

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-graduação em Microbiologia**

Rafaella Ferreira Avelar Costa

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS DE *ESCHERICHIA COLI***  
**ASSOCIADAS À MUCOSA ILEAL DE PACIENTES COM DOENÇA DE CROHN NO**  
**BRASIL**

Belo Horizonte

2016

Rafaella Ferreira Avelar Costa

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS DE *ESCHERICHIA COLI*  
ASSOCIADAS À MUCOSA ILEAL DE PACIENTES COM DOENÇA DE CROHN NO  
BRASIL**

Tese final apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Microbiologia.

Orientador:

Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins  
(Departamento de Microbiologia –  
ICB/UFMG)

Orientador no exterior:

Prof. Dr. Nicolas Barnich (Université  
d’Auvergne, França)

Co-orientadora:

Prof. Dr. Maria de Lourdes de Abreu Ferrari  
(Instituto Alfa de Gastroenterologia –  
HC/UFMG)

Belo Horizonte

2016

043

Costa, Rafaella Ferreira Avelar.

Isolamento e caracterização de linhagens de *Escherichia coli* associadas à mucosa ileal de pacientes com doença de Crohn no Brasil [manuscrito] / Rafaella Ferreira Avelar Costa. – 2016.

91 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins. Orientador no exterior: Prof. Dr. Nicolas Barnich. Co-orientadora: Prof. Dr. Maria de Lourdes de Abreu Ferrari.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Doença de Crohn. 3. Doenças Inflamatórias Intestinais. 4. *Escherichia coli*. I. Martins, Flaviano dos Santos. II. Barnich, Nicolas. III. Ferrari, Maria de Lourdes de Abreu. IV. Universidade Federal e Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DA DEFESA DE TESE DE RAFAELLA FERREIRA AVELAR COSTA

Nº REGISTRO: 2012667508

Relatora e Suplente: Profa. Sílvia Beleza de Moura

Suplente externo: Dra. Maria José Neves

Co-orientadora: Dra. Maria de Lourdes Abreu Ferrari

Às 09:00 horas do dia 24 de junho de 2016, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Yves Le Loir (INRA Rennes - França), Margarita Martínez Medina (Universitat de Girona - Espanha), Jacques Robert Nicoli (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Fabrício Freire de Melo (UFBA), Prof. Flaviano dos Santos Martins - Orientador e Dr. Nicolas Barnich (UdA) - Orientador externo sob regime de cotutela Brasil/França para julgar o trabalho final "Isolamento e caracterização de linhagens de *Escherichia coli* associadas à mucosa ileal de pacientes com doença de Crohn no Brasil", da aluna Rafaella Ferreira Avelar Costa, requisito final para a obtenção do Grau de **DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli - Decano do Departamento, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 24 de junho de 2016.

Dr. Yves Le Loir

Dra. Margarita Martínez Medina

Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli

Dr. Fabrício Freire de Melo

Prof. Flaviano dos Santos Martins (Orientador)

Dr. Nicolas Barnich (Orientador)

Prof. Paulo César Peregrino Ferreira  
Coordenador

## **LABORATÓRIOS ENVOLVIDOS E COLABORADORES**

**Laboratório de Agentes Bioterapêuticos, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais**

- Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins

**Instituto Alfa de Gastroenterologia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina/UFMG**

- Profa. Dra. Maria de Lourdes de Abreu Ferrari

- Prof. Silas de Castro

**Laboratório de Microbes, Intestin, Inflammation et Susceptibilité de l'Hôte (M2iSH), UMR Inserm Université d'Auvergne U1071, USC INRA2018, Clermont-Ferrand, France**

- Prof. Dr. Nicolas Barnich

- Profa. Dra. Arlette Darfeuille-Michaud

*Aos meus queridos pais, irmãos, meus filhos e meu amor,  
pelo incentivo, amor, carinho e paciência.*

*À memória de Arlette,  
pelo seu carinho, aprendizado e exemplo.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, em primeiro lugar, pela proteção e pelas oportunidades de crescimento e amadurecimento.

Aos meus queridos pacientes. Obrigada pelo carinho e por cada palavra de incentivo. Os momentos compartilhados foram inúmeros e levo cada um de vocês no meu coração.

Ao meu orientador Prof. Flaviano pela confiança, conselhos, orientação e por contribuir para meu crescimento profissional.

À minha co-orientadora Lourdinha pela sua confiança, paciência, carinho e amizade.

Ao meu orientador no exterior Prof. Nicolas por todo aprendizado no exterior, dedicação, paciência e confiança. Agradeço imensamente por fazer parte de todo meu crescimento profissional e pessoal.

À minha querida e eterna orientadora, Arlette. Meu carinho e admiração serão eternos. Essa vitória é nossa, e sei que você, onde quer que esteja, estará feliz pela conclusão desse tão sonhado trabalho. Muito Obrigada.

À Prof<sup>a</sup>. Silvia Beleza de Moura por todo carinho e amizade. Esse trabalho se iniciou graças à sua indicação. Sou e serei eternamente grata.

Aos colegas e amigos do LABio e LEFM, em especial Éricka, Spencer, Bárbara, Quésia, Fabs e Silvinha. Muito obrigada por todos os momentos compartilhados, por todas as brincadeiras e trocas de experiências. Vocês fazem parte dessa conquista.

Às minhas estagiárias Sara, Laís e Alessandra por toda dedicação e trabalho.

Aos meus queridos amigos do M2iSH. Vocês foram fundamentais na minha sobrevivência no exterior. Me receberam com tanto carinho, com tanta paciência que palavras jamais serão suficientes para agradecer tudo o que vocês fizeram por mim. Elisabeth, Mathilde, Emilie, Hang, Richard, Pedro, Adeline, Valérie, Agnès, Guillaume, Jenny, Amélie, Caroline, Jeanette,

Virginie, Anthony, Johan, Julie, Tiphannie, Cécily, Julien, Lucie, Anne-So, Mathilde, Floriane, Emeline, Mickael, Alix, Marie-Pierre e Josette, merci beaucoup.

Aos meus colegas de Pós-Graduação do Departamento de Microbiologia/UFMG e funcionários da secretaria de Pós-Graduação do Departamento de Microbiologia/UFMG.

À todos os funcionários do Instituto Alfa de Gastroenterologia, em especial Silas de Castro e Rodrigo Rosa. Obrigada por todo carinho e profissionalismo.

Aos meus pais Carlos Rogélio e Selma, pelo incentivo, suporte e amor.

Aos meus irmãos Felipe e Lorena pela paciência e carinho.

Aos meus filhos Soul, Hope e Aquiles, obrigada por serem a razão do meu viver.

Ao meu namorado Leonardo, por todo companheirismo e paciência nessa reta final. Não sei do que seria de mim sem sua compreensão, carinho, amor e amizade. Obrigada por cada palavra de incentivo e por me fazer chegar até o final.

A todos meus familiares, em especial minha vovó Lourdes, tio Marcelo e George. Vocês foram meus eternos incentivadores. Obrigada por todo carinho.

Aos meus amigos queridos, em especial aos amigos de toda vida Nina e Banana.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo financiamento desse trabalho.

Muito obrigada a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse.



*“O essencial é invisível aos olhos.”*

*(Antoine de Saint-Exupéry)*

## RESUMO

A doença de Crohn (DC) é uma doença inflamatória intestinal (DII) caracterizada por uma inflamação crônica do intestino nos seres humanos. Embora sua etiologia seja desconhecida, uma resposta inflamatória anormal direcionada contra a microbiota intestinal em um hospedeiro geneticamente susceptível tem sido proposta. Vários estudos têm demonstrado que a mucosa intestinal de pacientes com DC é anormalmente colonizada por linhagens de *Escherichia coli* com propriedades aderentes e invasivas (AIEC). Entretanto, até o momento, não há estudos que demonstrem o envolvimento dessas linhagens de *E. coli* em pacientes com DC no Brasil. O objetivo deste estudo foi isolar e caracterizar linhagens de *E. coli* associadas à mucosa ileal em pacientes DC brasileiros. Foram realizadas biópsias em 35 indivíduos, compreendendo 24 pacientes com DC e 11 controles. O nível de colonização de enterobactérias aderentes associadas à mucosa ileal é significativamente maior em pacientes com DC do que no grupo controle. Entre 270 linhagens isoladas, 241 foram identificadas como linhagens de *E. coli*. A detecção dos diferentes grupos filogenéticos de *E. coli* foi realizada por PCR. Não houve diferença significativa entre a distribuição dos grupos filogenéticos entre as linhagens de *E. coli* do grupo controle e pacientes DC. A capacidade de adesão e invasão das linhagens de *E. coli* isoladas foi determinada utilizando células humanas epiteliais intestinais (I-407) e assim como a sua capacidade de sobreviver e multiplicar-se em macrófagos humanos THP-1. A análise molecular também foi realizada para a detecção de factores de virulência e a presença de polimorfismos genéticos associados as linhagens AIEC. Neste estudo, apenas alguns isolados de *E. coli* apresentaram propriedades invasivas e capacidade de sobreviver em macrófagos. Além disso, a análise da sequência *fimH* das *E. coli* não revelou uma seleção de polimorfismos na adesina FimH, tal como foi descrito em AIEC isoladas a partir de pacientes europeus. Esses resultados, portanto, mostram que as linhagens isoladas de pacientes com DC brasileiros não são ainda co-evoluídas com seu hospedeiro para desenvolver um forte fenótipo aderente-invasivo, mas será crucial acompanhar, no futuro, a evolução dessas linhagens na população brasileira a fim de entender a evolução do fenótipo AIEC.

30

**Palavras-chave:** doença de Crohn, doença inflamatória intestinal, *Escherichia coli*, *E. coli* aderente-invasiva

## ABSTRACT

Crohn's disease (CD) is an inflammatory bowel disease (IBD) characterized by chronic inflammation of the intestine in humans. The etiology of CD remains unknown; however, the most common hypothesis is that chronic inflammation results from an abnormal inflammatory response against intestinal microbiota in a genetically susceptible host. Several studies have demonstrated that the intestinal mucosa of CD patients is abnormally colonized by adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) strains. However, to date, no studies have focused on the involvement of such *E. coli* strains in CD patients in Brazil. The aim of this study was to isolate and characterize the *E. coli* strains associated from ileum mucosa in Brazilian CD patients. Biopsies were performed on 35 subjects, comprising 24 patients with CD and 11 controls. The colonization level of adherent Enterobacteriaceae-associated to ileal mucosa is significantly higher in CD patients than in the control group. Among 270 isolates strains, 241 were identified as *E. coli* strains. Mark from different phylogenetic groups of *E. coli* was carried out by PCR. There was no significant difference between the distribution of phylogenetic groups in *E. coli* strains isolated in the control group and CD patients. The adhesion and invasion ability of *E. coli* strains isolated were determined using human intestinal epithelial cells (I-407) and as well as its ability to survive and multiply in human THP-1 macrophages. The molecular analysis was also performed for the detection of virulence factors and the presence of genetic polymorphisms associated with AIEC strains. In this study, only few *E. coli* isolates showed invasive properties and the ability to survive within macrophages. In addition, *fimH* sequence analysis of *E. coli* did not revealed selection of polymorphisms into FimH adhesin, as described for AIEC collection isolated from European patients. These results therefore showed that the strains isolated from Brazilian CD patients have probably not yet co-evolved with their hosts to develop a strong adherent-invasive phenotype, but it will be crucial to follow in the future the evolution of such strain in Brazilian population to understand the evolution of AIEC phenotype.

**Keywords:** Crohn's disease, inflammatory bowel disease, *Escherichia coli*, adherent-invasive *E. coli*

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Doença de Crohn. (A) A doença pode afetar qualquer parte do trato digestório, com uma maior pré-disposição à porção do íleo terminal e cólon. (B) Diferenças macroscópicas entre as mucosas de um indivíduo saudável e um indivíduo com doença de Crohn. 19

**Figura 2:** Incidência mundial da doença de Crohn. Os países em branco não apresentam dados epidemiológicos (Cosnes *et al.*, 2011; modificada). 20

**Figura 3:** Microscopia eletrônica de transmissão das células epiteliais HEP-2 infectadas pela linhagem LF82. (A) Adesão e invasão das bactérias à célula hospedeira (x 6.200). (B) Formação de extensões membranares pela célula hospedeira infectada, englobando as bactérias aderentes. (C) Lise de um vacúolo endocítico contendo as bactérias (Boudeau *et al.*, 1999). 26

**Figura 4:** Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos murinos J-774 infectados pela linhagem LF82. (A) Após uma hora de infecção, as bactérias LF82 foram internalizadas dentro de um fagossomo. (B) As bactérias LF82 foram capazes de se multiplicar sendo que após 8 horas de infecção, vários vacúolos contendo bactérias foram observados. (C) Após 24 horas de infecção, as bactérias LF82 foram observadas dentro de um grande e único vacúolo ( x 7.200) (Glasser *et al.*, 2001). 27

**Figura 5:** Estrutura da subunidade FimH, adesina que compõe o pili do tipo 1. Essa subunidade é constituída de um domínio pilina, que permite uma ancoragem ao pili, um domínio lectina, responsável pelo reconhecimento dos resíduos de manose e um braço flexível que liga os dois domínios. Em vermelho estão marcados as mutações presentes na linhagem AIEC LF82 : V27A, N70S, S78N et T158P (Schembri *et al.*, 2000 modificada). 30

**Figura 6:** Mecanismos de patogenicidade das AIEC: inflamação da mucosa ileal de pacientes com DC (Chassaing & Darfeuille-Michaud, 2011 modificada). 31

**Figura 7:** O envolvimento do receptor Gp96 no processo invasivo das linhagens AIEC associadas a mucosa ileal de pacientes com DC (Rolhion *et al.*, 2010 modificada). 32

**Figura 8:** Colonização da mucosa ileal por enterobactérias cultiváveis. Em vermelho está representado o valor da mediana. A análise estatística realizada foi “*t*” de Student seguido do teste Mann Whitney, sendo \*  $p < 0,05$ . 46

**Figura 9:** Classificação dos grupos filogenéticos entre as linhagens de *E. coli* isoladas 47

**Figura 10:** Porcentagem de invasão das linhagens de *E. coli* em cultura de células intestinais humanas I-407. Todas as amostras que apresentam resultados iguais ou superiores à 0.1% foram classificadas como invasivas às células I-407. Em vermelho está representado o valor da mediana. A análise estatística realizada foi “*t*” de Student seguido do teste Mann Whitney, sendo N.S.  $p > 0,05$ . 48

**Figura 11:** Microscopia eletrônica de varredura das células epiteliais I-407 infectadas por uma linhagem de *E. coli* isolada de paciente com DC. Não foi possível visualizar bactérias no interior das células epiteliais. A, Barra de escala: 10 nm; B, Barra de escala: 500 nm; C, Barra de escala: 2 nm; D, Barra de escala: 500 nm. 49

**Figura 12:** Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos humanos THP-1 infectados por uma linhagem de *E. coli* isolada de paciente DC. Em (A) e (B) é possível visualizar as bactérias dentro de vários vacúolos no interior da célula macrofágica. A, Escala de barra: 10 nm; B, Escala de barra: 2 nm. 50

**Figura 13:** Sobrevivência e multiplicação de linhagens de *E. coli* em cultura de células THP-1. Todas as amostras que apresentam resultados iguais ou superiores a 100% foram capazes de sobreviver e se replicar dentro de células macrofágicas após 24 horas de infecção. As linhagens K12 C600 e LF82 foram utilizadas como controles negativo e positivo, respectivamente. CTL, amostras pacientes controle; DC, amostras pacientes DC. (a) significativo em relação a linhagem K12, (b) significativo em relação a linhagem LF82. A análise estatística realizada foi ANOVA one-way seguido do teste Newman-Keuls, sendo n.s.  $p > 0,05$ . 51

**Figura 14:** Níveis da citocina TNF- $\alpha$  produzidos pelas células THP-1 infectadas com linhagens AIEC. A linhagem LF82 foi utilizada como controle positivo. CTL, amostras pacientes controle; DR, amostras pacientes com DC. A análise estatística realizada foi ANOVA one-way seguido do teste Newman-Keuls, sendo \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . 52

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Forma de apresentação clínica e localização da DC, de acordo com a Classificação de Montreal	36
<b>Tabela 2:</b> Sequência dos iniciadores e condições das PCR para detecção dos alvos <i>chuA</i> , <i>yjaA</i> e TSPE4.C2	37
<b>Tabela 3:</b> Sequência dos iniciadores e condições das PCR para detecção dos genes <i>hcp1</i> , <i>hcp3</i> , <i>lpfA</i> e <i>gipA</i>	41
<b>Tabela 4:</b> Sequência dos iniciadores e condições das PCR para detecção do gene <i>fimH</i>	42
<b>Tabela 5:</b> Características dos pacientes	44
<b>Tabela 6:</b> Distribuição dos pacientes de acordo com a idade ao diagnóstico de DC, segundo a classificação de Montreal	44
<b>Tabela 7:</b> Distribuição dos pacientes de acordo com a localização da doença, segundo a classificação de Montreal	45
<b>Tabela 8:</b> Distribuição dos pacientes de acordo com o comportamento da doença, segundo a classificação de Montreal	45
<b>Tabela 9:</b> Distribuição dos filogrupos das linhagens de <i>E. coli</i> em relação aos grupos de pacientes n (%)	46
<b>Tabela 10:</b> Análise da presença de possíveis fatores de virulência em linhagens AIEC isoladas	53
<b>Tabela 11:</b> Substituições nos resíduos de aminoácidos em FimH nas linhagens AIEC isoladas	54

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AIEC = *Escherichia coli* aderente-invasiva
- AmpR = resistência a ampicilina
- ASCA = anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies
- CEACAM6 = molécula de adesão 6 relacionada ao antígeno carcinoembriônico
- chuA* = gene associado a proteína TonB (responsável pelo transporte de heme)
- DAEC = *Escherichia coli* aderente-difusa
- DC = doença de Crohn
- DII = doença inflamatória intestinal
- DO = densidade óptica
- DNA = ácido desoxirribonucléico
- dNTP's = desoxirribonucleotídeos fosfatados
- EAEC = *Escherichia coli* enteroagregativa
- EDTA = ácido etilenodiamino tetra-acético
- EHEC = *Escherichia coli* entero-hemorrágica
- EIEC = *Escherichia coli* enteroinvasiva
- EPEC = *Escherichia coli* enteropatogênica
- EryR = resistência a eritrocimina
- ETEC = *Escherichia coli* enterotoxigênica
- ExPEC = *Escherichia coli* patogênica extraintestinal
- F = forward
- fimH* = gene associado à proteína FimH
- FimH = adesina H da fimbria do tipo 1
- gipA* = *Growth in Peyer's patches* gene A
- Gp96 = glicoproteína 96
- hcp* = *hemolysin-coregulated protein gene*
- HIV = Síndrome da Deficiência Imuno Adquirida
- IFN = interferon
- IL = interleucina
- ko = knock-out
- LB = Luria-Bertani
- lpfA* = long polar fimbriae gene A
- LPF = fimbria polar longa



LPS = lipopolissacarídeo

MAP = *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis*

MEV = microscopia eletrônica de varredura

MOI = multiplicidade de infecção

NOD = *nucleotide-binding oligomerization domain*

OMP = proteína de membrana externa

PBS = tampão fosfato salino

PCR = reação em cadeia da polimerase

PMA = *Phorbol myristate acetate*

PP = placas de Peyer

R = reverse

RNA = ácido ribonucléico

RU = retocolite ulcerativa

SNP = *single nucleotide polymorphism*

STEAEc = *E. coli* enteroagregativa produtora da toxina shiga

SVF = soro fetal bovino

T6SS = sistema de secreção do tipo 6

TGI = trato gastrointestinal

Th = célula T helper

TLR = *toll-like* receptor

TNF = fator de necrose tumoral

TSPE4.C2 = sequência de DNA componente de um gene codificador de uma lipase

U = unidade

UFC = unidade formadora de colônia

*yjaA* = gene associado à proteína YjaA (proteína de resposta ao estresse)

## SUMÁRIO

<b>1.0 INTRODUÇÃO</b>	<b>19</b>
<b>1.1. Doença de Crohn</b>	<b>19</b>
<b>1.2 Fatores etiológicos da doença de Crohn</b>	<b>21</b>
<b>1.2.1 Fatores ambientais</b>	<b>21</b>
<b>1.2.2 Fatores imunológicos</b>	<b>22</b>
<b>1.2.3 Fatores genéticos</b>	<b>22</b>
<b>1.2.4 Fatores relacionados à microbiota intestinal</b>	<b>23</b>
<b>1.2.4.1 <i>E. coli</i> associada à doença de Crohn</b>	<b>25</b>
<b>1.2.4.2 Mecanismos de patogenicidade da AIEC LF82</b>	<b>29</b>
<b>2.0 JUSTIFICATIVA</b>	<b>33</b>
<b>3.0 OBJETIVOS</b>	<b>34</b>
<b>3.1 Objetivo geral</b>	<b>34</b>
<b>3.2 Objetivos específicos</b>	<b>34</b>
<b>4.0 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>35</b>
<b>4.1 Isolamento, identificação e caracterização de possíveis linhagens de AIEC isoladas da mucosa ileal de pacientes com a doença de Crohn</b>	<b>35</b>
<b>4.1.1 Pacientes e colheita de biópsias</b>	<b>35</b>
<b>4.1.2 Isolamento e identificação de <i>E. coli</i></b>	<b>35</b>
<b>4.1.3 Extração de DNA</b>	<b>36</b>
<b>4.1.4 Caracterização dos grupos filogenéticos de <i>E. coli</i></b>	<b>36</b>
<b>4.1.5 Pesquisa e caracterização de linhagens AIEC</b>	<b>37</b>
<b>4.1.5.1 Culturas celulares</b>	<b>37</b>
<b>4.1.5.2 Linhagens bacterianas utilizadas</b>	<b>38</b>
<b>4.1.5.3 Ensaios de invasão bacteriana em cultura de células intestinais I-407</b>	<b>38</b>
<b>4.1.5.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</b>	<b>39</b>
<b>4.1.5.5 Ensaios de sobrevivência e multiplicação bacteriana em macrófagos humanos THP-1</b>	<b>39</b>
<b>4.1.5.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</b>	<b>40</b>
<b>4.1.5.7 Dosagem de TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>40</b>

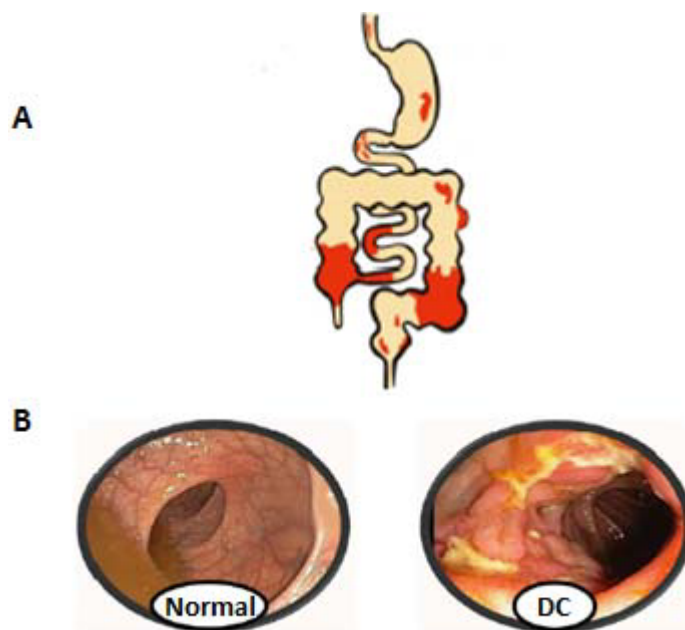
4.1.5.8 Detecção dos genes <i>hcp1</i> , <i>hcp3</i> , <i>lpfA</i> e <i>gipA</i>	41
4.1.5.9 Sequenciamento de <i>fimH</i>	41
4.2 Análise estatística	43
<b>5.0 RESULTADOS</b>	<b>44</b>
5.1 População	44
5.2 Colonização da mucosa ileal	45
5.3 Detecção dos grupos filogenéticos das linhagens de <i>E. coli</i>	46
5.4 Pesquisa de linhagens AIEC	47
5.4.1 Invasão bacteriana em cultura de células intestinais humanas I-407	47
5.4.2 Sobrevivência e multiplicação bacteriana em cultura de células THP-1	49
5.4.3 Níveis de TNF- $\alpha$ produzidos por células THP-1 infectadas por linhagens AIEC	51
5.4.4 Associação entre o perfil AIEC e a presença de possíveis fatores de virulência	52
5.4.5 Pesquisa de polimorfismos em FimH	53
<b>6.0 DISCUSSÃO</b>	<b>56</b>
<b>7.0 CONCLUSÕES</b>	<b>59</b>
<b>8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>60</b>
<b>9.0 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO PERÍODO</b>	<b>75</b>
9.1 Disciplinas cursadas	75
9.2 Trabalhos apresentados em congressos e eventos	75
9.3 Artigo	76
<b>ANEXOS</b>	<b>77</b>
ANEXO A	78
ANEXO B	79
ANEXO C	80

## 1.0 INTRODUÇÃO

### 1.1 Doença de Crohn

5 A doença de Crohn (DC) faz parte, juntamente com a retocolite ulcerativa (RU), de um grupo de condições inflamatórias do intestino delgado e grosso, conhecidas como doenças inflamatórias intestinais (DII) (Xavier & Podolsky, 2007).

A DC pode afetar potencialmente qualquer segmento do trato digestório, da boca ao ânus, entretanto acomete com maior propensão o íleo terminal e regiões do cólon (**Figura 1**).  
 10 A inflamação geralmente é descontínua e pode acometer todas as camadas intestinais, da mucosa à serosa. A doença manifesta-se frequentemente com dor abdominal, diarreia crônica, presença de sangue nas fezes e perda de peso, podendo evoluir com complicações como fistulização, abscessos e obstrução intestinal (Ferrari *et al.*, 2006; Sands, 2006).



15

**Figura 1:** Doença de Crohn. (A) A doença pode afetar qualquer parte do trato digestório, com uma maior pré-disposição à porção do íleo terminal e cólon. (B) Diferenças macroscópicas entre as mucosas de um indivíduo saudável e um indivíduo com doença de Crohn.

