificamente microrganismo da mesma espécie ou de outras. Por exemplo, *E. coli* produz bacteriocina que inibe diretamente o crescimento de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (KAMADA et al., 2013).

Microrganismos comensais também previnem a infecção por patógenos, alterando as condições ambientais do hospedeiro (por exemplo, pH), tornando-os proibitivos para a colonização por agentes patogênicos. Pode-se destacar também a microbiota vaginal que reduz o pH da vagina, o que impede a colonização por patógenos do trato urinário em que o pH ótimo para o crescimento é o neutro. Da mesma forma, no intestino, certas bactérias comensais

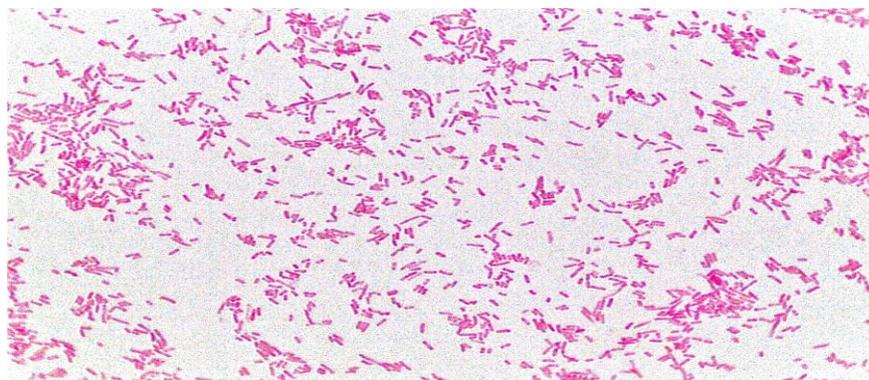
secretam ácidos, que podem alterar o pH local para inibir o crescimento de certos patógenos intestinais (KAMADA et al., 2013).

### 2.2.1 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* foi inicialmente descrita pelo médico alemão Theodor Escherich em 1885, como *Bactéria coli comuna*. Este microrganismo posteriormente foi renomeado como *Escherichia coli* após sua descoberta sendo uma bactéria Gram negativa pertencente à família *Enterobacteriaceae*, não esporulada, anaeróbica facultativa, fermentadora, apresenta flagelos peritríquios e cresce na temperatura de 18 a 44°C, tendo como temperatura ideal 37°C (FERREIRA; KONBL, 2009) (FIGURA 03).

Este microrganismo é caracterizado por suas propriedades bioquímicas sendo elas, reação indol positiva, lisina positiva, motilidade e vermelho de metila positiva, urease, H<sub>2</sub>S e utilização de citrato negativa (QUADRI et al., 2005). O produto da fermentação de manitol, glicose, sorbitol, ramanose, maltose, xilose, arabinose e glicerol produzem gás e ácidos. A maioria das cepas é capaz de fermentar lactose, no entanto, algumas tardiamente (ANDREATTI, 2007).

Figura 3 – *Escherichia coli* corada pelo método de Gram.



Fonte: Microbe World. Disponível em:  
<http://www.microbeworld.org/component/jlibrary/?view=article&id=13348>.  
Acesso em 13 de janeiro de 2016.

*Escherichia coli* ocorre em distintos perfis na natureza, variando de comensais, proporcionando resistência simbiótica contra organismos patogênicos, a patogênicas, causando doenças intra e extra-intestinais em hospedeiros humanos ou animais (ELSAS et al., 2011). Tem como principal nicho ecológico o intestino grosso de humanos e outros animais de sangue quente, na qual faz parte da microbiota intestinal comensal destes seres vivos. Por este motivo, pertence aos microrganismos colonizadores pioneiros da microbiota intestinal imediatamente após o nascimento. Nos adultos é a bactéria anaeróbica facultativa mais predominante (ALTERI e MOBLEY, 2012; NOWROUZIAN et al, 2006; SECHER et al., 2015).

Estudos sobre a colonização do TGI de recém-nascidos indicam que um dos fatores que pode ocorrer à aquisição da *E. coli* é pelo modo de nascimento (parto normal), uma vez que a presença deste microrganismo ocorre na vagina. Foi observada também uma relação entre a *E. coli* encontrada nas fezes das mães e no muco, engolidos pelos bebês no nascimento e a presença deste nas fezes destas crianças. Também observaram que recém-nascidos de parto cesariano o TGI pode ser colonizado pelo contato com as mãos e uniformes contaminados da equipe de enfermagem (BETTELHEIM; GOLDWATER, 2015; BETTELHEIM et al., 1976).

Estudos de colonização intestinal de murinos mostraram que a via Entner-Doudoroff, e de glucanato, são necessárias para o crescimento de *E. coli* comensal. Este microrganismo adquire nutrientes a partir da mucosa intestinal e regula os genes que codificam enzimas envolvidas no catabolismo de N-acetilglucosamina, ácido siálico, glucosamina, glucanato, arabinose e fucose intestinal. Quando há limitação da quantidade de açúcares devido ao consumo por outras bactérias colonizadoras na mucosa intestinal, *E. coli* também pode utilizar substratos gliconeogênicos para sustentar o crescimento no intestino. Desse modo, a flexibilidade metabólica pode promover a sua persistência no microambiente intestinal competitivo (BETTELHEIM; GOLDWATER, 2015).

A população de *E. coli* é diversa podendo ser diferenciadas em sete grandes grupos filogenéticos (A, B1, B2, C, D, E, e F). Os grupos filogenéticos A e B1 consistem, principalmente, de estirpes comensais encontrados no intestino grosso de humanos, animais e em amostras ambientais (RIJAVEC et al., 2008). Estas estirpes normalmente não contêm quaisquer fatores de virulência conhecidos (JOHNSON et al., 2001). No entanto, grupo filogenético B2, e em menor extensão, o do grupo D, consiste de estirpes patogênicos sendo normalmente portadores de genes associados à virulência estando associadas a doenças extra-intestinais

(CLERMONT et al., 2000; JOHNSON et al., 2001;). Alguns estudos indicam que as estirpes pertencentes aos grupos A e B1 também pode causar doença extra-intestinal, principalmente tratando-se de indivíduos imunodeprimidos. Um grupo filogenético E foi identificado, assim como F, tendo poucas descrições sobre estes grupos (KATOULI, 2010).

*Escherichia coli* patogênica pode ser mais encontrada em infecções do trato genito-urinário (ITU). Também pode causar bacteremias, meningite neonatal e infecções graves de origem alimentar. Um sorotipo específico como a O157: H7 foi responsável por surtos de origem alimentar e hídrica nos Estados Unidos e Europa (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION [CDC], 2006; PENNINGTON, 2014; MONEY et al., 2010).

A forma comensal de *E. coli*, exemplificado pela estirpe MG1655, tem como benefício auxiliar seu hospedeiro na quebra de compostos de carbono (TOUCHON et al., 2009). Por outro lado, estirpes comensais podem conter um ou mais genes de virulência e com potencial de provocar doenças. Com base nestes mecanismos elas podem ser classificadas como enteropatogênica (EPEC), enterotoxigênica (ETEC), enteroinvasora (EIEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroagregativa (EaggEC), uropatogênica (UPEC) entre outras. *E. coli* O157: H7 é um exemplo de um ETEC prejudicial, que já causou mortalidade no mundo todo. Cepas ETEC são capazes de produzir verotoxinas (genes representados por STX) causando uma leve diarreia sanguinolenta, que eventualmente culmina com a síndrome urêmica hemolítica. Mais de 150 sorotipos de *E. coli* produtora de verotoxina têm sido encontrados, mas a maioria dos surtos estão relacionados ao sorotipo O157 (TAYLOR, 2008). *E. coli* O157: H7 é um agente infeccioso de extrema importância, em decorrência de sua resistência à pH baixo (aproximadamente 2,5), que permite a passagem por meio do estômago (TILDEN et al., 1996). Seguindo a invasão de tecidos, podendo até causar a morte (ELSAS et al., 2011).

### **2.2.2 Relação da microbiota intestinal com o hospedeiro**

O hospedeiro e a microbiota intestinal estabelecem uma relação de mutualismo. O intestino para a microbiota serve como seu habitat. A temperatura ótima corporal e a

disponibilidade de nutrientes favorecem seu estabelecimento na mucosa intestinal do hospedeiro (HUDAULT et al., 2001; NUDING et al., 2013).

Por sua vez, os microrganismos comensais auxiliam na quebra de nutrientes e síntese de vitaminas essenciais. Esta relação beneficia tanto o hospedeiro quanto os microrganismos comensais (HUDAULT et al., 2001; NUDING et al., 2013).

Uma função importante da microbiota é a competição por nutrientes com organismos potencialmente patogênicos e a produção de bacteriocinas que impedem a colonização do epitélio intestinal por patógenos. Da mesma maneira, os microrganismos patogênicos têm mecanismos que inibem o crescimento de organismos comensais. Estudos realizados em camundongos *germ-free* utilizaram cepas de *E.coli* colonizadoras do TGI, demonstraram que foram capazes de proteger os animais contra infecção por *Salmonella typhimurium*. A microbiota exerce também um papel importante na resposta imune, sendo capaz de modular a resposta imunológica do hospedeiro (CARIO, 2005; NUDING et al., 2013).

O hospedeiro reconhece componentes da parede bacteriana, tanto de microrganismos pertencentes aos grupos comensais quanto patogênicos como LPS, peptidoglicano e flagelina, por meio de receptores de reconhecimento de padrões (PRR), Toll-like (TRLs) e nucleotídeo de ligação de receptores de domínio de oligomerização (NODs). Entretanto, os microrganismos comensais são tolerados, em contrapartida, os patogênicos são combatidos pelo sistema imune, pois estes microrganismos patogênicos invadem a mucosa intestinal podendo atingir a via sistêmica do organismo para iniciar a colonização (OTTE et al., 2003).

A estimulação dos receptores de reconhecimento de padrões (PRR), por bactérias comensais, resulta na produção de linfopietina estromal tímica (TSLP) por essas células. O TSLP pode melhorar a indução da secreção do fator de ativação celular dos linfócitos B promovendo a secreção de IgA na mucosa. IgA produzida é secretada para o lúmen intestinal e pode alterar a composição e função da microbiota (JOHANSSON et al., 2008).

A adesão bacteriana, translocação e infecção são impedidas pela barreira exercida pelo GALT e fatores inespecíficos, como os ácidos biliares, secreção de muco e peptídeos antimicrobianos. Componentes importantes pertencem à classe de defensinas, destacando alfa-defensinas, HD5, HD6 e outras (TOLLIN et al., 2003; WEHKAMP et al., 2009).

Assim, é possível verificar que a microbiota intestinal promove estímulos no sistema imune do hospedeiro que favorecem a sua colonização. Vale ressaltar que o hospedeiro se

beneficia de diversas formas na manutenção da tolerância a microbiota intestinal, bem como reforça a ideia de que favorece a homeostasia no TGI, uma vez que alterações na composição da microbiota comensal estão associadas ao desenvolvimento de patologias intestinais.

### 2.3 SISTEMA IMUNE DE MUCOSA

A mucosa intestinal apresenta uma complexa rede de células do sistema imunológico denominado de tecido linfóide associado ao intestino (GALT). Este tecido representa uma barreira que protege a mucosa. O GALT consiste em agregados ou isolados de folículos linfóides podendo conter até 70% das células do sistema imunológico do corpo humano no total (AIUTI; LEBBA, 2002).

O tecido linfóide associado ao intestino apresenta características anatômicas, fenotípicas e funcionais peculiares em comparação com os outros órgãos linfóides. A mucosa intestinal é caracterizada pela presença de dois tipos de estruturas linfóides, o tecido linfóide organizado em nódulos linfáticos macroscopicamente visíveis e tecido linfóide difuso que é constituído por linfócitos distribuídos amplamente pela lâmina da mucosa. Ao nível do intestino delgado estão as placas de Peyer e o apêndice cecal (AIUTI; LEBBA, 2002; VIGGIANO et al., 2015).

