



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



O PAPEL DA *Escherichia coli* NA RETOCOLITE ULCERATIVA

THAISY MILANELLI CANHIZARES

BOTUCATU - SP

2017

Instituto de Biociências – Seção Técnica de Pós-Graduação
Distrito de Rubião Júnior s.n CEP 18618-970 Botucatu SP Brasil
posgraduacao@ibb.unesp.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Julio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

O PAPEL DA *Escherichia coli* NA RETOCOLITE ULCERATIVA

THAISY MILANELLI CANHIZARES

JOSIAS RODRIGUES

(ORIENTADOR)

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética).

BOTUCATU - SP

2017

Instituto de Biociências – Seção Técnica de Pós-Graduação
Distrito de Rubião Júnior s.n CEP 18618-970 Botucatu SP Brasil
posgraduacao@ibb.unesp.br

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

Canhizares, Thaisy Milanelli.
O papel da *Escherichia coli* na retocolite ulcerativa.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2017
Orientador: Josias Rodrigues
Palavras-chave: *Escherichia coli*; Retocolite ulcerativa, fatores envolvidos,

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela sabedoria e discernimento dados para que eu conseguisse concluir esse trabalho com sucesso;

Aos meus pais, Rosana e Valdecir, a minha irmã Luana, minha prima Larissa, minha amiga Raquel e toda a minha família por toda força, apoio e confiança na minha capacidade de realizar esse trabalho;

Aos amigos que fiz no decorrer desses dois anos, principalmente, Gabriela, Vanessa, Monique, João e Aline, por toda a ajuda, apoio, confiança e principalmente, pela amizade, que levarei comigo sempre. Agradeço em especial a minha companheira de laboratório e amiga Ana Carolina, por todos os ensinamentos dados nesses dois anos, pela amizade e apoio que foram essenciais para que eu concluísse esse trabalho.

Ao meu orientador Josias Rodrigues, por toda a experiência, ensinamentos e apoio a mim dados nesse período de dois anos.

Ao professor assistente doutor Silvio Luis, ao professor titular Eduardo Bagagli e a pós-doutoranda Elisane Lenita, por toda a ajuda e motivação.

Pelo programa de Pós-Graduação e pela Capes, pelo suporte e apoio dados.

Obrigada a todos! Sem cada um de vocês, isso não seria possível!

“As dificuldades preparam pessoas comuns para destinos extraordinários.”

C. S. Lewis

RESUMO

Retocolite Ulcerativa (RU) é um tipo de patologia que acomete o cólon intestinal, se apresentando na forma de lesões superficiais de gravidade variável. Não possui causa definida, mas sabe-se que é influenciada por fatores genéticos e ambientais, na qual, esse último, inclui um desequilíbrio na composição de espécies da microbiota intestinal. *Escherichia coli* (*E. coli*), uma das bactérias que se encontra aumentada nesses pacientes, tem sido foco de estudos de caracterização, com o objetivo de esclarecer sua participação na etiologia ou complicação dos sintomas da doença. Esse trabalho adotou essa abordagem para a caracterização de uma coleção de *E. coli* isoladas de portadores de RU atendidos no Hospital das Clínicas da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (HC/UNESP) de Botucatu, com base em sua capacidade de produção de biofilme, sorotipagem e filotipagem. Juntamente a esses testes, foi realizada uma revisão bibliográfica sobre a possível relação da *E. coli* com a RU. O objeto de estudo dos testes foi uma coleção de *E. coli* composta por 68 isolados bacterianos de 34 portadores de RU e 44 de 22 indivíduos controle (CO). A tipagem bacteriana teve como foco genes que identificam os sorogrupos O25 e O83 e determinação de filogrupos da coleção de referência de *E. coli* (EcoR – A, B1, B2 e D). Os resultados obtidos foram: 1) predomínio de *E. coli* dos filogrupos B2 e A nos grupos CO (54,5% x 26,5%, $p=0,01$) e de portadores de RU (32,4% x 9,1%, $p=0,04$) respectivamente, 2) no grupo portador de RU, 8,8% e 11,8% dos indivíduos apresentaram os sorogrupos O25 e O83, respectivamente e, entre os CO, a prevalência de ambos os sorogrupos foi de 4,5% e, 3) isolados produtores de biofilme forte (Fo), moderado (Mo) e fraco (Fra) foram encontrados em 45,5%, 22,7% e 27,3% dos CO, respectivamente. Em portadores de RU, a prevalência foi de 32,4%, 8,8% e 14,7%, respectivamente. A divergência nos dados de filotipagem em relação à literatura denota o caráter de extensa variabilidade observada nas populações naturais de *E. coli* e que dificulta sua vinculação com a causa da RU. A ausência de diferença na prevalência de isolados produtores de biofilme entre os grupos sugere que tal propriedade não pode ser vinculada a um eventual potencial de *E. coli* em provocar ou complicar os sintomas da RU. A análise bibliográfica mostrou resultados divergentes sobre a relação da *E. coli* na RU, possivelmente devido às variações no método de colheita, características teciduais e método de quantificação das culturas, sendo necessário mais pesquisas sobre o tema para sua maior clareza.

ABSTRACT

Ulcerative colitis (UC) is a type of pathology that affects the intestinal colon, presenting as superficial lesions of different severity. It has no defined cause, but it is known to be influenced by genetic and environmental factors, which includes an imbalance in the composition of species of the intestinal microbiota. *Escherichia coli* (*E. coli*), one of the bacteria that is increased in these patients, has been the focus of characterization studies, to clarify its participation in the etiology or complication of the disease's symptoms. Following a line of research already consolidated in our laboratory, this work adopted this approach for the characterization of a collection of *E. coli* isolated from UC patients treated at the HC / UNESP of Botucatu, based on its biofilm production capacity, serotyping and filotyping. Also, a literature review was performed on the possible relationship between *E. coli* and UC. The study's object of these tests was a collection of *E. coli* composed of 68 bacterial isolates from 34 UC carriers and 44 from 22 control individuals (CO). Bacterial typing focused on genes that identify the O25 and O83 serogroups and determination of phylogroups from the *E. coli* reference collection (EcoR - A, B1, B2 and D). The results obtained were: 1) Predominance of *E. coli* of the phylogenetic groups B2 and A in the CO groups (54.5% x 26.5%, $p = 0.01$) and in the UC group (32.4% x 9, 1, $p = 0.04$), respectively. 2) In the UC group, 8.8% and 11.8% of the individuals had serogroups O25 and O83, respectively, and among CO, the prevalence of both serogroups was 4,5% and, 3) Isolated producers of strong (St), moderate (Mo) and weak (We) biofilms were found in 45,5%, 22,7% e 27,3% of the CO, respectively. In UC patients, the prevalence was 32.4%, 8.8% and 14.7%, respectively. The divergence in the data of phylotyping in relation to the literature denotes the character of extensive variability observed in the natural populations of *E. coli* and that makes it difficult to be linked to the cause of the UC. The absence of a difference in the prevalence of biofilm isolates among the groups suggests that such property can't be linked to an eventual potential of *E. coli* to cause or complicate UC symptoms. The literature analysis showed divergent results on the relationship of *E. coli* and UC, possibly due to variations in the collection method, tissue characteristics and quantification method of the cultures, being necessary more researches on the subject for its greater clarity.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA - Adesão agregativa

CO - Controle

DAEC - *Escherichia coli* de adesão difusa

DC - Doença de Crohn

DEC - *Escherichia coli* diarreio gênica

DII - Doença inflamatória intestinal

DO - Densidade óptica

EAEC - *Escherichia coli* enteroagregativa

EcN - *Escherichia coli* Nissle 1917

EcoR - Coleção de referência de *Escherichia coli*

EHEC - *Escherichia coli* enterohemorrágica

EIEC - *Escherichia coli* enteroinvasora

EPEC - *Escherichia coli* enteropatogênica

ETEC - *Escherichia coli* enterotoxigênica

ExPEC - *Escherichia coli* patogênica extraintestinal

FEB - Formação específica de biofilme

MEM - Meio essencial mínimo

PCR - Reação em cadeia da polimerase

RU - Retocolite Ulcerativa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 RETOCOLITE ULCERATIVA	10
1.1.1 Histórico	10
1.1.2 Manifestações clínicas e diagnóstico.....	11
1.1.3 Patogênese e características epidemiológicas.....	12
1.1.4 Terapia	13
1.2 FATORES ENVOLVIDOS NA RETOCOLITE ULCERATIVA.....	15
1.2.1 Fatores Genéticos	15
1.2.2 Fatores Ambientais	16
1.3 <i>Escherichia coli</i>	17
2. OBJETIVOS.....	24
2.1 Geral.....	24
2.2 Específicos	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Isolados de <i>E. coli</i>	26
3.2 Formação específica de biofilme (FEB)	26
3.3 Detecção dos sorogrupos O25 e O83.....	27
3.4 Classificação de filogrupos da EcoR	28
3.5 Análise estatística	28
CAPÍTULO 1	30
4. CAPÍTULO 1	31
CAPÍTULO 2	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 RETOCOLITE ULCERATIVA

A Retocolite Ulcerativa (RU), juntamente com a Doença de Crohn (DC) compõe as chamadas doenças inflamatórias intestinais (DII). Termo genérico que reflete um quadro patológico de causa desconhecida e resultante de uma resposta imune crônica, a qual é associada à ocorrência de lesões ao longo do aparelho digestivo, sendo o intestino, o local mais afetado [1]. Apesar de ambas as patologias pertencerem ao mesmo grupo de doenças, elas possuem características bem distintas, sendo a RU, a forma mais comum de DII em todo o mundo [2]. A RU é caracterizada pela ocorrência de inflamação e ulceração na mucosa do cólon, na qual essas são superficiais e apresentam-se difusas afetando principalmente a região terminal do intestino grosso (reto e sigmoide) [1]. Portadores dessa doença apresentam dores abdominais e diarreia com sangue e muco. Os achados histológicos característicos são inflamação aguda e crônica da mucosa por leucócitos polimorfonucleares e células mononucleares, abscessos de cripta, distorção das glândulas mucosas e depleção de células caliciformes.