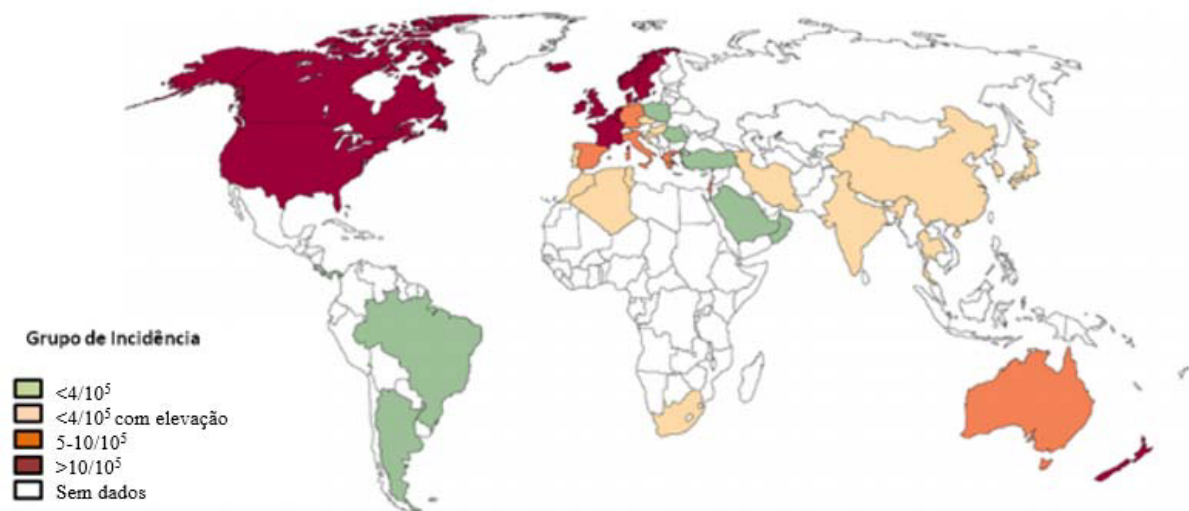
20

A DC apresenta tendência à recorrência durante toda a vida, mesmo após ressecções cirúrgicas, podendo estar associada a diversas manifestações extraintestinais. O tratamento medicamentoso atualmente disponível possibilita, na maioria dos casos, o controle da

atividade da doença e o alívio dos sintomas, entretanto, não proporciona a cura. A doença pode afetar indivíduos de qualquer faixa etária, porém, ocorre mais frequentemente em pacientes entre 20 e 40 anos de idade (Ferrari *et al.*, 2006; Sands, 2006). Suas consequências incapacitantes, sua natureza crônica e recorrente, além da ausência de um tratamento etiológico específico para a doença, fazem com que a DC seja um grande problema em gastroenterologia nos dias atuais.

A prevalência das DII aumentou acentuadamente ao longo do século passado, no entanto, a distribuição dessas doenças no mundo permanece muito desigual. DC e RU são mais frequentemente encontradas na Europa e América do Norte, enquanto as mesmas são raras no hemisfério Sul, com exceção das populações brancas da Austrália, Nova Zelândia e África Sul (Binder, 2004; Farrokhyar *et al.*, 2001).

A incidência média mundial da DC é estimada em 5 a 7 casos para 100.000 habitantes, variando entre as diferentes regiões do mundo (**Figura 2**) (Binder, 2004; Farrokhyar *et al.*, 2001). No Brasil, há poucos trabalhos sobre a prevalência dessa doença, entretanto sabe-se que sua incidência vem aumentando. Victoria e colaboradores (2009) relataram a incidência das DII em uma parte do estado de São Paulo. Eles observaram que, entre os anos de 1986 a 2005, a incidência da DC aumentou de 0,24 para 3,5 casos por 100.000 habitantes.



20

**Figura 2:** Incidência mundial da doença de Crohn. Os países em branco não apresentam dados epidemiológicos (Cosnes *et al.*, 2011; modificada).

## 1.2 Fatores etiológicos da doença de Crohn

A etiologia precisa da DC, até hoje desconhecida, é multifatorial. Estudos clínicos e epidemiológicos têm demonstrado o envolvimento de fatores ambientais, imunológicos, genéticos e relacionados à microbiota intestinal. As interações entre estes múltiplos fatores ainda são pouco conhecidas, entretanto, acredita-se que a doença seja o resultado de uma resposta inflamatória anormal direcionada contra a microbiota entérica em um hospedeiro geneticamente susceptível (Ogura *et al.*, 2001).

### 1.2.1 Fatores ambientais

Os argumentos a favor do envolvimento dos fatores ambientais no desenvolvimento da DC baseiam-se em várias observações tais como: (1) o aumento expressivo da incidência da doença nos países industrializados nos últimos 50 anos (Lerebours *et al.*, 2003); (2) a distribuição heterogênea da doença em nível mundial, onde a incidência da mesma é maior em países do hemisfério Norte em relação aos países do hemisfério Sul (Declercq *et al.*, 2010); e (3) as diferenças de incidência constatadas em certas populações migrantes, por exemplo, o aumento da frequência de DII em populações asiáticas que migraram para países europeus e inversamente a diminuição do risco da ocorrência de DII em populações européias que migraram para países asiáticos (Yang *et al.*, 2001).

Desde 1984, vários estudos têm observado uma associação entre o tabagismo e a DC, com um agravamento da evolução da doença, especialmente entre as mulheres (Birrenbach & Bocker, 2004; Cosnes, 2004). Os mecanismos dos efeitos do tabagismo permanecem obscuros, entretanto sabe-se que o tabaco afeta a imunidade da mucosa e a imunidade sistêmica, alterando as funções da imunidade inata e adaptativa. Além disso, o tabaco aumenta a permeabilidade intestinal, além de também aumentar a produção de muco no nível do cólon (Cosnes, 2004).

Outros estudos demonstraram que a dieta desempenha um papel importante no desenvolvimento da DC, sugerindo que frutas e legumes desempenham um papel protetor contra a doença e que o consumo de alimentos do tipo “fast-food”, além de açúcares refinados, representam fatores de risco para o desenvolvimento da DC (Matsui *et al.*, 1990; Persson *et al.*, 1992; Reif *et al.*, 1997; Russel *et al.*, 1998; Seibold, 2005; Suzuki *et al.*, 2008).

### 1.2.2 Fatores imunológicos

A DC é caracterizada por um estado de hiperativação do sistema imunológico que poderia ser o resultado de uma desregulação da resposta imune na mucosa intestinal do hospedeiro. Essa desregulação está associada a um aumento da permeabilidade intestinal, resultando em uma estimulação contínua do sistema imune da mucosa.

A inflamação intestinal resulta em um recrutamento e ativação de linfócitos e macrófagos, além de um infiltrado de neutrófilos, eosinófilos, monócitos e mastócitos. A liberação consecutiva de citocinas e de outros mediadores inflamatórios levam à uma amplificação da resposta imunitária local, responsável pelas lesões no tecido. As citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$  são liberadas em grandes quantidades na mucosa intestinal de pacientes com DC (Desreumaux *et al.*, 1997; Niessner & Volk, 1995).

As citocinas inflamatórias desempenham um papel importante na indução e cronicidade da inflamação intestinal em pacientes com DC. Devido ao papel comprovado das citocinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-6 e IL-23 durante a fase crônica da doença, a DC é considerada como uma patologia do tipo Th1 / Th17 (Desreumaux *et al.*, 1997; Niessner & Volk, 1995; Strober & Fuss, 2011). No entanto, demonstrou-se que as primeiras lesões da doença estão associadas à um aumento da produção de IL-4 (Desreumaux *et al.*, 1997), citocina responsável pela ativação do fator de transcrição GATA-3 (Ouyang *et al.*, 2000) e indispensável ao engajamento em via de diferenciação Th2 (Seder, 1994).

### 1.2.3 Fatores genéticos

A genética desempenha um importante papel na susceptibilidade à DC. Estudos epidemiológicos indicam que o risco de desenvolver DC, quando um parente de primeiro grau é acometido, é de 10 a 21 vezes mais elevado do que na população em geral e que a frequência das formas familiares da doença pode chegar a 40% (Binder & Orholm, 1996; Colombel & Hugot, 1996; Monsen *et al.*, 1991; Orholm *et al.*, 1991).

A DC é geneticamente bastante complexa e não pode ser explicada por apenas um único gene. Com o sequenciamento do genoma humano, vários loci foram identificados como potencialmente associados à DC. Os genes mais estudados até o presente momento são os genes que codificam as proteínas NOD2, TLR, ATG16L1, IRGM e IL-23R (Hugot *et al.*, 2001; Ogura *et al.*, 2001; Hampe *et al.*, 2007; Parkes *et al.*, 2007; Wellcome, 2007; Barrett *et al.*, 2008; Rioux *et al.*, 2007).

### 1.2.4 Fatores relacionados à microbiota intestinal

A DC está associada seguramente ao aumento da permeabilidade intestinal, resultando em estimulação contínua do sistema imune da mucosa. Sugere-se que esse seria o defeito primário que ocorre em indivíduos com DC. O aumento da permeabilidade intestinal tem sido proposto como uma das causas de doenças sistêmicas por décadas. Em diversas doenças autoimunes, a permeabilidade intestinal tem sido considerada como um estágio inicial da doença. No caso da DC, o aumento na permeabilidade intestinal tem sido descrito em porções não-inflamadas do intestino, assim como em parentes saudáveis de primeiro grau dos pacientes, sugerindo que esse defeito pode ocorrer independentemente da inflamação. Essa quebra na função da barreira intestinal envolve estruturas dinâmicas e complexas localizadas nas junções entre as células, como as proteínas das junções serreadas (Soderholm *et al.*, 2002).

Estudos utilizando modelos experimentais têm demonstrado que a microbiota intestinal desempenha um papel central no desenvolvimento da inflamação crônica. Uma das principais evidências veio de estudos utilizando animais IL-10 knock-out (Madsen, 2001). O modelo murino com o gene deletado para IL-10 (IL-10 ko) quando mantido em ambiente convencional, desenvolve espontaneamente uma colite muito semelhante à DC (Kuhn *et al.*, 1993). Entretanto, quando mantido em condições isentas de germes, a colite não se desenvolve. Essas descobertas sugerem que as bactérias presentes no lúmen intestinal desempenham um importante papel no início da inflamação nesse modelo. Além disso, esse modelo animal também apresenta um aumento na permeabilidade intestinal. Esses camundongos apresentam alterações significativas tanto nas espécies quanto na quantidade de bactérias presentes no cólon, sugerindo que fatores genéticos do hospedeiro podem ser críticos no controle da colonização bacteriana. Somado a tudo isso, o tratamento precoce desses animais com antibióticos pode prevenir o desenvolvimento posterior de uma colite, sugerindo que eventos iniciais durante o período neonatal podem influenciar a progressão da doença (Madsen, 2001). Trabalhos recentes vêm focando no uso de misturas bacterianas para alterar o balanço microbiano no cólon com a intenção de reduzir a inflamação em animais IL-10 ko (Madsen *et al.*, 1999; Madsen *et al.*, 2001; Madsen *et al.*, 2002; Jijon *et al.*, 2004, Ewaschuk *et al.*, 2008).

Em humanos, as primeiras evidências do envolvimento da microbiota intestinal em DII vieram de ensaios clínicos mostrando que o desvio do fluxo de fezes aliviava os sintomas da DC e que a exposição de porções do íleo terminal, no pós-operatório, a conteúdos do



lúmen, aumentava a inflamação da mucosa (Rutgeerts *et al.*, 1991; D'Haens *et al.*, 1998). Além disso, diversas outras evidências apontam para o envolvimento da microbiota intestinal na etiopatogênese da DII humana: (1) a antibioticoterapia alivia os sintomas da doença perianal; (2) presença de elevados níveis de antígenos microbianos no soro; (3) aumento da translocação bacteriana, que está diretamente associada ao aumento da permeabilidade intestinal; (4) aumento de bactérias mucolíticas associadas ao cólon (como o *Ruminococcus gnavus* e *Ruminococcus torques*) e do número de micro-organismos associados à mucosa, o que está diretamente ligado à diminuição da camada de muco; (5) diminuição da diversidade microbiana presente nas fezes e na mucosa, em especial daqueles micro-organismos com perfil anti-inflamatório, como o *Feacalibacterium prausnitzii*; (6) diminuição da secreção de peptídeos antimicrobianos, levando a um aumento do crescimento, aderência e translocação de micro-organismos da microbiota indígena; e (7) polimorfismos de genes envolvidos na secreção de peptídeos antimicrobianos pelas células de Paneth (revisado por Chassaing & Darfeuille-Michaud, 2011).

Diferentes teorias têm sido desenvolvidas quanto ao papel da microbiota intestinal na DC, em particular a teoria da disbiose e a teoria de um agente infeccioso patogênico persistente no nível da mucosa intestinal. Alguns trabalhos observaram que a composição da microbiota intestinal difere entre pacientes com DII e indivíduos saudáveis, além disso, uma maior concentração de enterobactérias foi observada entre indivíduos com DII (Keighley *et al.*, 1978; Dickinson *et al.*, 1980; Ruseler-van Embden & Both-Patoir, 1983; Seksik *et al.*, 2003; Swidsinski *et al.*, 2009; Willing *et al.*, 2009). Seksik e colaboradores (2003) mostraram que pelo menos 30% da microbiota dominante em pacientes com DII pertencem a grupos filogenéticos não encontrados na microbiota de indivíduos controle. Uma diminuição de Firmicutes também foi observada em pacientes com DII, incluindo uma diminuição significativa da espécie *Clostridium leptum* em pacientes com DC (Sokol *et al.*, 2008). Além disso, alguns autores também observaram uma diminuição de alguns grupos bacterianos benéficos, tais como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, além de um aumento de bactérias com potencial patogênico tais como *Bacteroides* e *E. coli* associadas à mucosa de pacientes com DC (Keighley *et al.*, 1978; Giaffer *et al.*, 1991; Giaffer *et al.*, 1992; Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998; Neut *et al.*, 2002; Swidsinski *et al.*, 2002; Tamboli *et al.*, 2004; Swidsinski *et al.*, 2005; Manichanh *et al.*, 2006; Sokol *et al.*, 2006; Sokol *et al.*, 2008). Todos estes resultados apóiam a hipótese de uma perturbação do equilíbrio entre bactérias potencialmente benéficas e patógenos oportunistas (disbiose), resultando no desenvolvimento das DII.

As semelhanças entre a DC e algumas formas de enterocolite infecciosa sugerem que vários agentes infecciosos pode estar envolvidos com a DC. Diferentes estudos apontam o envolvimento de diversos micro-organismos na etiologia da DC, tais como o envolvimento de alguns vírus, como por exemplo o vírus do sarampo, o envolvimento de leveduras, como *Candida albicans*, além do envolvimento de algumas espécies bacterianas (Chiba *et al.*, 1998a; Chiba *et al.*, 1998b; Kallinowski *et al.*, 1998). Até o momento nenhum patógeno específico foi comprovado.

Em contrapartida, uma variedade de bactérias patogênicas foram, a princípio, suspeitas de serem os agentes causadores da DC, sendo que muitos pesquisadores suspeitam do papel de *Mycobacterium avium* subespécie Paratuberculosis (MAP) na etiologia da DC. Essa bactéria causa enterocolite em ruminantes, fazendo desse patógeno um potencial agente etiológico associado à DC. Entretanto, um link entre MAP e DC ainda não foi completamente descartado e nem comprovado, devido a alguns resultados contraditórios descritos na literatura (Chassaing & Darfeuille-Michaud, 2011). Recentemente, foi descoberto que MAP libera uma molécula (manose) que previne os macrófagos de matarem *E. coli* da microbiota residente. Os autores também observaram que essa bactéria é um ativador para uma proteína circulante (“anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies – ASCA”) que é encontrada em aproximadamente dois terços dos pacientes com DC, sugerindo que esses indivíduos foram infectados por MAP (Mpofu *et al.*, 2007).

Conforme revisado por Chassaing & Darfeuille-Michaud (2011), uma maior prevalência de certas enterobactérias em pacientes com DII, em especial DC, em relação a grupos controle, vem sendo observada, como *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Salmonella* não-tifóide e *Escherichia coli*.

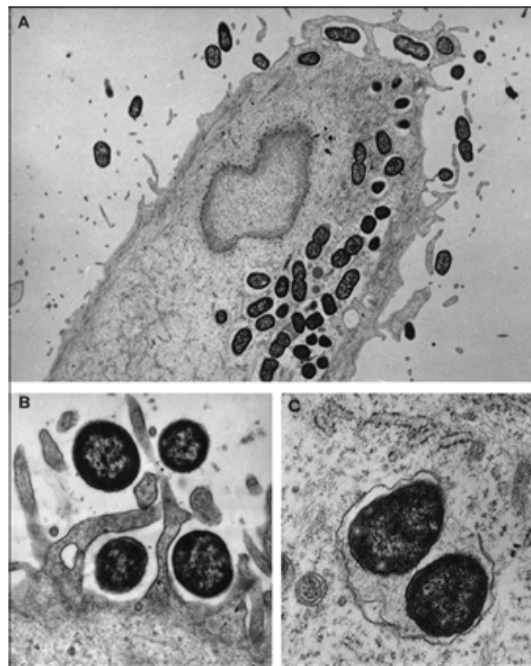
#### 1.2.4.1 *E. coli* associada à doença de Crohn

Diversos estudos independentes têm demonstrado o isolamento cada vez mais frequente de *E. coli* com propriedades aderentes e invasivas associadas à mucosa de pacientes com DII (Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998; Neut *et al.*, 2002; Swidsinski *et al.*, 2002; Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2004; Conte *et al.*, 2006; Baumgart *et al.*, 2007; Kotlowski *et al.*, 2007; Sasaki *et al.*, 2007; Eaves-Pyles *et al.*, 2008; Martinez-Medina *et al.*, 2009). As linhagens isoladas da mucosa intestinal de pacientes com DC são altamente aderentes às células do epitélio intestinal (Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998), além de altamente invasivas (Boudeau *et al.*, 1999), o que deu origem a um novo grupo designado *E. coli*

aderenteinvasiva (AIEC). Esse novo patotipo de *E. coli* foi isolado da mucosa ileal de 36,4% de pacientes com DC e de apenas 6% de pacientes controle (Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004).

A linhagem de *E. coli* AIEC LF82, isolada de uma lesão ileal crônica em um paciente com a DC (Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998; Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004), tem sido mais particularmente estudada (linhagem AIEC de referência). Essa linhagem é capaz de aderir e invadir *in vitro* as células epiteliais intestinais I-407, Caco-2 e HCT-8, além das células epiteliais da laringe HEp-2, possuindo um nível de internalização semelhante ao das *E. coli* enteroinvasivas (EIEC) (Boudeau *et al.*, 1999).

A interação entre a linhagem LF82 e as células epiteliais intestinais caracteriza-se pela emissão de projeções da membrana na superfície das células alvo, englobando as bactérias aderentes. Esses prolongamentos, localizados no local de contato íntimo com as bactérias, parecem ser apoiados por um acúmulo de elementos do citoesqueleto celular, como foi demonstrado pelas áreas citoplasmáticas densas observadas nos locais de interação (**Figura 3**). Esse fenômeno de internalização da linhagem LF82 nas células HEp-2 necessita de uma polimerização ativa de actina e do recrutamento de microtúbulos (Boudeau *et al.*, 1999).

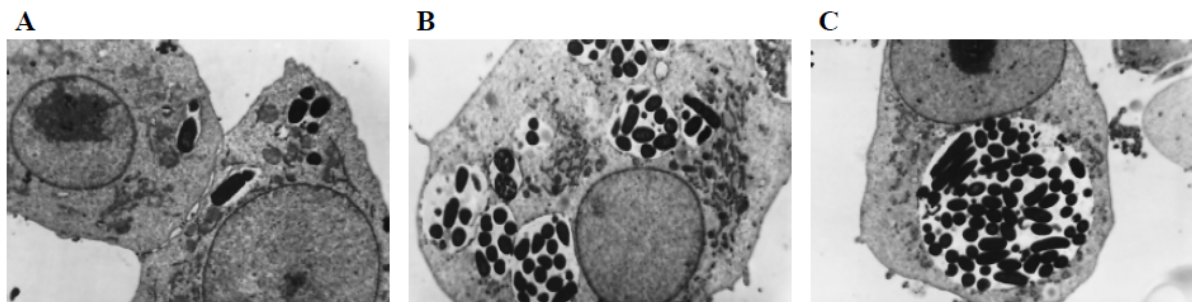


**Figura 3:** Microscopia eletrônica de transmissão das células epiteliais HEp-2 infectadas pela linhagem LF82. (A) Adesão e invasão das bactérias à célula hospedeira (x 6.200). (B) Formação de extensões membranares pela célula hospedeira infectada, englobando as bactérias aderentes. (C) Lise de um vacúolo endocítico contendo as bactérias (Boudeau *et al.*, 1999).

Como outras linhagens invasivas do tipo EIEC, *Shigella* spp. ou *Salmonella* spp., a LF82 é capaz de sobreviver e se multiplicar nas células intestinais. A análise realizada por microscopia eletrônica de transmissão mostrou que a linhagem LF82 tem a capacidade de lisar a membrana do vacúolo endocítico e encontrar-se livre no citoplasma, ambiente propício para a replicação bacteriana (Boudeau *et al.*, 1999).

O comportamento de linhagens de *E. coli* associadas à DC tem sido estudado em diferentes células macrofágicas. Os resultados obtidos mostram que 100% das linhagens de *E. coli* isoladas de pacientes com DC são capazes, após fagocitose pelos macrófagos murinos J-774, de sobreviver e de se multiplicar fortemente até 48 horas pós infecção. Além disso, a linhagem LF82 é capaz de resistir à atividade bactericida das células macrofágicas J-774 durante aproximadamente 5 dias (Glasser *et al.*, 2001).

A LF82 induz a formação de um grande vacúolo após 24 horas de infecção, pela fusão de vacúolos primários, preservando a integridade da célula hospedeira (**Figura 4**). Por meio de estudos avaliando-se resultados de microscopia eletrônica de transmissão, nenhuma bactéria livre no citoplasma foi observada. Além disso, Glasser e colaboradores (2001) observaram que a linhagem LF82 não induz a morte celular dos macrófagos infectados, por apoptose ou por necrose, e as células infectadas produzem níveis elevados de TNF- $\alpha$ .



**Figura 4:** Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos murinos J-774 infectados pela linhagem LF82. (A) Após uma hora de infecção, as bactérias LF82 foram internalizadas dentro de um fagossomo. (B) As bactérias LF82 foram capazes de se multiplicar sendo que após 8 horas de infecção, vários vacúolos contendo bactérias foram observados. (C) Após 24 horas de infecção, as bactérias LF82 foram observadas dentro de um grande e único vacúolo ( x 7.200) (Glasser *et al.*, 2001).

25

Dentro das células macrofágicas, as bactérias pertencentes a linhagem LF82 são internalizadas em fagossomos que evoluem para um compartimento do tipo ácido fagolisossomal contendo a catepsina D ativa. Os mecanismos pelos quais a LF82 resiste à atividade hidrolítica da catepsina D e ao pH ácido são ainda desconhecidos (Bringer *et al.*, 2006). Recentemente, Bringer e colaboradores (2012) demonstraram que a secreção elevada

30

de TNF- $\alpha$  induzida pela replicação intramacrofágica da LF82 seria necessária para uma máxima multiplicação dessa linhagem nos macrófagos. Os mecanismos pelos quais o TNF- $\alpha$  favorece a replicação intramacrofágica de linhagens AIEC não é completamente conhecido. Entretanto, sabe-se que essa citocina ativa os sinais antiapoptóticos (Gaur & Aggarwal, 2003), sugerindo que níveis altos de TNF- $\alpha$  produzidos pelos macrófagos infectados podem prevenir a morte celular.

Até o presente momento, sete patotipos de *E. coli* responsáveis pelas síndromes diarreicas foram identificadas com base na natureza dos seus fatores de virulência e nos eventos desencadeados pelas mesmas: (1) *E. coli* enterotoxigênica (ETEC); (2) *E. coli* enterohemorrágica (EHEC); (3) *E. coli* enteroagregativa (EAEC); (4) *E. coli* aderente difusa (DAEC); (5) *E. coli* enteropatogênica (EPEC); (6) *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) (revisado por Kaper, 2005); (7) *E. coli* enteroagregativa produtora da toxina shiga (STEAEC), responsável pelo surto de intoxicação alimentar em 2011 na Alemanha (Bielaszewska *et al.*, 2011). Essas linhagens de *E. coli* codificam fatores de adesão específicos, permitindo dessa forma a colonização do trato intestinal e a produção de toxinas ou outras proteínas capazes de afetar inúmeras funções das células eucarióticas.

Pesquisas por amplificação gênica e hibridização molecular de diferentes determinantes genéticos de adesão encontrados em linhagens de *E. coli* responsáveis por diarreias e infecções urinárias mostraram que 73% das linhagens de *E. coli* associadas à DC não possuem nenhum dos fatores de adesão e invasão já descritos em linhagens de *E. coli* patogênicas, responsáveis por infecções intestinais e urinárias (Boudeau *et al.*, 1999; Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998). Com base nas características patogênicas dessas linhagens associadas à DC, um novo patotipo de *E. coli* foi denominado: *E. coli* aderente invasiva (AIEC) (Boudeau *et al.*, 1999). Os critérios de inclusão de linhagens de *E. coli* nesse grupo são: (1) a capacidade de aderir e invadir as células epiteliais intestinais de acordo com um processo de recrutamento dependente de microtúbulos e microfilamentos; (2) a capacidade de sobreviver e se multiplicar fortemente dentro de grandes vacúolos em macrófagos, sem induzir a morte celular; (3) a capacidade de induzir a produção de níveis elevados de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos infectados.

Recentemente vários genomas de linhagens AIEC foram sequenciados e um estudo genômico comparativo de linhagens de *E. coli* isoladas de pacientes com DC revelou que essas linhagens representam uma população heterogênea com um perfil genômico semelhante a linhagens de *E. coli* patogênicas extraintestinais (ExPEC) (Clarke *et al.*, 2011; Krause *et al.*, 2010; Miquel *et al.*, 2010; Nash *et al.*, 2010; Vejborg *et al.*, 2011). Todos estes resultados

demonstram claramente que uma única linhagem não é encontrada em pacientes com DC, entretanto, alguns genótipos particulares são mais frequentemente associados às lesões ileais da doença (Baumgart *et al.*, 2007; Masseret *et al.*, 2001).