As funções do GALT são diversas destacando proteção contra doenças infecciosas locais e sistêmicas provocadas por microrganismos com preferencial penetração gastrointestinal, inibição da colonização por agentes patogênicos, proteção contra o desenvolvimento de reações alérgicas provocadas por alimentos, por fim, proteção contra o desenvolvimento de doenças autoimunes por reações imunes contra antígenos que entram no corpo por via oral (AIUTI; LEBBA, 2002; CONSTANTINOVITS et al., 2012).

Os linfócitos intra-epiteliais atuam como células efetoras citotóxicas (CD8+) em resposta aos antígenos, que são expressos na superfície da mucosa pelas células epiteliais. A inibição da colonização da mucosa intestinal por patógenos é realizada por estas células efetoras, por meio da lise das células epiteliais infectadas. Os linfócitos predominantes na lâmina intestinal são CD4+ e em uma porcentagem superior a 95% expressando o fenótipo CD45RO. Há também linfócitos que expressam marcadores para a ativação de células produtoras de HLA II, IL-2. Os

linfócitos B na lâmina intestinal são compostos por células secretoras de IgA e uma porcentagem maior de células B ativadas secretoras de IgG e IgM durante uma resposta inflamatória. Na lâmina própria também estão presentes células dendríticas (AIUTI; LEBBA, 2002).

Na mucosa intestinal o sistema imune apresenta locais indutores e efetores da resposta imune. Os locais indutores correspondem aos folículos linfáticos, constituídos pelas Placas de Peyer e o apêndice cecal, que são estruturas aferentes onde é apresentado o antígeno e ocorre a diferenciação dos linfócitos B e T (AUITI; LEBBA, 2002).

Auiti; Lebba (2002) descrevem que a IgA secretora no lúmen intestinal ocorre pela formação de uma ligação covalente do dímero com uma glicoproteína, denominada de componente secretora ou poli-receptor de Ig. Este componente é expresso sobre a superfície das células epiteliais da mucosa, sendo transportada para o lúmen intestinal. As funções da IgA secretora na mucosa são impedir a entrada de antígenos microbianos na mucosa e ou toxinas e neutralização de agentes virais intracelulares (ZANG et al., 2015). A IgG também pode ser transportada através do epitélio intestinal desempenhando seu papel (KAMADA et al., 2015).

Estudos descrevem que os microrganismos comensais podem modular a imunidade ao nível de mucosa intestinal. A microbiota intestinal afeta as respostas imunológicas sistêmicas pela modulação na expansão extra-intestinal das células T, desenvolvimento de tolerância oral e controle da inflamação (KIEPER et al., 2005; SAMUELSON et al., 2015). Samuelson et al. (2015), comentam que a microbiota intestinal induz a manutenção de células importantes para a imunidade de mucosa, bem como a expansão de células T CD4+ e a resposta Th1, Th2 e Th17.

Desse modo, a integridade da mucosa é necessária para a manutenção da homeostase do intestino. O desequilíbrio desta homeostase conduz a ativação do sistema imune levando a uma resposta a estes estímulos e indução da inflamação.

### **2.3.1 Tolerância imunológica da microbiota intestinal**

O reconhecimento das bactérias intestinais pelo sistema imunológico desencadeia uma resposta imune (SAMUELSON et al., 2015). A interação microbiota e células do epitélio intestinal podem gerar duas respostas imunes: a imunidade protetora contra patógenos e tolerância imunológica de não patógeno (CHICHOLOWSKI et al., 2015).

O desenvolvimento de tolerância imunológica ocorre após contato prévio de antígenos e representa um estado imunológico local e sistêmico de não reação imune efetora, decorridos de um desafio subsequente. Estudos indicam que a colonização por microrganismos no início da vida é o ponto chave na indução de tolerância imunológica do hospedeiro, apesar de ainda não ser totalmente compreendida (WENG; WALKER, 2013).

As células do sistema imune que confere efeitos supressores sobre a resposta imune incluem linfócitos T CD4+ FoxP3+ Treg, linfócitos T CD8+ produzindo IL10 e TGF- $\beta$ , células dendríticas tolerogênicas, células supressoras mieloídes e IL-10 produzida pelas linfócitos B (BELKAID; OLDENHOVE, 2008; WENG; WALKER, 2013).

Estudos relatam que os linfócitos T CD4 + FoxP3 + Treg desempenham um papel dominante na manutenção da tolerância imune e na supressão da resposta imune excessiva. A constatação de que estas células são mais abundantes na lâmina própria intestinal do que em nódulos linfáticos periféricos ou no baço confirma esta hipótese (BELKAID; OLDENHOVE, 2008; WENG; WALKER, 2013).

No epitélio intestinal a expressão de TLR é regulada negativamente pela membrana apical. Ocorre uma baixa expressão de TLR2 e TLR4 nesta membrana apical. Estes receptores não induz uma resposta inflamatória aos constituintes da parede celular de microrganismos comensais, como LPS e peptidoglicanos. Estudos revelaram que a flagelina de *E. coli* não induz uma resposta imunológica que é mediada por TLR5 na mucosa. Do contrário, ocorre a ativação de TLR5 por flagelinas de bactérias patogênicas como *Salmonella* sp. resultando na indução de inflamação intestinal aguda (ABREU, 2010; CHICHLAWSKI et al., 2015; FUKASE et al., 2003; GEWIRTZ et al., 2001).

As bactérias gram-negativas comensais são os principais produtores de LPS na mucosa intestinal. A fosfatase alcalina epitelial desfosforila o LPS bacteriano tornando-o tolerogênico e incapaz de estimular TLR9. No epitélio intestinal, fosfatase alcalina é concentrada a membrana apical contribuindo para indução de uma resposta inflamatória ou de tolerância imunológica. Para tanto, os PAMPs bacterianos não estão envolvidos somente na indução de respostas imunes, mas também na tolerância da mucosa intestinal (CHICHLAWSKI et al., 2015).

Portanto, o processo de tolerância imunológica a microbiota intestinal envolve diversos tipos celulares que estão presentes na mucosa do intestino. Assim, a interação microbiota e mucosa intestinal favorece um ambiente de homeostasia para que ambos exerçam suas funções.

Uma melhor compreensão dos eventos de tolerância imunológica oferecerá ferramentas para a descoberta de novas condutas clínicas nas doenças gastrointestinais.

### **2.3.2 Ativação e regulação da resposta imune pela microbiota**

A colonização do TGI por bactérias comensais influenciam na fisiologia intestinal e assim gera inúmeros benefícios já descritos. Os benefícios mais bem caracterizados por estes microrganismos incluem a promoção da absorção de nutrientes e proteção contra a colonização de agentes patogênicos de fontes diversas (ALEXANDER et al., 2014; FUNG, 2014).

Fung (2014) relata que a microbiota intestinal alterada está associada com doenças inflamatórias crônicas, infecção viral crônica, obesidade e câncer. Muitos estudos foram realizados e pouco se sabe sobre o papel destes microrganismos no processo do desenvolvimento destas doenças citadas (KAMADA et al., 2013; HOOPER et al., 2012).

Vaishnava et al. (2011) e Hill et al. (2010) relatam que a maioria dos microrganismos comensais estão restritos ao lúmen intestinal, mas uma pequena fração pode penetrar no interior da camada mucosa e colonizá-lo. Neste estudo, foram realizados sequenciamento de DNA da superfície do epitélio intestinal e revelou uma associação destes microrganismos com esta camada. Desta forma, as respostas das células do sistema imune estão associadas com estes microrganismos conferindo imunidade da mucosa, como exemplo a IgA secretora que protege o organismo a nível de mucosa, fazendo parte da primeira linha de defesa contra os patógenos.

Estudos abordando os mecanismos pelo qual a microbiota induz células TH17 foi capaz de observar a produção de citocinas. Portanto, alguns microrganismos comensais podem provocar respostas inflamatórias imunes que dependendo do contato conferem proteção tecidual. Dessa maneira, há uma interação do microrganismo comensal com o hospedeiro (HILL et al., 2010).

Estudos feitos em camundongos *germ-free* estimulados por dieta rica em LPS, mostraram que este é capaz de aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL12 e reduzir a produção de IL4 essenciais para diferenciação de células T naive (CHICHLOWSKI et al. 2015).

O estudo da resposta imune ao nível da mucosa intestinal poderia ser utilizado no desenvolvimento de estratégias de vacinação, pois está presente em todos os indivíduos e se estabelece nos primeiros meses de vida. A mucosa do intestino é uma região que apresenta funções de seleção e defesa do organismo e apresenta algumas particularidades do ponto de vista imunológico (KAMADA et al., 2013; MACHADO, 1995; ZIEMER; GBSON, 1998). Os antígenos secretados são importantes na indução da imunidade humoral e celular. Estes antígenos secretados e excretados foram identificados como candidatos à vacina em potencial e estudos de inter-relação de doenças gastrointestinais (KAMADA et al., 2013; YAMAMOTO et al., 1998).

Assim, ressaltando a importância da microbiota intestinal para o hospedeiro, tais como capacidade de formar barreiras contra microrganismos invasores, potencialização dos mecanismos de defesa e estimulando as respostas imunes, é possível que *Escherichia coli* exerça um papel fundamental na indução de resposta imune ao nível da mucosa intestinal do organismo.

Desse modo, o presente estudo visa avaliar a resposta imune utilizando os antígenos totais de *E. coli*, por meio de análise por Western Blotting, ensaios de proliferação celular e testes de imunoensaio.

### 3 OBJETIVOS

Serão apresentados o objetivo principal e os objetivos específicos deste trabalho.

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a produção de anticorpos e resposta de proliferação celular à antígenos totais de *Escherichia coli* em indivíduos saudáveis.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Verificar o perfil de proteínas do antígeno de *E. coli* por eletroforese em gel de poliacrilamida;
- b) Verificar o perfil antigênico reconhecido por anticorpos nos soros humanos pelo Western Blotting;
- c) Analisar a presença de anticorpos IgG e IgA sérica específicos contra os antígenos totais de *Escherichia coli* pelo ELISA;
- d) Analisar a proliferação e viabilidade de células mononucleares de sangue periférico de humanos (PBMC) por meio da metabolização de MTT;

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção será descrita a metodologia empregada no desenvolvimento da pesquisa.

### 4.1 PREPARO DE ANTÍGENOS TOTAIS de *E. coli*

Os antígenos totais foram obtidos a partir da cultura de *E. coli* (ATCC 25922) em Ágar BHI. Um inóculo da bactéria foi preparado e posteriormente adicionado em tubos Falcon estéril contendo 50 mL de Caldo BHI e incubado a 35°C por 72 horas. Após este tempo, os tubos foram centrifugados por 20 min a 2000 x g e o pellet de bactérias ressuspensionado em solução de cloreto de sódio a 0,9% estéril três vezes para lavagem. A seguir, as bactérias foram lisadas adicionando-se ao sedimento bacteriano solução de tris guanidina 8M e pH 8.0 deixando a solução em agitação por sessenta minutos a temperatura ambiente. Após, realizou-se a diálise em solução de tampão PBS pH 7,2 - 7,4 sob agitação a 4°C por 48 horas em membrana de poro de 12 kDa (Sigma-Aldrich), trocando a solução de PBS por duas vezes. O dialisado obtido foi centrifugado a 13.000 x g por trinta minutos e coletado o sobrenadante (BOOM et al., 1990). Para evitar a degradação do antígeno foi adicionado ao sobrenadante 1 mL do *pool* de inibidores de enzimas (Sigma-Aldrich). Foi feita a dosagem de proteínas pelo método do ácido bicinônico (BCA) (SMITH, et al. 2007).