1.1.1 Histórico

A RU foi descrita com esse nome pelo médico britânico Sir Samuel Wilks, em 1859. O termo foi dado devido a uma autópsia que ele realizou em uma mulher, de 42 anos de idade, que faleceu depois de vários meses manifestando febre e diarreia constante [4, 5]. Na autópsia, observou-se inflamação e ulcerações no cólon e o reto da paciente, porém, a doença só foi caracterizada patologicamente pelo próprio Wilks e Moxon (outro pesquisador da época), em 1875. Nesse ano, eles identificaram um exemplo precoce de RU em uma jovem que havia falecido, devido a uma diarreia sanguinolenta grave [4]. Esses acontecimentos foram responsáveis por uma série de descobertas sobre a doença no decorrer dos anos, conforme relatado a seguir.

Em 1909, a Sociedade Real de Medicina da Inglaterra organizou um simpósio para estudar 307 casos de RU, colhidos a partir dos hospitais de Londres [4]. No ano de 1938, a professora sueca de medicina, Nanna Svartz descobriu a sulfasalazina, um medicamento que é usado até hoje no tratamento da RU, ajudando a controlar sintomas e reduzindo a inflamação

crônica do intestino [5]. Em 1960, os cirurgiões ingleses Hugh Lockhart-Mummery e Basil Clifford Morson estabeleceram que a RU e a DC são doenças distintas, apesar de fazerem parte do mesmo grupo (DII) [6]. Em 1990, a Fundação Americana de Crohn e Colite publicou uma pesquisa na qual reconheceu a gravidade das DII e o primeiro jornal científico sobre o tema [7]. Com base nesses achados e com os atuais recursos da tecnologia, as pesquisas sobre as características e tratamentos da RU continuam em expansão.

1.1.2 Manifestações clínicas e diagnóstico

A presença de diarreia com sangue e muco é o principal sintoma intestinal da RU. Sintomas extraintestinais como dor abdominal, febre, mal-estar e perda de peso, também podem estar presentes dependendo da extensão da doença no paciente. Em casos mais graves (como câncer ou perfuração intestinal), uma intervenção cirúrgica pode ser necessária [8, 9].

A forma mais comum de se obter o diagnóstico do paciente é, inicialmente, através do exame de colonoscopia, na qual um aparelho contendo uma câmera (colonoscópio) é introduzido no reto do paciente e percorre o intestino mostrando seu estado (Figura 1). Entretanto, somente o exame não é o suficiente para definir um diagnóstico, sendo necessária também, uma análise de biópsias intestinais para determinar características histológicas específicas [10]. As inflamações que acometem o intestino desses pacientes são superficiais e difusas (Figura 1B) e, histologicamente, observa-se na mucosa, infiltrado neutrofilico, redução de células caliciformes, intensa inflamação nas criptas, destruição de células epiteliais e formação de abscessos [1, 3].

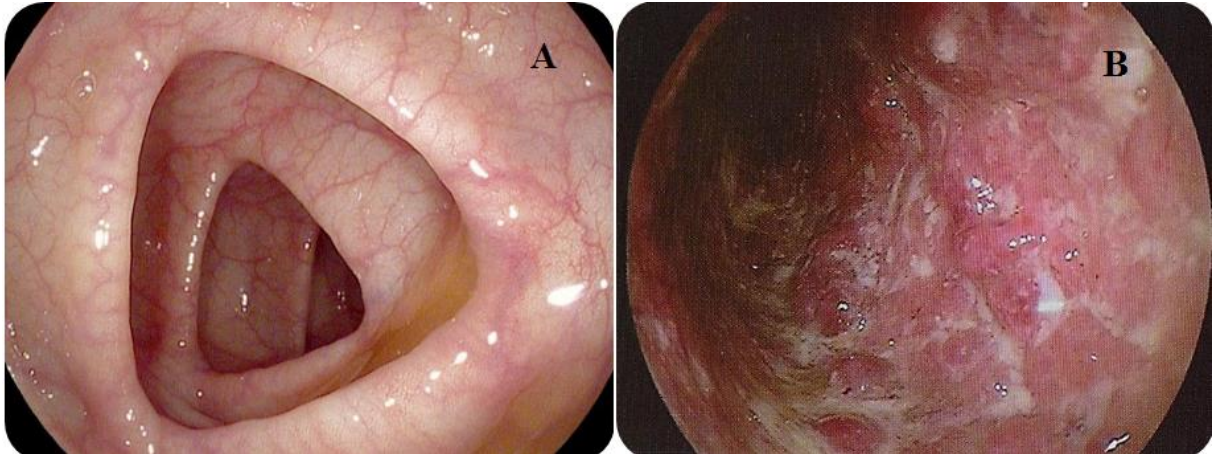


Figura 1. A - Imagem colonoscópica do cólon transverso de um indivíduo CO. B - Imagem colonoscópica do sigmoide de um paciente com RU. Imagens obtidas de pacientes do Hospital das Clínicas de Botucatu através de exames de colonoscopia.

Para mensurar a atividade e a gravidade da RU no paciente, vários sistemas de avaliação que integram aspectos clínicos e endoscópicos foram criados. O mais comum é o Escore de Mayo, método que se baseia na avaliação de quatro tópicos: 1) quantidade de evacuações diárias, 2) presença de sangramento retal, 3) achados endoscópicos do paciente e 4) avaliação global (como desconforto abdominal e bem-estar). Os resultados são pontuados de 0-3 de acordo com a gravidade dos sintomas em questão [11]. Com base na soma dos pontos, a gravidade da doença pode ser classificada como: em estado normal ou remissão (0-2 pontos), em atividade leve (3-5 pontos), em atividade moderada (6-10 pontos) ou em atividade grave (11 e 12 pontos). Por fim, a remissão da doença é definida como resolução completa dos sintomas e cicatrização endoscópica da mucosa [11-13]. Embora não seja uma forma de diagnosticar a RU, as medições laboratoriais também são úteis na avaliação e monitorização de sua atividade. A contagem de leucócitos e hemácias do sangue e as medidas da taxa de sedimentação de eritrócitos são alguns dos fatores que auxiliam a determinar a gravidade da inflamação e atividade da doença [13].

1.1.3 Patogênese e características epidemiológicas

A RU tem se tornado uma patologia cada vez mais comum e sua frequência nos países desenvolvidos vêm aumentando desde meados do século XX. As taxas e estimativas de incidência e prevalência anual variam de acordo com a região geográfica, sendo a América do Norte e Europa os locais que apresentam os maiores números de casos relatados [14]. No Brasil, entretanto, devido às deficiências dos sistemas de registro de dados, os estudos sobre

os aspectos epidemiológicos da doença ainda são escassos, sendo que, o número de casos é descoberto através de dados de internação hospitalar. Porém, sabe-se que no país, sua incidência e prevalência estão aumentadas [15-17].

Em relação ao gênero do paciente, diversos estudos mostraram similaridade nas taxas de incidência entre homens e mulheres, sugerindo assim, que a RU afeta ambos em igual proporção [8, 14, 17, 18]. A doença geralmente é diagnosticada entre o final da adolescência e o início da fase adulta (15-30 anos) e pode ter um segundo pico entre os 50 a 70 anos. Com base nos estudos até o momento datados, os brancos parecem ser os mais afetados pela patologia em questão [14, 15, 19]. A causa da RU permanece, até o momento desconhecida, entretanto, estudos afirmam que ela resulta da união de fatores genéticos e ambientais [3, 8].

1.1.4 Terapia

Por tratar-se de uma doença crônica, a RU não tem cura, porém, há tratamentos que aliviam os sintomas e diminuem a gravidade da doença. A escolha do tratamento apropriado leva em consideração o nível de atividade clínica do paciente (leve, moderada ou grave), o curso e a extensão da doença [17, 20]. Há quatro tipos principais de medicamentos que são utilizados no tratamento da RU: aminossalicilatos, corticosteroides, imunomoduladores e agentes biológicos [21]. Os aminossalicilatos, cujo princípio ativo é o 5-aminosalicílico (5-ASA), são representados principalmente, pela sulfasalazina e mesalazina [22]. Eles são anti-inflamatórios que agem diretamente no cólon, diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e inibindo os efeitos inflamatórios causados pelos radicais livres produzidos pelos leucócitos. Esses medicamentos podem ser usados tanto na forma oral quanto de supositórios e são geralmente utilizados quando a atividade clínica da doença é leve ou moderada [8, 22, 23]. Embora tenha boa aceitação entre os pacientes, em alguns casos podem ocorrer efeitos colaterais, dentre eles, febre, náuseas, tonturas e dores de cabeça [22].