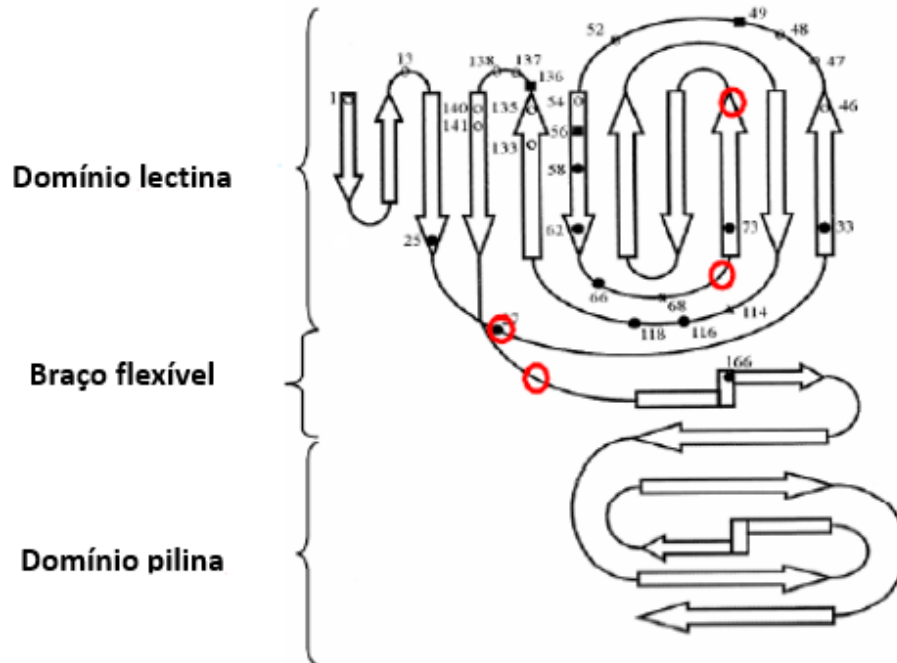
Curiosamente, a maioria dessas linhagens AIEC pertencem ao grupo filogenético B2, grupo em que se encontra a maioria das *E. coli* patogênicas. Avaliando-se a linhagem LF82, o sequenciamento mostrou que o seu genoma evoluiu à partir de linhagens ExPEC pertencentes ao grupo filogenético B2 com a aquisição de genes ou grupos de genes de *Salmonella* e *Yersinia*. Com base no estudo de genes que não são comuns em todos os genomas sequenciados de *E. coli* e dos polimorfismos de base única (SNP), a linhagem LF82 é filogeneticamente próxima da *E. coli* patogênica aviária (linhagem APEC-01), de *E. coli* associada à meningitis (linhagem MNEC S88) como também de *E. coli* uropatogênica (UPEC UTI89) (Miquel *et al.*, 2010).

#### 1.2.4.2 Mecanismos de patogenicidade da AIEC LF82

A adesão às células epiteliais intestinais é em parte mediada pelo pili do tipo 1, o qual interage com a glicoproteína CEACAM6 (molécula de adesão 6 relacionada ao antígeno carcino-embriônico) (Barnich *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2009). A expressão anormal do CEACAM6 na mucosa ileal de pacientes com DC resulta em uma colonização do epitélio intestinal desses pacientes por bactérias AIEC, através do reconhecimento entre os resíduos de manose do receptor CEACAM6 e as variantes do pili tipo 1 expressas pelas AIEC (Dreux *et al.*, 2013). A causa de uma expressão anormal do CEACAM6 em pacientes com DC não é claramente definida; entretanto, estudos *in vitro* mostraram que o receptor poderia ser altamente expresso em células epiteliais intestinais devido à uma estimulação por citocinas pró-inflamatórias (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ), além de pela própria infecção pelas AIEC. Dessa forma as linhagens AIEC seriam capazes de promover a sua colonização induzindo uma expressão anormal do CEACAM6 na superfície das células hospedeiras (Abraham & Cho, 2009; Barnich *et al.*, 2007).

O pili do tipo 1 desempenha um papel-chave na invasão das células epiteliais pela linhagem LF82, induzindo a formação de projeções membranares na superfície das células alvo, contribuindo dessa forma para a sua internalização. O sequenciamento dos genes do operon *fim* da LF82 mostraram variações estruturais em várias subunidades, em especial na adesina FimH (**Figura 5**), em comparação com a da linhagem *E. coli* K12 não patogênica,

indicando que a LF82 sintetiza variantes do pili tipo 1 (Boudeau *et al.*, 2001), permitindo uma eficiente ligação às células epiteliais intestinais (Dreux *et al.*, 2013).



5

**Figura 5:** Estrutura da subunidade FimH, adesina que compõe o pili do tipo 1. Essa subunidade é constituída de um domínio pilina, que permite uma ancoragem ao pili, um domínio lectina, responsável pelo reconhecimento dos resíduos de manose e um braço flexível que liga os dois domínios. Em vermelho estão marcados as mutações presentes na linhagem AIEC LF82 : V27A, N70S, S78N e T158P (Schembri *et al.*, 2000 modificada).

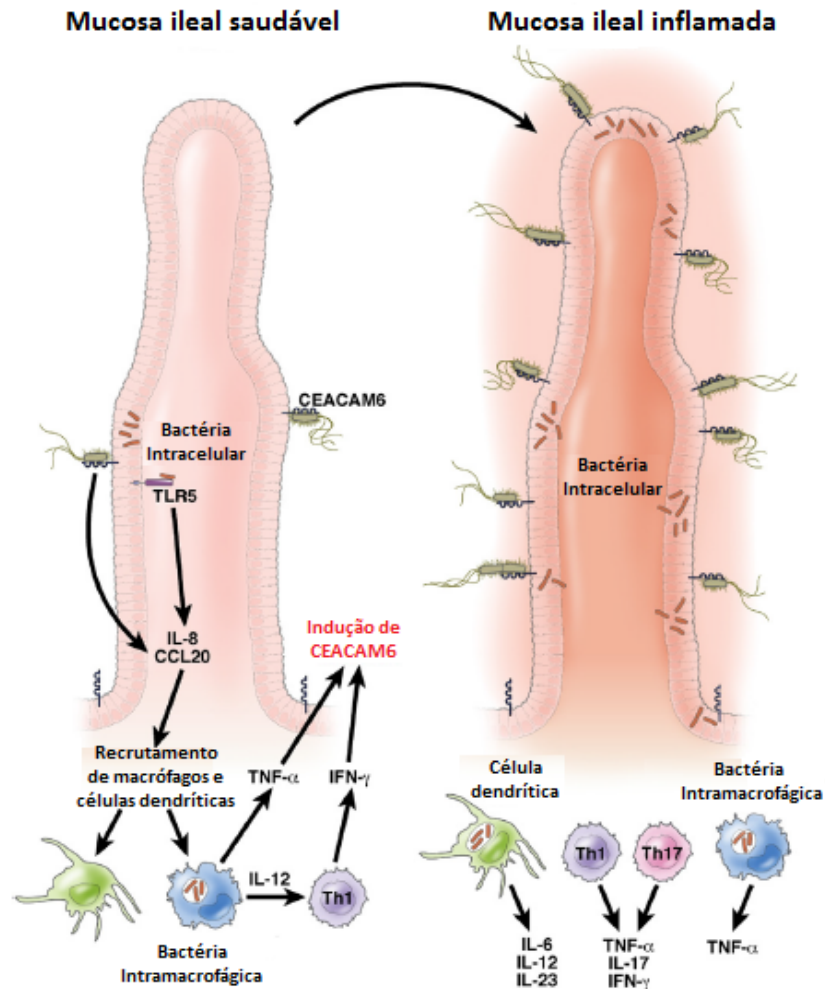
10

Os flagelos são também importantes para a adesão e invasão às células epiteliais intestinais. Uma vez acessado a membrana basolateral, as AIEC induzem a secreção de IL-8 e CCL20 via interação da flagelina com o receptor TLR5 (*toll-like receptor 5*), levando ao recrutamento de macrófagos e células dendríticas (Eaves-Pyles *et al.*, 2008; Subramanian *et al.*, 2008). Após fagocitose pelos macrófagos e células dendríticas, as AIEC intracelulares se replicam nos vacúolos, induzindo a produção de TNF- $\alpha$  e IL-12, que ativam as células Th1 a produzir IFN- $\gamma$ . Na mucosa inflamada, a expressão de CEACAM6 é aumentada em resposta à estimulação por TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  e infecção das células por AIEC, criando um aumento da colonização e da inflamação, que levam à uma cronicidade da doença, com secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-12, IL-23 e IL-17 (**Figura 6**) (Chassaing & Darfeuille-Michaud, 2011). Esses dados foram confirmados *in vivo* por Carvalho e colaboradores (2009): animais transgênicos CEABAC10, que expressam CEACAMs humanos, desenvolvem uma

15

20

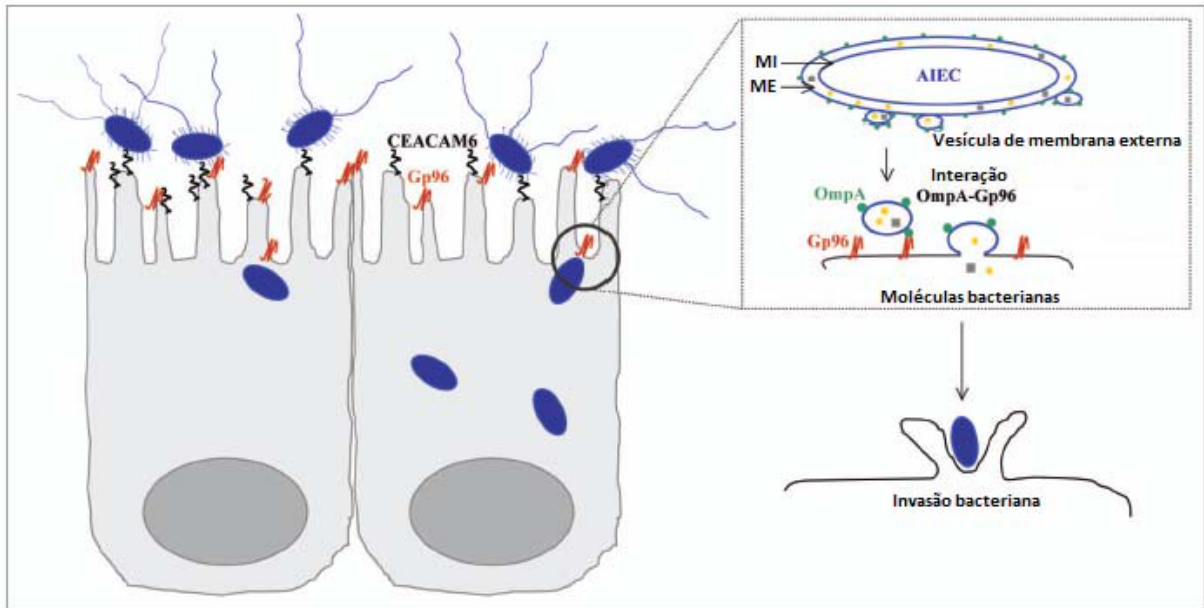
colite grave quando infectados pela AIEC LF82, mas não desenvolvem colite quando infectados com uma linhagem não patogênica de *E. coli*.



5 **Figura 6:** Mecanismos de patogenicidade das AIEC: inflamação da mucosa ileal de pacientes com DC (Chassaing & Darfeuille-Michaud, 2011 modificada).

Vesículas de membrana externa contendo a proteína OmpA desempenham um papel na invasão das células epiteliais intestinais pela LF82. A glicoproteína Gp96 de resposta ao estresse no retículo endoplasmático, que é expressa anormalmente na superfície apical das células epiteliais da mucosa ileal de pacientes com DC, age como receptor da célula hospedeira para OmpA, promovendo a invasão das células epiteliais pelas AIEC (**Figura 7**). As vesículas de membrana externa se fundem com as células hospedeiras e acredita-se que a liberação de algumas moléculas bacterianas, que ainda permanecem indefinidas, estão envolvidas na polimerização de actina e recrutamento de microtúbulos que ocorre durante a invasão celular (Rolhion *et al.*, 2010).





**Figura 7:** O envolvimento do receptor Gp96 no processo invasivo das linhagens AIEC associadas a mucosa ileal de pacientes com DC (Rolhion *et al.*, 2010 modificada).

- 5 Além da capacidade de adesão e invasão, a LF82 é também capaz de se translocar através das células M, localizadas nas placas de Peyer (PP), ganhando assim acesso à lâmina própria. Essa interação é mediada pelo pili do tipo 1 e por uma fimbria polar longa (LPF), podendo interagir de forma independente com GP2. Sabe-se que os locais iniciais de inflamação em pacientes com DC são as PP e folículos linfóides da região do cólon. Assim,
- 10 este mecanismo de translocação realizado pelas AIEC é consistente com os sinais clínicos iniciais da doença (Chassaing *et al.*, 2011).

## 2.0 JUSTIFICATIVA

A DC é uma afecção caracterizada por uma inflamação intestinal crônica, de caráter recorrente, que pode acometer potencialmente qualquer sítio do trato digestivo. Embora sua etiologia seja ainda desconhecida, uma resposta inflamatória anormal direcionada contra a microbiota intestinal, em um hospedeiro geneticamente susceptível, tem sido proposta. A doença afeta preferencialmente o adulto jovem e é um importante problema de saúde pública devido à sua natureza crônica e recorrente. Dados epidemiológicos revelam que a incidência da DC vem aumentando em nível mundial, sobretudo nos países desenvolvidos, acompanhada paralelamente por mudanças nos padrões alimentares das sociedades atuais.

Vários estudos independentes realizados na Europa e EUA demonstraram que a mucosa ileal de pacientes com DC é anormalmente colonizada por linhagens de *E. coli* com propriedades aderentes e invasivas (AIEC). As principais características desse novo patotipo de *E. coli* são sua capacidade de aderir e invadir as células epiteliais intestinais, além da sua habilidade de sobreviver e replicar-se dentro de células macrofágicas, secretando níveis elevados de TNF- $\alpha$ .

No Brasil, até o presente momento, não há trabalhos experimentais que demonstrem o isolamento dessas AIEC associadas à mucosa ileal de pacientes com DC. Dessa forma, o objetivo inicial desse estudo foi isolar e caracterizar possíveis linhagens de *E. coli* com propriedades aderentes e invasivas, associadas à mucosa de pacientes com DC no Brasil. Vale ressaltar que com a realização desse estudo, juntamente com outros futuros trabalhos, será possível analisar se na América do Sul, em especial no Brasil, agentes infecciosos também estariam envolvidos na etiologia da DC, assim como foi apontado em outros países.

### 3.0 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

- 5            Isolar e caracterizar possíveis linhagens de AIEC associadas à mucosa ileal de pacientes com DC.

#### 3.2 Objetivos específicos

- 10    **3.2.1** Coletar biópsias de pacientes com DC e isolar linhagens de *E. coli*.

**3.2.2** Caracterizar os principais grupos filogenéticos das linhagens de *E. coli* isoladas.

- 15    **3.2.3** Caracterizar possíveis linhagens AIEC, avaliando o perfil de invasão em cultura de células epiteliais, sobrevivência em cultura de células macrofágicas e indução da produção de TNF- $\alpha$ .

**3.2.4** Caracterizar as linhagens AIEC isoladas, verificando a presença de possíveis fatores de virulência e também de polimorfismos na proteína FimH.

20

## 4.0 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Isolamento, identificação e caracterização de possíveis linhagens de AIEC isoladas da mucosa ileal de pacientes com a doença de Crohn

5

#### 4.1.1 Pacientes e colheita de biópsias

Os pacientes foram selecionados a partir da clientela assistida no Ambulatório de Intestino do Instituto Alfa de Gastroenterologia, do Hospital das Clínicas da UFMG, onde foram submetidos à colonoscopia para esclarecimento dos sintomas relacionados ao trato gastrointestinal. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (sob o parecer nº CAAE – 00836712.4.0000.5149) (**Anexo A**). Após os pacientes serem informados a respeito dos objetivos da pesquisa, bem como dos riscos inerentes associados à colonoscopia, todos assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (**Anexo B**). Não foram incluídos pacientes em uso de antimicrobianos nas duas semanas anteriores à realização do exame.

Foram coletadas oito biópsias da mucosa ileal saudável de 24 pacientes com diagnóstico prévio de DC, baseado em critérios clínicos, laboratoriais, endoscópicos, radiológicos e histopatológicos. Para se avaliar o comportamento e localização da DC, adotou-se a classificação de Montreal (Silverberg *et al.*, 2005) proposta no Congresso Mundial de Gastroenterologia em Montreal (**Tabela 1**). Oito biópsias de pacientes controles, sem nenhuma DII associada, também foram coletadas, sendo estes pacientes submetidos à colonoscopia para a realização de screening de tumor. Dados clínicos foram obtidos de cada paciente pela aplicação de um questionário.

#### 4.1.2 Isolamento e identificação de *E. coli*

Para as culturas bacterianas, as biópsias foram mantidas, imediatamente após a colheita, em banho de gelo à temperatura de 4°C por no máximo uma hora, até serem processadas e semeadas em placas de Petri contendo ágar MacConkey (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA). Após incubação a 37°C por 18 horas, foram identificadas cinco colônias lactose-positivas e cinco colônias lactose-negativas de cada paciente (quando possível, de morfotipos diferentes), de acordo com testes bioquímicos realizados em meio de triagem TSI,

ágar citrato e meio Rugai (Pessoa & Silva, 1972). Após identificação, as linhagens de *E. coli* foram mantidas em caldo LB acrescido de glicerol a 30% em ultrafreezer a -80°C.

**Tabela 1:** Forma de apresentação clínica e localização da DC, de acordo com a Classificação de Montreal

Idade ao diagnóstico (A)	A1: 16 Anos ou menos
	A2: 17-40 anos
	A3: >40 anos
Localização (L)	L1: Íleo terminal
	L2: Cólon
	L3: Íleocólon
	L4: Trato GI superior
	L1 + L4: Íleo + TGI Superior
	L2 + L4: Cólon + TGI Superior
	L3 + L4: Íleocólon + TGI Superior
Comportamento (B)	B1: Não estenosante, não penetrante
	B2: Estenosante
	B3: Penetrante
	B1p: Não estenosante, não penetrante + fistula perianal
	B2p: Estenosante + fistula perianal
	B3p: penetrante + fistula perianal

5

#### 4.1.3 Extração de DNA

O DNA das amostras foi extraído por meio da preparação de lisados bacterianos. Resumidamente, um mL de cada cultura bacteriana foi centrifugado a 5000 rpm por cinco minutos. O sobrenadante foi descartado e, posteriormente, foram adicionados 200 µL de água milliQ a cada tubo. As amostras foram incubadas a 95°C por 10 minutos e, em seguida, centrifugadas sobre as mesmas condições descritas anteriormente. O sobrenadante foi recuperado e a concentração do DNA foi determinada por espectrofotometria. O DNA foi estocado a -20°C até o momento do uso.

15

#### 4.1.4 Caracterização dos grupos filogenéticos de *E. coli*

Os principais grupos filogenéticos de *E. coli* (A, B1, B2 e D) foram caracterizados por PCR, por meio da detecção dos genes *chuA* e *yjaA* e do fragmento de DNA TSPE4.C2, de

acordo com as metodologias descritas em literatura (**Tabela 2**). Apesar das mesmas condições das reações, uma PCR foi realizada separadamente para cada alvo.

**Tabela 2:** Sequência dos iniciadores e condições das PCR para detecção dos alvos *chuA*, *yjaA* e TSPE4.C2

Alvo	Sequência iniciadores (5' - 3')	Temperatura, tempo e ciclos da PCR	Produto PCR (pb)	Referência
<i>chuA</i>	F: GACGAACCAACGGTCAGGAT R: TGCCGCCAGTACCAAAGACA		279	
<i>yjaA</i>	F: TGAAGTGTCAGGAGACGCTG R: ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	94°C 5 min., 40 ciclos (94°C 5 s., 59°C 10 s, e 72°C 5 min.) e 72°C 5 min.	211	Clermont <i>et al.</i> , 2000
TSPE4.C2	F: GAGTAATGTCGGGGCATTCA R: CGCGCCAACAAAGTATTACG		152	

A PCR foi feita em um volume final de 25 µL contendo 20 a 100 ng da amostra de DNA, dois µL de tampão 10X [200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl], uma U de *Taq* DNA Polimerase (Euromedex), 0,5 µM de cada iniciador, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> e 200 µM de dNTP's (Invitrogen Life Technologies). A amostra LF82 da coleção do Laboratório M2iSH (genotipada como *chuA*, *yjaA* e TSPE4.C2 positiva) foi usada como controle positivo da reação. Para o controle negativo interno da reação foi usada água milliQ.

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio e analisado em transiluminador de luz ultravioleta.

As linhagens de *E. coli* foram previamente caracterizadas com base na presença ou ausência dos genes *chuA* e *yjaA* e do fragmento de DNA TSPE4.C2, sendo estas alocadas em quatro grupos filogenéticos: (A) amostras negativas para os três alvos ou positivas apenas para o gene *yjaA*; (B1) amostras positivas apenas para TSPE4.C2; (B2) amostras positivas para os três alvos ou apenas para os genes *chuA* e *yjaA*; (D) amostras positivas apenas para o gene *chuA* ou positivas para *chuA* e TSPE4.C2.

## 5 4.1.5 Pesquisa e caracterização de linhagens AIEC

### 4.1.5.1 Culturas celulares

A linhagem celular I-407 (células epiteliais intestinais de origem humana; ATCC, 10 CCL-6) foi cultivada em frascos de 75 cm<sup>2</sup>, a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de

CO<sub>2</sub>, em meio Eagle's Minimal Essential Medium modificado, EMEM, (Seromed, Biochrom KG, Berlim, Alemanha) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SVF; Lonza, Basel, Suíça), 1% de aminoácidos não essenciais, 1% de L-glutamina, 200 U/L de penicilina, 50 mg/mL de estreptomicina e 0,25 mg/L de anfotericina B com 1% de vitaminas. O meio foi trocado a cada 48 horas e, após confluência de aproximadamente 80-90%, as células foram tripsinizadas com uma solução de 0,2% de tripsina (Sigma) contendo 0,5 mM de EDTA e, cultivadas em placas de 24 poços para os experimentos de infecção em meio EMEM completo, sem adição de antibióticos.

A linhagem celular THP-1 (linhagem monocítica de origem humana; ATCC, TIB-202) foi cultivada em frascos de 75 cm<sup>2</sup>, a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>, em meio RPMI, (Seromed, Biochrom KG, Berlim, Alemanha) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SVF; Lonza, Basel, Suíça) juntamente com 1% de L-glutamina. Para diferenciação celular, as células foram incubadas em meio RPMI na presença de 20 ng/mL de PMA, durante 18 horas, em placas de 24 poços para os experimentos de infecção.

#### 4.1.5.2 Linhagens bacterianas utilizadas

As linhagens bacterianas isoladas e identificadas como *E. coli* foram crescidas *overnight* em caldo Luria-Bertani (LB) a 37°C sem agitação, durante 18 horas. A linhagem AIEC LF82 (AmpR, EryR), isolada de uma lesão crônica de um paciente com DC (Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998), foi utilizada como linhagem padrão e a linhagem K12 C600, não patogênica, foi utilizada como controle negativo. A densidade ótica (DO) foi mensurada a 620 nm. Uma DO=1 corresponde a uma concentração de 1,6 x 10<sup>9</sup> bactérias/mL.

#### 4.1.5.3 Ensaios de invasão bacteriana em cultura de células intestinais I-407

A invasão bacteriana em células I-407 foi quantificada usando o método de diluição em placa, conforme descrito por Boudeau *et al.*, (1999). Poços com 2x10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup> foram preparados a partir das culturas celulares I-407. Após 24 horas, a monocamada foi lavada uma vez com PBS e, em seguida, um mL de meio EMEM completo (sem antibióticos e com 10% de soro fetal bovino) foi adicionado a cada poço. As células foram infectadas com MOI 10 (10 bactérias por célula) por poço e, em seguida, foram incubadas a 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após três horas de infecção, as células foram novamente lavadas com PBS e em seguida incubadas por uma hora, sob as mesmas condições, em meio EMEM completo

contendo 100 µg/mL de gentamicina. A seguir, as monocamadas foram lavadas com PBS e as células foram lisadas utilizando-se 500 µl de Triton 1X. Os lisados foram então diluídos em água deionizada e em seguida plaqueados em meio LB ágar, sendo as placas incubadas por 18 horas a 37°C. A porcentagem de invasão celular foi calculada do seguinte modo:

5

Porcentagem de invasão = número de UFC x 100/quantidade total de bactérias inoculadas

#### 4.1.5.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

10

Para avaliar a capacidade de invasão bacteriana, as células I-407 foram infectadas por linhagens de *E. coli* previamente selecionadas e após três horas de infecção, as células foram fixadas em glutaraldeído à temperatura ambiente por uma hora e enviadas ao Centro de Microscopia (CICS, UdA) para fotografia em microscopia eletrônica de varredura utilizando-se técnica padrão (Arnold & Boor, 1986). As amostras foram fotografadas e retornadas para

15

#### 4.1.5.5 Ensaios de sobrevivência e multiplicação bacteriana em macrófagos humanos THP-1

20

Os ensaios de sobrevivência e multiplicação bacteriana em linhagem macrofágica humana THP-1 foram mensurados de acordo com o teste de proteção pela gentamicina (Bringer *et al.*, 2005). Resumidamente, poços com  $2,5 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> foram preparados a partir das culturas THP-1. Após 24 horas, as células foram infectadas a uma MOI de 25 bactérias por célula durante 20 minutos. As células infectadas foram, então, lavadas com PBS e, em seguida, incubadas em meio RPMI contendo 50 µg/mL de gentamicina durante 40 minutos (uma hora de infecção) ou 24 horas (24 horas de infecção). Após o tempo de infecção, as monocamadas foram lavadas com PBS e as células foram lisadas utilizando-se

25

30

Porcentagem de sobrevivência e multiplicação intracelular =

(número de UFC após 24 horas de infecção/número de UFC após 1 hora de infecção) x 100



#### 4.1.5.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para avaliar a capacidade de sobrevivência e multiplicação bacteriana, as células THP-1 foram infectadas por linhagens de *E. coli* previamente selecionadas e, após 24 horas de infecção, fixadas em glutaraldeído a temperatura ambiente por uma hora e enviadas ao Centro de Microscopia (CICS, Uda) para fotografia em microscopia eletrônica de varredura utilizando-se técnica padrão (Arnold & Boor, 1986). As amostras foram fotografadas e retornadas para posterior análise.