### 4.2 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

O gel de corrida foi preparado a uma concentração de 4,5% (p/v) de acrilamida, 125 mM de Tris-HCl (pH 6,8) e SDS 0,2% (p/v). O gel de separação foi preparado com 12,5% (p/v) de acrilamida, Tris-HCl 375 mM (pH 8,8) e SDS 0,2% (p/v). A polimerização química dos géis ocorreu pela adição de persulfato de amônio e TEMED nas concentrações finais de 0,1% (p/v) e 0,7% (v/v), respectivamente. O tampão de corrida constituiu-se de Tris 38,7 mM, glicina 236 mM

e SDS 0,1% (p/v) (pH 8,3). O tampão da amostra apresentou uma concentração final de Tris-HCl 62,5 mM (pH 6,8), SDS 2% (p/v), glicerol 10% (v/v), 2-mercaptoetanol 5% (v/v) e azul de bromofenol 0,001% (p/v). As proteínas foram desnaturadas em tampão de amostra por aquecimento a 100°C por três minutos. Em seguida, foram aplicados aproximadamente 15 µL da fração antigênica solúvel nos poços do gel. A eletroforese foi realizada em corrente constante (15mA a 100V) por aproximadamente 2 horas. A coloração do gel foi feita utilizando-se uma solução contendo azul de Coomassie R-250 a 0,25% (p/v), metanol 45% (v/v) e ácido acético 10% (v/v). Finalmente, o gel foi descorado com uma solução contendo álcool etílico 50% (v/v) e água destilada 50% (v/v) e posteriormente fotografado (LAEMMLI, 1970).

#### 4.3 SOLUÇÃO DE LPS (LIPOPOLISSACARIDEO)

Uma solução de LPS (Sigma-Aldrich) de *E. coli* foi doada pelo Laboratório de Fisiologia da UNIFAL-MG e mantidas a -20°C na concentração de 100 mg/mL.

#### 4.4 OBTENÇÃO DE AMOSTRAS DE SOROS HUMANOS

Foram selecionados trinta indivíduos, alunos dos cursos de graduação da UNIFAL-MG, saudáveis, de ambos os sexos, maiores de 18 anos. Foram excluídos indivíduos em uso de medicamentos como corticoides ou anti-histamínicos. Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) pelos participantes foram coletados 5 mL de sangue venoso em tubos com ativador de coágulo para obtenção do soro que foi armazenado a -20°C.

O estudo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humano da Universidade Federal de Alfenas, com o número do protocolo (47823315.0.0000.5142) (Anexo A).

#### 4.5 TESTE DE WESTERN BLOTTING (WB)

Inicialmente foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12%, a fim de separar as proteínas do antígeno total de *E. coli* conforme descrito no item 4.2. O antígeno obtido encontrava-se na concentração de 2,31 mg/mL e foi diluído (1:2) em tampão de amostra, aquecido a 100° C por 5 minutos e distribuídos no gel de poliacrilamida, em cuba vertical. As condições de corrida do gel foram de corrente de 100 V por aproximadamente duas horas. Para a estimativa do peso molecular das proteínas do antígeno foram utilizados padrões de peso molecular de 200 kDa a 29 kDa. As proteínas, assim separadas, foram transferidas do gel para a membrana de nitrocelulose, utilizando solução tampão Tris-glicina (24 mM de Tris, 192 mM de glicina e metanol 20%). A transferência teve a duração de duas horas, a 400 mA e 100V.

Em seguida, a membrana foi corada usando uma solução de Ponceau a 0,3% para verificar se as proteínas do gel foram transferidas para o papel de nitrocelulose e comparar com o perfil de bandas do padrão de peso molecular. A membrana foi lavada duas vezes por 3 minutos com tampão TBS-T (100 mM de Tris-HCl; 0,9% de NaCl; 0,1% de Tween 20) e bloqueada com solução de albumina bovina sérica (BSA) a 3%, por duas horas, a temperatura de 25-27° C, sob agitação. Após o bloqueio, as membranas foram lavadas três vezes por cinco minutos com TBS-T. A membrana foi incubada com um pool de 7 soros humanos na diluição de 1/200 por 12 horas a 4°C. Em seguida, foram realizadas três lavagens, por 10 minutos com TBS-T. Após a lavagem a membrana foi incubada com anticorpo anti-IgG humano conjugada com peroxidase na diluição de 1/1000 por uma hora, sob agitação, à temperatura de 25-27°C. Após este período, a membrana foi lavada três vezes, por dez minutos com TBS-T. Foi utilizado como método de revelação a diaminobenzidina (DAB) (Sigma-Aldrich) a 0.03% como cromógeno e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich) por 10 minutos como ativador (TOWBIN et al., 1979).

#### 4.6 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO POR ELISA (ENZYME LINKED IMMUNO SORBENT ASSAY) PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG TOTAL E IgA SÉRICA ANTI-*E. coli*.

Anticorpos IgG e IgA sérica anti-antígenos totais de *E. coli* foram detectados em soros de 30 indivíduos. Placas de 96 poços de fundo chato (Nunc) foram sensibilizadas com 100 µL de antígeno total na concentração de 10 µg/mL, diluídos em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M (pH 9,6) a 4°C por 15 h. A seguir, as placas foram lavadas em tampão PBS-Tween 0,05% (PBS-T) e bloqueadas com 150 µL de leite em pó desnatado (Molico®) a 3% em PBS-T. Foi adicionado aos poços 100 µL de soro humano diluído 1:80 e mantidos por 1 h a 37°C. Após incubação e nova lavagem com PBS-T, foi adicionado 100 µL de conjugado peroxidase anti-IgG humano diluído 1:8.000 (Sigma-Aldrich) e o conjugado peroxidase anti-IgA sérica humano diluído 1:2.000. As placas foram incubadas por 1 h a 37°C. Após nova lavagem com PBS-T, foi adicionado o substrato OPD (Sigma-Aldrich) em tampão citrato pH 4,5 a 0,1M e 40 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Após 10 minutos a reação foi paralisada com adição de 30 µL de solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. A leitura foi feita por espectrofotometria a 492 nm em leitor de ELISA (Zenith200rt). Os soros foram testados em duplicatas.

##### **4.6.1 Ensaio imunoenzimático por ELISA para detecção de anticorpos IgG total e IgA sérica ANTI-LPS.**

Anticorpos IgG e IgA sérica anti-LPS foram avaliados como controle em soros de 30 indivíduos. Placas de 96 poços de fundo chato (Nunc) foram sensibilizadas com 100 µL de LPS na concentração de 10 µg/mL no total, diluídos em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M (pH 9,6) a 4°C por 15 h. A seguir, as placas foram lavadas em PBS-Tween 0,05% (PBS-T) e bloqueadas com 150 µL de leite em pó desnatado (Molico®) a 3% em PBS-T. Foi adicionado aos poços 100 µL de soro humano diluído 1:80 por 1 h a 37°C. Após incubação e nova lavagem com PBS-T, foi adicionado 100 µL de conjugado peroxidase anti-IgG humano diluído 1:8.000 (Sigma-Aldrich) e

o conjugado peroxidase anti-IgA sérica humano diluído 1:2.000. As placas foram incubadas por 1 h a 37°C. Após nova lavagem com PBS-T, foi adicionado o substrato OPD (Sigma-Aldrich) em tampão citrato pH 4,5 a 0,1M e 40 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Após 10 minutos a reação foi paralisada com adição de 30 µL de solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. A leitura foi feita por espectrofotometria a 492 nm em leitor de ELISA (Zenith200rt). Os soros foram testados em duplicatas.

#### 4.7 REMOÇÃO DO LPS COM POLIMIXINA B

Como o objetivo de avaliar a contaminação de LPS em amostras de Ag total de *E. coli* utilizada no teste de proliferação celular e viabilidade celular, realizou-se ensaios de remoção do LPS. A técnica que remove LPS em amostras de extratos antigênicos obtidas de culturas de bactérias Gram negativas foi baseada no estudo realizado por Ergin e colaboradores (2007). Uma amostra da solução de antígeno total de *E. coli* e de LPS foram tratados com polimixina B na concentração de 1,2 mg/mL. Para remoção do LPS, as soluções de LPS e de antígeno total foram incubadas com polimixina B sob agitação por 45 minutos a 4°C. Como controle utilizou-se amostras sem adição de polimixina B.

#### 4.8 OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC) E ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR

O ensaio de proliferação e viabilidade celular foi avaliado pela técnica do MTT. A técnica de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) tem por finalidade quantificar espectrofotometricamente a ativação e o crescimento celular. Esta técnica baseia-se na clivagem do sal amarelo tetrazólio (MTT) em cristais de formazan azul. Foram coletados 10 mL de sangue periférico humano heparinizado para obtenção de PBMC. O sangue heparinizado foi cuidadosamente empilhado sobre uma mistura de Ficoll-Hypaque (Amersham), na proporção de 2:1 em tubos de 15 mL com o auxílio da pipeta de 10 mL em capela de fluxo

laminar. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 500 x g durante 40 minutos a 18° C em centrífuga refrigerada (Eppendorf 5810R). O anel de células mononucleares foi coletado com auxílio de pipeta tipo Pasteur e transferido para tubos Falcon de 50 mL. As células foram lavadas 3 vezes com 30 mL de meio RPMI 1640.

O sedimento de células foi ressuspenso em 1 mL de RPMI suplementado com 1,6% de L-glutamina (solução estoque de 200 mM), acrescido de antibióticos (penicilina e estreptomicina) a 1% (Sigma-Aldrich) e 10% de soro fetal bovino inativado (Cultilab). Procedeu-se à contagem das células em câmara de Neubauer empregando o corante Trypan Blue a 10%.

As células mononucleares foram cultivadas em placas de 96 poços, de fundo plano, estéreis (TTP), em duplicata na concentração de  $2 \times 10^5$  células por poço. Para a padronização da técnica foi testado o tempo de cultivo de 48 e 72 horas e diferentes concentrações do antígeno 25 µg/mL a 0,19 µg/mL.

Após a padronização a cultura de células mononucleadas foi usada para os testes de proliferação e viabilidade celular sob estímulos de antígenos totais de *E. coli* e LPS tratados com e sem polimixina B. Como controle positivo (proliferação celular) foi utilizada solução de fitohemaglutinina (PHA) na concentração de 1 µg/mL e como controle negativo somente a cultura celular. As placas foram incubadas por 3 dias a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Ao final do terceiro dia, foi adicionado aos poços 20 µL da solução de 5 mg/mL de MTT (Sigma-Aldrich) em PBS e as placas foram incubadas a 37 °C por 4 horas. Ao final deste período, foi retirado o meio de cultura dos poços e adicionado 200 µL de DMSO para solubilização dos cristais de formazan. Todo o procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar. A seguir foi realizada a leitura das placas para obtenção dos valores de absorbância a 570 nm em leitor de microplacas (Zenit) (SOUZA et al., 2014).

#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados gerados foi realizada utilizando o software *Graph Pad Prism 4.0*. Os dados paramétricos passaram pelo teste de análise de variância (ANOVA). Os resultados do teste de ELISA foram avaliados utilizando o Teste T. Para os resultados de

proliferação celular a análise estatística foi realizada utilizando *one-way* ANOVA, com pós teste de Bonferroni. O cálculo da razão foi realizado a partir E/C, onde E é média das densidades óticas (D.O.) do experimento e C é a média das D.O. do controle de células. O índice de proliferação celular foi calculado, como  $[(A-B)/A]$ , onde A e B são as absorbâncias das células controle e tratadas, respectivamente. A porcentagem de viabilidade celular foi calculada, como  $[(A-B) \times 100]$ , onde A e B são as absorbâncias das células tratadas e controle, respectivamente. As diferenças obtidas foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de p foi menor que 0,05.