Os corticosteroides, hormônios produzidos pelas glândulas suprarrenais, possuem também, forte ação anti-inflamatória e imunossupressora. Além das opções orais e retais, podem ser também administrados na forma intravenosa [22]. São geralmente, utilizados na fase aguda da doença, já que agem de forma rápida e efetiva diminuindo a inflamação, entretanto, seu uso a longo prazo pode resultar em fortes efeitos colaterais, como hipertensão, infecção, acne, entre outros [17, 22].

A azatioprina é um dos representantes principais dos imunomoduladores. Possui forte ação imunossupressora, o que interfere diretamente no funcionamento do sistema imune, baixando a imunidade do paciente e, conseqüentemente, diminuindo a inflamação. Seu uso é oral e geralmente é indicado em casos de atividade moderada e grave que não obtiveram resposta ao uso dos corticosteroides ou pacientes corticodependentes [17, 22]. Efeitos colaterais como, febre, pancreatite e mal-estar podem ocorrer em alguns pacientes [22].

Agentes biológicos com base no uso de anticorpos também são usados, como por exemplo, o Infliximab® e Adalimumab®, que são anticorpos anti-TNF- α , que reduzem a inflamação intestinal no paciente [24].

Quando o paciente não responde ao tratamento, a cirurgia se torna a única alternativa. Há dois tipos de cirurgia utilizada em portadores de RU: a colectomia, na qual uma parte ou todo o cólon do paciente é retirado, e a proctocolectomia, onde é feita a remoção do cólon, reto e ânus do paciente. Outros fatores decorrentes da RU, como perfuração intestinal, hemorragia incontrolável e câncer, também podem resultar em processos cirúrgicos [25].

O uso de probióticos é uma forma alternativa de terapia para a RU. Probióticos são definidos como microrganismos vivos que conferem um benefício para a saúde do hospedeiro quando ingeridos em quantidades adequadas [21]. Eles auxiliam em diversos processos do organismo, dentre eles, a alteração da microbiota intestinal, inibição do crescimento de bactérias patogênicas, estimulação da imunidade intestinal e o aumento da produção de butirato, um ácido graxo de cadeia curta que atua como agente anti-inflamatório [21, 26]. Uma cepa de *E. coli*, chamada de Nissle 1917 (EcN), tem sido muito utilizada como probiótico na terapia e remissão da RU. Ela é capaz de reduzir a permeabilidade epitelial e os danos na mucosa do cólon, resultando assim, na melhora da inflamação no paciente. Além disso, diversos estudos mostraram que a EcN pode ser tão eficaz quanto a mesalazina no tratamento da doença [27-29]. Um exemplo é o trabalho feito por Rembacken e colaboradores, onde foi analisada a taxa e o tempo de remissão da RU em 116 pacientes, mostrando que não houve diferença nos resultados comparados com a mesalazina, confirmando assim, a eficácia da EcN [21, 27].

O impacto da disbiose intestinal sobre etiopatogênese da RU tem motivado a adoção de outro método, a transplantação fecal, que visa o restabelecimento da microbiota intestinal (normobiose) como estratégia terapêutica para a doença [30, 31]. Um teste realizado por Colman e colaboradores mostrou resultados eficazes com o uso dessa técnica, onde a

remissão clínica foi alcançada em 54 (45%) dos 119 pacientes [32]. Entretanto, uma tentativa pioneira realizada na cidade de Botucatu por médicos do setor de Gastroenterologia do HC/UNESP em parceria com o Laboratório de Microbioma e Genômica Bacteriana do Instituto de Biociências (IBB) para tratar um paciente jovem com atividade clínica elevada foi infrutífera. Caso semelhante de insucesso no uso da transplantação fecal foi descrito recentemente no Japão, sendo a paciente uma criança de três anos que não respondia ao tratamento convencional [30]. Essa divergência de resultados mostra que a eficácia da transplantação fecal é variável e parece depender da gravidade dos casos de cada paciente [30, 31].

1.2 FATORES ENVOLVIDOS NA RETOCOLITE ULCERATIVA

1.2.1 Fatores Genéticos

A suspeita da relação da carga genética do paciente com a doença foi evidenciada com base na observação de maior ocorrência de casos entre parentes de portadores, mostrando que o envolvimento genético influencia na suscetibilidade da doença [3]. Estudos sobre gêmeos também mostraram taxas de concordância aumentadas para a doença, sendo cerca de 16% no caso de gêmeos homozigóticos e 4% em gêmeos dizigóticos [33].

Já foram encontrados em média 110 genes relacionados à RU. Dentre eles, dois dos mais conhecidos são: o *ECMI* e *IL-10* [3, 34]. O gene *ECMI* (Extracellular Matrix Protein 1) é um gene da barreira epitelial, localizado no cromossomo 1. É conhecido por interagir com a membrana basal, agindo principalmente, na regulação da permeabilidade da barreira epitelial intestinal. Portanto, falhas nesse gene permitem que a barreira epitelial se torne mais permeável, deixando-a vulnerável, o que facilita a entrada de bactérias patogênicas e/ou toxinas prejudiciais que podem auxiliar na patogênese da RU [3, 35, 36].

A *IL-10* é uma citocina anti-inflamatória produzida principalmente por linfócitos e macrófagos. É conhecida por inibir a síntese e/ou expressão de citocinas pró-inflamatórias, como o *TNF- α* e *IL-12*, por exemplo, e também por inibir a atividade de macrófagos e células T [3, 37]. Sendo assim, erros na *IL-10* podem afetar a mucosa intestinal resultando em inflamação, devido ao alto número de citocinas pró-inflamatórias presentes na mucosa. Conseqüentemente, quanto maior a carga de genes associados a RU, maior o risco de manifestação da doença [3, 35, 38].

1.2.2 Fatores Ambientais

Os fatores ambientais que possuem maior relação com a RU são: o tabagismo, a apendicectomia e a microbiota intestinal [8, 39]. A relação da RU com o tabagismo foi descoberta em 1982, quando foi observado que esse, acarretava um efeito protetor em portadores da doença [40]. Diversos estudos mostraram que os fumantes são menos propensos a desenvolver RU do que pessoas não fumantes, sugerindo assim, que o tabagismo pode ter relação com o desenvolvimento e remissão da doença [8, 41, 42]. Alguns estudos subsequentes também relacionaram o efeito do cigarro com uma menor necessidade de colectomia em fumantes atuais e uma menor taxa recidiva da doença. Porém, o mecanismo biológico pelo qual o tabagismo influencia na RU ainda não é claro. Entretanto, várias teorias sobre essa relação foram propostas no decorrer dos anos. A alteração da microbiota nos fumantes, a influência na formação de muco do cólon e a redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias pela nicotina, são algumas delas [41-43]. No entanto, estudos mais aprofundados sobre os efeitos específicos do tabagismo em portadores de RU são necessários para um melhor entendimento sobre seus fatores de proteção.

A apendicectomia (remoção do apêndice) também mostrou ter efeitos protetores em portadores de RU. Várias hipóteses foram propostas, já que o mecanismo pelo qual essa relação ocorre também é incerto [8, 39]. Estudos sugerem que a apendicectomia pode influenciar o sistema imune da mucosa intestinal desses pacientes, podendo reduzir o risco de desenvolvimento da doença [39]. Pesquisadores também acreditam que pacientes que são geneticamente predispostos a desenvolver RU sejam menos propensos a sofrer de apendicite aguda devido à coexistência de fatores como alteração da motilidade intestinal e anormalidades da mucina (glicoproteína responsável pela viscosidade do muco intestinal) [17, 44].

Por fim, um dos fatores mais importantes relacionados com a doença é a microbiota intestinal [8, 45]. Ela nada mais é do que toda a população de microrganismos que vivem no intestino. Estudos sugerem que a colonização intestinal pode iniciar antes do nascimento, devido à presença de bactérias que foram encontradas no líquido amniótico em alguns estudos e só, posteriormente, é influenciada pelo nascimento, de acordo com o tipo de parto realizado [46, 47]. No parto normal, a microbiota do recém-nascido é formada pelo contato com as bactérias do trato genital da mãe, e na cesariana, pelo contato com a pele da mãe e com a equipe médica. Em seguida, a microbiota vai amadurecendo de acordo com a amamentação (leite materno ou fórmula), com o contato do bebê com o ambiente, e por fim, ela atinge a

composição de um indivíduo saudável na fase adulta [46, 48, 49]. Curiosamente, há 10 vezes mais bactérias do que células no corpo humano, que podem ser compostas por até 36.000 espécies diferentes, entre elas, cerca de 70% são encontradas somente no intestino grosso [50, 51]. A maioria delas vivem em simbiose com nosso organismo, auxiliando no metabolismo e absorção de nutrientes, na função da barreira epitelial e na inibição de crescimento de bactérias patogênicas [50-52]. O sistema imune intestinal geralmente tolera essa microbiota através do reconhecimento realizados pelos TLRs (“toll-like receptors”) e NODs (“nucleotide-binding oligomerization domain”), portanto, quando esse processo é falho, ocorre a quebra dessa tolerância e uma inflamação pode ocorrer, causando danos ao hospedeiro [53, 54].

Em um indivíduo adulto saudável, a microbiota é composta principalmente por bactérias do filo Bacteroidetes e Firmicutes, e em menor quantidade por bactérias do filo Proteobacteria [51]. Entretanto, portadores de RU apresentam um desequilíbrio (disbiose) na composição dessas espécies, tendo uma diminuição de bactérias do filo Firmicutes (principalmente *Roseburia hominis* e *Faecalibacterium prausnitzii*), e um aumento de bactérias do filo Proteobacteria, especificamente *E. coli* [55, 56]. Na verdade, tem sido demonstrado em camundongos, que o aumento de espécies reativas de enxofre e nitrogênio geradas pelas reações inflamatórias favorece a proliferação de *E. coli* [57]. É razoável imaginar que, nesta condição, a população bacteriana aumentada possa conter uma maior prevalência de cepas potencialmente patogênicas do que na microbiota normal, eventualmente contribuindo para o agravamento dos sintomas [58].