#### 10 4.1.5.7 Dosagem de TNF- $\alpha$

Após infecção das células THP-1 com linhagens de *E. coli* selecionadas, durante 24 horas, o sobrenadante foi recuperado, centrifugado por 10 min, a 10.000 g, a 4°C, e a citocina foi dosada, pelo método ELISA, no sobrenadante da cultura. Resumidamente, uma placa de 15 96 poços foi sensibilizada com o anticorpo de captura (50  $\mu$ L por poço) e em seguida incubada a 4°C *overnight*. No dia seguinte a placa foi lavada quatro vezes com o tampão de lavagem e posteriormente adicionou-se 300  $\mu$ L do reagente diluente para se efetuar o bloqueio de sítios inespecíficos de ligação na placa. Após uma hora, 50  $\mu$ L dos padrões e das amostras foram adicionados a cada poço da placa de microtitulação que foi incubada por duas 20 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, a placa foi lavada quatro vezes com o tampão de lavagem e 50  $\mu$ L do conjugado (“anti-TNF- $\alpha$ ”, com biotina) foram adicionados a cada poço da placa que foi incubada por duas horas à temperatura ambiente. A seguir a placa foi lavada quatro vezes com o tampão de lavagem e 50  $\mu$ L de estreptoavidina-peroxidase foram acrescentados a cada poço da placa. Após 20 minutos de incubação à temperatura ambiente e 25 um novo ciclo de lavagem, 100  $\mu$ L da solução do substrato contendo tetrametilbenzidina foram acrescentados a cada poço da placa, que foi incubada por 20 minutos à temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de 50  $\mu$ L da solução de parada. A leitura da DO foi feita em leitor de ELISA (Sunrise, Salzburg, Áustria) com filtro de 450 nm, imediatamente depois do término da reação. As concentrações de TNF- $\alpha$  foram determinadas 30 pela comparação dos valores de DO das amostras testadas com aqueles de uma curva padrão construída a partir de concentrações diferentes das amostras padrão.

#### 4.1.5.8 Detecção dos genes *hcp1*, *hcp3*, *lpfA* e *gipA*

Os genes *hcp1*, *hcp3*, *lpfA* e *gipA*, principais genes estudados na linhagem LF82, foram pesquisados por PCR, de acordo com as metodologias descritas em literatura e determinadas neste estudo (**Tabela 3**).

**Tabela 3:** Sequência dos iniciadores e condições das PCR para detecção dos genes *hcp1*, *hcp3*, *lpfA* e *gipA*

Alvo	Sequência iniciadores (5' - 3')	Temperatura, tempo e ciclos da PCR	Produto PCR (pb)	Referência
<i>hcp1</i>	F: AAACACCACTGGAGTACCTG R: TGGTACTTAGCAAGAAAGAGC	95°C 3 min., 35 ciclos (95°C 45 s., 55°C 30 s, e 72°C 45 s.) e 68°C 8 min.	999	Esse estudo
<i>hcp3</i>	F: CGAAATCAGTCTTGTTCCGC R: GGGTTTCCTTATCGTGTCT	95°C 3 min., 35 ciclos (95°C 45 s., 55°C 30 s, e 72°C 45 s.) e 68°C 8 min.	745	Esse estudo
<i>lpfA</i>	F: GGCCTTCTTTCAGACGGTA R: CTGGAAAACGCGATATCTCC	95°C 3 min., 35 ciclos (95°C 45 s., 57°C 30 s, e 72°C 45 s.) e 68°C 8 min.	199	Chassaing <i>et al.</i> , 2011
<i>gipA</i>	F: GTCGTTGCGCCACCAACAA R: ACGGCGCAGATGGTAATTCT	94°C 5 min., 35 ciclos (94°C 1 m., 55°C 1 m, e 72°C 30 s.) e 72°C 10 min.	200	Vazeille <i>et al.</i> , 2016

A PCR foi realizada em um volume final de 25 µL contendo 20 a 100 ng da amostra de DNA, dois µL de tampão 10X [200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl], uma U de *Taq* DNA Polimerase (Euromedex), 0,5 µM de cada iniciador, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> e 200 µM de dNTP's (Invitrogen Life Technologies). A amostra LF82 foi usada como controle positivo da reação. Para o controle negativo interno da reação foi usada água destilada.

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio e analisado em transiluminador de luz ultravioleta.

#### 4.1.5.9 Sequenciamento de *fimH*

Para o sequenciamento do gene *fimH* um par de iniciadores foi desenhado com base em regiões gênicas conservadas, identificadas nas sequências de *E. coli* depositadas no GenBank: K-12 MG1655 (NC000913.3), LF82 (AF288194.1), UPEC (NC004431) e APEC 01 (NC008563). A sequência dos iniciadores e as condições das reações estão descritas na **Tabela 4**.

**Tabela 4:** Sequência dos iniciadores e condições das PCR para detecção do gene *fimH*

Alvo	Sequência iniciadores (5'-3')	Temperatura, tempo e ciclos da PCR	Produto PCR (pb)	Referência
<i>fimH</i>	F: ATTCCTCACAATCAGCGCAC R: CGCGTCTTATCTGGCCTACA	95°C 3 min., 35 ciclos (95°C 45 s., 57°C 30 s, e 72°C 45 s.) e 68°C 8 min.	1125	Esse estudo

A PCR foi feita em um volume final de 50 µL contendo 20 a 100 ng da amostra de DNA, cinco µL de tampão 10X [200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl], duas U de *Taq* DNA Polimerase Platinum® (Invitrogen Life Technologies), um µM de cada iniciador, 50 mM MgSO<sub>4</sub> e 10 mM de dNTP's (Invitrogen Life Technologies). A amostra LF82 foi usada como controle positivo da reação. Para o controle negativo interno da reação foi usada água destilada.

Cinco µL dos produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio e analisado em transiluminador de luz ultravioleta.

Os fragmentos obtidos foram purificados separadamente com o kit de purificação Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. O produto amplificado foi adicionado em igual volume à solução de ligação de membrana. A mistura foi transferida para mini colunas SV, fornecidas pelo kit, que foram inseridas em tubos coletores de dois mL, incubadas e centrifugadas a 10.000 g por um minuto cada. A seguir, a mini coluna foi lavada com 700 µL da solução de lavagem e centrifugada a 10.000 g por um minuto. O procedimento foi repetido com 500 µL da solução de lavagem e em seguida a mini coluna foi centrifugada por cinco minutos. O tubo coletor foi desprezado e a mini coluna transferida para um tubo de 1,5 mL. Cinquenta µL de água livre de nucleases foram adicionados diretamente no centro da coluna que foi incubada por cinco minutos e, a seguir, centrifugada a 10.000 g por um minuto.

Os produtos purificados foram diretamente sequenciados (ambas as fitas: *forward* e *reverse*) com o kit de reação ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) de acordo com as especificações do fabricante e com os iniciadores descritos na **Tabela 4**, em um sequenciador automático de DNA (ABI PRISM 3130, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

As sequências dos fragmentos foram editadas usando o programa CAP3 Sequence Assembly Program (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>) para a formação de um “contig”

correspondente à sequência completa do gene *fimH*. Posteriormente, a homologia das sequências foi analisada com o programa BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) e em seguida alinhadas com as sequências do genoma das amostras LF82 e K-12 MG1655 com o programa Multalin Interface Page (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin>). As sequências foram transformadas em aminoácidos com a ajuda do programa Expasy Translate Tool (<http://ca.expasy.org/tools/dna.html>).

## 4.2 Análise estatística

O significado estatístico dos resultados obtidos foram avaliados utilizando o software GraphPad Prism versão 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA), com a utilização do ANOVA. Em caso de distribuição assimétrica os resultados foram analisados por teste Mann Whitney e teste Kruskal-Wallis ajustado por teste de Dunns. Os resultados com  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## 5.0 RESULTADOS

### 5.1 População

5 As características dos pacientes, dos quais as amostras de *E. coli* foram isoladas encontram-se na **Tabela 5**. O número amostral desse estudo foi pequeno devido as dificuldades em se obter amostras de pacientes com DC, além do tempo reduzido para a realização da colheita das biópsias (março de 2012 a agosto de 2013).

10 **Tabela 5:** Características dos pacientes

Pacientes	N	Sexo F/M	Idade (anos)	
			Média ± DP	Faixa etária
Controle	11	6/5	57,1 ± 13,4	28 - 81
DC	24	16/8	42,3 ± 12,0	18 - 66
<b>Total</b>	35	22/13	46,1 ± 12,9	18 - 81

N, número; F, feminino; M, masculino; DP, desvio padrão.

15 De acordo com a idade, ao diagnóstico de DC, segundo a classificação de Montreal (Silverberg *et al.*, 2005), dois pacientes (8,33%) tinham idade igual ou inferior a 16 anos ao diagnóstico (A1), em 17 (70,83%) a idade estava entre 17 e 40 anos (A2) e cinco (20,83%) tinham mais de 40 anos (A3) (**Tabela 6**).

**Tabela 6:** Distribuição dos pacientes de acordo com a idade ao diagnóstico de DC, segundo a classificação de Montreal

Idade ao Diagnóstico (A)	n (%)
A1: 16 Anos ou menos	2 (8,33%)
A2: 17-40 anos	17 (70,83%)
A3: >40 anos	5 (20,83%)

20

Quanto à localização da doença, houve predomínio do acometimento íleo-colônico, presente em 14 pacientes (58,33%), seguido por acometimento ileal (37,5%) e cólon (4,16%) (**Tabela 7**). Não houve acometimento de outras formas da doença.

**Tabela 7:** Distribuição dos pacientes de acordo com a localização da doença, segundo a classificação de Montreal

Localização (L)	n (%)
L1: Íleo terminal	9 (37,5%)
L2: Cólon	1 (4,16%)
L3: Íleocólon	14 (58,33%)

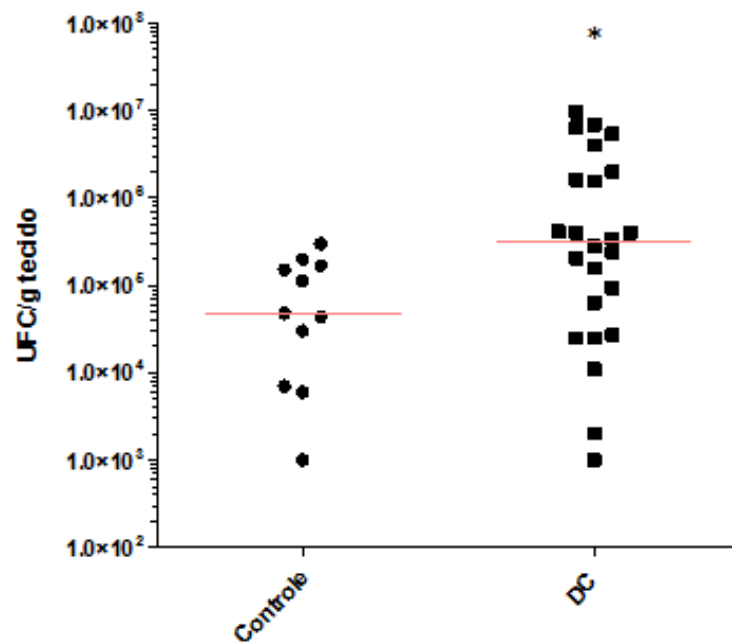
Em relação ao comportamento da doença, houve predomínio das formas estenosante (33,33%), seguido da forma penetrante (25,00%) e não estenosante, não penetrante (20,83%). A presença de fistula perianal foi observada em cinco pacientes, distribuídos uniformemente nos grupos (**Tabela 8**).

**Tabela 8:** Distribuição dos pacientes de acordo com o comportamento da doença, segundo a classificação de Montreal

Comportamento (B)	n (%)
B1: Não estenosante, não penetrante	5 (20,83%)
B2: Estenosante	8 (33,33%)
B3: Penetrante	6 (25,00%)
B1p: Não estenosante, não penetrante + fistula perianal	1 (4,16%)
B2p: Estenosante + fistula perianal	2 (8,33%)
B3p: penetrante + fistula perianal	2 (8,33%)

## 5.2 Colonização da mucosa ileal

A análise quantitativa das enterobactérias cultiváveis associadas à mucosa ileal mostrou uma taxa de colonização de  $10^3$  a  $10^5$  no grupo controle e de  $10^3$  a  $10^7$  em pacientes DC. A colonização da mucosa ileal em pacientes DC foi significativamente maior em relação aos controles ( $p = 0,0252$ ) (**Figura 8**).



**Figura 8:** Colonização da mucosa ileal por enterobactérias cultiváveis. Em vermelho está representado o valor da mediana. A análise estatística realizada foi “*t*” de Student seguido do teste Mann Whitney, sendo \*  $p < 0,05$ .

### 5 5.3 Detecção dos grupos filogenéticos das linhagens de *E. coli*

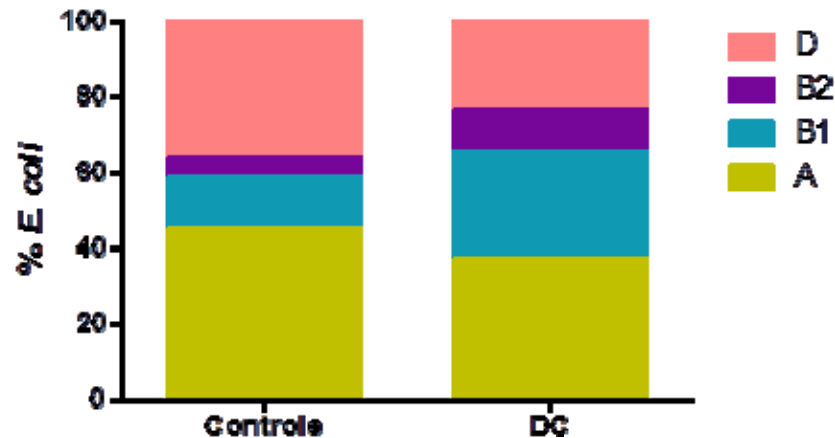
Dos 35 pacientes avaliados (11 controles e 24 DC), 270 colônias bacterianas foram isoladas e caracterizadas, das quais 241 (58 no grupo controle e 183 em pacientes DC) foram identificadas como linhagens de *E. coli* de acordo com testes bioquímicos realizados para a identificação de enterobactérias. Os principais grupos filogenéticos de *E. coli* (A, B1, B2 e D) foram determinados em todas as 241 linhagens. Não houve diferença significativa entre a distribuição dos grupos filogenéticos entre as linhagens de *E. coli* do grupo controle e pacientes DC ( $p = 0,3797$ ) (Tabela 9).

15 **Tabela 9:** Distribuição dos filogrupos das linhagens de *E. coli* em relação aos grupos de pacientes n (%)

Pacientes	Total de linhagens	Filogrupos <sup>#</sup>			
		A	B1	B2	D
Controle	58	26 (44,83)	8 (13,79)	3 (5,17)	21 (36,21)
DC	183	68 (37,16)	51(27,87)	21 (11,48)	43 (23,50)

<sup>#</sup>A análise estatística foi realizada usando o teste de Kruskal-Wallis ajustado pelo teste de Dunn.

No grupo controle, a grande maioria das linhagens de *E. coli* pertenceram ao filogrupos A (44,83%) e D (36,21%). Em pacientes com DC, a grande maioria das linhagens pertenceram aos filogrupos A (37,16%) e B1 (27,87%). Comparando-se os dois grupos, foi possível observar que as porcentagens de linhagens pertencentes aos filogrupos B1 e B2 foram duas vezes maiores em pacientes DC que em relação ao grupo controle (**Figura 9**).



**Figura 9:** Classificação dos grupos filogenéticos entre as linhagens de *E. coli* isoladas

## 5.4 Pesquisa de linhagens AIEC

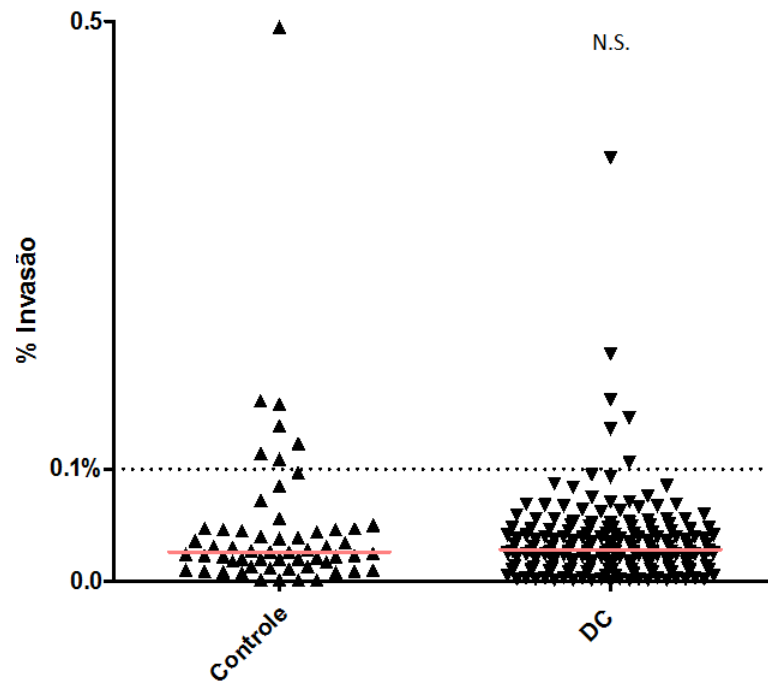
10

### 5.4.1 Invasão bacteriana em cultura de células intestinais humanas I-407

A capacidade de invasão à cultura de células intestinais humanas I-407 foi investigada em todas as 241 linhagens de *E. coli*. Para a realização dos testes, as linhagens K12 C600 e LF82 foram utilizadas como controles negativo e positivo, respectivamente. Todas as linhagens foram avaliadas em três experimentos independentes e a média dos resultados foi analisada. Resultados iguais ou maiores que 0,1% classificaram as linhagens como invasivas às células I-407. Das 241 linhagens isoladas, 13 (5,4%) foram consideradas invasivas às culturas de células epiteliais, sendo sete linhagens no grupo controle e seis em DC (**Figura 10**). Não houve uma diferença significativa entre o perfil de invasão celular das linhagens isoladas da mucosa de pacientes do grupo controle e DC ( $p = 0,9225$ ).

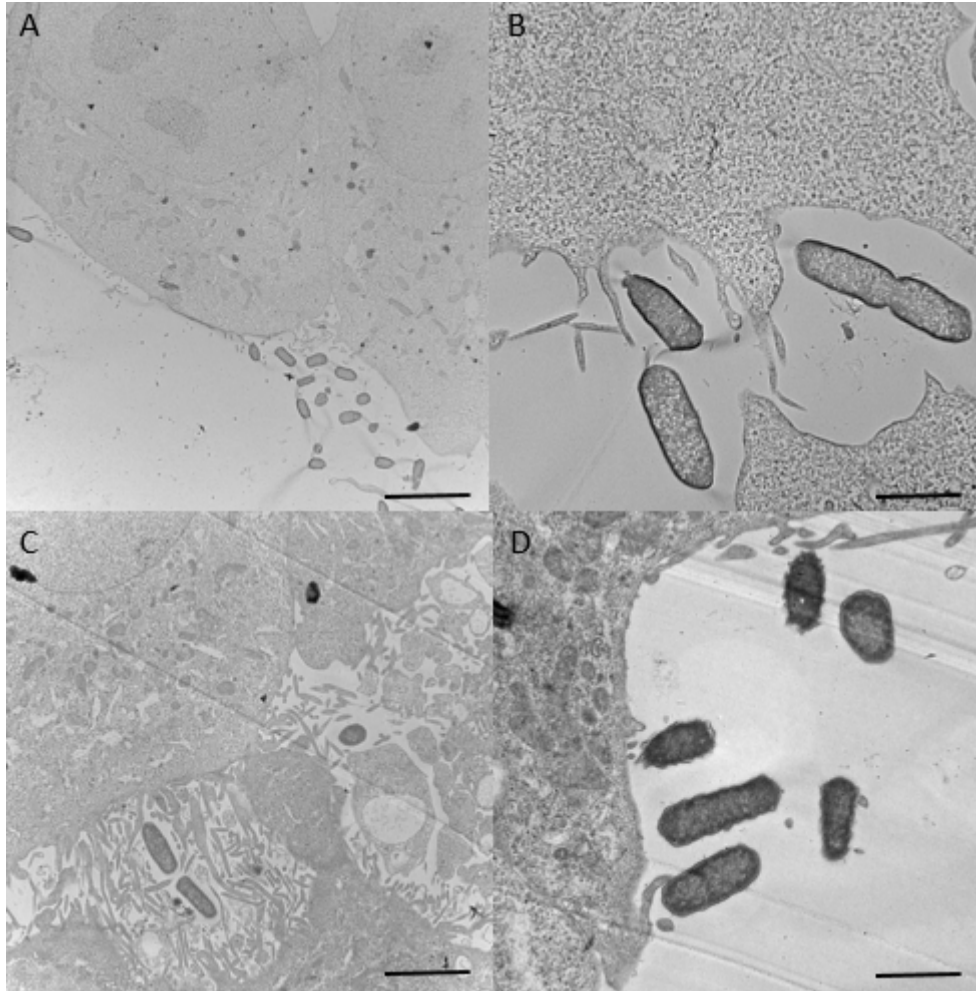
20





**Figura 10:** Porcentagem de invasão das linhagens de *E. coli* em cultura de células intestinais humanas I-407. Todas as amostras que apresentam resultados iguais ou superiores à 0.1% foram classificadas como invasivas às células I-407. Em vermelho está representado o valor da mediana. A análise estatística realizada foi “*t*” de Student seguido do teste Mann Whitney, sendo N.S.  $p > 0,05$ .

A linhagem LF82 tem a capacidade de invadir diferentes culturas celulares tais como, Caco2, HEp2, HCT8 e I-407, sendo que em células I-407 sua porcentagem média de invasão é em torno de 4,7% (Boudeau *et al.*, 1999). No presente trabalho, observou-se que nenhuma linhagem de *E. coli* apresentou o mesmo perfil de invasão em cultura de células I-407 da LF82. Além disso, nenhuma linhagem apresentou porcentagem de invasão maior que 0,5%. Avaliando-se tanto os controles quanto os pacientes com DC, verificou-se que a maioria das linhagens de *E. coli*, 228 linhagens (94,6%), apresentaram valores inferiores à 0,1%, evidenciando que a maioria das linhagens isoladas nesse estudo não possuem habilidade para invadir as culturas de células I-407 (**Figura 11**), sendo esta característica essencial para a classificação do patotipo AIEC.



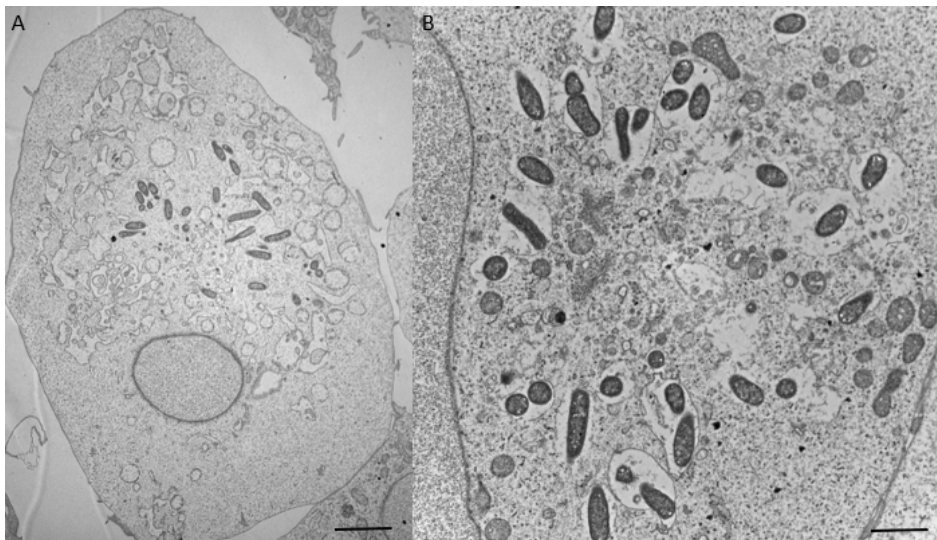
**Figura 11:** Microscopia eletrônica de varredura das células epiteliais I-407 infectadas por uma linhagem de *E. coli* isolada de paciente com DC. Não foi possível visualizar bactérias no interior das células epiteliais. A, Barra de escala: 10 nm; B, Barra de escala: 500 nm; C, Barra de escala: 2 nm; D, Barra de escala: 500 nm.

#### 5.4.2 Sobrevivência e multiplicação bacteriana em cultura de células THP-1

Todas as 13 linhagens consideradas invasivas em cultura de células I-407 foram utilizadas para os ensaios de sobrevivência e multiplicação em macrófagos humanos THP-1. As linhagens K12 C600 e LF82 foram utilizadas como controles negativo e positivo, respectivamente. Todas as linhagens foram avaliadas em três experimentos independentes e a média dos resultados foi analisada. Resultados iguais ou superiores a 100% indicaram que as linhagens foram capazes de sobreviver e se replicar em cultura de células THP-1 após 24 horas de infecção.