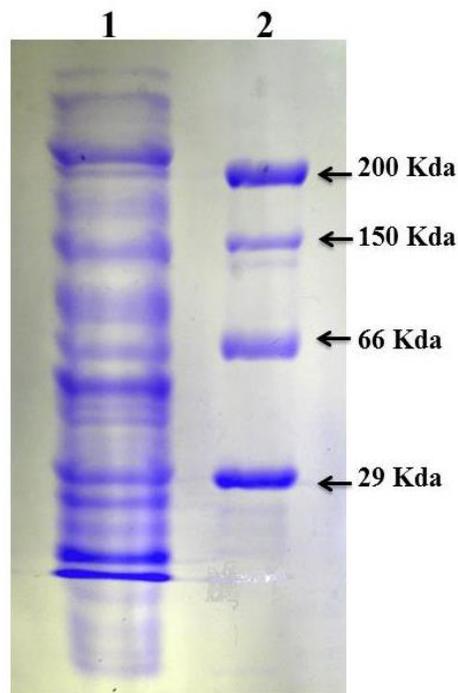
## 5 RESULTADOS

Serão apresentados os resultados obtidos após o desenvolvimento da pesquisa.

### 5.1 PERFIL ELETROFORÉTICO DOS ANTÍGENOS TOTAIS DE *E. coli*

O perfil eletroforético de antígenos totais de *E. coli* é mostrado na Figura 04. Pode-se observar várias bandas no gel correspondendo às proteínas extraídas com diferentes pesos moleculares. A partir do padrão molecular é possível estimar os pesos destas proteínas que variaram acima de 200 kDa a abaixo de 29 kDa.

Figura 4 – Análise eletroforética por SDS-PAGE.



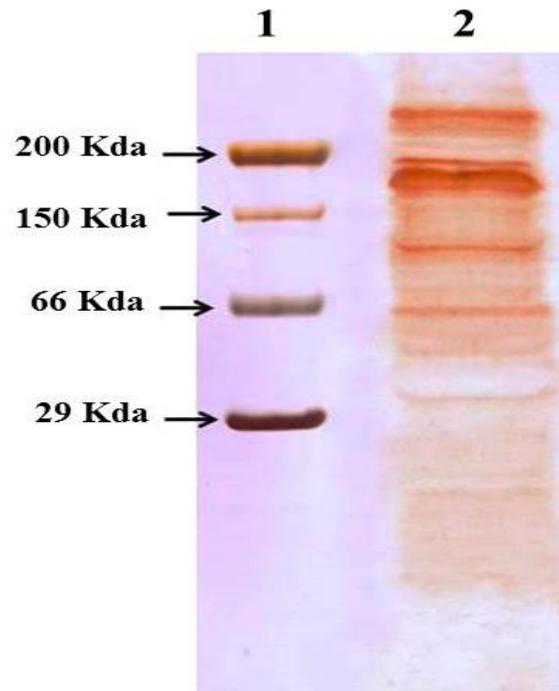
Fonte: Do autor.

Nota: A canaleta 1 corresponde as proteínas do antígeno de *E. coli* cepa (ATCC 25922) e a canaleta 2 o padrão de peso molecular. O gel de poliacrilamida a 12 % corado com azul de Comassie R-250. Padrão de peso molecular (200; 150; 66; 29 kDa).

## 5.2 PERFIL DE RECONHECIMENTO ANTIGÊNICO POR WESTERN BLOTTING

Após a realização da eletroforese, como descrito na técnica de Western Blotting, um pool de sete soros humanos foi testado. O perfil de reconhecimento do extrato antigênico de *E. coli* pode ser visualizado na Figura 05. Nota-se que um repertório de bandas proteicas foi reconhecido pelos soros humano. Através do padrão de peso molecular também é possível estimar o peso destas proteínas, compreendendo entre acima de 200 kDa e abaixo de 29 kDa. Verifica-se, que um maior número de proteínas acima de 200 e entre 66 kDa, foram reconhecidas com maior intensidade pelos anticorpos humanos. Observa-se que houve um reconhecimento proteico com maior intensidade entre 200 e 150 kDa quando comparada com as demais. Também demonstra-se que várias proteínas com peso abaixo de 29 kDa foram reconhecidas com menor intensidade quando comparadas com as de pesos superiores.

Figura 5 – Análise por Western Blotting



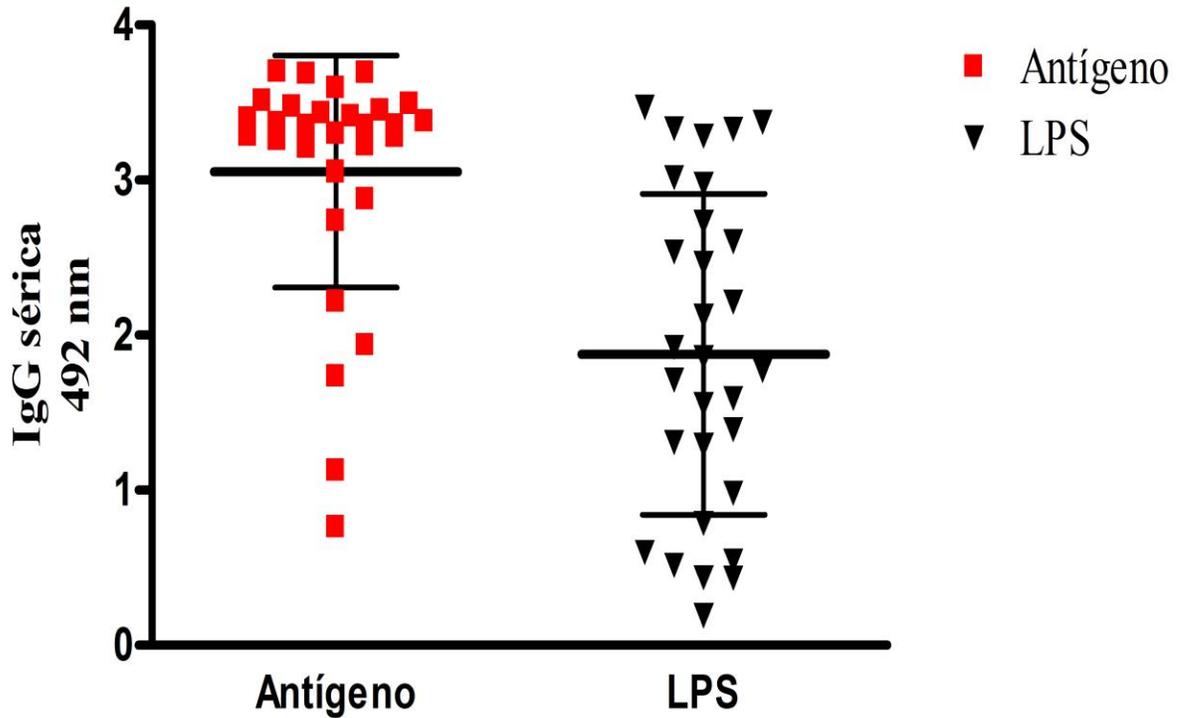
Fonte: O autor.

Nota: A canaleta 1 corresponde ao padrão de peso molecular e a canaleta 2 o perfil proteico de *E. coli* reconhecido pelo pool de soro de 7 indivíduos. O antígeno total de *E. coli* foi aplicado em gel de poliacrilamida 12 % e transferido para membrana de nitrocelulose onde o anticorpo secundário anti-IgG humano total diluído 1/200. O perfil de proteínas reconhecidas pelos soros humano foi revelado pelo método imunoenzimático - DAB.

### 5.3 PESQUISA DE IgG TOTAL E IgA SÉRICA EM SORO HUMANO PELO ENSAIO DE ELISA

Amostras de soros humanos (n=30) foram utilizadas para a pesquisa de IgG total contra antígenos de *E. coli* e LPS. Pode ser observado na Figura 06 que todas as amostras apresentaram níveis significativos de anticorpos IgG antiantígenos de *E. coli* e também para LPS. Verifica-se que alguns soros apresentaram menores níveis de D.O. para o antígeno e também para LPS. Observa-se, uma maior dispersão das D.O. para LPS quando comparados com os antígenos de *E. coli*. A média das D.O. para o antígeno total foi de 3,0 enquanto para o LPS foi de 1,87. Os dados sugerem que o soro humano possui altos títulos de IgG contra antígenos de *E. coli*.

Figura 6 – Detecção de IgG sérica em soros de humano

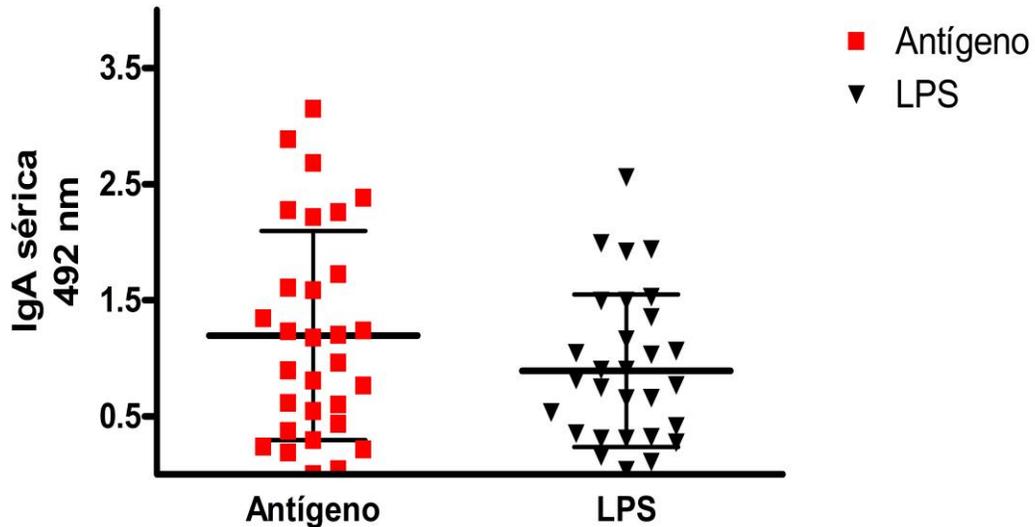


Fonte: Do autor

Nota: Valores médios das D.O. de IgG para antígeno total e LPS no teste de ELISA. Os soros foram testados em duplicatas e a D.O utilizada foi de 492 nm, (n=30).

Na Figura 07, observa-se pesquisa de IgA sérica de soros humanos (n=30), contra os antígenos de *E. coli* e LPS. Observa-se também que todas as amostras apresentam níveis significativos de anticorpos IgA sérica antiantígenos de *E. coli* e para LPS. A média das D.O. para o antígeno total foi de 1,17 enquanto para o LPS foi de 0,93. Nota-se que alguns soros apresentaram maiores níveis de D.O. para o extrato antigênico de *E. coli*.

Figura 7 - Detecção de IgA sérica em soros de humano



Fonte: Do autor

Nota: Valores médios das D.O. de IgA sérica para antígeno total e LPS no teste de ELISA. Os soros foram testados em duplicatas e a D.O utilizada foi de 492 nm, (n=30).