1.3 *Escherichia coli*

E. coli foi inicialmente descrita como *Bacterium coli commune* pelo médico alemão Theodor Escherich, em 1885. Na década de 40, o médico John Bray mostrou de uma forma convincente a relação de algumas cepas de *E. coli* como causa de diarreia, ao identificar essa bactéria como agente de surtos de diarreia em crianças na Inglaterra [59, 60]. Pertence à família Enterobacteriaceae, à classe Gamaproteobacteria e é um bacilo gram-negativo e anaeróbio facultativo. Reside no lúmen intestinal de humanos e em grande parte dos animais de sangue quente [52]. Embora, viva geralmente em simbiose com seu hospedeiro, muitas vezes pode se tornar patogênica e resistente à drogas, devido à mutações ou transferência

horizontal de genes de virulência, tendo participação efetiva em algumas patologias humanas [52, 61-64].

As cepas de *E. coli* possuem uma grande variedade de clones e, para diferenciá-las, é necessário que elas sejam caracterizadas fenotipicamente e geneticamente. A sorotipagem e a formação de biofilme são dois dos métodos utilizados para a caracterização dessas cepas e, também, como marcador epidemiológico para sua patogenicidade [65, 66]. Sua célula bacteriana possui estruturas antigênicas de superfície que são capazes de auxiliar na identificação de sorogrupos e sorotipos, os quais podem estar relacionados com linhagens virulentas de bactérias e, conseqüentemente, com diversas patologias. As estruturas antigênicas de superfície são as: somáticas (O), capsulares (K) e flagelares (H). O antígeno de superfície “O” faz parte da composição do LPS (lipopolissacarídeo), um dos componentes principais da membrana exterior de *E. coli*. Esse antígeno apresenta variações diversas entre as bactérias, o que determina diferentes sorogrupos entre as suas espécies [60, 67, 68].

As bactérias estão presentes em todos os lugares, porém, dificilmente se encontram isoladas, sendo mais comum na forma de biofilme. Esse nada mais é, do que um aglomerado de bactérias envolto por uma membrana de polissacarídeos, excretada pelas mesmas [69]. A formação do biofilme é dividida em três etapas:

- I- Adesão, onde um pequeno grupo de bactérias isoladas começa a se aderir em uma superfície biótica (ex: placa bacteriana, mucosa intestinal) ou abiótica (ex: tubulações, rochas);
- II- Crescimento, após a aderência, inicia-se o processo de multiplicação e excreção da membrana de polissacarídeos, deixando-as fortemente ligadas, formando uma matriz;
- III- Separação, onde a matriz se desenvolve e as bactérias que se diferenciaram fenotipicamente, produzem enzimas que as desligam da matriz já madura, permitindo-as se aderirem e colonizarem outra superfície [69].

Fatores como pH, temperatura, disponibilidade de nutrientes e oxigênio estão implicados no desenvolvimento do biofilme. As bactérias formadoras de biofilme têm extrema importância na medicina humana, já que esta capacidade confere a elas uma grande vantagem adaptativa. Inclusive em portadores de RU, já que o biofilme pode ser encontrado na mucosa desses portadores [66, 70, 71].

Devido ao seu fácil cultivo e manipulação, e relação com doenças humanas, *E. coli* é uma das bactérias mais estudadas e mais conhecidas do mundo e seus estudos foram responsáveis por várias das realizações mais marcantes no estudo da biologia [60, 72]. Embora *E. coli* geralmente seja vista como uma bactéria maléfica, somente a minoria de suas espécies pode apresentar perigo e causar danos ao hospedeiro. A maioria delas é benéfica, produzem vitaminas K e B12 e, principalmente, age competindo por nicho com bactérias patogênicas, impedindo assim, que essas se proliferem e causem doenças no hospedeiro [73].

E. coli pode causar infecções humanas se o organismo entrar em contato com cepas patogênicas através de alimentos ou água contaminada, podendo resultar em mal-estar, vômitos, infecções urinárias entre outros [60]. De acordo com o local do organismo onde estas bactérias se estabelecem e as patologias que aí podem causar, podemos classificá-las em: a) *E. coli* diarreio gênicas (*Diarrheagenic E. coli* – DEC), as que causam infecções intestinais [67], e b) *E. coli* patogênicas extraintestinais (*Extra-intestinal pathogenic E. coli* – ExPEC), as que causam infecções fora do intestino, como bacteremias, meningites, infecções urinárias e generalizadas [52]. Tendo por base alguns critérios, tais como as manifestações que podem causar, a faixa etária dos pacientes acometidos, os fatores de patogenicidade que apresentam e marcadores de tipagem (por exemplo: sorogrupos e filogrupos) tanto as ExPEC quanto as DEC podem ser classificadas em categorias patogênicas (ou patótipos). Entre as DEC, foram definidas seis categorias patogênicas: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), e *E. coli* de adesão difusa (DAEC) [52]. Diferente das DEC que são denominadas pelo conjunto de fatores de virulência que possuem, as ExPEC são denominadas de acordo com seu local de isolamento, como por exemplo a *E. coli* uropatogênica (UPEC), na qual seu sítio de isolamento é amostras de infecções no trato urinário [67]. Tem sido mostrado também, que os isolados de DII normalmente apresentam em comum o fato de serem relacionados aos patótipos de ExPEC [58], que incluem, entre outras, cepas dos sorogrupos O25 e O83, que são normalmente associadas com infecções hospitalares [62].

Dentre as DEC, EPEC foi o primeiro grupo de *E. coli* associado com doenças humanas, para denominar os sorogrupos de *E. coli* que foram associados aos casos de diarreia na Inglaterra [52, 60]. EPEC ficou conhecida por ser a principal causa de diarreia infantil em países pouco desenvolvidos [52, 60]. Seu principal mecanismo de patogenicidade é definido por sua capacidade de induzir lesão histopatológica no epitélio intestinal do hospedeiro,

chamada *attaching and effacing* (A/E) [52, 60, 67, 74, 75]. Esta lesão é caracterizada pela aderência íntima da bactéria ao enterócito, chamada de “adesão localizada”, onde formam-se microcolônias de bactérias aglomeradas. Em seguida, ocorre a destruição das microvilosidades intestinais e formação de estruturas semelhantes a pedestais, devido a alterações do citoesqueleto e intensa polimerização de actina que ocorre sob a bactéria aderida [52, 60, 75].

ETEC é uma das principais causas de diarreia aguda em crianças pequenas e principal agente causador da “diarreia do viajante”, doença que acomete indivíduos que transitam para países em desenvolvimento, regiões tropicais e subtropicais [60, 76]. ETEC é caracterizada pela capacidade de produzir enterotoxinas específicas: termolábil (LT) e termoestável (ST) [52, 60, 67, 75, 76]. Embora esse patótipo não cause lesão direta nos enterócitos, essas toxinas (LT/ST) os alteram fisiologicamente, causando um desequilíbrio hidrossalino no intestino, resultando em diarreia aquosa [52, 67, 74, 76].

As cepas de EIEC possuem características bioquímicas, genéticas e patogênicas muito semelhantes às espécies de *Shigella*, sendo diferenciadas através da utilização de antissoros e testes bioquímicos específicos [60, 67, 75]. Sua patogênese é caracterizada pela capacidade de invadir as células do epitélio intestinal, na qual é mediada pelo gene *ipaH*. Após colonizarem a mucosa intestinal do hospedeiro, as bactérias invadem as células da mucosa, escapam da fagocitose dos macrófagos residentes da lâmina própria e invadem células adjacentes. O que conseqüentemente, causa lesões e desestabilização do epitélio intestinal, levando a destruição dos tecidos e, causando diarreia no hospedeiro [67, 75].

EHEC foi associado com doenças humanas inicialmente através de surtos de colite hemorrágica (CH) e síndrome hemolítica urêmica (SHU) nos EUA [52, 60, 67, 77]. Sendo considerado um subgrupo do patótipo STEC (*Shiga toxin-producing E. coli*), o patótipo EHEC é caracterizado principalmente por produzir a toxina de *Shiga* e, assim como EPEC, a lesão A/E [60, 67, 75]. A toxina é injetada no enterócito e inibe a síntese proteica das células, resultando em morte celular. Quando a toxina entra na corrente sanguínea, pode causar a SHU, uma doença sistêmica, porém, que afeta principalmente o rim, causando insuficiência renal, redução do número de plaquetas e anemia hemolítica [52, 60, 67].

O patótipo EAEC é caracterizado por se aderir de forma agregativa às células HEp-2 e HeLa, forma que se assemelha a tijolos empilhados (AA - adesão agregativa) [52, 60, 75]. Essas bactérias induzem aumento na secreção de muco, sob o qual elas ficam protegidas,

podendo formar biofilme. Com o biofilme instalado na mucosa, a absorção de nutrientes é impedida e ocorre colonização persistente dessas bactérias no intestino, causando complicações ao paciente infectado [60, 67, 78].