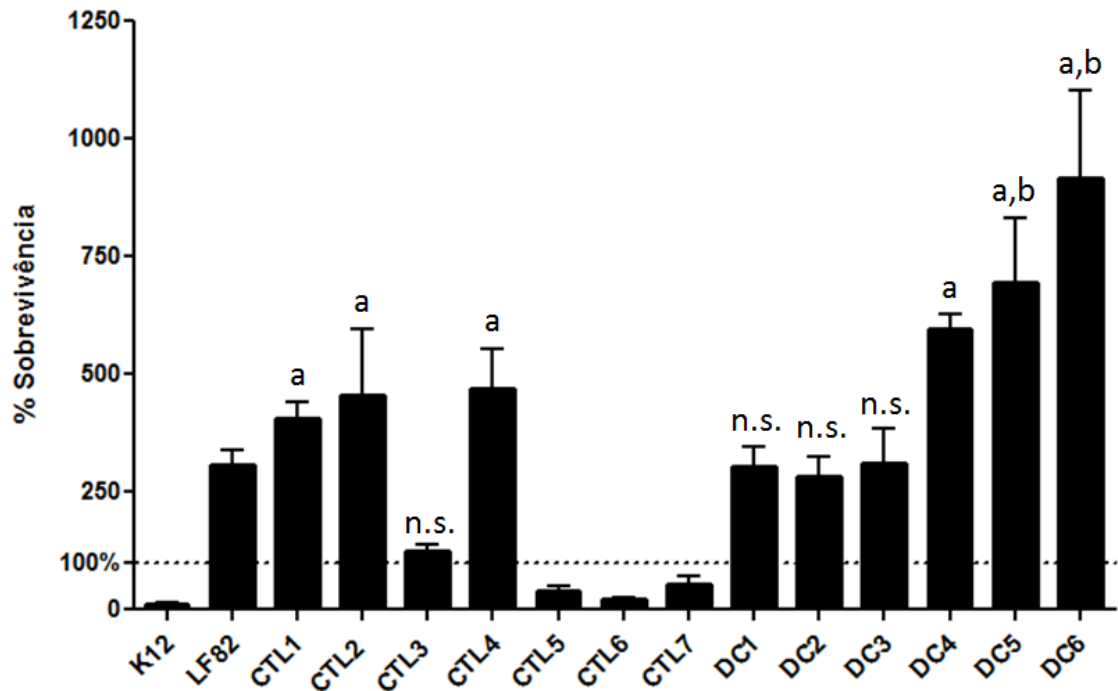
Das linhagens avaliadas nesse estudo, dez (quatro linhagens no grupo controle e 6 em pacientes DC) foram observadas como sendo capazes de sobreviver e se multiplicar no

interior das células macrofágicas (**Figura 12**). Por serem invasivas em cultura de células I-407, além de possuírem a capacidade de sobreviver e se replicar dentro de células THP-1, foi possível classificar essas dez linhagens como sendo AIEC. Anteriormente, foi referido que nenhuma das linhagem estudadas apresentou perfil de invasão celular como a linhagem LF82, entretanto, duas das dez linhagens AIEC isoladas de pacientes DC (amostras DC5 e DC6) apresentaram uma capacidade de sobrevivência significativa em células THP-1 quando comparadas à LF82 ( $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ , respectivamente) (**Figura 13**). Sabe-se que as linhagens AIEC diferem entre si e as mesmas podem não apresentar a mesma capacidade de invasão celular em células I-407 e sobrevivência em THP-1. Apesar da amostra CTL3 apresentar uma capacidade baixa de sobrevivência em células THP-1 (entretanto maior que 100%), a mesma foi classificada como sendo uma linhagem AIEC.



15

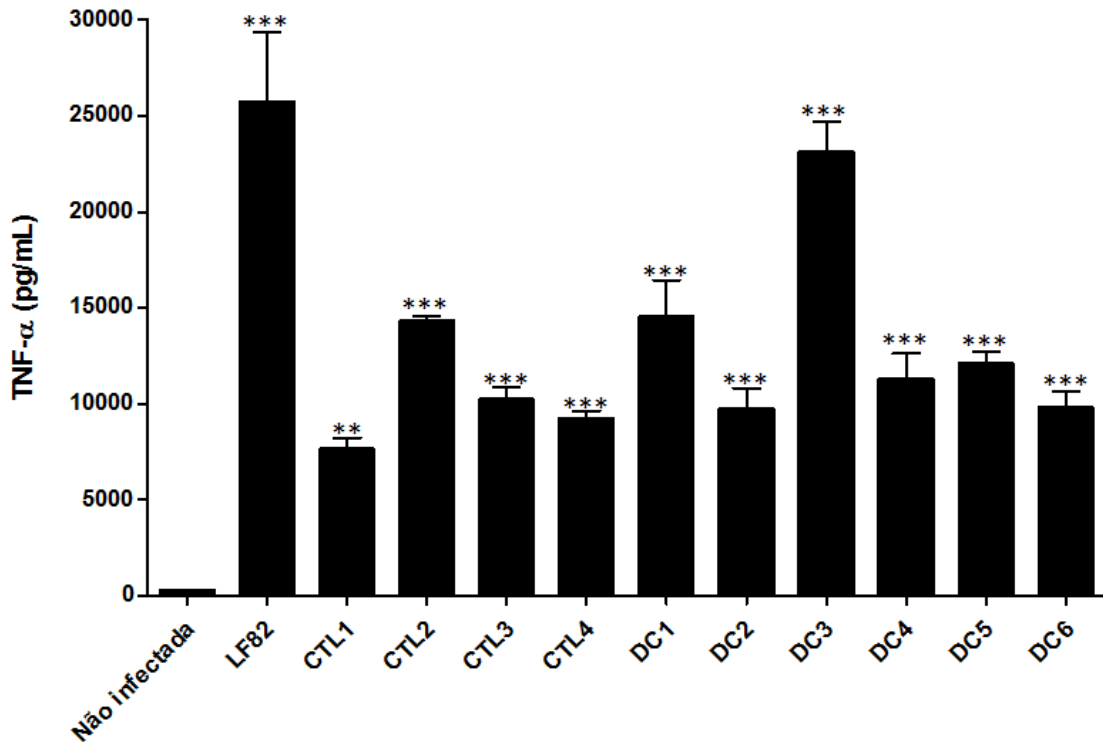
**Figura 12:** Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos humanos THP-1 infectados por uma linhagem de *E. coli* isolada de paciente DC. Em (A) e (B) é possível visualizar as bactérias dentro de vários vacúolos no interior da célula macrofágica. A, Escala de barra: 10 nm; B, Escala de barra: 2 nm.



**Figura 13:** Sobrevivência e multiplicação de linhagens de *E. coli* em cultura de células THP-1. Todas as amostras que apresentam resultados iguais ou superiores a 100% foram capazes de sobreviver e se replicar dentro de células macrofágicas após 24 horas de infecção. As linhagens K12 C600 e LF82 foram utilizadas como controles negativo e positivo, respectivamente. CTL, amostras pacientes controle; DC, amostras pacientes DC. (a) significativo em relação a linhagem K12, (b) significativo em relação a linhagem LF82. A análise estatística realizada foi ANOVA one-way seguido do teste Newman-Keuls, sendo n.s.  $p > 0,05$ .

#### 10 5.4.3 Níveis de TNF- $\alpha$ produzidos por células THP-1 infectadas por linhagens AIEC

A produção da citocina TNF- $\alpha$  foi mensurada em células THP-1 infectadas com as dez amostras de *E. coli* caracterizadas como linhagens AIEC. A linhagem LF82 foi utilizada como controle positivo. Os níveis de TNF- $\alpha$  foram significativamente maiores nas células infectadas com linhagens AIEC comparando-se às células não infectadas (**Figura 14**). Entre os grupos controle e DC não houve diferença significativa entre os níveis de TNF- $\alpha$ .



**Figura 14:** Níveis da citocina TNF- $\alpha$  produzidos pelas células THP-1 infectadas com linhagens AIEC. A linhagem LF82 foi utilizada como controle positivo. CTL, amostras pacientes controle; DR, amostras pacientes com DC. A análise estatística realizada foi ANOVA one-way seguido do teste Newman-Keuls, sendo \*\*  $p < 0,01$ ,  
5 \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 5.4.4 Associação entre o perfil AIEC e a presença de possíveis fatores de virulência

Os genes *hcp1*, *hcp3*, *lpfA* e *gipA* (possíveis fatores de virulência encontrados na  
10 linhagem LF82) foram analisados por PCR em todas as 10 linhagens caracterizadas como AIEC. Para todas as reações, a linhagem LF82 foi utilizada como controle positivo.

Os genes *hcp1* e *hcp3*, que representam dois tipos do sistema de secreção do tipo VI (T6SS), foram encontrados em duas linhagens AIEC isoladas do grupo controle. Relacionando-se a presença desses genes com o filogruppo dessas linhagens, foi possível  
15 observar que o T6SS foi encontrado em amostras dos grupos B2 e D. Esses resultados sugerem uma relação da presença do T6SS com a patogenicidade desses isolados, uma vez que linhagens pertencentes aos filogrupos B2 e D são caracterizadas como possivelmente patogênicas. Entretanto, nenhum outro gene de virulência foi encontrado nessas mesmas linhagens.

20 Avaliando-se o *lpfA*, gene responsável pela codificação da fimbria polar longa (LPF), apenas duas linhagens foram positivas para esse gene. Vale ressaltar que essas duas linhagens foram isoladas de um mesmo paciente DC e as mesmas foram caracterizadas como

pertencentes ao filogruppo B1. Sabe-se que a identificação do gene *lpfA* é de extrema importância para a caracterização do perfil patogênico das linhagens AIEC e que o mesmo é mais frequentemente encontrado em linhagens AIEC isoladas de pacientes DC do que no grupo controle. Vale ressaltar que esse gene não é comumente encontrado em linhagens de *E. coli* não patogênicas (Chassaing *et al.*, 2011).

O gene *gipA*, responsável pela codificação de uma transposase, não foi detectado em nenhuma linhagem AIEC isolada da mucosa ileal de pacientes brasileiros (**Tabela 10**). Alguns trabalhos têm destacado a importância do gene *gipA* na sobrevivência e multiplicação em PP como também em macrófagos entre linhagens de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Klumpp & Fuchs, 2007; Stanley *et al.*, 2000; Vazeille *et al.*, 2016).

**Tabela 10:** Análise da presença de possíveis fatores de virulência em linhagens AIEC isoladas

Linhagens	Filogruppo	<i>hcp1</i>	<i>hcp3</i>	<i>lpfA</i>	<i>gipA</i>
LF82	B2	+	+	+	+
CTL1	B2	-	+	-	-
CTL2	D	+	-	-	-
CTL3	B1	-	-	-	-
CTL4	A	-	-	-	-
DC1	B1	-	-	+	-
DC2	B1	-	-	+	-
DC3	B2	-	-	-	-
DC4	B1	-	-	-	-
DC5	B1	-	-	-	-
DC6	B1	-	-	-	-

#### 15 5.4.5 Pesquisa de polimorfismos em FimH

O gene *fimH* foi analisado nas dez linhagens AIEC isoladas neste estudo. Para comparação, o *fimH* das linhagens LF82 e K12 foram utilizados para o alinhamento das amostras. Entre as dez linhagens AIEC, 43 polimorfismos de base única (SNPs) foram identificados no gene *fimH*, resultando na substituição de oito aminoácidos na sequência proteica. Das dez linhagens AIEC, nove apresentaram pelo menos um polimorfismo proteico

e apenas a linhagem CTL2 (isolada do grupo controle), apresentou 100% de similaridade quando comparada à FimH da *E. coli* K12 (**Tabela 11**).

5 **Tabela 11:** Substituições nos resíduos de aminoácidos em FimH nas linhagens AIEC isoladas

Linhagens	Substituições nos resíduos de aminoácidos									
	Peptídeo sinal	Domínio lectina				Domínio pilina				
	6	26	27	66	70	78	119	158	202	269
<b>K12</b>	<b>T</b>	<b>P</b>	<b>V</b>	<b>G</b>	<b>N</b>	<b>S</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>A</b>	<b>Q</b>
LF82			A		S	N		P		
CTL1			A							K
CTL2										
CTL3	N		A				V			
CTL4			A	S					V	
DC1		L	A							
DC2		L	A							
DC3			A		H					
DC4			A							
DC5			A							
DC6			A							

10 A linhagem LF82 apresenta quatro substituições na sequência de aminoácidos da proteína FimH: V27A, N70S, S78N e T158P. Dentre essas, a substituição T158P é um polimorfismo característico das linhagens AIEC, de origem evolutivamente recente, o que representa uma mudança patoadaptativa típica dos patógenos bacterianos (Dreux *et al.*, 2013). Avaliando-se as linhagens isoladas neste trabalho, apenas a mutação V27A foi observada entre as mesmas. Assim como descrito por Dreux e colaboradores (2013), o polimorfismo

V27A não é encontrado exclusivamente em linhagens AIEC. Desse modo, essa variação não é classificada como uma mudança patoadaptativa exclusiva de linhagens AIEC associadas à DC.



## 6.0 DISCUSSÃO

A microbiota intestinal vem sendo associada à etiopatogênese das DII (Sartor, 2008). Mudanças na composição da comunidade microbiana entérica, com diminuição no número de espécies bacterianas residentes e um aumento do número de bactérias associadas à mucosa, vem sendo observadas na DC. Vários estudos independentes têm demonstrado aumento considerável da população de Enterobacteriaceae, especialmente *E. coli*, na mucosa intestinal de pacientes DC em comparação ao grupo controle (revisado por Carrière *et al.*, 2014; revisado por Martinez-Medina & Garcia-Gil, 2014).

*Escherichia coli* é um importante micro-organismo que compõe a microbiota intestinal humana, desempenhando um papel importante na promoção da estabilidade e na manutenção da fisiologia intestinal. Por meio da aquisição de fatores de virulência, algumas linhagens de *E. coli* tornaram-se patogênicas, sendo estas implicadas na etiologia das DII (Nataro & Kaper, 1998).

Análises filogenéticas têm demonstrado que linhagens de *E. coli* se enquadram em quatro principais grupos filogenéticos (A, B1, B2 e D). As linhagens pertencentes aos grupos A e B1 são pouco ou não patogênicas enquanto linhagens dos grupos B2 e D são mais frequentemente patogênicas, sendo comumente associadas a infecções urinárias e extraintestinais (Selander *et al.*, 1987; Herzer *et al.*, 1990; Wirth *et al.*, 2006; Moulin-Schouleur *et al.*, 2007). Linhagens de *E. coli* isoladas de pacientes com DII são principalmente classificadas nos grupos B2 e D. Alguns trabalhos demonstram uma maior colonização por linhagens pertencentes aos grupos B2 e D em pacientes com DII em comparação aos controles (Kotlowski *et al.*, 2007; Dreux *et al.*, 2013); entretanto, outros autores observaram uma distribuição semelhante dos grupos filogenéticos entre os grupos controle e DII (Martinez-Medina *et al.*, 2009; Ryan *et al.*, 2002; Sepehri *et al.*, 2011; Sepehri *et al.*, 2009; Schippa *et al.*, 2009; Nowrouzian *et al.*, 2006; Elliott *et al.*, 2013).

No presente estudo demonstramos que a mucosa de pacientes DC, de uma pequena amostra da população brasileira, também é fortemente colonizada por enterobactérias, na sua maioria por linhagens de *E. coli*. Essas linhagens isoladas da nossa população apresentam um perfil mais homogêneo quando classificadas de acordo com os principais grupos filogenéticos, entretanto, foi possível observar que em relação ao grupo controle, há um aumento considerável de linhagens B1 e B2 nos pacientes DC.

Sabe-se que na DC vários fatores predispõem o surgimento de um microambiente intestinal favorável para a colonização efetiva por *E. coli*, contribuindo, dessa forma, para a

susceptibilidade à doença. Como já dito, *E. coli* é um importante micro-organismo da microbiota intestinal normal. Entretanto, linhagens de *E. coli* associadas à mucosa de pacientes DC apresentam propriedades peculiares, como a capacidade de adesão e invasão do epitélio intestinal e uma capacidade de sobreviver e se multiplicar extensamente dentro de

5 culturas de células macrofágicas, produzindo grandes quantidades de TNF- $\alpha$  (Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998; Boudeau *et al.*, 1999; Glasser *et al.*, 2001; Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004).

Os resultados do nosso estudo mostraram que a grande maioria das linhagens de *E. coli*, isoladas tanto em pacientes DC quanto no grupo controle, não são AIEC. Entretanto,

10 diversos trabalhos independentes demonstraram que a mucosa de pacientes DC é fortemente colonizada por linhagens AIEC em relação ao grupo controle. Os motivos pelos quais existe uma discrepância nesses resultados não estão totalmente esclarecidos, entretanto, acredita-se que a presença de AIEC associadas à mucosa de pacientes DC pode variar de acordo com as diferentes populações.

Apesar de todos os estudos realizados onde a patogenicidade das linhagens AIEC foi avaliada, até o presente momento os fatores genéticos característicos do patotipo AIEC não são totalmente esclarecidos. Sabe-se que linhagens AIEC apresentam uma variabilidade elevada de genótipos, dificultando a identificação de fatores genéticos específicos do patotipo (revisito por Martinez-Medina *et al.*, 2014).

15

Até o presente momento os genes *hcp1*, *hcp3*, *lpfA*, *gipA* e *fimH* têm sido os mais estudados na linhagem LF82. De acordo com os estudos desenvolvidos no laboratório M2iSH, os genes *lpfA* e *gipA* participam dos processos de interação e sobrevivência de linhagens AIEC em PP via células M (Chassaing *et al.*, 2011; Vazeille *et al.*, 2016). Os estudos em relação ao T6SS em linhagens AIEC são ainda preliminares, sendo que os meios

20 pelos quais esse sistema de secreção contribui para a virulência de linhagens AIEC permanecem desconhecidos.

25

A adesina FimH desempenha um papel essencial na virulência das linhagens AIEC, permitindo a adesão bacteriana, via FimH, à mucosa, por meio da molécula de adesão CEACAM6, que é expressa anormalmente na mucosa ileal de 35% dos pacientes com DC

30 (Barnich *et al.*, 2007). Por meio do seu domínio lectina, a proteína FimH medeia a adesão bacteriana aos resíduos de manose presentes no receptor CEACAM6 (Nilsson *et al.*, 2006).

A presença de polimorfismos proteicos decorrentes de substituições em alguns aminoácidos de FimH está correlacionada a uma maior habilidade de adesão às células do epitélio intestinal pelas linhagens AIEC, possibilitando uma maior afinidade de FimH aos

resíduos de manose do receptor CEACAM6 (Dreux *et al.*, 2013). A presença de polimorfismos em FimH representa um dos mecanismos de evolução da virulência de linhagens AIEC, possibilitando dessa forma o desenvolvimento de DII crônicas em hospedeiros geneticamente susceptíveis. Como observado neste estudo, as linhagens AIEC isoladas de pacientes DC e controles, não apresentam variações relevantes na proteína FimH.

A baixa prevalência desses genes nas AIEC isoladas nesse estudo sugere que essas linhagens não apresentam um perfil altamente patogênico. Além disso, em concordância com os resultados apresentados anteriormente, as poucas linhagens caracterizadas como AIEC não possuem virulência como da linhagem LF82.

Vale ressaltar que diferentemente dos dados descritos na literatura (Kotlowski *et al.*, 2007; Dreux *et al.*, 2013), as linhagens AIEC isoladas nesse estudo pertencem, principalmente, ao filogruppo B1. Essas discrepâncias sugerem um perfil diferenciado entre AIEC isoladas de diferentes populações, onde possivelmente fatores ambientais, nutricionais e genéticos estão correlacionados, tanto com susceptibilidade à doença quanto ao sucesso da colonização da mucosa intestinal por linhagens de *E. coli* patogênicas.

## 7.0 CONCLUSÕES

O aumento do número de casos de DC no Brasil, observados nas últimas décadas, provavelmente reflete as mudanças no comportamento e estilo de vida da população, 5 ilustrados pelo aumento da urbanização, mudanças na dieta tradicional para uma dieta mais industrializada e a melhoria das condições de saúde e higiene. Acredita-se que o desenvolvimento econômico e expansão do estilo de vida são fatores que contribuem para o processo de evolução da patogenicidade e a seleção de determinadas linhagens bacterianas na microbiota entérica da população brasileira. Através desse estudo foi possível observar que a 10 mucosa ileal de pacientes com DC, de uma pequena amostragem da população brasileira, é fortemente colonizada por enterobactérias, em especial por *E. coli*. Entretanto, as linhagens isoladas desses pacientes não são coevolúidas com seu hospedeiro para desenvolver um forte fenótipo aderenteinvasivo.

## 8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. **N Engl J Med** 361: 2066-2078, 2009.

- 5 Arnold JR, Boor PJ. Improved transmission electron microscopy (TEM) of cultured cells through a "floating sheet" method. **J Ultrastruct Mol Struct Res** 94: 30-36, 1986.

Barnich N, Carvalho FA, Glasser AL, Darcha C, Jantscheff P, Allez M, Peeters H, Bommelaer G, Desreumaux P, Colombel JF, Darfeuille-Michaud A. CEACAM6 acts as a  
 10 receptor for adherent-invasive *E. coli*, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. **J Clin Invest** 117: 1566-1574, 2007.

Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, Cho JH, Duerr RH, Rioux JD, Brant SR, Silverberg MS, Taylor KD, Barmada MM, Bitton A, Dassopoulos T, Datta LW, Green T, Griffiths AM,  
 15 Kistner EO, Murtha MT, Rugeiro MD, Rotter JI, Schumm LP, Steinhardt AH, Targan SR, Xavier RJ, Libioulle C, Sandor C, Lathrop M, Belaiche J, Dewit O, Gut I, Heath S, Laukens D, Mni M, Rutgeerts P, Van Gossum A, Zelenika D, Franchimont D, Hugot JP, de Vos M, Vermeire S, Louis E, Cardon LR, Anderson CA, Drummond H, Nimmo E, Ahmad T, Prescott NJ, Onnie CM, Fisher SA, Marchini J, Ghorri J, Bumpstead S, Gwilliam R, Tremelling M,  
 20 Deloukas P, Mansfield J, Jewell D, Satsangi J, Mathew CG, Parkes M, Georges M, Daly MJ. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. **Nat Genet** 40: 955-962, 2008.

Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a  
 25 standardized single disc method. **Am J Clinical Pathol** 45: 493, 1996.

Baumgart M, Dogan B, Rishniw M, Weitzman G, Bosworth B, Yantiss R, Orsi RH, Wiedmann M, McDonough P, Kim SG, Berg D, Schukken Y, Scherl E, Simpson KW. Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive  
 30 *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of Clostridiales in Crohn's disease involving the ileum. **ISME J** 1: 403-418, 2007.

Bielaszewska M, Mellmann A, Zhang W, Köck R, Fruth A, Bauwens A, *et al.* Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic

uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. **Lancet Infect Dis** 11: 671–676, 2011.

5 Binder V, & Orholm M. Familial occurrence and inheritance studies in inflammatory bowel disease. **Neth J Med** 48: 53-56, 1996.

Binder, V. Epidemiology of IBD during the twentieth century: an integrated view. **Best Pract Res Clin Gastroenterol** 18: 463-479, 2004.

10 Birrenbach T, Bocker U. Inflammatory bowel disease and smoking: a review of epidemiology, pathophysiology, and therapeutic implications. **Inflamm Bowel Dis** 10: 848-859, 2004.

15 Boudeau J, Glasser AL, Masseret E, Joly B, Darfeuille-Michaud A. Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. **Infect Immun** 67: 4499-4509, 1999.

20 Boudeau J, Barnich N, Darfeuille-Michaud A. Type 1 pili-mediated adherence of *Escherichia coli* strain LF82 isolated from Crohn's disease is involved in bacterial invasion of intestinal epithelial cells. **Mol Microbiol** 39: 1272-1284, 2001.

25 Bringer MA, Barnich N, Glasser AL, Bardot O, Darfeuille-Michaud A. HtrA stress protein is involved in intramacrophagic replication of adherent and invasive *Escherichia coli* strain LF82 isolated from a patient with Crohn's disease. **Infect Immun** 73: 712-21, 2005.

Bringer MA, Glasser AL, Tung CH, *et al.* The Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* strain LF82 replicates in mature phagolysosomes within J774 macrophages. **Cell Microbiol** 8: 471–484, 2006.

30 Bringer MA, Billard E, Glasser AL, Colombel JF, Darfeuille-Michaud A. Replication of Crohn's disease-associated AIEC within macrophages is dependent on TNF- $\alpha$  secretion. **Lab Invest** 92: 411-419, 2012.

Carrière J, Darfeuille-Michaud A, Nguyen HT. Infectious etiopathogenesis of Crohn's disease. **World J Gastroenterol** 20: 12102-12117, 2014.

Carvalho FA, Barnich N, Sivignon A, Darcha C, Chan CH, Stanners CP, Darfeuille-Michaud  
5 A. Crohn's disease adherent-invasive *Escherichia coli* colonize and induce strong gut  
inflammation in transgenic mice expressing human CEACAM. **J Exp Med** 206: 2179-2189,  
2009.

Chassaing B, Rolhion N, de Vallée A, Salim SY, Prorok-Hamon M, Neut C, Campbell BJ,  
10 Söderholm JD, Hugot JP, Colombel JF, Darfeuille-Michaud A. Crohn disease--associated  
adherent-invasive *E. coli* bacteria target mouse and human Peyer's patches via long polar  
fimbriae. **J Clin Invest** 121: 966-975, 2011.

Chassaing B, Darfeuille-Michaud A. The commensal microbiota and enteropathogens in the  
15 pathogenesis of inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology** 140: 1720-1728, 2011.

Chiba M, Fukushima T, Inoue S, Horie Y, Iizuka M, Masamune O. *Listeria monocytogenes* in  
Crohn's disease. **Scand J Gastroenterol** 33: 430-434, 1998a.

20 Chiba M, Komatsu M, Iizuka M, Masamune O, Hoshina S, Kono M. Microbiology of the  
intestinal lymph follicle: a clue to elucidate causative microbial agent(s) in Crohn's disease.  
**Med Hypotheses** 51: 421-427, 1998b.

Clarke DJ, Chaudhuri RR, Martin HM, Campbell BJ, Rhodes JM, Constantinidou C, Pallen  
25 MJ, Loman NJ, Cunningham AF, Browning DF, Henderson IR. Complete Genome Sequence  
of the Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive *Escherichia coli* Strain HM605. **J  
Bacteriol** 193: 4540, 2011.

Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli*  
30 Phylogenetic Group. **Appl Environ Microbiol** 66: 4555-4558, 2000.

**CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth  
Informational Supplement.** CLSI document M100-S24; Wayne, PA: Clinical and  
Laboratory Standards Institute; 2014.

Colombel JF, & Hugot JP. Genetics of Crohn disease: a complex model. **Gastroenterol Clin Biol** 20: B15-20, 1996.

5 Conte MP, Schippa S, Zamboni I, Penta M, Chiarini F, Seganti L, Osborn J, Falconieri P, Borrelli O, Cucchiara S. Gut-associated bacterial microbiota in paediatric patients with inflammatory bowel disease. **Gut** 55: 1760-1767, 2006.

Cosnes J. Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. **Best Pract Res Clin Gastroenterol** 18: 481-496, 2004.

10

Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology** 140: 1785-1794, 2011.

15 Darfeuille-Michaud A, Neut C, Barnich N, Lederman E, Di Martino P, Desreumaux P, Gambiez L, Joly B, Cortot A, Colombel JF. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. **Gastroenterology** 115: 1405-1411, 1998.

20 Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser AL, Barnich N, Bringer MA, Swidsinski A, Beaugerie L, Colombel JF. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. **Gastroenterology** 127: 412-421, 2004.

25 Declercq C, Gower-Rousseau C, Vernier-Massouille G, Salleron J, Balde M, Poirier G, Lerebours E, Dupas JL, Merle V, Marti R, Duhamel A, Cortot A, Salomez JL, Colombel, JF. Mapping of inflammatory bowel disease in northern France: spatial variations and relation to affluence. **Inflamm Bowel Dis** 16: 807-812, 2010.