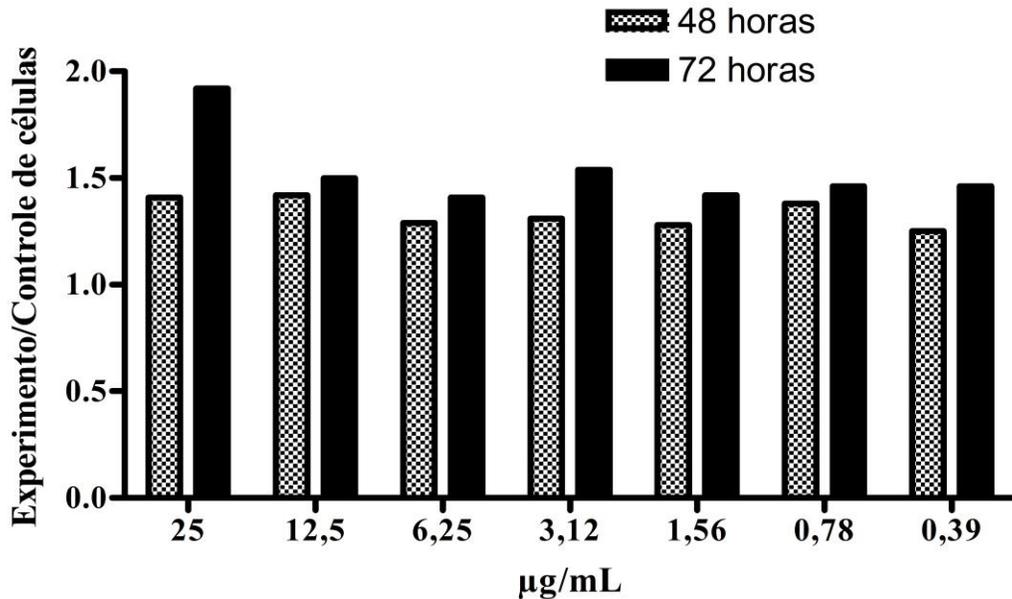
#### 5.4 PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

Para a padronização do ensaio de proliferação celular testou-se as variáveis tempo em dias e concentração do antígeno de *E. coli*. Como se verifica na Figura 08 foi realizado o cálculo da relação entre os valores médios da densidade ótica dos experimentos (antígeno) e o controle de células. O antígeno foi testado nas seguintes concentrações (25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78; 0,39  $\mu\text{g/mL}$ ). A análise dos dados demonstra que o tempo de 72 horas apresentou maiores razões quando comparados com 48 horas, sugerindo uma maior proliferação celular. No tempo de 48 horas para as diferentes concentrações do antígeno as razões foram muito próximas.

Diferentemente no tempo de 72 horas nota-se que a concentração do antígeno de 25  $\mu\text{g/mL}$  apresentou uma maior razão quando comparado com as demais concentrações do antígeno. A partir destes dados faz-se necessário discriminar a resposta de proliferação celular induzida pelas proteínas do antígeno e o LPS presente neste. Desta forma, optou-se por utilizar o tempo de 72 horas de cultivo celular e também todas as concentrações do antígeno preparadas,

mesmo demonstrando que a concentração de 25 µg/mL teve uma maior razão quando comparado com as demais.

Figura 8 - Padronização do ensaio de proliferação celular em células mononucleares humanas



Fonte: Do autor

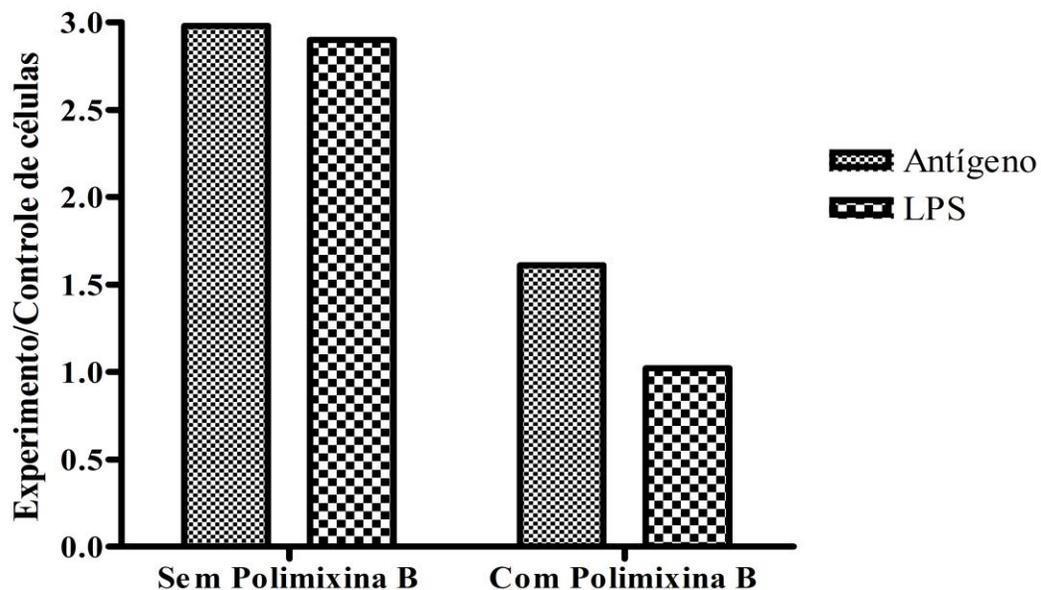
Nota: Proliferação de células mononucleares estimuladas (n=2), por 48 e 72 horas, com antígenos totais de *E. coli*. A concentração utilizada foi de  $2 \times 10^5$  células. O antígeno de *E. coli* foi preparado nas concentrações de 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78; 0,39 µg/mL. O MTT (5 mg/mL) foi adicionado 4 horas antes do fim do período de incubação. Os cristais de formazan foram solubilizados com adição de 200 µL de dimetilsulfóxido. A leitura da absorbância foi realizada a 570 nm.

## 5.5 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR DISCRIMINANDO A RESPOSTA AO ANTÍGENO DE *E. coli* E LPS

Após a padronização, como descrito no item 5.4. polimixina B foi utilizada para redução da concentração de LPS no extrato antigênico (concentração de 25 µg/mL), afim de discriminar a resposta induzida pelas proteínas do antígeno e o LPS presente neste. A Figura 09 mostra a razão

entre os valores médios da densidade ótica dos experimentos (antígeno e LPS com polimixina B e sem polimixina B) e o controle de células não estimuladas. O antígeno e o LPS sem polimixina B apresentou uma maior razão, correspondendo a 2,98 e 2,90 respectivamente, sugerindo uma maior proliferação celular. As razões obtidas do antígeno e LPS sem polimixina B foram muito próximas sugerindo que o LPS presente no extrato antigênico poderia estar influenciando na ativação e proliferação celular. O antígeno e LPS adicionados de polimixina B apresentaram uma razão de 1,61 e 1,02 respectivamente. Nestes resultados obtidos pelo antígeno e LPS com polimixina B, a diferença entre as razões foram de 0,590. Este resultado demonstra que, a polimixina B foi capaz de reduzir os efeitos do LPS presente no extrato antigênico sobre a proliferação celular, quando comparado com a solução de LPS. Dessa maneira, optou-se por utilizar o antígeno tratado com polimixina B.

Figura 9 – Resposta de proliferação de células mononucleares de humano estimuladas com antígeno total de *E. coli* e solução de LPS na presença ou ausência de polimixina B.

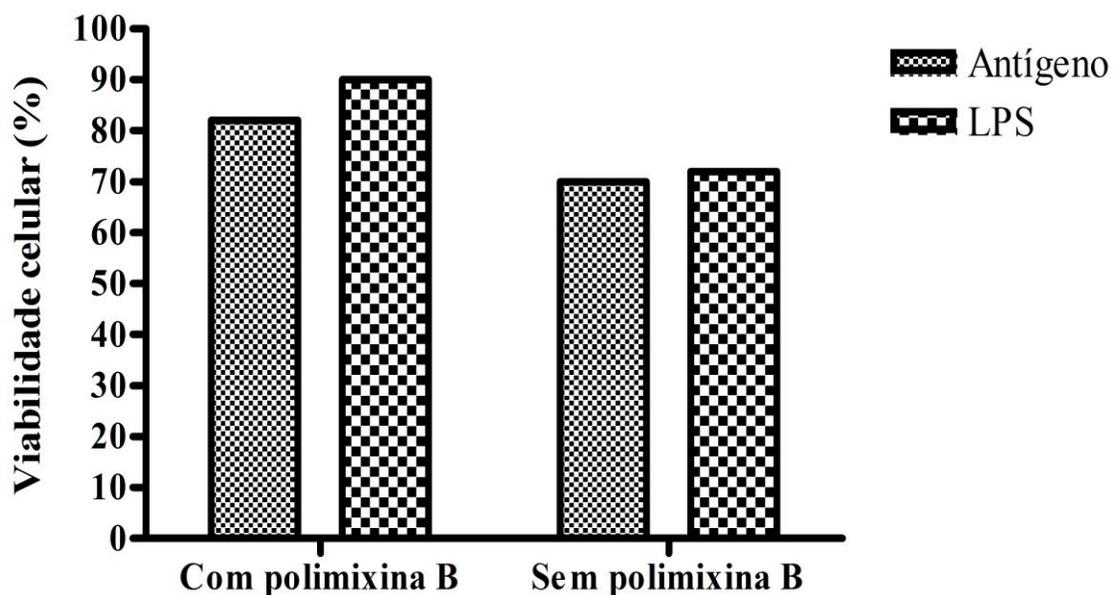


Fonte: Do autor

Nota: Células mononucleares estimuladas por 72 horas, por antígenos totais de *E. coli* e LPS na concentração de 25 µg/mL com e sem polimixina B. A concentração utilizada foi de  $2 \times 10^5$  células. O MTT (5 mg/mL) foi adicionado 4 horas antes do fim do período de incubação. Os cristais de formazan foram solubilizados com adição de 200 µL de dimetilsulfóxido. A leitura da absorbância realizada a 570 nm (n=3). A análise estatística foi realizada utilizando análise de variância *one way*, com pós teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ .

Na figura 10 verifica-se a viabilidade celular, para as células mononucleares de sangue periférico humano. Nota-se que a taxa de viabilidade celular, dada em porcentagem, não foi inferior a 70% para o antígeno e LPS com polimixina B e sem polimixina B. Na análise estatística, não se detectou diferença na viabilidade entre o antígeno e LPS com e sem polimixina B. Portanto, para o antígeno e LPS com polimixina B observou-se que, o antibiótico não foi capaz de reduzir a taxa de viabilidade celular.

Figura 10 – Viabilidade celular de células mononucleares periféricas de humano.



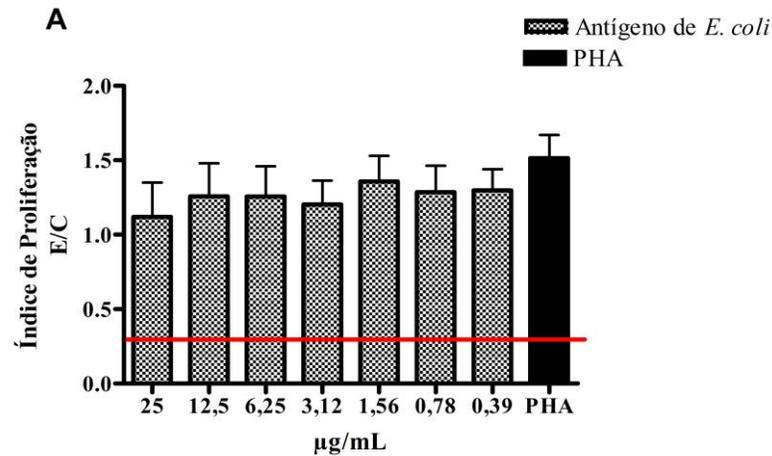
Fonte: O autor

Nota: Viabilidade de células mononucleares humanas estimuladas por 72 horas com antígeno de *E. coli* e LPS na concentração de 25 µg/mL tratados e não tratados com polimixina B. A concentração utilizada foi de  $2 \times 10^5$  células. O MTT (5 mg/mL) foi adicionado 4 horas antes do fim do período de incubação. Os cristais de formazan foram solubilizados com adição de 200 µL de dimetilsulfóxido. A leitura da absorbância realizada a 570 nm (n=3). A análise estatística foi realizada utilizando análise de variância *one way*, com pós teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ .

## 5.6 ANÁLISE DO ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR DE PBMC ESTIMULADAS POR ANTÍGENO TOTAL DE *E. coli* PREVIAMENTE TRATADOS COM POLIMIXINA B.

Após os ensaios de proliferação celular utilizando polimixina B para reduzir a concentração de LPS foram testadas oito amostras de PBMC de indivíduos adultos e saudáveis. A estimulação por meio do PHA (fitohemaglutinina) foi utilizada como controle positivo, para verificar a proliferação celular de PBMC utilizada em diferentes concentrações do antígeno total de *E. coli*. Como pode ser evidenciado na figura 11, há uma proliferação celular para todas as concentrações de antígeno total de *E. coli* tratados com polimixina B, quando comparado com o controle positivo (PHA). Verifica-se que o índice de proliferação foi superior ao controle de células (sem estímulo). A análise estatística comparando o índice de proliferação entre as concentrações do antígeno mostra que não houve significância estatística ( $p > 0,05$ ), sugerindo que, independente da concentração do extrato antigênico, este foi capaz de induzir uma resposta celular.

Figura 11 – Índice de proliferação celular induzido pelos antígenos totais de *E. coli* tratados com polimixina B.

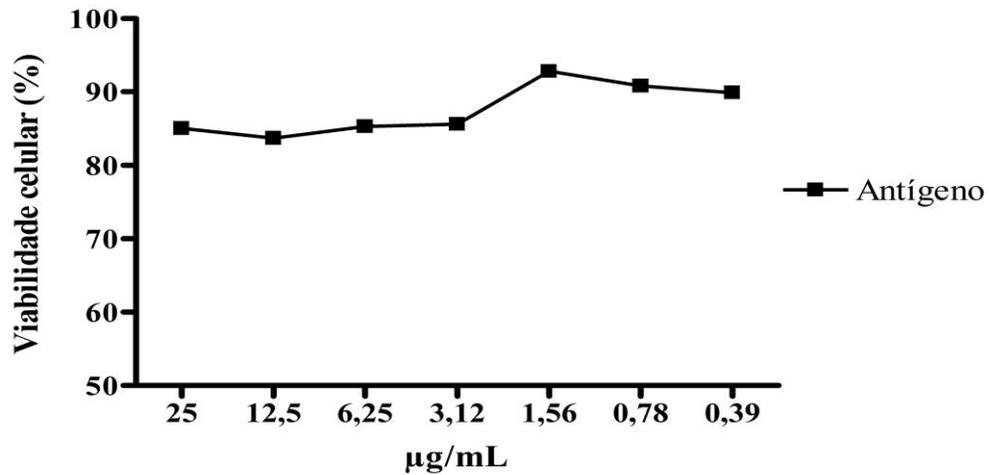


Fonte: Do autor

Nota: Proliferação de células mononucleares estimuladas (n=8), por 72 horas, com antígenos totais de *E. coli* nas concentrações de 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78 e 0,39 µg/mL tratados com polimixina B e PHA na concentração de 1 µg/mL. Indica controle de células (sem estímulo). (E/C) Indica experimento/controlado de células. A concentração celular utilizada foi de  $2 \times 10^5$  células/poço. O MTT (5 mg/mL) foi adicionado 4 horas antes do fim do período de incubação. Os cristais de formazan foram solubilizados com adição de 200 µL de dimetilsulfóxido. A leitura da absorbância foi realizada a 570 nm. A análise estatística foi realizada utilizando análise de variância *one way*, com pós teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ .

A viabilidade celular, em porcentagem, está representada na figura 12. Nota-se que para todas as concentrações do antígeno a viabilidade foi superior e/ou iguais a 90%. Também foi realizado, análise estatística comparando a viabilidade celular entre as concentrações do antígeno. O teste revelou que não houve diferença estatística comparando a viabilidade celular entre as concentrações do antígeno. Sugere-se que o extrato antigênico não foi capaz de reduzir a viabilidade celular.

Figura 12 – Viabilidade de células estimuladas com diferentes concentrações do antígeno total de *E. coli*.



Fonte: Do autor

Nota: Viabilidade de células mononucleares estimuladas (n=8) por 72 horas, com antígenos totais de *E. coli* nas concentrações de 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78 e 0,39 µg/mL. A concentração utilizada foi de  $2 \times 10^5$  células. O MTT (5 mg/mL) foi adicionado 4 horas antes do fim do período de incubação. Os cristais de formazan foram solubilizados com adição de 200 µL de dimetilsulfóxido. A leitura da absorbância realizada a 570 nm. Análise estatística foi realizada utilizando análise de variância de uma via, com pós teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ .

## 6 DISCUSSÃO

A porta de entrada da maioria dos agentes infecciosos ocorre pela superfície das mucosas, principalmente pelo trato gastrointestinal e respiratório. As mucosas representam uma divisão entre o ambiente externo e o interno do organismo. Desse modo, por meio da alimentação e respiração, o organismo entra em contato com moléculas que possuem um potencial antigênico (LUZZI et al., 1995; BROWN et al., 2013).

O trato gastrointestinal é colonizado principalmente por bactérias anaeróbicas facultativas, destacando-se a *E. coli*, pois é um dos microrganismos pioneiros na colonização intestinal. Os estudos indicam que a colonização da mucosa intestinal por bactérias comensais proporciona inúmeros benefícios ao hospedeiro. As bactérias comensais contribuem para prevenir o crescimento de microrganismos patogênicos e auxiliam também na função metabólica do hospedeiro. Atualmente, estudos têm sido realizados para entender o papel e a interação da microbiota intestinal com o sistema imune de mucosa do hospedeiro (BROWN et al., 2013).

A microbiota normal reside nas superfícies epiteliais do trato gastrointestinal, sendo esta uma grande área de colonização bacteriana. Associada a esta existe uma complexa rede de células do sistema imunológico (BROWN et al., 2013; MANUZAK et al., 2012). A resposta imunológica aos microrganismos comensais são essenciais para a maturação do tecido linfóide local e sistêmico. Portanto, a microbiota intestinal pode ter o potencial de regular o sistema imune ao nível de mucosa e ao nível sistêmico do hospedeiro (JABRA et al., 2006; SMITH et al., 2007).

*Escherichia coli*, um microrganismo que é comum na mucosa intestinal de animais e humanos, principalmente na fase adulta, exerce uma interação com o hospedeiro e promove à homeostasia (MANUZAK et al., 2012). A utilização do extrato antigênico neste estudo, a partir de uma preparação de *Escherichia coli* foi possível analisar o perfil eletroforético e verificar o processo de extração destas proteínas. O preparo que envolveu na ruptura da parede celular bacteriana e a obtenção de diferentes bandas presentes no gel foram visualizados na Figura 04. A partir do padrão molecular também foi possível estimar os pesos das proteínas obtidas (Figura 04). O perfil eletroforético obtido indicou que o extrato antigênico possui várias proteínas, podendo ser de diversas partes da célula bacteriana visto que a extração destas proteínas foi realizada por meio de lise celular. Escolheu-se este método com o intuito de verificar se as proteínas são imunogênicas e avaliar a resposta imune ao extrato antigênico. Entretanto, além de

proteínas este antígeno pode conter outros componentes, como carboidratos e lipídeos. Os lipopolissacarídeos presente nas bactérias Gram negativas pode estar em grandes ou pequenas concentrações.

O processo de extração de proteínas utilizando a guanidina, segundo Palmer; Wingfield (2012), têm como principal vantagem ter menos contaminantes no extrato antigênico a partir do *pellet* bacteriano obtido. Austin et al. (1990), também utilizaram este método, afim estudar a camada S de *Pseudomonas* sp. realizando a extração de proteínas. Ferreira et al. (2013), utilizou outro método de extração de proteínas com tampão de lise contendo 0,5% de Triton X-100. No perfil eletroforético foi possível visualizar várias proteínas extraídas.

No presente estudo, mostrou-se pela técnica de Western blotting que os soros de humanos foram capazes de reconhecer diferentes proteínas do antígeno total de *E. coli*. Observou-se que os soros humanos reconheceram com maior intensidade proteínas cujos pesos eram superiores a 66 kDa (Figura 05). A presença de anticorpos séricos reativos aos diferentes antígenos bacterianos pode ser interpretada como indicativo de colonização prévia. Os estímulos induzidos pelos antígenos de *Escherichia coli* podem ser capazes de estimular a produção de anticorpos protetores tanto em nível de mucosa quanto sérico. A partir deste perfil de reconhecimento antigênico pode ser possível determinar futuros candidatos vacinais, uma vez que sendo proteínas mais imunogênicas são capazes de induzir uma resposta imune efetiva contra moléculas encontradas em agentes patogênicos.

Alerasol et al. (2014), realizaram o ensaio de Western Blotting para a identificação do perfil de reconhecimento antigênico em soros de camundongos BALB/C imunizados com *Escherichia coli* enterotoxigênica. Os resultados demonstraram que os soros de camundongos foram capazes de reconhecer proteínas que compreendiam aos pesos entre 42 a 29 kDa e 14 kDa. A partir destes resultados, mostra-se que o perfil de reconhecimento antigênico para os soros humanos foram similares, pois houve um repertório de bandas de proteínas que compreendem aos pesos abaixo de 66 kDa que também foram reconhecidas.

Os soros de indivíduos saudáveis foram analisados quanto à presença de anticorpos anti-antígenos de *E. coli* (IgG total e IgA sérica). Posteriormente, pesquisou-se anticorpos anti-LPS (IgG total e IgA sérica), a fim de verificar se há a presença destes circulantes. Dos soros testados, todos apresentaram níveis significativos tanto para IgG total quanto IgA sérica anti-antígenos de

*E. coli* e para o LPS (Figura 06 e 07). Tais resultados podem mostrar uma resposta sistêmica aos antígenos estudados.

Segundo Peterson et al., (2007) no estado de homeostasia os anticorpos exercem a função de mediar a tolerância imunológica e de proteção à mucosa intestinal, aos microrganismos colonizadores.

Estudos realizados por Kamary e colaboradores (2013), realizaram a dosagem de anticorpos IgG e IgA sérica em soros de humanos, após uma imunização oral por antígenos de *E. coli*. Os resultados demonstraram a presença de níveis significativos de anticorpos séricos IgG total e IgA. Desse modo, os resultados apresentados pela literatura reforçam os nossos resultados.

Snoeck et al. (2006), ressalta que a IgA secretora possui a função de primeira linha de defesa do hospedeiro. Já a função da IgA sérica é fazer parte da segunda linha de defesa do organismo. Tal função também é aplicada a IgG total. A presença de IgA sérica detectada nas amostras de soro humano pode ser explicada segundo Peterson et al. (2007), pelo fato da diferenciação de células B em células produtoras de IgA sérica serem induzidas localmente na lâmina própria do intestino delgado. Por sua vez, a presença de IgG pode-se sugerir que a troca de classes de células produtoras de anticorpos induzam a secreção desta molécula.

O LPS está presente nas bactérias Gram negativa. No presente estudo também foi pesquisada a presença de anticorpo IgG e IgA serica anti-LPS (Figura 06 e 07). A dosagem de anticorpos anti-LPS de *E. coli* O104-H4 em soros humanos foram realizadas por Balabanova e colaboradores (2013) os quais detectaram a presença de anticorpos IgG anti-LPS de *E. coli* O104-H4.