O termo “adesão difusa” que caracteriza a forma de adesão da DAEC é descrito como cepas capazes de se aderirem de modo homogêneo, ou seja, cobrindo uniformemente toda a superfície da célula intestinal do hospedeiro [60, 67, 75]. A DAEC é caracterizada por formar projeções celulares longas semelhantes a dedos, que as incorporam protegendo-as de ataques do organismo. Isso ocorre devido ao aumento de citocinas pró-inflamatórias e lesões nas microvilosidades, decorrente de alterações da expressão de proteínas funcionais do citoesqueleto celular [67, 75, 79]. Com base nessas informações, os seis patótipos de DEC, diferenciam-se principalmente, por seu principal mecanismo de virulência, sendo: EHEC e ETEC pela capacidade de produzir toxinas (*shiga*, LT/ST), EPEC e DAEC pela formação de lesões histopatológicas nos enterócitos, EIEC por invasão celular e EAEC pela formação de biofilmes [52].

Sabe-se que há muitas evidências que apoiam a suspeita do envolvimento da microbiota intestinal com a patogênese da DII [56]. No caso da RU, pesquisas realizadas com camundongos ilustraram bem a importância das bactérias na sua patogênese, na qual, mostraram que os animais criados em condições “*germ-free*” não desenvolviam a doença, fortalecendo assim, a hipótese de que as bactérias estão envolvidas no desenvolvimento da RU [26, 80-83]. Um trabalho realizado por Tabaqchali e colaboradores sugerindo esse envolvimento mostrou que pacientes diagnosticados com a doença apresentavam anticorpos séricos em maior título e contra um maior número de antígenos “O” de *E. coli*. Porém, não foi identificada qualquer associação de antígeno “O” de *E. coli* com a RU [58, 84]. Estudos de grupos independentes visando identificar marcas de patogenicidade nestas bactérias, em princípio, apresentaram resultados divergentes ou não conclusivos quanto ao envolvimento bacteriano com a causa da doença. Embora Cooke e colaboradores [84] verificaram uma correlação entre a prevalência de cepas produtoras de toxinas com a atividade da RU, a presença destas *E. coli* toxigênicas tendia a acontecer após e não antes do agravamento do quadro inflamatório. Ademais, estas toxinas, que tinham atividade hemolítica, surgiam nos pacientes que apresentavam sangue nas fezes, indicando possivelmente que as condições no intestino determinavam o aparecimento das mesmas, não havendo, portanto, uma relação da presença da bactéria com a causa da doença [84].

Trabalhos realizados por Thomazini e colaboradores apresentaram dois resultados interessantes: 1) concentrações maiores de *E. coli* associadas à mucosa retal de portadores de RU, através de testes bioquímicos e contagem de colônias em placas de ágar MacConkey; 2) um maior número de genes de virulência relacionados à EAEC em comparação aos genes de virulência de outras DEC em portadores de RU [80]. Resultados esses, que conferem com trabalhos anteriores que indicam o aumento de *E. coli* na mucosa intestinal de portadores de DII [58, 85, 86].

Devido a algumas variações no método de colheita das amostras, como o local (mucosa ou fezes), característica do tecido (inflamado ou normal) e método de quantificação das culturas, alguns resultados apresentados na literatura mostram divergência sobre a importância da *E. coli* na patogênese da RU, sendo necessário que mais estudos sejam realizados sobre essa relação [87].

Buscando portanto maior clareza sobre o papel da *E. coli* na patogenicidade da RU, já que o aumento na população de *E. coli* é uma marca da disbiose na doença e que há um menor volume de dados sobre o envolvimento de *E. coli* com a RU comparado com a DC, apresento nesse trabalho, resultados de caracterização genética e fenotípica realizadas com cepas de *E. coli* isoladas de portadores de RU e indivíduos sadios (CO). A apresentação dos resultados será dividida em dois capítulos, sendo o primeiro, referente a testes que foram realizados no período de dois anos desse Programa de Pós-graduação, sendo eles, pesquisa dos sorogrupos O25 e O83, determinação dos filogrupos EcoR e capacidade de formação de biofilme e, resultados de testes anteriores de propriedades de adesão e marcadores genéticos de virulência. O segundo capítulo consistirá de uma revisão bibliográfica sobre o papel da *E. coli* na RU, na qual será apresentado na forma de artigo científico.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o potencial de virulência pela tipagem e determinação da capacidade de formação de biofilme de uma coleção de isolados de *E. coli* de portadores de RU e juntamente a isso, apresentar uma revisão bibliográfica sobre o papel da *E. coli* na RU.

2.2 Específicos

- Realizar a classificação dos isolados em um dos filogrupos da coleção EcoR;
- Promover a sorotipagem, através da reação em cadeia da polimerase (PCR), tendo como alvo genes que identificam os sorogrupos O25 e O83;
- Avaliar a capacidade de produção de biofilme dos isolados;

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolados de *E. coli*

As cepas de *E. coli* que fizeram parte desse estudo foram isoladas, entre 2002 e 2012 de pacientes atendidos no setor de endoscopia do Hospital das Clínicas da UNESP em Botucatu e classificadas em 2 grupos de acordo com seu diagnóstico: portadores de RU e pacientes CO. Esses últimos compreendem pacientes que foram submetidos ao exame por apresentarem outras patologias intestinais de natureza não infecciosa e com diagnóstico negativo para DII. Os critérios de inclusão das amostras foram baseados nos seguintes tópicos: a) diagnóstico confirmatório ou não da doença, b) ausência de sintomas intestinais de natureza infecciosa, c) não ingestão de antibióticos nos últimos 40 dias anteriores ao exame e d) declaração de consentimento assinada pelo paciente para a coleta das amostras. Todos os procedimentos conduzidos relativos aos pacientes foram aprovados pela comissão de ética local em Pesquisa.

As cepas foram estocadas a -80°C em caldo soja tripticaseína (TSB - Tryptic Soy Both) com 15% de glicerol. Compreenderam a 112 isolados de um total de 56 pacientes, sendo duas amostras bacterianas por paciente. Trinta e quatro dos 56 pacientes são portadores de RU e 22 são CO. Os isolados foram originalmente obtidos de biópsias da região terminal do intestino (reto ou sigmoide) ou fezes. A escolha das amostras em função do sítio de mucosa não foi ao acaso, visto que a RU afeta predominante o cólon distal. A inclusão de isolados de fezes se justifica pelo fato de alguns pacientes não apresentarem isolados de biópsias e pela semelhança entre a microbiota fecal e a microbiota da mucosa do cólon terminal. Todas as amostras foram previamente avaliadas quanto à capacidade de adesão às células HEp-2 e submetidas à pesquisa de genes para serina proteases autotransportadoras de enterobactérias (SPATES), *eae* (*E. coli* attaching and effacing) *aggR* (fator transcricional da adesão agregativa), *stx* (citotoxinas de Shiga) e plasmídeo de adesão agregativa (pAA).

3.2 Formação específica de biofilme (FEB)

O teste de formação de biofilme foi realizado conforme Naves e colaboradores [88]. As cepas bacterianas dos portadores de RU e CO foram semeadas em caldo Luria-Bertani (LB) com 0,5% de glicose e incubadas a $35,5^{\circ}\text{C}$ *overnight*. Após incubação, foi preparada uma diluição de 100x destas culturas em Meio Essencial Mínimo de Eagle contendo 10% de

soro fetal bovino e 0,8% de glicose (MEM/SFB/glicose) e volumes de 130µl destas diluições foram transferidos para microplacas de 96 poços e incubadas a 30°C *overnight*. Em seguida, a concentração bacteriana de cada poço foi medida pela determinação da densidade óptica (DO) a 620nm. As culturas foram descartadas, os poços foram lavados uma vez com PBS (Phosphate-buffered-saline - constituído de mistura de 8g de NaCl, 0,2g de KCl e 1,44g de Na₂PO₄ diluídos em 1L) e incubadas por 20 minutos na estufa a 37°C para secagem. Posteriormente, elas foram coradas com cristal violeta (MERCK) a 1% (diluído em água) e incubadas em temperatura ambiente por 5 minutos. Os poços foram lavados cinco vezes com PBS a fim de retirar o excesso de cristal violeta e foram incubadas por 1 hora na estufa a 37°C para secagem. Por fim, as culturas foram ressuspendidas em 130µl de etanol e a DO foi medida a 540nm. Em cada teste, foi acrescentado um controle positivo e um negativo, sendo o primeiro uma cepa reconhecidamente capaz de formar biofilme (*E. coli* O42) e o segundo, o MEM/SFB/glicose utilizada no teste, sem cultura. A FEB foi expressa pela razão da diferença entre a DO a 540nm da suspensão bacteriana em etanol/cristal violeta de cada isolado e a DO a 540nm do MEM/SFB/glicose sobre a DO a 620nm dos isolados das culturas em meio MEM/SFB/glicose. Sendo assim: $FEB = (DO_{540} \text{ cultura} - DO_{540} \text{ meio}) / DO_{620} \text{ cultura}$. As bactérias foram classificadas de acordo com o valor de seu FEB, podendo ser fraca (≤ 0.5), moderada (>0.5 a ≤ 1.0) ou forte formadora de biofilme (>1.0) [88, 89].