30 Desreumaux P, Brandt E, Gambiez L, Emilie D, Geboes K, Klein O, Ectors N, Cortot A, Capron M, Colombel JF. Distinct cytokine patterns in early and chronic ileal lesions of Crohn's disease. **Gastroenterology** 113: 118-126, 1997.

D'Haens GR, Geboes K, Peeters M, Baert F, Penninckx F, Rutgeerts P. Early lesions of recurrent Crohn's disease caused by infusion of intestinal contents in excluded ileum. **Gastroenterology** 114: 262-267, 1998.



- Dickinson RJ, Varian SA, Axon AT, Cooke EM. Increased incidence of faecal coliforms *in vitro* adhesive and invasive properties in patients with ulcerative colitis. **Gut** 21: 787-792, 1980.
- 5 Dreux N, Denizot J, Martinez-Medina M, Mellmann A, Billig M, Kisiela D, Chattopadhyay S, Sokurenko E, Neut C, Gower-Rousseau C, Colombel JF, Bonnet R, Darfeuille-Michaud A, Barnich N. Point mutations in FimH adhesion of Crohn's disease associated adherent-invasive *Escherichia coli* enhance intestinal inflammatory response. **PLOS Pathogens** 9: e1003141, 2013.
- 10 Eaves-Pyles T, Allen CA, Taormina J, Swidsinski A, Tutt CB, Jezek GE, Islas-Islas M, Torres AG. *Escherichia coli* isolated from a Crohn's disease patient adheres, invades, and induces inflammatory responses in polarized intestinal epithelial cells. **Int J Med Microbiol** 298: 397-409, 2008.
- 15 Elliott TR, Hudspith BN, Wu G, Cooley M, Parkes G, Quiñones B, Randall L, Mandrell RE, Fagerquist CK, Brostoff J, Rayment NB, Boussioutas A, Petrovska L, Sanderson JD. Quantification and characterization of mucosa-associated and intracellular *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. **Inflamm Bowel Dis** 19: 2326-2338, 2013.
- 20 Ewaschuk JB, Diaz H, Meddings L, Diederichs B, Dmytrash A, Backer J, Looijer-van Langen M, Madsen KL. Secreted bioactive factors from *Bifidobacterium infantis* enhance epithelial cell barrier function. **Am J PhysiolGastrointest Liver Physiol** 295: 1025-1034, 2008.
- 25 Farrokhyar F., Swarbrick ET, Irvine EJ. A critical review of epidemiological studies in inflammatory bowel disease. **Scand J Gastroenterol** 36: 2-15, 2001.
- Ferrari MLA, Carvalho RC, Cunha AS. Anticorpos Monoclonais nas Doenças Inflamatórias Intestinais. In: PRS Rocha, LGV Coelho, RG Silva, TCA Ferrari (Ed.). **Tópicos em**
- 30 **Gastroenteorologia 15 - Avanços em Gastroenterologia**, 351-371, 2006.
- Gaur U, Aggarwal BB. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. **Biochem Pharmacol** 66:1403–1408, 2003.

Giaffer MH, Holdsworth CD, Duerden BI. The assessment of faecal flora in patients with inflammatory bowel disease by a simplified bacteriological technique. **J Med Microbiol** 35: 238-243, 1991.

- 5 Giaffer MH, Holdsworth CD, Duerden BI. Virulence properties of *Escherichia coli* strains isolated from patients with inflammatory bowel disease. **Gut** 33: 646-650, 1992.

10 Glasser AL, Boudeau J, Barnich N, *et al.* Adherent invasive *Escherichia coli* strains from patients with Crohn's disease survive and replicate within macrophages without inducing host cell death. **Infect Immun** 69: 5529–5537, 2001.

15 Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K, Albrecht M, Mayr G, De La Vega FM, Briggs J, Gunther S, Prescott NJ, Onnie CM, Hasler R, Sipos B, Folsch UR, Lengauer T, Platzer M, Mathew CG, Krawczak M, Schreiber S. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in *ATG16L1*. **Nat Genet** 39: 207-211, 2007.

20 Herzer, P. J., S. Inouye, M. Inouye, and T. S. Whittam. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** 172: 6175–6181, 1990.

25 Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. **Nature** 411: 599-603, 2001.

30 Jijon H, Backer J, Diaz H, Yeung H, Thiel D, McKaigney C, De Simone C, Madsen K. DNA from probiotic bacteria modulates murine and human epithelial and immune function. **Gastroenterology** 126: 1358-1373, 2004.

Kallinowski F, Wassmer A, Hofmann MA, Harmsen D, Heesemann J, Karch H, Herfarth C, Buhr HJ. Prevalence of enteropathogenic bacteria in surgically treated chronic inflammatory bowel disease. **Hepatogastroenterology** 45: 1552-1558, 1998.

Kaper JB. Pathogenic *Escherichia coli*. **Int J Med Microbiol** 295: 355-356, 2005.

Keighley MR, Arabi Y, Dimock F, Burdon DW, Allan RN, Alexander-Williams J. Influence of inflammatory bowel disease on intestinal microflora. **Gut** 19: 1099-1104, 1978.

5

Klumpp J, Fuchs TM. Identification of novel genes in genomic islands that contribute to *Salmonella typhimurium* replication in macrophages. **Microbiology**. **153**:1207-20, 2007.

10

Kotlowski R, Bernstein CN, Sepehri S, Krause DO. High prevalence of *Escherichia coli* belonging to the B2+D phylogenetic group in inflammatory bowel disease. **Gut** 56: 669-675, 2007.

15

Krause DO, Little AC, Dowd SE, Bernstein CN. Complete genome sequence of adherent invasive *Escherichia coli* UM146 isolated from Ileal Crohn's disease biopsy tissue. **J Bacteriol** 193: 583, 2010.

20

Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. **Cell** 75: 263-274, 1993.

Lerebours E, Savoye G, Guedon C. Epidemiology and natural history of chronic inflammatory bowel disease. **Gastroenterol Clin Biol** 27: S76-80, 2003.

25

Madsen KL, Doyle JS, Jewell LD, Tavernini MM, Fedorak RN. *Lactobacillus* species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. **Gastroenterology** 116: 1107-1114, 1999.

Madsen KL. Inflammatory bowel disease: lessons from the IL-10 gene-deficient mouse. **Clin Invest Med** 24: 250-257, 2001.

30

Madsen K, Cornish A, Soper P, McKaigney C, Jijon H, Yachimec C, Doyle J, Jewell L, De Simone C. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. **Gastroenterology** 121: 580-591, 2001.

Madsen KL, Fedorak RN, Tavernini MM, Doyle JS. Normal breast milk limits the development of colitis in IL-10-deficient mice. **Inflamm Bowel Dis** 8: 390-398, 2002.

5 Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, Gloux K, Pelletier E, Frangeul L, Nalin R, Jarrin C, Chardon P, Marteau P, Roca J, Dore J. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. **Gut** 55: 205-211, 2006.

10 Martin HM, Campbell BJ, Hart CA, Mpofu C, Nayar M, Singh R, Englyst H, Williams HF, Rhodes JM. Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. **Gastroenterology** 127: 80-93, 2004.

15 Martinez-Medina M, Aldeguer X, Lopez-Siles M, González-Huix F, López-Oliu C, Dahbi G, Blanco JE, Blanco J, Garcia-Gil LJ, Darfeuille-Michaud A. Molecular diversity of *Escherichia coli* in the human gut: new ecological evidence supporting the role of adherent-invasive *E. coli* (AIEC) in Crohn's disease. **Inflamm Bowel Dis** 15: 872-882, 2009.

20 Martinez-Medina M, Garcia-Gil LJ. *Escherichia coli* in chronic inflammatory bowel diseases: an update on adherent invasive *Escherichia coli* pathogenicity. **World J Gastrointest Pathophysiol** 5: 213-227, 2014.

Masseret E, Boudeau J, Colombel JF, Neut C, Desreumaux P, Joly B, Cortot A, Darfeuille-Michaud A. Genetically related *Escherichia coli* strains associated with Crohn's disease. **Gut** 48: 320-325, 2001.

25 Matsui T, Iida M, Fujishima M, Imai K, Yao T. Increased sugar consumption in Japanese patients with Crohn's disease. **Gastroenterol Jpn** 25: 271, 1990.

30 Miquel S, Peyretailade E, Claret L, de Vallee A, Dossat C, Vacherie B, Zineb el H, Segurens B, Barbe V, Sauvanet P, Neut C, Colombel JF, Medigue C, Mojica FJ, Peyret P, Bonnet R, Darfeuille-Michaud A. Complete genome sequence of Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* strain LF82. **PLoS One** 5: e12714, 2010.

Monsen U, Bernell O, Johansson C, Hellers G. Prevalence of inflammatory bowel disease among relatives of patients with Crohn's disease. **Scand J Gastroenterol** 26: 302-306, 1991.

Moulin-Schouleur M, Reperant M, Laurent S, Bree A, Mignon-Grasteau S, *et al.* Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. **J Clin Microbiol** 45: 3366–3376, 2007.

5

Mpofu CM, Campbell BJ, Subramanian S, Marshall-Clarke S, Hart CA, Cross A, Roberts CL, McGoldrick A, Edwards SW, Rhodes JM. Microbial mannan inhibits bacterial killing by macrophages: a possible pathogenic mechanism for Crohn's disease. **Gastroenterology** 133: 1487-1498, 2007.

10

Nash JH, Villegas A, Kropinski AM, Aguilar-Valenzuela R, Konczy P, Mascarenhas M, Ziebell K, Torres AG, Karmali MA, Coombes BK. Genome sequence of adherent-invasive *Escherichia coli* and comparative genomic analysis with other *E. coli* pathotypes. **BMC Genomics** 11: 667, 2010.

15

Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol Rev.** 11: 142-201, 1998.

Neut C, Bulois P, Desreumaux P, Membre JM, Lederman E, Gambiez L, Cortot A, Quandalle P, van Kruiningen H, Colombel JF. Changes in the bacterial flora of the neoterminal ileum after ileocolonic resection for Crohn's disease. **Am J Gastroenterol** 97: 939-946, 2002.

Niessner M, Volk BA. Altered Th1/Th2 cytokine profiles in the intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease as assessed by quantitative reversed transcribed polymerase chain reaction (RT-PCR). **Clin Exp Immunol** 101: 428-435, 1995.

25

Nilsson LM, Thomas WE, Sokurenko EV, Vogel V. Elevated shear stress protects *Escherichia coli* cells adhering to surfaces via catch bonds from detachment by soluble inhibitors. **Appl Environ Microbiol** 72: 3005–3010, 2006.

30

Nowrouzian FL, Adlerberth I, Wold AE. 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** 8: 834-840, 2006.

Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nuñez G, Cho JH. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. **Nature** 41: 603-606, 2001.

5

Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Sorensen TI, Binder V. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. **N Engl J Med** 324: 84-88, 1991.

Ouyang W, Lohning M, Gao Z, Assenmacher M, Ranganath S, Radbruch A, Murphy KM. Stat6-independent GATA-3 autoactivation directs IL-4-independent Th2 development and commitment. **Immunity** 12: 27-37, 2000.

10

Parkes M, Barrett JC, Prescott NJ, Tremelling M, Anderson CA, Fisher SA, Roberts RG, Nimmo ER, Cummings FR, Soars D, Drummond H, Lees CW, Khawaja SA, Bagnall R, Burke DA, Todhunter CE, Ahmad T, Onnie CM, McArdle W, Strachan D, Bethel G, Bryan C, Lewis CM, Deloukas P, Forbes A, Sanderson J, Jewell DP, Satsangi J, Mansfield JC, Cardon L, Mathew CG. Sequence variants in the autophagy gene *IRGM* and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. **Nat Genet** 39: 830-832, 2007.

15

Persson PG, Ahlbom A, Hellers G. Diet and inflammatory bowel disease: a case-control study. **Epidemiology** 3: 47-52, 1992.

20

Pessoa, GVA, Silva EAM. Meios de Rugai e lisina-motilidade combinados em um só tubo para a identificação presuntiva de enterobactérias. **Revista do Instituto Adolfo Lutz** 32: 97-100, 1972.

25

Reif S, Klein I, Lubin F, Farbstein M, Hallak A, Gilat T. Pre-illness dietary factors in inflammatory bowel disease. **Gut** 40: 754-760, 1997.

Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, Silverberg MS, Goyette P, Huett A, Green T, Kuballa P, Barmada MM, Datta LW, Shugart YY, Griffiths AM, Targan SR, Ippoliti AF, Bernard EJ, Mei L, Nicolae DL, Regueiro M, Schumm LP, Steinhardt AH, Rotter JI, Duerr RH, Cho JH, Daly MJ, Brant SR. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for

30

Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. **Nat Genet** 39: 596-604, 2007.

5 Rolhion N, Barnich N, Bringer MA, Glasser AL, Ranc J, Hébuterne X, Hofman P, Darfeuille-Michaud A. Abnormally expressed ER stress response chaperone Gp96 in CD favours adherent-invasive *Escherichia coli* invasion. **Gut** 59: 1355-1362, 2010.

10 Ruseler-van Embden JG, Both-Patoir HC. Anaerobic gram-negative faecal flora in patients with Crohn's disease and healthy subjects. **Antonie Van Leeuwenhoek** 49: 125-132, 1983.

Russel MG, Engels LG, Muris JW, Limonard CB, Volovics A, Brummer RJ, Stockbrugger RW. Modern life' in the epidemiology of inflammatory bowel disease: a case-control study with special emphasis on nutritional factors. **Eur J Gastroenterol Hepatol** 10: 243-249, 1998.

15 Rutgeerts P, Goboos K, Peeters M, Hiele M, Penninckx F, Aerts R, Kerremans R, Vantrappen G. Effect of faecal stream diversion on recurrence of Crohn's disease in the neoterminal ileum. **Lancet** 338: 771-774, 1991.

20 Ryan P, Bennett MW, Aarons S, Lee G, Collins JK, O'Sullivan GC, O'Connell J, Shanahan F. PCR detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in Crohn's disease granulomas isolated by laser capture microdissection. **Gut** 51: 665-670, 2002.

25 Sands BE. Crohn's Disease. *In*: Sleisenger e Fordtran (Ed.). **Gastrointestinal and liver disease**. Philadelphia, USA: Saunders, 2459-2498, 2006.

Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology** 134: 577-594, 2008.

30 Sasaki M, Sitaraman SV, Babbin BA, Gerner-Smidt P, Ribot EM, Garrett N, Alpern JA, Akyildiz A, Theiss AL, Nusrat A, Klapproth JM. Invasive *Escherichia coli* are a feature of Crohn's disease. **Lab Invest** 87: 1042-1054, 2007.

Schembri MA, Sokurenko EV, Klemm P. Functional flexibility of the FimH adhesin: insights from a random mutant library. **Infect Immun** 68: 2638-2646, 2000.

5 Schippa S, Conte MP, Borrelli O, Iebba V, Aleandri M, Seganti L, Longhi C, Chiarini F, Osborn J, Cucchiara S. Dominant genotypes in mucosa-associated *Escherichia coli* strains from pediatric patients with inflammatory bowel disease. **Inflamm Bowel Dis** 15: 661-672, 2009.

10 Seder RA. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4<sup>+</sup> T cells. **J Allergy Clin Immunol** 94: 1195-1202, 1994.

Seibold F. ASCA: genetic marker, predictor of disease, or marker of a response to an environmental antigen? **Gut** 54: 1212-1213, 2005.

15 Seksik P, Rigottier-Gois L, Gramet G, Sutren M, Pochart P, Marteau P, Jian R, Dore J. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. **Gut** 52, 237–242, 2003.

20 Selander RK, Caugant DA, Whittam TS. 1987. **Genetic structure and variation in natural populations of *Escherichia coli***, p. 1625–1648. In F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

25 Sepehri S, Kotlowski R, Bernstein CN, Krause DO. Phylogenetic analysis of inflammatory bowel disease associated *Escherichia coli* and the fimH virulence determinant. **Inflamm Bowel Dis** 15: 1737-1745, 2009.

30 Sepehri S, Khafipour E, Bernstein CN, Coombes BK, Pilar AV, Karmali M, Ziebell K, Krause DO. Characterization of *Escherichia coli* isolated from gut biopsies of newly diagnosed patients with inflammatory bowel disease. **Inflamm Bowel Dis** 17: 1451-1463, 2011.



Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott IDR, Bernstein CN, Brant SR *et al.* Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. **Can J Gastroenterol** 19: 5-36, 2005.

5

Soderholm JD, Olaison G, Peterson KH, Franzén LE, Lindmark T, Wirén M, Tagesson C, Sjö Dahl R. Augmented increase in tight junction permeability by luminal stimuli in the non-inflamed ileum of Crohn's disease. **Gut** 50: 307-313, 2002.

10

Sokol H, Seksik P, Rigottier-Gois L, Lay C, Lepage P, Podglajen I, Marteau P, Dore J. Specificities of the fecal microbiota in inflammatory bowel disease. **Inflamm Bowel Dis** 12: 106-111, 2006.

15

Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermudez-Humaran LG, Gratadoux JJ, Blugeon S, Bridonneau C, Furet JP, Corthier G, Grangette C, Vasquez N, Pochart P, Trugnan, G, Thomas G, Blottiere HM, Dore J, Marteau P, Seksik P, Langella P. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. **Proc Natl Acad Sci U S A** 105: 16731-16736, 2008.

20

Stanley, T.L., Ellermeier, C.D., and Slauch, J.M. Tissue-specific gene expression identifies a gene in the lysogenic phage Gifsy-1 that affects *Salmonella enterica* serovar Typhimurium survival in Peyer's patches. **J Bacteriol** 182: 4406-4413, 2000.

25

Strober W, Fuss IJ. Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology** 140: 1756-1767, 2011.

30

Subramanian S, Rhodes JM, Hart CA, Tam B, Roberts CL, Smith SL, Corkill JE, Winstanley C, Virji M, Campbell BJ. Characterization of epithelial IL-8 response to inflammatory bowel disease mucosal *E. coli* and its inhibition by mesalamine. **Inflamm Bowel Dis** 14: 162-175, 2008.

Suzuki H, Fukuda Y, Koizuka H, Tomita T, Hori K, Suzuki M, O'Morain C. Dietary antigens in Crohn's disease: antibodies to porcine pancreatic amylase. **Am J Gastroenterol** 103: 656-664, 2008.

Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, Weber J, Hoffmann U, Schreiber S, Dietel M, Lochs H. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology** 122: 44-54, 2002.

- 5 Swidsinski A, Weber J, Loening-Baucke V, Hale LP, Lochs H. Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. **J Clin Microbiol** 43: 3380-3389, 2005.

- 10 Swidsinski A, Loening-Baucke V, Herber A. Mucosal flora in Crohn's disease and ulcerative colitis - an overview. **J Physiol Pharmacol** 60 Suppl 6: 61-71, 2009.

Tamboli CP, Neut C, Desreumaux P, Colombel JF. Dysbiosis in inflammatory bowel disease. **Gut** 53: 1-4, 2004.

- 15 Vazeille E, Chassaing B, Buisson A, Dubois A, de Vallée A, Billard E, Neut C, Bommelaer G, Colombel JF, Barnich N, Darfeuille-Michaud A, Bringer MA. GipA factor Supports Colonization of Peyer's Patches by Crohn's Disease-associated *Escherichia Coli*. **Inflamm Bowel Dis** 22:68-81, 2016.

- 20 Vejborg RM, Hancock V, Petersen AM, Krogfelt KA, Klemm P. Comparative genomics of *Escherichia coli* isolated from patients with inflammatory bowel disease. **BMC Genomics** 12: 316, 2011.

- 25 Victoria CR, Sassak LY, Nunes HRdC. Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, inmidwestern of São Paulo State, Brazil. **Arq Gastroenterol** 46: 20–5, 2009.

Wellcome. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. **Nature** 447: 661-678, 2007.

- 30 Willing B, Halfvarson J, Dicksved J, Rosenquist M, Jarnerot G, Engstrand L, Tysk C, Jansson JK. Twin studies reveal specific imbalances in the mucosa-associated microbiota of patients with ileal Crohn's disease. **Inflamm Bowel Dis** 15: 653-660, 2009.

Wirth T, Falush D, Lan R, Colles F, Mensa P, *et al.* Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. **Mol Microbiol** 60: 1136–1151, 2006.

Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease.  
5 **Nature** 448: 427-434, 2007.

Yang, SK, Loftus EV, Sandborn WJ. Epidemiology of inflammatory bowel disease in Asia.  
**Inflamm Bowel Dis** 7: 260-270, 2001.

## 9.0 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO PERÍODO

### 9.1 Disciplinas cursadas

- 5 Aproveitamento de 26 créditos do mestrado  
 DIP MIC808 - Seminários em Microbiologia (2 créditos)  
 DIP MIC856 - Treinamento Didático em Microbiologia I (2 créditos)  
 DIP MIC835 – Tópicos especiais em Microbiologia (2 créditos)  
 DIP MIC850 – Biologia de Leveduras (3 créditos)
- 10 DIP MIC857 – Treinamento Didático em Microbiologia II (2 créditos)

### 9.2 Trabalhos apresentados em congressos e eventos

- 15 **COSTA, R. F. A.; FERRARI, L. A.; BRINGER, M. A.; DARFEUILLE-MICHAUD, A.; MARTINS, F. S.; BARNICH N.** Isolation and characterization of adherent-invasive *Escherichia coli* in Crohn's disease patients in Brazil. 28º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2015, Florianópolis.

- 20 **COSTA, R. F. A.; FERRARI, L. A.; BRINGER, M. A.; DARFEUILLE-MICHAUD, A.; MARTINS, F. S.; BARNICH N.** Isolation and characterization of adherent-invasive *Escherichia coli* in Crohn's disease patients in Brazil. II Simpósio de Microbiologia da UFMG, 2015, Belo Horizonte.

- 25 **COSTA, R. F. A.; FERRARI, L. A.; BRINGER, M. A.; DARFEUILLE-MICHAUD, A.; MARTINS, F. S.; BARNICH N.** Isolation and characterization of adherent-invasive *Escherichia coli* in Crohn's disease patients in Brazil. 3º International Congress of translational research in human nutrition, 2015, Clermont-Ferrand (França).

- 30 **COSTA, R. F. A.; FERRARI, L. A.; BRINGER, M. A.; DARFEUILLE-MICHAUD, A.; MARTINS, F. S.; BARNICH N.** Recherche et caractérisation des *E. coli* adhérents et invasifs chez les patients atteints de maladie de Crohn (MC) au Brésil. Journées de l'Ecole doctorale SVSAE, 2015, Clermont-Ferrand (França).

**COSTA, R. F. A.; FERRARI, L. A.; BRINGER, M. A.; DARFEUILLE-MICHAUD, A.; MARTINS, F. S.; BARNICH N.** Isolation and characterization of adherent-invasive *Escherichia coli* in Crohn's disease patients in Brazil. 5<sup>o</sup> International Human Microbiome Congress, 2015, Luxembourg (Luxembourg).

5

**COSTA, R. F. A.; FERRARI, L. A.; BRINGER, M. A.; DARFEUILLE-MICHAUD, A.; MARTINS, F. S.; BARNICH N.** Recherche et caractérisation des *E. coli* adhérents et invasifs chez les patients atteints de maladie de Crohn (MC) au Brésil. Journée Scientifique du CRNH Auvergne, 2014, Clermont-Ferrand (França).

10

**COSTA, R. F. A.; FERRARI, L. A.; BRINGER, M. A.; DARFEUILLE-MICHAUD, A.; MARTINS, F. S.; BARNICH N.** Identificação e caracterização de linhagens de *Escherichia coli* aderentes e invasivas em pacientes com doença de Crohn no Brasil. XII Jornadas de Jóvenes Investigadores AUGM, 2014, Valparaíso (Chile).

15

**COSTA, R. F. A.; FERRARI, L. A.; BRINGER, M. A.; DARFEUILLE-MICHAUD, A.; MARTINS, F. S.; BARNICH N.** Identificação e caracterização de linhagens de *Escherichia coli* aderentes e invasivas ISOLADAS da mucosa ileal de pacientes com doença de Crohn. 3<sup>o</sup> Congresso Nacional de Saúde, Faculdade de Medicina da UFMG, Belo Horizonte, 2014  
**(Trabalho premiado como melhor pôster)**

20

**COSTA, R. F. A.; FERRARI, L. A.; BRINGER, M. A.; MARTINS, F. S.; BARNICH N.** Identificação e caracterização de linhagens de *Escherichia coli* aderentes e invasivas isoladas da mucosa ileal de pacientes com doença de Crohn. I Simpósio de Microbiologia da UFMG – A Microbiologia e a Sociedade, Belo Horizonte, 2014.

25

### **9.3 Artigo**

**(Anexo C)**





**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**

**Projeto: CAAE -00836712.4.0000.5149**

**Interessado(a): Prof. Flaviano dos Santos Martins  
Departamento de Microbiologia  
Instituto de Ciências Biológicas – UFMG**

**DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 20 de fevereiro de 2013, o projeto de pesquisa intitulado **"Isolamento e caracterização de Escherichia coli aderente-invasivas (AIECs) e perfil microbiano de lesões intestinais de pacientes com doença de Crohn"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

**Prof.ª Maria Teresa Marques Amaral  
Coordenadora do COEP-UFMG**

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

#### ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI* ADERENTE-INVASIVAS (AIECs) E PERFIL MICROBIANO DE LESÕES INTESTINAIS DE PACIENTES COM DOENÇA DE CROHN

Você está sendo convidado (a) participar, voluntariamente do estudo **Isolamento e caracterização de *Escherichia coli* aderente-invasivas (AIECs) e perfil microbiano de lesões intestinais de pacientes com doença de Crohn**. Trata-se de um estudo em nível de doutorado vinculado ao Programa de pós-graduação em Microbiologia, do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. O objetivo dessa pesquisa é avaliar a presença da bactéria *Escherichia coli* aderente-invasiva (AIEC) na mucosa intestinal de pacientes com doença de Crohn.

O participante (a) deverá permitir a coleta de oito fragmentos de mucosa intestinal, durante a colonoscopia, procedimento que será submetido para esclarecimento diagnóstico de sua doença. Esse procedimento será realizado por profissionais devidamente treinados em ambiente reservado e com toda respeito à sua intimidade.

**Riscos:** Os riscos com complicações da colonoscopia não são comuns, mas podem acontecer mesmo que o paciente não participe da pesquisa. Os riscos são minimizados com a realização dos procedimentos com uma equipe altamente qualificada, sendo referência em todo o estado de Minas Gerais.