Luzzi et al. (1995) ressaltam que há evidência de que anticorpos anti-LPS são capazes de prevenir a colonização do hospedeiro por bactérias patogênicas, como exemplo a *E. coli* O157. Além disso, estudos descrevem que uma das semelhanças entre as estirpes de *E. coli* é a presença do LPS, pois estes podem ter epítomos compartilhados com outras *E. coli* e também com outros microrganismos, como por exemplo, outras bactérias Gram negativa (MORAES et al., 2014). Dessa maneira, isto pode explicar os resultados encontrados na determinação de anticorpos séricos contra o LPS, uma vez que, pode ocorrer imunidade cruzada.

Foi padronizado o tempo de cultivo e concentração do antígeno nos ensaios de proliferação e viabilidade celular (Figura 08). A partir deste ensaio fez-se necessário discriminar a resposta celular induzida pelas proteínas do antígeno e o LPS presente neste. Os resultados

apresentados na Figura 08 revelam que diferentes concentrações do antígeno de *E. coli* tiveram índices semelhantes de metabolização de MTT, por este motivo sugere-se que o LPS poderia também estar participando na resposta celular.

Posteriormente foi testada a capacidade da polimixina B em neutralizar o LPS presente no antígeno. Uma solução de LPS com e sem polimixina B foi utilizado como controle. De acordo com os resultados apresentados na Figura 09, houve uma resposta de proliferação celular induzida pela solução de LPS similar ao antígeno na ausência de polimixina B. A adição de polimixina B diminuiu a resposta de proliferação celular ao antígeno e ao LPS. Tal fato sugere que o LPS presente no antígeno pode realmente estar influenciando na resposta de proliferação celular. Verificou-se também a influência da polimixina B sobre a viabilidade celular para o antígeno e LPS com e sem polimixina B. De acordo com os resultados apresentados na Figura 10 a viabilidade celular não reduziu significativamente pela presença do antibiótico, não sendo inferior a 70%. Por este motivo, optou-se em utilizar o antígeno tratado com polimixina B, a fim de diminuir a influência do LPS sobre a proliferação celular.

A Figura 11 mostra a resposta de proliferação celular induzida pelos antígenos totais de *E. coli* em diferentes concentrações. Os resultados apresentados mostram que não houve diferença estatística entre as concentrações do antígeno, sugerindo que o extrato antigênico é capaz de induzir uma resposta celular até mesmo em pequenas concentrações. De acordo, com a Figura 12 a viabilidade celular não foi reduzida permanecendo acima de 80% e não houve diferença estatística entre as concentrações do antígeno testadas.

Zeuthen et al. (2010), demonstram em culturas de células obtidas de animais *germ-free* que os antígenos de *L. acidophilus* e *E. coli* são capazes de induzir a produção de citocinas anti-inflamatórias. Antígenos de *E. coli* em cultura foram capazes de induzir a produção de IL 10. Neste estudo observaram também que o LPS pode ser capaz de regular negativamente a expressão de TLR-4 e isto pode permitir que ocorra uma tolerância a esta molécula na mucosa intestinal. Carasi et al. (2015), também avaliaram a resposta imune de *Lactobacillus kefir* em células de sangue periférico humano e demonstraram que, este foi capaz de induzir a proliferação celular e a produção de IL 6; IL10; INF $\gamma$  e GM-CSF. Por fim, concluíram que este microrganismo pode ser um forte candidato a ser utilizado no controle de doenças intestinais.

Concluindo, os resultados indicam que os antígenos totais de *E. coli* são capazes de induzir uma resposta imune. Ainda assim, sugerindo que os antígenos provenientes da mucosa

podem induzir respostas locais e sistêmicas. Além disso, foi possível verificar que a colonização do hospedeiro por microrganismos comensais são capazes de estimular o sistema imune e indicando uma associação positiva entre a colonização da mucosa intestinal e a defesa do hospedeiro.

## 7 CONCLUSÃO

Conclui-se que;

- a) O perfil eletroforético do antígeno total de *E. coli* demonstrou a presença de várias proteínas com pesos moleculares variados;
- b) Foi observado neste estudo que os anticorpos presentes no soro humano foram capazes de reconhecer várias proteínas do antígeno total de *E. coli*;
- c) Detectou-se a presença de anticorpos IgG total e IgA sérica antiantígenos de *E. coli* e anti LPS em soros de humanos testados pela técnica de ELISA;
- d) No ensaio de proliferação e viabilidade celular o extrato antigênico de *E. coli* foi capaz de induzir a proliferação celular em diferentes concentrações;
- e) A viabilidade celular não foi reduzida na presença de diferentes concentrações do antígeno total de *E. coli*;
- f) Antígenos de *E. coli* podem induzir respostas locais e sistêmicas.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, M. T. Toll-like receptor signal in gin the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. **Nat. Rev. Immunol.** v. 10, p. 131–144, 2010.
- AIUTI, F.; LEBBA F. Immunità della mucosa intestinale e vaccini per via orale con particolare riferimento ai vaccini anti - *E. coli*: una rassegna. **Le Infezioni in Medicina.** n. 4, p. 191-203, 2002.
- ALERASOL, M. et al. Immunogenicity of a Fusion Protein Comprising Coli Surface Antigen 3 and Labile B Subunit of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Iranian Biomedical Journal.** v.18, n. 4, p. 212-218, 2014
- ALEXANDER, K. L. et al. Microbiota activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Immunological Reviews.** v. 260, p. 206–220, 2014.
- ALTERI, C. J.; MOBLEY, H. L. T. *Escherichia coli* physiology and metabolism dictates adaptation to diverse host microenvironments. **Current Opinion in Microbiology.** v. 15, p.3–9, 2012.
- ALVES, R. **O retorno e terno.** Papyrus. ed. 27, 1992.
- ANDREATTI, L. R. F. **Saúde aviária e doenças.** São Paulo: Roca. 2007, v. 10, p. 112-117.
- AUSTIN, J. W. et al. Structural and Chemical Characterization of the S Layer of a Pseudomonas-Like Bacterium. **Journal of Bacteriology.** v. 172, n 2, p. 808-817,1990.
- BALABANOVA, Y. et al. Serological Evidence of Asymptomatic Infections during *Escherichia coli* O104:H4 Outbreak in Germany in 2011. **PLoS ONE** . v.8, n.9, e73052, 2013.
- BEDANI, R.; ROSSI, E. A. Microbiota intestinal e probióticos: Implicações sobre o câncer de colon. **J Port Gastreterol.** v. 15, p. 19-28, 2009.
- BELKAID, Y.; OLDENHOVE, G. Tuning microenvironments: induction of regulatory T cells by dendritic cells. **Immunity.** v. 29, p. 362–371, 2008.
- BETTELHEIM, K. A. et al .The acquisition of *Escherichia coli* by new- born babies. **Infection.** v. 4, p. 174–9, 1976.
- BETTELHEIM, K. A. The non-O157 Shiga-toxigenic (verocytotoxigenic) *Escherichia coli*; under rated pathogens. **Crit Rev Microbiol.** v. 33, p. 67–87, 2007.
- BETTELHEIM, K. A.; GOLDWATER, P. N. *Escherichia coli* and sudden infant death syndrome. **Front. Immunol.** 6:343, 2015.

BROWN, E. M. et al. The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine. *Nature immunology*. v. 14, 2013.

BULL, M. J.; PLUMMER, N. T. Part 1: The Human Gut Microbiome in Health and Disease. **Integr Med (Encinitas)**. v. 13, n.6, p. 17–22, 2014.

CARASI, P. et al. Impact of Kefir Derived *Lactobacillus kefir* on the Mucosal Immune Response and Gut Microbiota. **Journal of Immunology Research**. 2015.

CARIO, E. Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. **Gut**. v.54, p. 1182–1193, 2005.

CASTELLO, M. E. The intestinal microbiome in human disease and how it relates to arthritis and spondyloarthritis. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**. v. 29, p. 202-212, 2015.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Ongoing multistate outbreak of *Escherichia coli* serotype O157:H7 infections associated with consumption of fresh spinach—United States, September 2006. **MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.** v. 55, p. 1045–1046, 2006.

CHICHOLOWSKI, M.; RUDOLPH, C. Visceral Pain and Gastrointestinal Microbiome. **J Neurogastroenterol Motil**. v. 21, n. 2, p. 2093-0879, 2015.

CLERMONT, O. et al. Rapid and simple 18 determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Appl Environ Microbiol**. v.66, p. 4555-4558, 2000.

CONSTANTINOVITS, M. et al. Organizer and regulatory role of colonic isolated lymphoid follicles in inflammation. **Acta Physiol Hung**. v. 99, p. 344-352, 2012.

DE SANTIS, S. et al. Nutritional Keys for Intestinal Barrier Modulation. **Front. Immunol**. v. 6, p. 612, 2015.

DISPONÍVEL em: <http://www.microbeworld.org/component/jlibrary/?view=article&id=13348>, acessado em 13 de janeiro de 2016.

ELSAS, J. D. et al.. Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. **The ISME Journal**. v. 5, p. 173–183, 2011.

FERREIRA, A. J. P.; KNÖBL, T. Enfermidades bacterianas. In: JÚNIOR BERCHIERI, A.; SILVA, NEPOMUCENO, E.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das aves**. Campinas: Facta cap.4, p. 457-474, 2009.

- FERREIRA, R. N. et al. Bovine serum albumin nanoparticle vaccine reduces lung pathology induced by live *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. **Vaccine (Guildford)**, v. 31, p. 5062-5066, 2013.
- FUKASE, K. et. Al. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidogly can containing diaminopimelic acid. **Nat. Immunol.** v. 4, p. 702–707, 2003.
- FUNG, T. C. Anatomical localization of commensal bacteria in immune cell homeostasis and disease. **Immunological Reviews.** v. 260, p.35–49, 2014.
- GEUKING, M. B. et al. The interplay between the gut microbiota and the immune system. **Gut Microbes.** v. 5, n.3, p. 411–418, 2014.
- GEWIRTZ, A. T. et al. Cutting-edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial pro-inflammatory gene expression. **J. Immunol.** v. 167, p. 1882–1885, 2001.
- HILL, D. A. et al. Metagenomic analyses reveal antibiotic-induced temporal and spatial changes in intestinal microbiota with associated alterations in immune cell homeostasis. **Mucosal Immunol.** v. 3, p.148–158, 2010.
- HOOVER, L. V.; LITTMAN, D. R.; MACPHERSON, A. J. Interactions between the microbiota and the immune system. **Science.** v. 336, p. 1268–1273, 2012.
- HOOVER, L. V.; MACPHERSON, A. J. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. **Nat. Rev. Immunol.** v.10, p. 159–169, 2010.
- HUDAULT, S.; GUIGNOT, J.; SERVIN, A. L. *Escherichia coli* strains colonising the gastrointestinal tract protect germ-free mice against *Salmonella typhimurium* infection. **Gut.** v. 49, p. 47–55, 2001.
- HUURRE, A. et al. Mode of delivery effects on gut microbiota and humoral immunity. **Neonatology.** v. 93, n. 4, p. 236–240, 2008.
- JABRA, R. M. A. et al. Effect of farnesol on *Staphylococcus aureus* biofilm formation and antimicrobial susceptibility. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 50, p. 1463, 2006.
- JIMÉNEZ, E.; MARÍN, M. L.; MARTÍN, R. et al. Is meconium from healthy newborns actually sterile? **Res Microbiol.** v.159, n.3, p.187–193, 2008.
- JOHANSSON, M. E. et al.: The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. **Proc Natl Acad Sci.** v. 105, p. 15064–15069, 2008.