3.3 Detecção dos sorogrupos O25 e O83

A detecção dos sorogrupos O25 e O83 foi baseada na identificação, por duplex PCR, dos genes *wzy* e *wzx* respectivamente, conforme protocolo de Li e colaboradores, tendo como molde lisados bacterianos obtidos por fervura de suspensões de bactérias em água destilada a 100°C/10 minutos [65]. A solução da reação consistiu de uma mistura master, contendo 5µL de Taq 5x Master Mix BioLabs®, primers *wxzR*, *wxzF*, *wxyR* e *wxyF* (tabela 1), sendo cada um deles em volumes de 0,5µL e concentração de 10µM, DNA extraído das amostras bacterianas em volume de 2,5µL, água destilada estéril em volume de 15,5µL, totalizando 25µL de solução. As PCRs foram realizadas em um termociclador da marca Eppendorf, nas seguintes condições: 1) Desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, 2) Amplificação em 30 ciclos com desnaturação de 95°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão 72°C por 1 minuto, 3) Extensão final 72°C por 5 minutos. A reação de amplificação ocorreu estritamente conforme o protocolo original [65], sendo os amplicons visualizados em

um capturador de imagens (BioRad Gel DocTMEZ), após eletroforese em gel de agarose a 1%, juntamente com uma referência de tamanho molecular.

3.4 Classificação de filogrupos da EcoR

A classificação dos isolados em cada um dos filogrupos da EcoR foi baseada na detecção por PCR e combinação dos genes *chuA*, *yjaA* e TspE4.C2, conforme protocolo de Clermont e colaboradores [90]. As sequências dos primers são apresentadas na tabela 1 e análise dos amplicons foi feita conforme descrição no item anterior.

3.5 Análise estatística

O nível de significância nas análises comparativas foi determinado com base dos resultados do teste *t* de *student*, sendo consideradas significativas diferenças com valores de $p < 0,05$.

Tabela 1. Sequência dos primers e tamanho dos amplicons dos fragmentos dos genes identificados por PCR.

Gene	Primers	Sequência dos primers (5-3')	Tamanho dos amplicons (bp)	Finalidade	Referência
wxy	WL-14666 WL-14667	(F) AGAGATCCGTCTTTTATTTGTTTCGC (R) GTTCTGGATACCTAACGCAATACCC	230	Detecção do antígeno O25	[65]
wxz	WL-14668 WL-14669	(F) GTACACCAGGCAAACCTCGAAAG (R) TTCTGTAAGCTAATGAATAGGCACC	362	Detecção do antígeno O83	[65]
<i>chuA</i>	chuA1 chuA2	(F) GACGAACCAACGGTCAGGAT (R) TGCCGCCAGTACCAAAGACA	279	Classificação de filogrupos EcoR	[90]
<i>yjaA</i>	yjaA.1 yjaA.	(F) TGAAGTGTCAGGAGACGCTG (R) ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	211	Classificação de filogrupos EcoR	[90]
TspE4C2	TspE4C2.1 TspE4C2.2	(F) GAGTAATGTCTGGGGCATTCA (R) CGCGCCAACAAAGTATTACG	152	Classificação de filogrupos EcoR	[90]

CAPÍTULO 1

4. CAPÍTULO 1

O conjunto desses dados, compreendendo propriedades de adesão, filogrupo, marcadores genéticos de virulência e capacidade de formação de biofilme, é apresentado na tabela 2. Tanto no grupo CO como entre portadores de RU, mais da metade dos pacientes apresentou *E. coli* aderentes às células HEp-2, as quais expressaram os padrões de adesão agregativo (AA) e difuso (AD). Não houve diferenças entre os grupos quanto à prevalência de amostras expressando esses padrões. Diferenças também não foram observadas em relação à prevalência de alguns marcadores genéticos de virulência (*eae*, SPATE, pAA em combinação com *aggR* e *stx*), capacidade de formação de biofilme, presença dos filogrupos B1 e D e sorogrupos O25 e O83. Por outro lado, observou-se um predomínio de amostras dos filogrupos A entre portadores de RU e de B2 e *aggR*+ entre CO (tabela 2).

Dados da literatura indicam que o filogrupo B2 abriga amostras bacterianas em geral com potencial de patogenicidade e normalmente associadas a infecções extraintestinais e também a casos de DII [91]. Por outro lado, o filogrupo A é composto majoritariamente de *E. coli* comensal [90]. Os dados da tabela 2 mostram um quadro diferente, uma vez que B2 foi mais comum entre isolados do grupo CO e A em maior número entre portadores de RU. A interpretação desta divergência deve levar em consideração o fato de que os indivíduos CO também apresentam algum tipo de patologia, que inclui casos de diarreia, manifestação que, não raro, pode ser provocada por *E. coli*. O fato do gene *aggR*, um marcador importante de EAEC típica [52], ser mais prevalente em *E. coli* do grupo CO pode ser considerado evidência nesse sentido.

Tabela 2. Número (%) de pacientes CO e portadores de RU dos quais foram isoladas *E. coli* com as características relacionadas

Propriedade		Grupo ^(a)		Teste T ^(d)	Estudo(s) ^(e)
		CO [22]	RU [34]		
Padrões de adesão ^(b)	AA	10 (45)	22 (65)	0,18	Anteriores
	AD	4 (18)	4 (12)	0,12	Anteriores
Filogrupos	A	2 (9)	11 (32)	0,04	Atual
	B1	5 (23)	3 (9)	0,08	Atual
	B2	12 (55)	9 (26)	0,01	Atual
	D	8 (36)	13 (38)	0,39	Atual
Sorogrupo	O25	1 (5)	4 (12)	0,26	Atual
	O83	1 (5)	3 (9)	0,13	Atual
Marcadores genéticos de virulência ^(c)	SPATE	9 (41)	20 (59)	0,08	Anteriores
	<i>eae</i>	2 (9)	4 (12)	0,47	Anteriores
	<i>aggR</i>	3 (14)	0	0,01	Anteriores
	pAA, <i>aggR</i>	0	3 (9)	0,08	Anteriores
	<i>stx</i>	0	1 (3)	0,21	Anteriores
Formação de biofilme	Fraca	6 (27)	5 (15)	0,09	Atual
	Moderada	5 (23)	3 (9)	0,05	Atual
	Forte	10 (45)	11 (32)	0,30	Atual

^(a) Entre colchetes, número de pacientes dos quais foram isoladas as amostras bacterianas (2 por paciente)

^(b) Padrões de adesão: AA, adesão agregativa, AD adesão difusa, em testes feitos com células Hep-2

^(c) Marcadores genéticos de virulência: *eae*, *E. coli attaching and effacing*; *stx*, *shiga toxin*; *aggR*, ativador transcricional de fatores de adesão agregativa, pAA, marcador para o plasmídeo de adesão agregativa e SPATE, *serina protease auto-transporter toxins of Enterobacteriaceae*.

^(d) Teste T, em negrito, $p < 0,05$

^(e) Os dados da tabela são do trabalho atual e de estudos anteriores. Entre esses se incluem resultados publicados [80] e não publicados.

Em relação ao filogrupo A, uma possível explicação para sua maior prevalência entre amostras de RU pode estar num artigo publicado em 2008, de Gordon e colaboradores [92] que indica que a identidade filogenética de membros desse grupo pode não estar completamente definida, de modo que ele pode incluir diferentes linhagens evolutivas e com potencial de patogenicidade.

Os isolados desse trabalho compreendem *E. coli* de pacientes que são atendidos rotineiramente no ambiente hospitalar, onde há certa probabilidade desses pacientes adquirirem *E. coli* associadas a infecções hospitalares. O fato de portadores de RU e CO apresentarem *E. coli* dos sorogrupos O25 e O83, que são normalmente relacionados a essas infecções, pode sugerir que essas bactérias têm como origem o ambiente hospitalar. Na verdade, a condição desses pacientes, pelo menos em alguns casos, pode implicar em certo oportunismo para a aquisição de bactérias que podem provocar ou complicar um quadro de doença como o representado pelas DII [93].

Quanto ao biofilme, também não se observou associação significativa com a RU, embora, em trabalho anterior, tenha sido demonstrada uma correlação entre o caráter de produção moderada de biofilme com amostras de *E. coli* isoladas a partir de pacientes portadores de DII [89].

Com base nas observações de estudos realizados até o momento, é sugerido que as interações da *E. coli* com a RU não é mediado por “virulência”, como era suspeitado por muitos pesquisadores. Em contraste, os isolados associados com a doença devem representar bactérias comensais que devido às mudanças nos processos inflamatórios, obtiveram vantagem adaptativa. A presença de um alto número dessas bactérias, de alguma forma, parece contribuir para o agravamento dos sintomas da RU [94]. No entanto, esta hipótese deve ser testada em estudos futuros, devido a controvérsias ainda presentes nos resultados disponíveis.

CAPÍTULO 2

1
2
3
4
5
6
7
8
9

***Escherichia coli* in ulcerative colitis**

Thaisy Milanelli Canhizares, Ana Carolina da Silva Santos, Josias Rodrigues*

Department of Microbiology and Immunology, Institute of Biosciences of the State
University of São Paulo, Campus de Rubião Junior, CEP 18618-961, Botucatu SP, Brazil

*Corresponding author. Department of Microbiology and Immunology. Rua Prof. Plinio Pinto
e Silva, CEP 18618-961. Rubião Junior, Botucatu, SP, Brazil. Phone: 055 14 3880 0426.