**Benefícios:** O conhecimento detalhado do perfil microbiano na mucosa de pacientes com doença de Crohn poderá auxiliar no tratamento desses pacientes, direcionando a utilização de um antimicrobiano específico, reduzindo assim o tempo e custos do seu tratamento.

As dúvidas acerca dos riscos, benefícios, procedimentos serão esclarecidas sempre que solicitadas. Sua participação nesse estudo é voluntária e gratuita. Você tem a liberdade de se recusar a participar do estudo, ou, se aceitar participar, de refinar seu consentimento a qualquer momento. Este fato não implica na interrupção de seu atendimento, que está assegurado. **As informações obtidas neste estudo serão confidenciais, com preservação da identidade e, serão utilizadas apenas para fins de pesquisa.**

A responsável pelo Ambulatório de Intestino do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da UFMG, Profa. Dra. Maria de Lourdes de Abreu Ferrari, assim como os médicos da equipe, poderão ser contatados nos telefones 3409-9403 e 3409-9490 e são responsáveis pelo seu tratamento. A pesquisa está sendo realizada pelo Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins (3409-3018 e 3409-2737), Profa. Dra. Maria de Lourdes de Abreu Ferrari (3409-9403 e 3409-9490) e pela doutoranda Rafaella Ferreira Avelar Costa (3409-2737), todos da UFMG. O Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais está localizado na Av. Presidente Antônio Carlos nº. 6.627, na Unidade Administrativa II, segundo andar, sala 2005, Campus Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais (CEP-31270901). Telefone (31) 3409-4592.

Ciente das informações acima, eu \_\_\_\_\_, aceito participar do estudo **"Isolamento e caracterização de *Escherichia coli* aderente-invasivas (AIECs) e perfil microbiano de lesões intestinais de pacientes com doença de Crohn"**.

\_\_\_\_\_  
Rafaella Ferreira Avelar Costa – Doutoranda do Programa de pós-graduação em Microbiologia

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Flaviano dos Santos

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Maria de Lourdes de Abreu Ferrari

ASSINATURA DO VOLUNTÁRIO \_\_\_\_\_

NOME DO MÉDICO \_\_\_\_\_

ASSINATURA DO MÉDICO \_\_\_\_\_ DATA \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_



RESEARCH ARTICLE

Open Access



# Characterization of mucosa-associated *Escherichia coli* strains isolated from Crohn's disease patients in Brazil

Rafaella F. A. Costa<sup>1,2</sup>, Maria L. A. Ferrari<sup>3,4</sup>, Marie-Agnès Bringer<sup>5</sup>, Arlette Darfeuille-Michaud<sup>2\*</sup>, Flaviano S. Martins<sup>1</sup> and Nicolas Barnich<sup>2\*</sup>

## Abstract

**Background:** Crohn's disease (CD) is characterized by chronic inflammation of the human intestine. Several studies have demonstrated that the intestinal mucosa of CD patients in Western countries is abnormally colonized by adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) strains. However, no studies to date have focused on the involvement of such *E. coli* strains in CD patients in Brazil. Here, we characterized *E. coli* strains associated with the ileal mucosa of Brazilian CD patients (ileal biopsies from 35 subjects, 24 CD patients and 11 controls).

**Results:** The colonization level of adherent *Enterobacteriaceae* associated with the ileal mucosa of CD patients was significantly higher than that of the controls. The proportions of *E. coli* strains belonging to phylogroups B1 and B2 were two-fold higher in strains isolated from CD patients than in those isolated from controls. CD patients in the active phase harbored 10-fold more *E. coli* belonging to group B2 than CD patients in remission. Only a few *E. coli* isolates had invasive properties and the ability to survive within macrophages, but 25% of CD patients in Brazil (6/24) harbored at least one *E. coli* strain belonging to the AIEC pathobiont. However, *fimH* sequence analysis showed only a few polymorphisms in the FimH adhesin of strains isolated in this study compared to the FimH adhesin of AIEC collections isolated from European patients.

**Conclusions:** Mucosa-associated *E. coli* strains colonize the intestinal mucosa of Brazilian CD patients. However, the strains isolated from Brazilian CD patients have probably not yet co-evolved with their hosts and therefore have not fully developed a strong adherent-invasive phenotype. Thus, it will be crucial to follow in the future the emergence and evolution of AIEC pathobionts in the Brazilian population.

**Keywords:** Crohn's disease, Inflammatory bowel disease, Mucosa-associated *Escherichia coli*

## Background

Crohn's disease (CD) is an inflammatory bowel disease (IBD) characterized by chronic inflammation of the human intestine [1]. The etiology of CD remains unknown, but the most common hypothesis is that chronic inflammation results from an abnormal inflammatory response

to intestinal microbiota in a genetically susceptible host [2]. Recent studies have suggested that the composition of intestinal microbiota contributes to CD pathogenesis. In humans, the first evidence of the involvement of intestinal microbiota in IBD came from clinical data showing that diverting the flow of feces relieved the symptoms of CD [3]. Different theories regarding the role of the intestinal microbiota in CD have been developed, in particular the theory of dysbiosis and that of a persistent pathogenic infectious agent in the intestinal

\* Correspondence: [nicolas.barnich@uca.fr](mailto:nicolas.barnich@uca.fr)

<sup>†</sup>Arlette Darfeuille-Michaud is deceased.

<sup>2</sup>Université Clermont Auvergne, Inserm U1071, M2iSH, USC-INRAE 2018, 28 place Henri Dunant, 63000 Clermont-Ferrand, France

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2020 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

mucosa. However, no specific pathogen has yet been definitively identified.

*E. coli* is an important microorganism of the human intestinal microbiota and plays an important role in promoting the stability and maintenance of intestinal physiology. Through the acquisition of virulence factors, some strains of *E. coli* have become pathogenic and are implicated in the etiology of IBD [4]. The search for specific pathogens in the intestinal mucosa of patients with CD has resulted in the identification in 1998 of several candidates, among which Adherent-Invasive *E. coli* (AIEC) have much supporting evidence [5]. Since, a higher prevalence of such AIEC pathobionts, with pro-inflammatory potential, in CD patients compared to healthy subjects, have been reported in various western countries [6–8]. AIEC bacteria behave like pathobiont bacteria rather than real pathogens, and must share in the evolution of common ancestors with ExPEC strains [9]. These bacteria could be the results of an adaptation of non-pathogenic bacteria to environmental factors leading to a phenotypic characteristic. Moreover, this group of bacteria is very heterogeneous (as example AIEC isolated from adults [6, 9–11], children [12, 13], and companion animals [14]) from a phylogenetic point of view, which makes it difficult to characterize them at the molecular level. The phenotypic characteristics of these bacteria are: (1) adhesion and invasion of intestinal epithelial cells, involving a process of actin polymerization and recruitment of microtubules [5, 14], and (2) survival and replication in macrophages, leading to the massive release of the cytokine TNF, without inducing the death of the infected macrophage [15]. Two AIEC strains able to adhere to and invade different intestinal epithelial cell lines were isolated from a chronic ileal lesion in a patient with CD (AIEC LF82 (O83:H1) and NRG857c); these strains have been fully identified and closely studied [5, 14]. AIEC are distinct from other pathogenic intestinal *E. coli* in that they do not harbor genes typically associated with other pathogens [14, 16]. Several AIEC genomes were recently sequenced, and comparative genomic studies of *E. coli* strains isolated from patients with CD showed that these strains represent a heterogeneous population with a genomic profile similar to that of extraintestinal pathogenic *E. coli* strains (ExPEC) [17–21]. AIEC colonization in mice leads to strong inflammatory responses in the gut, suggesting that AIEC could play a role in CD immunopathogenesis [10, 11]. Furthermore, the presence of AIEC in the mucosa of CD patients at initial diagnosis suggests that these microorganisms may play a role in the early stages of disease onset [12].

Much of the work on this organism, and its potential role in CD, has been undertaken in Europe, North America and Australia. However, to truly consider the involvement of AIEC in CD, the presence of these bacteria in patients in other parts of the world, including

countries with high disease incidence and countries with increasing disease incidence, need to be demonstrated. In the past few decades, the incidence of CD has been increasing in developing countries. No studies have focused on the involvement of such *E. coli* strains in CD patients in Brazil. A recent study detected invasive *E. coli* in the ileum and stools of a CD patient. This strain, while able to adhere to and invade epithelial cells, does not have all the AIEC criteria [22]. The aim of this study was to isolate and characterize *E. coli* strains, particularly AIEC, associated with ileal mucosa in Brazilian CD patients.

## Results

### Patient characteristics

The median ages of in CD patients and healthy controls were  $42.3 \pm 12.0$  years and  $57.1 \pm 13.4$  years, respectively. There were 16 female and 8 male CD patients and 6 women and 5 men in the control group. The ileocolonic area was the most predominantly affected (14 patients: 58.3%), followed by the ileum (9 patients: 37.5%). Colon involvement was present in only one patient (4.1%). Stenosis was observed in 33.3% of patients, penetrating disease in 25.0%, and neither stenosis nor penetrating disease in 20.8%. Patient characteristics are shown in Table 1, patient distribution according to age at CD diagnosis is shown in Table 1, patient distribution according to disease localization is shown in Table 2, and patient distribution according to disease behavior is shown in Table 2.

### Mucosa-associated *Enterobacteriaceae* in CD patients and controls

Mucosa-associated *E. coli* were isolated from all controls and CD patients. However, a significant 6.45-fold increase ( $p = 0.0252$ ) in the level of mucosa-associated *Enterobacteriaceae* was observed in the ileal mucosa of CD patients (median:  $3.1 \times 10^5$  CFU/g of tissue) compared with that of controls (median:  $4.8 \times 10^4$  CFU/g of tissue) (Fig. 1), indicating a higher colonization rate of intestinal mucosa in CD patients than in controls.

Of the 270 *Enterobacteriaceae* isolates obtained in this study, 241 were identified as *E. coli* strains (58 in controls and 183 in CD patients). Concerning the other 29 isolated strains, 10 were *Klebsiella* sp. (2 in control

**Table 1** Patient characteristics

Patients	N	Gender F/M	Age (Years)	
			Average $\pm$ SD	Age range
Control	11	6/5	$57.1 \pm 13.4$	28–81
CD	24	16/8	$42.3 \pm 12.0$	18–66
<b>Total</b>	35	22/13	$46.1 \pm 12.9$	18–81

N number, F female, M male, SD standard deviation

**Table 2** Montreal classification of Crohn's disease

Criteria	n (%)
<b>Age at Diagnosis (A)</b>	
A1: 16 years or less	2 (8.3%)
A2: 17–40 years	17 (70.8%)
A3: 40 years or more	5 (20.8%)
<b>Localization (L)</b>	
L1: Terminal Ileum	9 (37.5%)
L2: Colon	1 (4.2%)
L3: Ileocolonic	14 (58.3%)
<b>Behavior (B)</b>	
B1: Not stenting, non-penetrating	5 (20.8%)
B2: Stenting	8 (33.3%)
B3: Penetrating	6 (25.0%)
B1p: Not stenting, non-penetrating + perianal fistula	1 (4.2%)
B2p: stenting + perianal fistula	2 (8.3%)
B3p: penetrating + perianal fistula	2 (8.3%)

subjects and 8 in CD patients) and 19 were *Enterobacter* sp. (2 in control subjects and 17 in CD patients). All identification was made by nonautomated tests.

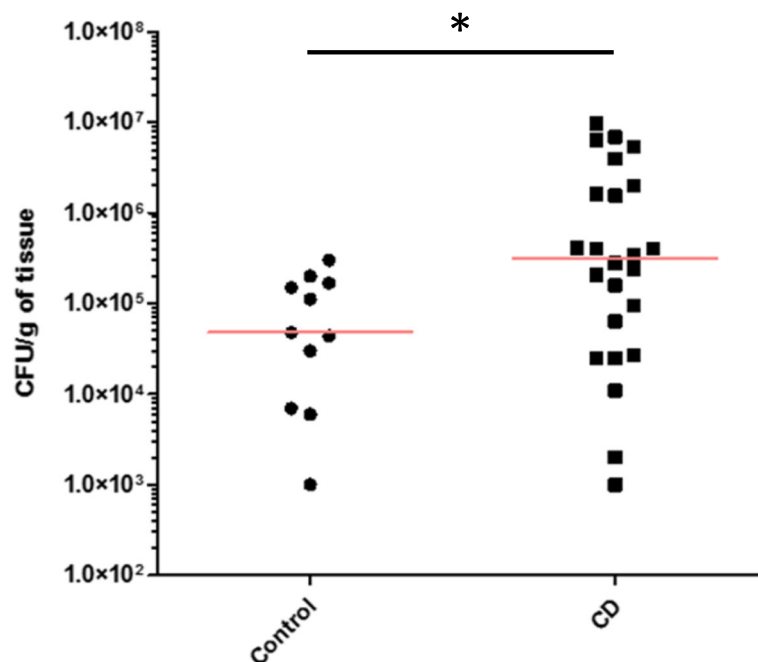
#### Phylogeny of *E. coli* strains associated with intestinal mucosa

Analysis of the phylogroup distribution of *E. coli* isolated from controls and CD patients showed no significant

difference between the two groups ( $p = 0.3797$ ) (Table 3). In the controls, most *E. coli* strains belonged to phylogroups A (44.8%) and D (36.2%). In CD patients, most strains belonged to phylogroups A (37.2%) and B1 (27.9%). The proportions of *E. coli* strains belonging to phylogroups B1 and B2 were two-fold higher in strains isolated from CD patients (B1, 27.9%; B2, 11.5%) than in those isolated from controls (B1, 13.8%; B2, 5.2%). Interestingly, CD patients in the active phase (20.2%) harbored 10-fold more *E. coli* strains belonging to the B2 group than CD patients in remission (2.0%) and 2.4-fold fewer strains of group D (12.8% CD active vs 31.3% CD remission).

#### Ability of *E. coli* strains to invade human intestinal epithelial cells

We determined the ability of the 241 *E. coli* strains isolated in this study to invade human intestinal epithelial I-407 cells. Intracellular bacteria with an abundance equal to or greater than 0.1% compared to the inoculum were classified as invasive to I-407 cells [23]. Of the 241 *E. coli* strains isolated from intestinal mucosa, 13 (5.4%) were considered invasive to epithelial cells, 7 strains in the control group and 6 in CD patients (Fig. 2). There was no global significant difference between the cell invasion profile of strains isolated from the mucosa of the control and CD groups ( $p = 0.9225$ ). Assessment of controls and CD patients showed that the abundances of most intestinal-associated *E. coli* strains (94.6%) were



**Fig. 1** Quantification of *Enterobacteriaceae* associated with the ileal mucosa of controls and patients with CD. The value of the median is shown in red. The statistical analysis was performed using the nonparametric Mann-Whitney test. \*  $p < 0.05$

**Table 3** Distribution of *E. coli* strains among the phylogenetic groups

Patients	Strains	Phylogenetic groups <sup>a</sup>			
		A	B1	B2	D
Control	58	26 (44.83%)	8 (13.79%)	3 (5.17%)	21 (36.21%)
CD	183	68 (37.16%)	51 (27.87%)	21 (11.48%)	43 (23.50%)

<sup>a</sup>The statistical analysis was performed by the Kruskal-Wallis test adjusted by Dunn’s test. No statistical difference was observed

lower than 0.1%, indicating that most strains isolated in this study had not yet evolved to select the ability to invade intestinal epithelial cells.

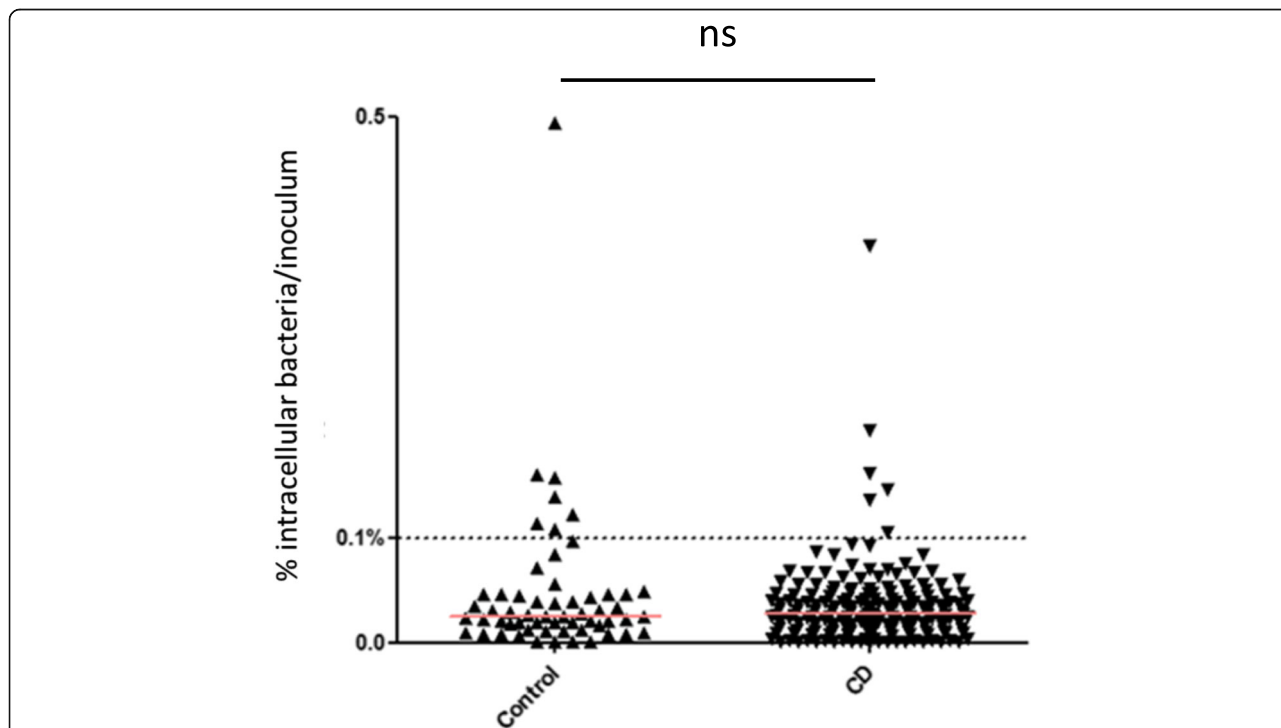
**Survival and replication within THP-1 cells**

All 13 *E. coli* strains considered invasive to I-407 cells were used for intracellular replication assays in human THP-1 macrophages. Assay results with values significantly higher than 100% (percentage of the number of bacteria at 6 h post-infection compared to 1 h post-infection) indicated that the strains were able to replicate within THP-1 cells after 24 h of infection. Of the strains tested in this study, 9 *E. coli* strains (3 in the control group and 6 in CD patients) were able to multiply within macrophages (Fig. 3). As these 9 *E. coli* strains were invasive to I-407 cells and were able to replicate within THP-1 cells, they were classified as AIEC. The ability of two out of 9

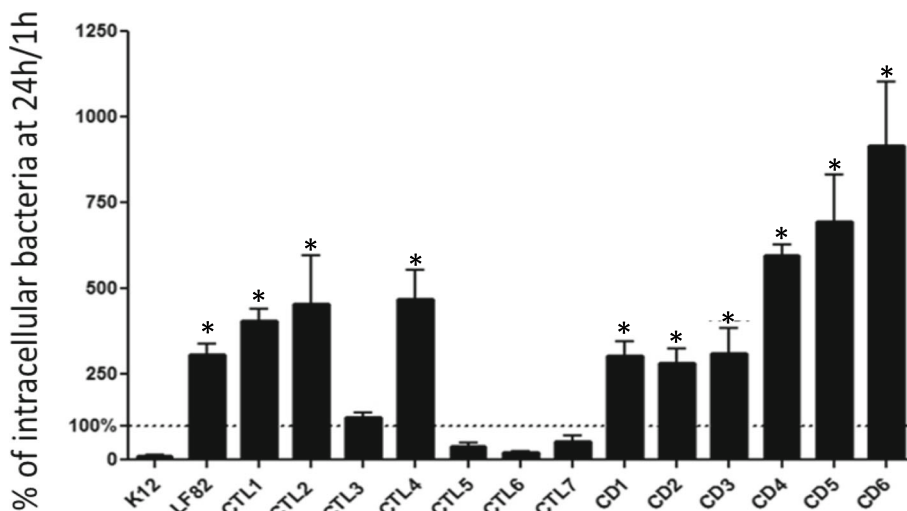
AIEC strains isolated from CD patients (samples CD5 and CD6) to survive in THP-1 cells was significantly high compared to the reference AIEC strain LF82. The production of TNF- $\alpha$  in THP-1 cells infected with the 9 *E. coli* strains identified as AIEC was measured. The strain LF82 was used as a positive control, and *E. coli* K-12, which is unable to replicate in macrophages, was used as a negative control. TNF- $\alpha$  levels were significantly higher in cells infected with AIEC strains than in uninfected cells (Fig. 4). There was no significant difference in TNF- $\alpha$  levels between AIEC strains isolated from controls and CD patients. In conclusion, 6 out of 24 CD patients harbor at least one AIEC strain (25%) compared to 3 out of 11 controls (27%).

**Association between AIEC profile and the presence of putative virulence factors and/or *fimH* polymorphisms**

We first looked for the presence of the *hcp1* and *hcp3* genes, one of the genes of the type VI secretion system potentially involved in AIEC virulence, and the *lfpA* and *gipA* genes, involved in the ability of AIEC to interact with Peyer’s patches, in AIEC strains isolated from Brazilian CD patients. We observed no association between the presence of these four genes and the AIEC phenotype of AIEC strains isolated from Brazilian CD patients (Table 4).



**Fig. 2** Invasive ability of *E. coli* strains. The results are expressed as the percentage of inoculum surviving in human Intestine-407 epithelial intestinal cells after 3 h of infection and 1 h of gentamicin treatment. The value of the median is shown in red. The statistical analysis was performed using the nonparametric Mann-Whitney test. n.s.  $p > 0.05$



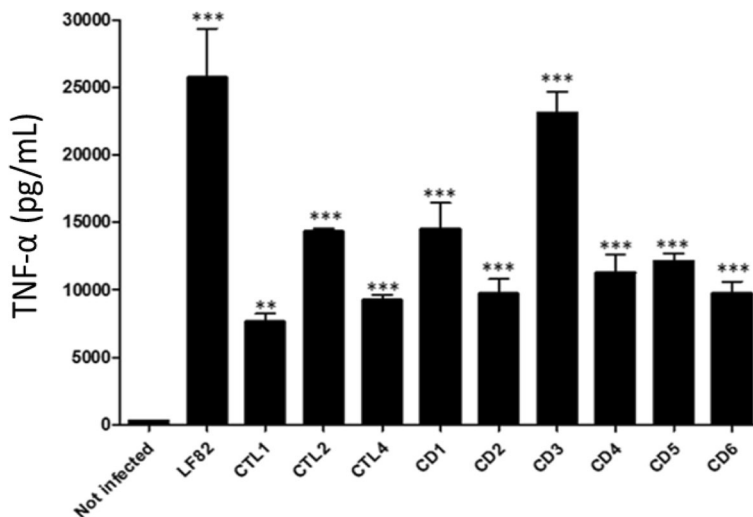
**Fig. 3** Survival and replication of *E. coli* strains within THP-1 cells. CTL, control subject samples; CD, CD patient samples. The statistical analysis was performed using a nonparametric Mann-Whitney test to determine if the value corresponding to the number of intracellular bacteria at 6 h post-infection was significantly higher than the value at 1 h post infection for each strain. \*  $p < 0.05$

In addition, the *fimH* gene in all AIEC strains isolated in this study was sequenced. For comparison, the *fimH* sequences of the LF82 and K12 strains were used for the alignment of the *fimH* sequences. In the 9 AIEC strains, 43 single base polymorphisms (SNPs) were identified in the *fimH* gene, resulting in the substitution of eight amino acids in the protein sequence. Of the 9 AIEC strains, 8 had at least one amino acid polymorphism, and only 1 (isolated from the control group, CTL2) had 100% similarity compared to the *fimH* gene of *E. coli* K12 (Table 5). Only the V27A mutation was observed in the strains isolated in this study. As reported elsewhere [24], the V27A polymorphism is not found exclusively in

AIEC strains. Thus, this variation is not classified as an exclusive pathoadaptive change associated with the AIEC phenotype but could be a mark of the transition from commensalism to pathobionts in *E. coli*.

**Discussion**

The intestinal microbiota has been associated with the etiopathogenesis of IBD [25]. Changes in the composition of the enteric microbial community, with a decrease in the number of resident bacterial species and an increase in the number of bacteria associated with the mucosa, have been observed in CD. Several independent studies have shown a considerable increase in the



**Fig. 4** TNF-α levels produced by THP-1 cells infected with AIEC strains. CTL, control subject samples; CD, CD patient samples. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  (compared to noninfected cells)

**Table 4** Analysis of the presence of putative virulence factors in AIEC strains

Strains	Phylogroup	<i>hcp1</i>	<i>hcp3</i>	<i>lpfA</i>	<i>gipA</i>
LF82	B2	+	+	+	+
CTL1	B2	-	+	-	-
CTL2	D	+	-	-	-
CTL4	A	-	-	-	-
CD1	B1	-	-	+	-
CD2	B1	-	-	+	-
CD3	B2	-	-	-	-
CD4	B1	-	-	-	-
CD5	B1	-	-	-	-
CD6	B1	-	-	-	-

population of *Enterobacteriaceae*, especially *E. coli*, in the intestinal mucosa of CD patients compared to control subjects [26, 27]. Several studies have demonstrated that the intestinal mucosa of CD patients in Western countries is abnormally colonized by pathobiont *Escherichia coli* strains with adherent and invasive properties (AIEC) [5–13, 23, 28]. Much of the work on AIEC, as well as their potential role in CD, has been undertaken in areas of high CD incidence (Europe, North America and Australia). It was currently unclear whether the changes in such putative pathogen organisms identified in Western populations are more widespread in IBD patients in regions with increasing IBD incidence, especially in Latin America and more specifically in Brazil.

Phylogenetic analyses have shown that *E. coli* strains are classified into four main phylogenetic groups (A, B1, B2 and D). Here, we demonstrate that the mucosa of

Brazilian CD patients is also heavily colonized by *Enterobacteriaceae*, mostly by *E. coli* strains. The strains isolated in this study have a more homogeneous profile when classified according to the major phylogenetic groups. However, we observed a considerable increase in the phylogroups B1 and B2 in Brazilian CD patients compared to controls, and the CD patients in the active phase harbored 10-fold more *E. coli* belonging to the B2 group than CD patients in remission. The *E. coli* strains belonging to groups A and B1 are weakly or nonpathogenic, while those belonging to groups B2 and D are most often pathogenic and are commonly associated with urinary tract and extraintestinal infections [29–32]. *E. coli* strains isolated from IBD patients in Western countries are mostly classified into groups B2 and D. While some researchers observed a similar distribution of phylogenetic groups in the control and IBD groups [13, 33–38], other studies, in agreement with our data, have reported increased colonization by strains belonging to groups B2 and D in IBD patients compared to controls [10, 24].