- KAMADA, N. et al. Humoral immunity in the gut selectively targets phenotypically virulent attaching-and-effacing bacteria for intraluminal elimination. **Cell Host Microbe**. v. 17, p. 617–627, 2015.
- KAMADA, N.; SEO, S. U.; CHEN, G. Y.; NUNEZ, G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. **Nat Rev Immunol**. v. 13, p. 321–335, 2013.
- KAMADA, N.; CHEN, G. Y.; INOHARA, N. & NÚÑEZ, G. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. **Nat. Rev. Immunol**. v.14, n. 7, p. 685–690, 2013.
- KAMARY, S. S. et al. Safety and Immunogenicity of a Single Oral Dose of Recombinant Double Mutant Heat-Labile Toxin Derived from Enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Clin Vaccine Immunol**. v. 20, n 11, p. 1764–1770, 2013.
- KATOULI, M. Population structure of gut *Escherichia coli* and its role in development of extra intestinal infections. **Iran. J. Microbiol.** v. 2, n.2, p.59-72, 2010
- KIEPER, W. C. et al. Recent immune status determines the source of antigens that drive homeostatic T cell expansion. **J. Immunol**. v. 174, p. 3158–3163, 2005.
- KRAEHENBUHL, J. P.; PRINGAULT, E.; NEUTRA, M. R. Intestinal epithelia and barrier functions. *Aliment Pharmacol Ther*. v. 11, p. 3–9, 1997.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. 227(5259):680-685, 1970.
- LEY, R.E. et al. Obesity alters gut microbial ecology. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.102, n.31, p. 11070–11075, 2005.
- LEY, R. E; TURNBAUGH P, J.; KLEIN, S.; GORDON, J. I. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. **Nature**. v. 444, p. 1022–1023, 2006.
- LOPETUSO, L. R. et al. The gastrointestinal microbiome e Functional interference between stomach and intestine. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**. v. 28, p. 995–1002, 2014.
- LOZUPONE, C. A. et al. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. **Nature**. v. 489, p. 220-230, 2012
- LUZZI, I. et al. Detection of serum antibodies to the lipopolysaccharide of *Escherichia coli* O103 in patients with hemolytic uremic syndrome. **J. Infect**. v. 171, p. 514-515, 1995.
- MACHADO, C. S. M. Desenvolvimento da resposta imune de mucosas: influências do aleitamento materno e ambientais. **Jornal de Pediatria**, p. 241, 1995.

- MACKIE, R. I.; SGHIR, A.; GASKINS, H. R. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. **Am J Clin Nutr.** v. 69, n.5, p. 1035–1045, 1999.
- MANSON, J. M.; RAUCH, M.; GILMORE, M. S. The commensal microbiology of the gastrointestinal tract. **Adv Exp Med Biol.** v. 635, p. 15-28, 2008.
- MANUZAK, J. et al. Differential Interleukin-10 (IL-10) and IL-23 Production by Human Blood Monocytes and Dendritic Cells in Response to Commensal Enteric Bacteria. **Clin Vaccine Immunol.** p. 1207–1217, 2012.
- MARIETTA, E. et al. Immunogenetic control of the intestinal microbiota. **Immunology.** v.145, p. 313–322, 2014.
- MCLOUGHLIN, R. M.; MILLS, K. H. G. Influence of gastrointestinal commensal bacteria on the immune responses that mediate allergy and asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.** v. 127, p. 1097–1107, 2011.
- MONEY, P. et al. Cattle, weather and water: mapping *Escherichia coli* O157:H7 infections in humans in England and Scotland. **Environ. Microbiol.** v. 12, p. 2633–2644, 2010.
- MORAES, A. C. F. et al. Microbiota intestinal e risco cardiometabólico: mecanismos e modulação dietética. **Arq Bras Endocrinol Metab.** v. 58, n. 4, p. 317-327, 2014.
- NOWROUZIAN, F. L. et al. Enhanced persistence in the colonic microbiota of *Escherichia coli* strains belonging to phylogenetic group B2: role of virulence factors and adherence to colonic cells. **Microbes Infect.** v. 8, p. 834–840, 2006.
- NUDING, S. et al. The Host and the Flora. **Dig Dis.** v.31, p. 286–292, 2013.
- OTTE, J. M.; KIEHNE, K.; HERZIG, K. H. Antimicrobial peptides in innate immunity of the human intestine. **J Gastroenterol.** v. 38, p. 717– 726, 2003.
- OUWERKERK, J. P.; DE VOS, W. M.; BELZER, C. Glycobiome: bacteria and mucus at the epithelial interface. **Best Pract Res Clin Gastroenterol.**v. 27, n. 25-38, 2013.
- PALMER, I.; WINGFIELD, P. T. Preparation and Extraction of Insoluble (Inclusion-Body) Proteins from *Escherichia coli*. **Curr Protoc Protein.** p.2 -25, 2012.
- PENNINGTON, T. H. *E. coli* O157 outbreaks in the United Kingdom: past, present, and future. **Infect. Drug Resist.** v.7, p. 211–222, 2014.
- PETERSON, D. A. et al. IgA Response to Symbiotic Bacteria as a Mediator of Gut Homeostasis. **Cell Host & Microbe.** v. 2, p. 328–339, 2007.

QUADRI, F. et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Developing Countries: Epidemiology, Microbiology, Clinical Features, Treatment, and Prevention. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 18, n. 3, p. 465, 2005.

RESCIGNO, M. The intestinal epithelial barrier in the control of homeostasis and immunity. **Trends Immunol.** v. 32, p. 256–64, 2011.

RIJAVEC, M. et al. D. Virulence factors and biofilm production among *Escherichia coli* strains causing bacteraemia of urinary tract origin. **J Med Microbiol.** v.57, p.1329-1334, 2008.

ROMERO, E. S. et al. The intestinal barrier function and its involvement in digestive disease. **Rev Esp Enferm Dig (Madrid).** v. 107, n. 11, p. 686-696, 2015.

ROUND, J. L.; MAZMANIAN, S. K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. **Nat. Rev. Immunol.** v. 9, p. 313–323, 2009.

SAMUELSON, D. R. et al. Regulation of lung immunity and host defense by the intestinal microbiota. **Front. Microbiol.** v. 6, p.1085, 2015.

SANTOS, A. C. A. L. **Uso de probióticos na recuperação da flora intestinal, durante antibioticoterapia.** 2010. 39f. Monografia (Pós Graduação) – Instituto de Nutrição, Rio de Janeiro, RJ.

SCHENK, M.; MUELLER, C. The mucosal immune system at the gastrointestinal barrier. **Best Pract Res Clin Gastroenterol.** v. 22, p. 391–409, 2008.

SECHER T. et al. Oral tolerance failure upon neonatal gut colonization with *Escherichia coli* producing the genotoxin colibactin. **Infect Immun.** v. 83, p.2420 –2429, 2015.

SMITH, P. K. et al. Measurement of protein using Bicinchoninic Acid. **Anal. Biochem.**, v. 150, p. 76-86, 1985.

SMITH, K. et al. Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. **Semin Immunol.** v. 19, p. 59, 2007.

SNOECK, V. et al. The IgA system: a comparison of structure and function in different species. **Vet. Res.** v. 37, p. 455–467, 2006.

SOUZA, T. B. et al. Synthesis and in vitro evaluation of antifungal and cytotoxic activities of eugenol glycosides. **Medicinal Chemistry Research** v. 23, p. 496-502, 2014.

SWIDSINSKI, A. et al. Spatial organization of bacterial flora in normal and inflamed intestine: a fluorescence in situ hybridization study in mice. **World J Gastroenterol.** v.11, n.8, p. 1131 1140, 2005.

- TAYLOR, C. M. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* and *Shigella dysenteriae* type 1-induced haemolyticuraemic syndrome. **Pediatr Nephrol.** v. 23, p. 1425–1431, 2008.
- TILDEN, J. R. J. et al. A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. **Am J Public Health.** v. 86, p. 1142–1145, 1996.
- TOLLIN, M. et al. Antimicrobial peptides in the first line defence of human colon mucosa. **Peptides.** v. 24, p. 523–530, 2003.
- TOWBIN, H.; STAEKLIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl. Acad. Sci.** v.76, p. 4350-4354, 1979.
- TOUCHON, M. et al. Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. **PLoS Genet** 5: e1000344, 2009.
- TURNER, J. R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. **Nat Rev Immunol.** v. 9, p. 799–809, 2009.
- VAISHNAVA, S. et al. The antibacterial lectin RegIII gamma promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. **Science.** v. 334, p. 255–258, 2011.
- VIGGIANO, D. et al. Gut barrier in health and disease: focus on childhood. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences.** v. 19, p. 1077-1085, 2015.
- WEHKAMP, J.; STANGE, E. F.; FELLERMANN, K.; Defensin- immunology in inflammatory bowel disease. **Gastroenterol Clin Biol.** v.33, p.137–144, 2009.
- WENG, M.; WALKER, W. A. The role of gut microbiota in programming the immune Phenotype. **J Dev Orig Health Dis.** v.1, n.4, 2013.
- YAMAMOTO, Y. I. et al. Detection in human sera of IgG, IgM and IgA to excreted/secreted antigens from *Toxoplasma gondii* by use of dot-ELISA and immunoblot assay. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** v.92, n.1, p.23–30, 1998.
- ZEUTHEN, L. H. et al. *Lactobacillus acidophilus* induces a slow but more sustained chemokine and cytokine response in naïve foetal enterocytes compared to commensal *Escherichia coli*. **BMC Immunology.** v. 11, n.2, 2010.
- ZHANG, K. et al. The intestinal epithelium as guardian of gut barrier Integrity. **Cellular Microbiology.** 2015.
- ZIEMER, C. J.; GIBSON, G. R. An overview of probiotics, prebiotics and symbiotic in the functional food concept: perspectives and future strategies. **Int. Dairy J., Amsterdam.** v.8, p.473-479, 1998.

## ANEXO

## Anexo A – Parecer do Comitê de Ética Humano

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
ALFENAS



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CONTRA ANTÍGENOS TOTAIS DE Escherichia coli

**Pesquisador:** Luiz Cosme Cotta Malaquias

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 47823315.0.0000.5142

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL-MG

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.291.363

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de projeto de pesquisa que intenciona avaliar se além da resposta imune ao nível da mucosa, a microbiota intestinal seria capaz de induzir resposta imune sistêmica. Para tal, serão obtidos 10 mL de sangue periférico de 30 de indivíduos saudáveis, de ambos os sexos, maiores de 18 anos, selecionados entre os alunos dos cursos de graduação da UNIFAL-MG.

**Objetivo da Pesquisa:**

Avaliar a resposta imune aos antígenos totais do microrganismo Escherichia coli.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:** mínimos. A coleta de sangue poderá provocar leve desconforto local (dor) e eventualmente hematomas em pessoas mais sensíveis.

**Benefícios:** Não são previstos benefícios diretos aos sujeitos da pesquisa. O conhecimento gerado poderá contribuir no futuro no desenvolvimento de novas estratégias de vacinação.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Não há.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos foram apresentados.

Endereço: Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700  
Bairro: centro CEP: 37.130-000  
UF: MG Município: ALFENAS  
Telefone: (35)3299-1318 Fax: (35)3299-1318 E-mail: comite.etica@unifal-mg.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
ALFENAS



Continuação do Parecer: 1.291.363

**Recomendações:**

Não há.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O colegiado do CEP acata o parecer do relator.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_555411.pdf	19/10/2015 09:16:51		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.doc	19/10/2015 09:16:16	Luiz Cosme Cotta Malaquias	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	19/10/2015 09:15:59	Luiz Cosme Cotta Malaquias	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo de anuência.jpg	15/07/2015 15:16:38		Aceito
Folha de Rosto	FR E coli.jpg	15/07/2015 15:14:25		Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

ALFENAS, 22 de Outubro de 2015

---

**Assinado por:**  
**Celso Ferrarezi Junior**  
**(Coordenador)**

Endereço: Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700  
Bairro: centro CEP: 37.130-000  
UF: MG Município: ALFENAS  
Telefone: (35)3299-1318 Fax: (35)3299-1318 E-mail: comite.etica@unifal-mg.edu.br