Email: Josias@ibb.unesp.br

10 **Abstract**

11 Ulcerative colitis (UC) is the clinical variant of inflammatory bowel diseases (IBD) which
12 manifests superficially and diffusely in the colon. In most of the cases it is less severe than
13 Crohn's disease (CD), the other IBD variant, which may affect as transmural and focal lesions
14 all length of the intestinal tract, particularly the ileum. Although of unknown etiology, IBD
15 manifestation depends on a number of factors, including gut dysbiosis, whose features include
16 the elevation of the number of *Escherichia coli*. While evidence on an active role of these
17 bacteria in CD accumulates, the involvement of *E. coli* in UC is less clear. This could be in
18 part explained by particular aspects of UC manifestation, the striking heterogeneity of the *E.*
19 *coli* species, and its condition as commensal bacteria of the gut. Based on the available data,
20 we hypothesize that although *E. coli* may be involved with the etiology of UC, its role is
21 secondary to the disease manifestation.

22 *Key words: Escherichia coli; bacteria; virulence, colitis, inflammatory*

23 1. Introduction

24 Ulcerative colitis (UC) is the clinical variant of inflammatory bowel diseases (IBD),
25 manifested as mucosal diffuse and superficial lesions restricted to the colon. Because of their
26 high concentration and close contact with the colonic mucosa, microorganisms have been
27 considered determinant factors for disease manifestation or complication. The gut microbiota
28 in UC patients is characterized by imbalance in species composition consisting in overall
29 reduction in richness and rise in the abundance of some bacterial groups (dysbiosis), such as
30 members of Enterobacteriaceae [1] whose main example is *Escherichia coli*.

31 An early report on the link between UC and a member of Enterobacteriaceae dates back to the
32 end of World War II, following the rise in the incidence of bacillary dysentery and UC among
33 US troops, raising the suspicion of *Shigella flexneri* involvement in UC's etiology [2]. In
34 fact, even before this assumption, a hypothesis of an infectious origin for UC had pointed to
35 *S. dysenteriae* as the cause of disease (See review by Denys Burke [3]). *E. coli* have not only
36 been detected in higher numbers but also have been shown to be more active in clinical
37 materials from cases of UC [4]. Yet, despite of demonstration of coliforms proliferation by
38 many authors in different locations and times, employing culture dependent or molecular tools
39 [1, 5, 6], an unaltered [7, 8] [9] or even lower concentration [10] of these bacteria in UC cases
40 have also been observed. In addition to methodological differences to assess bacterial
41 abundance, divergences in the results of these works could be explained in part by the nature
42 of clinical sample analyzed. It has been demonstrated, for example, that while *E. coli*
43 population in stools of UC patients is unaltered, higher concentration is observed in mucosal
44 biopsies, particularly those taken from rectum and sigmoid, which are the sites where the
45 lesions are detected in most of the cases [6]. In fact, comparing inflamed and not inflamed
46 regions of the gut, the proliferation of *E.coli* has been shown to occur in inflamed tissue only

47 [11]. Also, there is a significant decline in bacterial species richness in inflamed tissue of IBD
48 patients [12].

49 Apart from direct bacteriology investigation, indication on the possible role of *E. coli* in UC
50 etiopathogenesis was also drawn from immunologic studies. Sera from UC patients were
51 shown to be cross-reactive with some O antigens [13] and with an OmpC of *E. coli* [14], and
52 to possess specificity for perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (pANCA) [15].
53 The burst respiratory in polymorphonuclear leucocytes is potentiated by UC antibodies
54 directed to *E. coli* and other commensal bacteria [16]. Higher titers to a higher number of *E.*
55 *coli* O antigens have been detected in the sera of UC patients as compared with those of
56 corresponding sample from normal subjects. Although the presence of these antibodies has
57 been considered secondary to the disease process, it is believed that they may contribute for
58 extra intestinal complications of UC [17]. In spite of the high number of studies conducted
59 thus far, in different lines of investigation, it is not as yet clear the extent of the involvement
60 of *E. coli* with UC. In view of the need for disease control fueled by the crescent incidence of
61 UC worldwide and evidence supporting the role of microbes in body homeostasis, interest in
62 this theme is constantly renewing. In this context, an update on the participation of *E. coli* in
63 UC, a subject explored in many previous reviews, is worthwhile.

64 2. Virulence of *E. coli* from UC

65 *E. coli* are Gram negative and facultative anaerobe bacilli belonging to the family
66 Enterobacteriaceae and the class Gammaproteobacteria, easy to culture at 37°C in media
67 impeditive for Gram positive. It is one of the most well adapted bacterial species in the
68 mammalian gut, and once considered the predominant bacteria in the feces prior to the
69 realization that strict anaerobes are much more abundant in human colon [3]. Following its
70 description by Theodorus Escherich in 1885, it was initially unsuspected of involvement with

71 diseases in the gut, its natural habitat. But this assumption increasingly changed as sporadic
72 reports on the association of *E. coli* with diarrheal diseases were published, culminating with
73 its identification as the cause of an infantile diarrhea outbreak in London, in 1945 [18]. With
74 the recognition of *E. coli* as a human enteropathogen, the search for virulence-associated
75 features in *E. coli* isolates from cases of diarrhea enabled the identification of multiple
76 diarrhegenic *E. coli* (DEC) categories [19]. Because of the similarity of the symptoms of UC
77 and those of infectious diarrhea, search for DEC virulence markers in addition to those of
78 extra intestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) in UC clinical isolates were then considered.
79 Basically, the characterization of these bacteria initially consisted in the evaluation of their
80 ability to produce exotoxins and to interact with epithelial cells, as well as the identification of
81 particular O and or H antigens. The role of exotoxins and interactions with eukaryotic cells,
82 along with other aspects eventually associating *E. coli* with UC are discussed below.

83 2.1. Exotoxins

84 One of the first works focusing on exotoxin detection found a correlation between disease
85 activity and presence of hemolytic and necrotoxic *E. coli* strains in stools from UC patients
86 [20]. These strains, which were most commonly detected in patients with blood in their stools,
87 appeared to follow rather than precede the relapse of disease and therefore, probably, were not
88 primary determinants of its manifestation. In 1983, the highly virulent enterohemorrhagic *E.*
89 *coli* (EHEC) pathotype was described following its link with a foodborne hemorrhagic colitis
90 (HC) outbreak, taken place one year before in Oregon [21]. The close similarity between the
91 symptoms of HC and that of UC encouraged the screening of UC clinical isolates for the
92 presence of shiga cytotoxins (Stx), which are EHEC's virulence factors. Nevertheless, the
93 importance of Shiga cytotoxin producing *Escherichia coli* (STEC) in the cause of UC could
94 not be demonstrated because the association of STEC linked HC and UC was only sporadic
95 and results of independent works were conflicting [22, 23, 24]. Genes for serina protease

96 autotransporter exotoxins of enterobacteriaceae (SPATE), including cytotoxins, [25] and, more
97 recently, genes for a cancer associated genotoxin [26] were respectively detected in higher
98 prevalence in UC patients' tissues and *E. coli* from UC cases. Other *E. coli* exotoxins genes
99 found to be more significantly associated with UC were *cdt* (cytolethal distending toxin), *hly*
100 (haemolysin) [27].

101 2.2. Interactions with eukaryotic cells

102 The interactions of *E. coli* with eukaryotic cells consist of superficial or intimate attachment
103 and/or invasion into these cells. Bacterial products or actions involved in any steps of these
104 processes and eventually interfering with cell physiology and metabolism are considered
105 putative virulence factors. One of the first works investigating cell adherence ability, wherein
106 buccal epithelial cells (BEC) were used, revealed that patients diagnosed with UC beard a
107 higher prevalence of BEC mannose resistant adherent *E. coli* than control subjects [28].
108 Nonetheless, bacterial adherence was later shown not to correlate with disease activity in the
109 host where the bacteria were detected [24, 29], and some studies did not demonstrate a higher
110 prevalence of adherent *E. coli* in UC [10]. *E. coli* isolates from UC display the aggregative
111 adherence (AA) pattern [30], a feature of different categories of pathogenic and commensal *E.*
112 *coli* [31]. UC *E. coli* can adhere to intestinal epithelial cells and induce the secretion of the
113 pro-inflammatory interleukin IL-8, but there is no evidence that they are invasive [32].
114 Invasive *E. coli* are less prevalent in UC than in CD [33]. Because some AA *E. coli* are strong
115 biofilm producers [31], a feature contributing for bacteria colonization and resistance to host
116 cell factors and determinant for an extracellular lifestyle, probably the mode of interaction of
117 *E. coli* with host cells in UC, biofilms could have a role in the disease manifestation or
118 aggravation. AA *E. coli* not only display an efficient cell adhesion apparatus, but also induce
119 the secretion of mucus by goblet cells [31]. Biofilms are formed in the mucus substratum and

120 probably contributes for inflammatory reaction in the typically damaged and leaky gut
121 mucosa of UC patients.

122 Adherence of *E. coli* from IBD is in great part dependent on the expression of type 1 pili,
123 which is usually also found in other *E. coli* categories, including commensals. In an altered
124 environment (e.g., pathological conditions), such those in urinary tract infections, Crohn's
125 disease (CD) and UC, the tip of type 1 pili (fim H protein) undergoes amino acid
126 replacements favoring bacterial colonization. Therefore, type 1 mediated adherence in *E. coli*
127 differs in normal and pathological conditions and apparently strains possessing distinct fimH
128 mutations are detected in different diseases [34]. A feature of ileal CD histopathology is the
129 mucosal over-expression of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6,
130 (CEACAM 6) [35], particularly in the ileum mucosa. This molecule was found to be a
131 receptor for type 1 pili of CD associated adherent and invasive *E. coli* (AIEC) [36]. Yet, an
132 eventual role of type 1 pili in *E. coli* from UC is not as clear as probably evidenced in CD.