Several factors of CD predispose patients to the emergence of an intestinal microenvironment advantageous for effective colonization by *E. coli*, thereby contributing to susceptibility to the disease. As stated previously, *E. coli* is an important microorganism of the normal intestinal microbiota. However, *E. coli* strains associated with the mucosa of CD patients possess unusual properties, such as the ability to adhere to and invade the intestinal epithelium and to multiply within macrophages, leading to the production of large amounts of TNF- $\alpha$  [5, 14, 15, 23]. The results of our study show that most *E. coli* strains isolated in both CD patients and controls did not have the invasive phenotype. However, 6 out of 24 CD patients harbored at least one strain with characteristics of AIEC. This prevalence of CD patients harboring AIEC bacteria is consistent with data reported in the literature of adult cohorts [39]. In contrast, the prevalence of AIEC bacteria in the controls in this study was abnormally high compared to the literature. This can be explained by the low number of controls included ( $n = 11$ ) and by the fact that the controls were hospitalized patients without IBD but with other comorbidities. The 3 control patients harboring AIEC bacteria had schistosomiasis (CTL1), gallbladder neoplasia in 2009 and cholecystectomy in 2009 (CTL2), and Still's disease-rheumatic fever (CTL3). However, several independent studies have demonstrated that the mucosa of CD patients is heavily colonized by AIEC strains in comparison to a control group. The reasons for this discrepancy are not fully understood. However, it is believed that the presence of AIEC associated with the mucosa of CD patients can vary according to different populations. One of the hypotheses to explain the high prevalence of AIEC in Western countries is environmental exposure over a

**Table 5** Substitutions of amino acid residues in the AIEC strains

Strains	Mutations at amino acid residue									
	Leader Lectin domain					Pilin domain peptide				
	6	26	27	66	70	78	119	158	202	269
<b>K12</b>	<b>T</b>	<b>P</b>	<b>V</b>	<b>G</b>	<b>N</b>	<b>S</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>A</b>	<b>Q</b>
LF82			A		S	N		P		
CTL1			A							K
CTL2										
CTL4			A	S					V	
DC1		L	A							
DC2		L	A							
DC3			A		H					
DC4			A							
DC5			A							
DC6			A							

long period. It is likely that over the next few decades, *E. coli* with invasive properties will be selected in the ileal mucosa of Brazilian CD patients with abnormal colonization of adherent *E. coli* as Brazilian CD patients gradually adopt a more Western lifestyle; alternatively, the ileal mucosa of Brazilian CD patients could be contaminated by more aggressive AIEC pathobiont strains whose circulation in such populations would be favored by global travel.

Despite all the studies that have assessed the pathogenicity of AIEC strains, the genetic factors leading to the AIEC phenotype have not yet been fully characterized. AIEC strains have high genome variability, complicating the identification of specific genetic factors of the pathotype [27]. The FimH adhesin plays an essential role in the virulence of AIEC strains; bacterial adhesion occurs via an interaction between FimH adhesion and mannosylated CEACAM6 adhesion molecules, which are abnormally expressed in the ileal mucosa of 35% of CD patients in Europe [40]. Through its lectin domain, the FimH protein mediates bacterial adhesion to mannose residues present in the CEACAM6 receptor [41]. The presence of protein polymorphisms resulting from substitutions in the amino acid sequences of some FimH proteins is correlated with an increase in the ability of AIEC to adhere to the intestinal epithelium, increasing the affinity of FimH to mannose residues exposed by the CEACAM6 receptor [24]. The presence of FimH polymorphisms is thought to be one of the virulence evolution mechanisms of AIEC pathogenicity that leads to the development of chronic inflammatory bowel disease in genetically susceptible hosts. In a mouse model, it was reported that mutated FimH variants increased the ability of urinary *E. coli* isolates to colonize the urinary tract, and these variants were correlated with the overall extra-intestinal virulence of *E. coli* [42, 43]. As noted in this study, significant variations of the FimH protein of the AIEC strains isolated from Brazilian CD patients and controls have not yet been selected, except for the A27V polymorphism. Even if we showed that A27V is found in most natural FimH variants, V27A is unlikely to be pathoadaptive for AIEC in CD, as it is not sufficient to mediate a high level of bacteria binding to mannosylated CEACAM6 [24]. Another study argued that the V27A substitution (i.e., with alanine in position 27) is the primary pathoadaptive FimH mutation arising in AIEC isolated from CD pediatric patients in the entire spectrum of mucosal inflammation [44].

Other AIEC bacterial factors play a role in AIEC virulence. This is the case for the *lpfA* and *gipA* genes, which participate in the processes of AIEC interaction and survival in Peyer's patches via M cell interaction [45, 46]. The type 6 secretion system (T6SS) seems to be strongly involved in AIEC pathogenicity, but the means by which the

secretion system contributes to AIEC strain virulence remain to be elucidated. The low prevalence of these genes in the *E. coli* collection isolated in this study suggests that these mucosa-associated *E. coli* strains do not have a highly pathogenic profile. Furthermore, in agreement with the results presented above, the few strains isolated from Brazilian subjects and characterized as AIEC lack the virulence genes of the AIEC strain LF82. Note that in contrast to findings in other reports [10, 24], the AIEC strains isolated in this study belong mainly to the B1 phylogroup. These discrepancies suggest that the profile of AIEC differs according to the population in which they are isolated and that environmental, nutritional and genetic factors may be correlated both with susceptibility to disease and the success of colonization of the intestinal mucosa by strains of pathogenic *E. coli*. In our study, only a few *E. coli* isolates from Brazilian subjects had invasive properties and the ability to replicate within macrophages. In addition, sequence analysis of *fimH* genes of *E. coli* strains showed no selection of significant *fimH* polymorphisms associated with virulence, unlike in AIEC collections isolated from European patients. This indicates that strains isolated in Brazilian CD patients have probably not yet co-evolved to develop a strong adherent-invasive phenotype. We can hypothesize that these B1 and B2 strains selected in Brazilian CD patients will evolve in the future. Thus, it will be of great interest to follow the evolution of the pathogenicity of these strains over the next decade with the aim of gaining a better understanding of the high prevalence of AIEC in developed countries.

## Conclusions

In our study, we have shown that *E. coli* strains colonize the intestinal mucosa of Brazilian CD patients; however, the strains isolated from Brazilian CD patients have probably not yet co-evolved with their hosts and therefore have not developed a strong adherent-invasive phenotype. Thus, it will be important to conduct further studies to investigate the evolution of such strains in the Brazilian population to understand the emergence of AIEC pathogens in Western countries or to follow the circulation of the more aggressive AIEC pathobiont strains in Brazilian populations, as these strains could be favored by global travel.

## Methods

### Patients

Thirty-five subjects, 24 CD patients and 11 controls, were enrolled between March 2012 and August 2013 at the Instituto Alfa de Gastroenterologia (IAG), Hospital das Clínicas (HC), Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil. The diagnosis of CD in the patients was based on clinical, laboratory, radiological, endoscopic and histopathological findings. The

control group comprised individuals who had undergone routine ileocolonoscopy at the hospital without any clinicopathological diagnosis of inflammatory disease. None of the patients had received antibiotics in the 2 weeks before sampling. Ileal mucosa biopsy specimens were spread onto MacConkey agar, and the isolates were identified as previously described [47]. The strains were isolated in Brazil and characterized by a metabolic macromethod using an old procedure used in the article published by Pessoa et al. [47]. The characterization of the strains was then confirmed in the laboratory in France, following isolation on Drigalski selective medium. Then, strain identification was confirmed using the well-established API 20 E strips (Biomerieux) method for manual microorganism identification at the species level, and **APIWEB** software containing all of the API databases was used for a reliable automated interpretation of API strip results.

#### Bacterial strains

Of the Enterobacteriaceae isolated from mucosa, 241 were identified as *E. coli* strains, 183 from the mucosa of CD patients and 58 from controls. The AIEC reference strain LF82, which was isolated from a chronic ileal lesion of a CD patient [5], and the nonpathogenic *E. coli* K-12 strain MG1655 were used in the experiments. Bacteria were grown in Luria-Bertani (LB) broth overnight at 37 °C without shaking.

#### *E. coli* phylotyping

The *E. coli* phylogroup of each strain was determined by the multiplex PCR technique described by Clermont et al.; this technique assigns strains to phylogroups A, B1, B2 and D based on the presence/absence of three genes (*chuA*, *yjaA* and *TspE4.C2*) [48].

#### Cell lines and cell culture

Human intestinal epithelial Intestine-407 cells (ATCC, CCL-6) were maintained in an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C in modified Eagle's Minimal Essential Medium (EMEM, PAA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Lonza), 1% nonessential amino acids (PAA), 1% L-glutamine (PAA), 200 U/L penicillin, 50 mg/mL streptomycin and 0.25 mg/L amphotericin B with 1% vitamins (PAA).

Human monocytic THP-1 cells (ATCC, TIB-202) were maintained in an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C in RPMI 1640 medium (PAA) supplemented with 10% FBS and 1% L-glutamine (PAA). THP-1 monocytes were differentiated into macrophages by treatment with 20 ng/mL phorbol myristate acetate (PMA; Sigma) for 24 h.

#### Invasion assay

The number of invasive bacteria in Intestine-407 cells was determined by the gentamicin protection assay as previously described [14]. Briefly, Intestine-407 cells were seeded at a density of  $2 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> in 24-well plastic plates in the cell culture medium described above without antibiotics. After 24 h of culture at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> (allowing cells to reach 80–90% confluence), the cells were infected at a multiplicity of infection (MOI) of 10 for 3 h. Cells were washed with PBS and incubated in cell culture medium containing 100 µg/mL gentamicin (Euromedex) for 1 h to kill extracellular bacteria (the bactericidal effect of gentamicin at this concentration was validated on all the strains tested). After washing, the epithelial cells were lysed with 1% Triton X-100 (Sigma) in deionized water. Samples were diluted and plated onto LB agar plates to determine the number of CFUs 24 h later.

#### Macrophage survival assay

THP-1 cells were seeded on 24-well tissue culture plates at a density of  $2.5 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> and infected at an MOI of 25 for 20 min. Infected cells were then washed and incubated with culture medium containing 50 µg/mL gentamicin for 40 min (1 h after infection) or 24 h (24 h after infection) [49].

#### Enzyme-linked immunosorbent assay for TNF-α quantification

Macrophages were infected as described above, and the amount of TNF-α in the culture supernatant was measured. All collected supernatants were frozen at –80 °C until processing. Released pro-inflammatory TNF-α cytokines were quantified in the supernatant by ELISA using kits from R&D systems following the manufacturer's instructions.

#### Detection of virulence factors by PCR

The presence or absence of the *hcp1*, *hcp3*, *lpfA* and *gipA* genes was analyzed by PCR. The primers, PCR conditions and product sizes are given in Table 6.

#### Sequencing of the *fimH* gene

To amplify the *fimH* gene, a pair of primers was designed based on conserved regions of the *E. coli* sequences deposited in GenBank: K-12 MG1655 (NC000913.3), LF82 (AF288194.1), UPEC (NC004431) and APEC 01 (NC008563). Primers and PCR conditions are given in Table 6. After purification with the Wizard<sub>SV</sub> Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA), PCR products were sequenced (Sanger sequencing technique using the barcode system, Eurofins Genomics Europe Sequencing, Germany). Nucleotide sequences were obtained from both strands and analyzed



**Table 6** Primer sequences and PCR conditions used to detect the *hcp1*, *hcp3*, *lpfA*, *gipA* and *fimH* genes

Gene	Primer sequencing (5'-3')	PCR conditions	Product (pb)	Reference
<i>hcp1</i>	F: AACACCACTGGAGTACCTG R: TGGTACTTAGCAAGAAAGAGC	95 °C 3 min., 35 cycles (95 °C 45 s., 55 °C 30 s, e 72 °C 45 s.) e 68 °C 8 min.	999	This study
<i>hcp3</i>	F: CGAAATCAGTCTTGTCGCC R: GGGTTTCCTATCGTGTCT	95 °C 3 min., 35 cycles (95 °C 45 s., 55 °C 30 s, e 72 °C 45 s.) e 68 °C 8 min.	745	This study
<i>lpfA</i>	F: GGCCTTCTTTCAGACGGTA R: CTGAAAACCTGCGATATCTCC	95 °C 3 min., 35 cycles (95 °C 45 s., 57 °C 30 s, e 72 °C 45 s.) e 68 °C 8 min.	199	[45]
<i>gipA</i>	F: GTCGTTGCGCCACCAACAA R: ACGGCGCAGATGGTAATTCT	94 °C 5 min., 35 cycles (94 °C 1 m., 55 °C 1 m, e 72 °C 30 s.) e 72 °C 10 min.	200	[46]
<i>fimH</i>	F: ATTCCTACAATCAGCGCAC R: CGCGTCTTATCTGGCCTACA	95 °C 3 min., 35 cycles (95 °C 45 s., 57 °C 30 s, e 72 °C 45 s.) e 68 °C 8 min.	1125	This study

for editing by the CAP3 Sequence Assembly Program (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>) and the BLAST homology search program (blastN) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Alignment analysis was carried out by the Multalin Page interface program (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin>). The sequences were converted into amino acids with the Expasy Translate Tool (<http://ca.expasy.org/tools/dna.html>).

### Statistical analysis

The data were analyzed with GraphPad Prism software version 5.00 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). To compare proportions of strains belonging to different phylogroups, we carried out statistical analysis using the Kruskal-Wallis test adjusted by Dunn's test. To compare the values of bacteria associated with the ileal mucosa or the level of invasion of different isolated bacteria between CD patients and controls, since the values do not present a normal distribution, we used the nonparametric Mann-Whitney test. For each strain, to determine the value corresponding to the number of intramacrophagic bacteria at 24 post-infection was significantly higher than that at 1 h post-infection, we used the nonparametric Mann-Whitney test. To compare the level of TNF alpha secretion by macrophages infected with AIEC strains at 24 h post-infection compared to uninfected cells, we used a one-way ANOVA test followed by the Newman-Keuls test. All experiments were performed at least three times. The results with  $p < 0.05$  were considered significant.

### Abbreviations

CD: Crohn's disease; AIEC: Adherent-invasive *Escherichia coli*; IBD: Inflammatory bowel disease; ExPEC: Extraintestinal pathogenic *E. coli* strains; T6SS: Type 6 secretion system; IAG: Instituto Alfa de Gastroenterologia; HC: Hospital das Clínicas; UFMG: Federal University of Minas Gerais; LB: Luria-Bertani; PCR: Polymerase chain reaction; MOI: Multiplicity of infection; SNPs: Single base polymorphisms

### Acknowledgements

The authors would like to thank the staff of the Instituto Alfa de Gastroenterologia (IAG), Hospital das Clínicas (HC), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) for providing the bowel biopsies. Thanks to the anonymous reviewers and editors for strengthening this manuscript.

### Authors' contributions

RFAC, ADM, FSM and NB contributed to the study design. RFAC collected samples, analyzed and interpreted the patient data and identified *E. coli* strains under the guidance of MLAF and FSM. RFAC performed *E. coli* phylotyping, experiments on cell cultures and detection of virulence factors by PCR under the guidance of ADM, MAB and NB. RFAC, FSM and NB analyzed data and also wrote the manuscript. All authors, except for ADM, read and approved the final manuscript. ADM, unfortunately, died during the study execution and, therefore, could not participate in its conclusion. All authors read and approved the manuscript.

### Funding

RFAC received a PhD fellowship from Brazilian Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and the French government's "Eiffel excellence scholarship". This work was financial supported by the Ministère de la Recherche et de la Technologie, Inserm (UMR1071) and INRAE (USC-2018). The funders had no role in the design of the study and collection, analysis, and interpretation of data and in writing the manuscript and decision to publish.

### Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are included in this article.

### Ethics approval and consent to participate

All work in this study was approved Ethics Committee of Federal University of Minas Gerais, Brazil (# CAAE – 00836712.4.0000.5149). Informed consent was obtained from all patients before sample collection. All participants signed a written consent. No participant was under 16 years old.

### Consent for publication

Not applicable.

### Competing interests

None of the investigators has any financial interest or financial conflict with the subject matter or materials discussed in this report. The authors declare they have no competing interests.

### Author details

<sup>1</sup>Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. <sup>2</sup>Université Clermont Auvergne, Inserm U1071, M2iSH, USC-INRAE 2018, 28 place Henri Dunant, 63000 Clermont-Ferrand, France. <sup>3</sup>Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil. <sup>4</sup>Instituto Alfa de Gastroenterologia, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. <sup>5</sup>Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, AgroSup Dijon, CNRS, INRAE, Université Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon, France.

Received: 27 February 2020 Accepted: 12 June 2020

Published online: 23 June 2020

## References

- Duchmann R, Zeitz M. Crohn's disease. In: Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, Bienenstock J, McGhee JR, editors. Mucosal Immunology. San Diego: Academic; 1999. p. 1055–80.
- Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001;41:603–6.
- Rutgeerts P, Goboos K, Peeters M, Hiele M, Penninckx F, Aerts R, et al. Effect of faecal stream diversion on recurrence of Crohn's disease in the neoterminal ileum. *Lancet*. 1991;338:771–4.
- Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*. 1998; 11:142–201.
- Darfeuille-Michaud A, Neut C, Barnich N, Lederman E, Di Martino P, Desreumaux P, Gambiaez L, et al. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1998;115: 1405–11.
- Neut C, Bulois P, Desreumaux P, Membre JM, Lederman E, Gambiaez L, et al. Changes in the bacterial flora of the neoterminal ileum after ileocolonic resection for Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*. 2002;97:939–46.
- Martin HM, Campbell BJ, Hart CA, Mpofu C, Nayar M, Singh R, et al. Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology*. 2004;127:80–93.
- Conte MP, Schippa S, Zamboni I, Penta M, Chiarini F, Seganti L, et al. Gut-associated bacterial microbiota in paediatric patients with inflammatory bowel disease. *Gut*. 2006;55:1760–7.
- Baumgart M, Dogan B, Rishniw M, Weitzman G, Bosworth B, Yantiss R, et al. Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of Clostridiales in Crohn's disease involving the ileum. *ISME J*. 2007;1:403–18.
- Kotlowski R, Bernstein CN, Sepehri S, Krause DO. High prevalence of *Escherichia coli* belonging to the B2+D phylogenetic group in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2007;56:669–75.
- Sasaki M, Sitaraman SV, Babbini BA, Gerner-Smidt P, Ribot EM, Garrett N, et al. Invasive *Escherichia coli* are a feature of Crohn's disease. *Lab Invest*. 2007;87:1042–54.
- Eaves-Pyles T, Allen CA, Taormina J, Swidsinski A, Tutt CB, Jezek GE, et al. *Escherichia coli* isolated from a Crohn's disease patient adheres, invades, and induces inflammatory responses in polarized intestinal epithelial cells. *Int J Med Microbiol*. 2008;298:397–409.
- Martinez-Medina M, Aldegue X, Lopez-Siles M, González-Huix F, López-Oliu C, Dahbi G, et al. Molecular diversity of *Escherichia coli* in the human gut: new ecological evidence supporting the role of adherent-invasive *E. coli* (AIEC) in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2009;15:872–82.
- Boudeau J, Glasser AL, Masseret E, Joly B, Darfeuille-Michaud A. Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infect Immun*. 1999;67:4499–509.
- Glasser AL, Boudeau J, Barnich N, et al. Adherent invasive *Escherichia coli* strains from patients with Crohn's disease survive and replicate within macrophages without inducing host cell death. *Infect Immun*. 2001;69:5529–37.
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2:123–40.
- Clarke DJ, Chaudhuri RR, Martin HM, Campbell BJ, Rhodes JM, Constantinidou C, et al. Complete genome sequence of the Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* strain HM605. *J Bacteriol*. 2011;193:4540.
- Krause DO, Little AC, Dowd SE, Bernstein CN. Complete genome sequence of adherent invasive *Escherichia coli* UM146 isolated from ileal Crohn's disease biopsy tissue. *J Bacteriol*. 2010;193:583.
- Miquel S, Peyretailade E, Claret L, de Vallee A, Dossat C, Vacherie B, et al. Complete genome sequence of Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* strain LF82. *PLoS One*. 2010;5:e12714.
- Nash JH, Villegas A, Kropinski AM, Aguilar-Valenzuela R, Konczyk P, Mascarenhas M, et al. Genome sequence of adherent-invasive *Escherichia coli* and comparative genomic analysis with other *E. coli* pathotypes. *BMC Genomics*. 2010;11:667.
- Vejborg RM, Hancock V, Petersen AM, Krogfelt KA, Klemm P. Comparative genomics of *Escherichia coli* isolated from patients with inflammatory bowel disease. *BMC Genomics*. 2011;12:316.
- Santos AC, Romeiro F, Sasaki L, Rodrigues J. *Escherichia coli* from Crohn's disease patient displays virulence features of enteroinvasive (EIEC), enterohemorrhagic (EHEC), and enteroaggregative (EAEC) pathotypes. *Gut Pathog*. 2015;7:2.
- Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser AL, Barnich N, et al. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2004;127:412–21.
- Dreux N, Denizot J, Martinez-Medina M, Mellmann A, Billig M, Kisiela D, et al. Point mutations in FimH adhesion of Crohn's disease associated adherent-invasive *Escherichia coli* enhance intestinal inflammatory response. *PLoS Pathog*. 2013;9:e1003141.
- Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2008;134:577–94.
- Carrière J, Darfeuille-Michaud A, Nguyen HT. Infectious etiopathogenesis of Crohn's disease. *World J Gastroenterol*. 2014;20:12102–17.
- Martinez-Medina M, Garcia-Gil LJ. *Escherichia coli* in chronic inflammatory bowel diseases: an update on adherent invasive *Escherichia coli* pathogenicity. *World J Gastrointest Pathophysiol*. 2014;5:213–27.
- Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, et al. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2002;122:44–54.
- Selander RK, Caugant DA, Whittam TS. Genetic structure and variation in natural populations of *Escherichia coli*. In: Neidhardt FC, Ingraham JL, Low KB, Magasanik B, Schaechter M, Umberger HE, editors. *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 1987. p. 1625–48.
- Herzer PJ, Inouye S, Inouye M, Whittam TS. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1990;172:6175–81.
- Wirth T, Falush D, Lan R, Colles F, Mensa P, et al. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol Microbiol*. 2006;60:1136–51.
- Moulin-Schouleur M, Reperant M, Laurent S, Bree A, Mignon-Grasteau S, et al. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. *J Clin Microbiol*. 2007;45:3366–76.
- Ryan P, Bennett MW, Aarons S, Lee G, Collins JK, O'Sullivan GC, O'Connell J, Shanahan F. PCR detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in Crohn's disease granulomas isolated by laser capture microdissection. *Gut*. 2002;51:665–70.
- Nowrouzian FL, Adlerberth I, Wold AE. 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*. 2006;8:834–40.
- Sepehri S, Kotlowski R, Bernstein CN, Krause DO. Phylogenetic analysis of inflammatory bowel disease associated *Escherichia coli* and the fimH virulence determinant. *Inflamm Bowel Dis*. 2009;15:1737–45.
- Schipa S, Conte MP, Borrelli O, Iebba V, Aleandri M, Seganti L, et al. Dominant genotypes in mucosa-associated *Escherichia coli* strains from pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2009;15:661–72.
- Sepehri S, Khafipour E, Bernstein CN, Coombes BK, Pilar AV, Karmali M, et al. Characterization of *Escherichia coli* isolated from gut biopsies of newly diagnosed patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17:1451–63.
- Elliott TR, Hudspeth BN, Wu G, Cooley M, Parkes G, Quiñones B, et al. Quantification and characterization of mucosa-associated and intracellular *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2013;19:2326–38.
- Palmela C, Chevarin C, Xu Z, Torres J, Sevrin G, Hirten R, Barnich N, et al. Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2018; 67:574–87.
- Barnich N, Carvalho FA, Glasser AL, Darcha C, Jantschke P, Allez M, et al. CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive *E. coli*, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *J Clin Invest*. 2007;117:1566–74.
- Nilsson LM, Thomas WE, Sokurenko EV, Vogel V. Elevated shear stress protects *Escherichia coli* cells adhering to surfaces via catch bonds from detachment by soluble inhibitors. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72:3005–10.
- Hommals F, Gouriou S, Amorin C, Bui H, Rahimy MC, Picard B, et al. The FimH A27V mutation is pathoadaptive for urovirulence in *Escherichia coli* B2 phylogenetic group isolates. *Infect Immun*. 2003;71:3619–22.
- Sokurenko EV, Chesnokova V, Doyle RJ, Hasty DL. Diversity of the *Escherichia coli* type 1 fimbrial lectin. Differential binding to mannosides and uroepithelial cells. *J Biol Chem*. 1997;272:17880–6.

44. Iebba V, Conte MP, Lepanto MS, Di Nardo G, Santangelo F, et al. Microevolution in fimH gene of mucosa-associated *Escherichia coli* strains isolated from inflammatory bowel disease pediatric patients. *Infect Immun*. 2012;80:1408–17.
45. Chassaing B, Rolhion N, de Vallée A, Salim SY, Prorok-Hamon M, Neut C, et al. Crohn disease-associated adherent-invasive *E. coli* bacteria target mouse and human Peyer's patches via long polar fimbriae. *J Clin Invest*. 2011;121:966–75.
46. Vazeille E, Chassaing B, Buisson A, Dubois A, de Vallée A, Billard E, et al. GipA factor supports colonization of Peyer's by Crohn's disease-associated *Escherichia coli*. *Inflamm Bowel Dis*. 2016;22:68–81.
47. Pessoa GVA, Silva EAM. Meios de Rugai e lisina-motilidade combinados em um só tubo para a identificação presuntiva de enterobactérias. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 1972;32:97–100.
48. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol*. 2000;66:4555–8.
49. Bringer MA, Barnich N, Glasser AL, Bardot O, Darfeuille-Michaud A. HtrA stress protein is involved in intramacrophagic replication of adherent and invasive *Escherichia coli* strain LF82 isolated from a patient with Crohn's disease. *Infect Immun*. 2005;73:712–21.

### Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:**

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

**At BMC, research is always in progress.**

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)