133 2.3. Other features of *E. coli* in UC

134 Particular characteristics of *E. coli* metabolism could explain their overgrowth in IBD. It is for
135 example believed that by-products of inflammatory response such as nitrate, which are not
136 used by strict anaerobes (the dominant bacteria of the gut), can be electron acceptors in the *E.*
137 *coli* anaerobe metabolism. Accordingly, colitis generates highly oxidized by-products,
138 including nitrates, S-oxides, and N-oxides boosting *E. coli* and other Enterobacteriaceae
139 metabolism, leading to their over-abundance and anaerobes displacement [37]. Under
140 inflammation, iron availability is limited, and *E. coli* respond by the expression of genes, such
141 as *chuA* and *iutA*, augmenting their iron uptake efficiency [11].

142 3. UC *E. coli* are ExPEC

143 As is the case of other diseases where the participation of *E. coli* is suspected, investigation of
144 their involvement with UC is complicated by the extreme genetic heterogeneity and versatility
145 of association of these bacteria with humans. This issue is approached with the use of typing
146 assays, in an attempt of grouping the isolates according to their sources. However, the use of
147 techniques enabling discrimination at a certain level of detail did not succeed in associating a
148 particular group of *E. coli* with UC. UC *E. coli* belong to the B2 [38] or B2 and D
149 phylogroups of the “*E. coli* reference collection (EcoR)”. These phylogroups represent
150 ExPEC isolates [25], whose distinction from opportunists is not clear-cut.

151 4. Conclusion

152 The above observations, concerning the studies conducted thus far, seem to suggest that the
153 impact of *E. coli* on UC is not mediated by “virulence” as classically understood. In contrast,
154 isolates putatively associated with the disease must represent commensal bacteria which
155 experience a rise in abundance as a result of changing conditions due to the inflammatory
156 process, conferring them adaptive advantage. The presence of an abnormally high number of
157 these bacteria, in some way, contributes for aggravating the symptoms of UC. Nevertheless,
158 this hypothesis should be tested in future studies, because controversies persist on the theme,
159 because of conflicting results of available data.

160 References

- 161 1. Swidsinski, A., et al., Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*,
162 2002. **122**(1): p. 44-54.
- 163 2. Felsen, J. and W. Wolarsky, Bacillary Dysentery and Chronic Ulcerative Colitis in
164 World War II. *Science*, 1947. **105**(2721): p. 213.
- 165 3. Burke, D., *Escherichia coli* and ulcerative colitis. *J R Soc Med*, 1997. **90**(11): p. 612-
166 7.

- 167 4. Sokol, H., et al., Temperature gradient gel electrophoresis of fecal 16S rRNA reveals
168 active *Escherichia coli* in the microbiota of patients with ulcerative colitis. J Clin
169 Microbiol, 2006. **44**(9): p. 3172-7.
- 170 5. van der Wiel-Korstanje, J.A. and K.C. Winkler, The faecal flora in ulcerative colitis. J
171 Med Microbiol, 1975. **8**(4): p. 491-501.
- 172 6. de Souza, H.L., et al., Mucosa-associated but not luminal *Escherichia coli* is
173 augmented in Crohn's disease and ulcerative colitis. Gut Pathog, 2012. **4**(1): p. 21.
- 174 7. Keighley, M.R., et al., Influence of inflammatory bowel disease on intestinal
175 microflora. Gut, 1978. **19**(12): p. 1099-104.
- 176 8. Giaffer, M.H., C.D. Holdsworth, and B.I. Duerden, The assessment of faecal flora in
177 patients with inflammatory bowel disease by a simplified bacteriological technique. J
178 Med Microbiol, 1991. **35**(4): p. 238-43.
- 179 9. Pascal, V., et al., A microbial signature for Crohn's disease. Gut, 2017. **66**(5): p. 813-
180 822.
- 181 10. Hartley, M.G., et al., Adhesive and hydrophobic properties of *Escherichia coli* from
182 the rectal mucosa of patients with ulcerative colitis. Gut, 1993. **34**(1): p. 63-7.
- 183 11. Pilarczyk-Zurek, M., et al., Possible role of *Escherichia coli* in propagation and
184 perpetuation of chronic inflammation in ulcerative colitis. BMC Gastroenterol, 2013.
185 **13**: p. 61.
- 186 12. Sepehri, S., et al., Microbial diversity of inflamed and noninflamed gut biopsy tissues
187 in inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis, 2007. **13**(6): p. 675-83.
- 188 13. Marcussen, H., Fluorescent anti-colonic and *E. coli* antibodies in ulcerative colitis.
189 Scand J Gastroenterol, 1978. **13**(3): p. 277-81.
- 190 14. Cohavy, O., et al., Colonic bacteria express an ulcerative colitis pANCA-related
191 protein epitope. Infect Immun, 2000. **68**(3): p. 1542-8.

- 192 15. Duerr, R.H., et al., Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in ulcerative colitis.
193 Comparison with other colitides/diarrheal illnesses. *Gastroenterology*, 1991. **100**(6): p.
194 1590-6.
- 195 16. Furrie, E., et al., Systemic antibodies towards mucosal bacteria in ulcerative colitis and
196 Crohn's disease differentially activate the innate immune response. *Gut*, 2004. **53**(1):
197 p. 91-8.
- 198 17. Tabaqchali, S., D.P. O'Donoghue, and K.A. Bettelheim, *Escherichia coli* antibodies in
199 patients with inflammatory bowel disease. *Gut*, 1978. **19**(2): p. 108-13.
- 200 18. Robins-Browne, R.M., Traditional enteropathogenic *Escherichia coli* of infantile
201 diarrhea. *Rev Infect Dis*, 1987. **9**(1): p. 28-53.
- 202 19. Sonnenberg, M.S., *Escherichia coli*: pathotypes and principles of pathogenesis. 2nd
203 edition. ed. xxi, 576 pages.
- 204 20. Cooke, E.M., et al., Properties of strains of *Escherichia coli* carried in different phases
205 of ulcerative colitis. *Gut*, 1974. **15**(2): p. 143-6.
- 206 21. Riley, L.W., et al., Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli*
207 serotype. *N Engl J Med*, 1983. **308**(12): p. 681-5.
- 208 22. Farina, C., et al., Ulcerative colitis precipitated by a verocytotoxin-producing
209 *Escherichia coli* infection. *Ital J Gastroenterol*, 1995. **27**(9): p. 498-500.
- 210 23. Ljungh, A., et al., Shiga-like toxin production and connective tissue protein binding of
211 *Escherichia coli* isolated from a patient with ulcerative colitis. *Scand J Infect Dis*,
212 1988. **20**(4): p. 443-6.
- 213 24. Giaffer, M.H., C.D. Holdsworth, and B.I. Duerden, Virulence properties of
214 *Escherichia coli* strains isolated from patients with inflammatory bowel disease. *Gut*,
215 1992. **33**(5): p. 646-50.

- 216 25. Kotlowski, R., et al., High prevalence of *Escherichia coli* belonging to the B2+D
217 phylogenetic group in inflammatory bowel disease. *Gut*, 2007. **56**(5): p. 669-75.
- 218 26. Prorok-Hamon, M., et al., Colonic mucosa-associated diffusely adherent afaC+
219 *Escherichia coli* expressing lpfA and pks are increased in inflammatory bowel disease
220 and colon cancer. *Gut*, 2014. **63**(5): p. 761-70.
- 221 27. Vejborg, R.M., et al., Comparative genomics of *Escherichia coli* isolated from
222 patients with inflammatory bowel disease. *BMC Genomics*, 2011. **12**: p. 316.
- 223 28. Burke, D.A. and A.T. Axon, Ulcerative colitis and *Escherichia coli* with adhesive
224 properties. *J Clin Pathol*, 1987. **40**(7): p. 782-6.
- 225 29. Burke, D.A. and A.T. Axon, Adhesive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease
226 and infective diarrhoea. *BMJ*, 1988. **297**(6641): p. 102-4.
- 227 30. Thomazini, C.M., et al., High prevalence of aggregative adherent *Escherichia coli*
228 strains in the mucosa-associated microbiota of patients with inflammatory bowel
229 diseases. *Int J Med Microbiol*, 2011. **301**(6): p. 475-9.
- 230 31. Nataro, J.P. and J.B. Kaper, Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*,
231 1998. **11**(1): p. 142-201.
- 232 32. Rolhion, N. and A. Darfeuille-Michaud, Adherent-invasive *Escherichia coli* in
233 inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 2007. **13**(10): p. 1277-83.
- 234 33. Elliott, T.R., et al., Quantification and characterization of mucosa-associated and
235 intracellular *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*,
236 2013. **19**(11): p. 2326-38.
- 237 34. Iebba, V., et al., Microevolution in fimH gene of mucosa-associated *Escherichia coli*
238 strains isolated from pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Infect*
239 *Immun*, 2012. **80**(4): p. 1408-17.

- 240 35. Grunert, F., et al., CD66b, CD66c and carcinoembryonic antigen (CEA) are
241 independently regulated markers in sera of tumor patients. *Int J Cancer*, 1995. **63**(3):
242 p. 349-55.
- 243 36. Barnich, N., et al., CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive *E. coli*,
244 supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *J Clin Invest*, 2007. **117**(6): p.
245 1566-74.
- 246 37. Winter, S.E., et al., Host-derived nitrate boosts growth of *E. coli* in the inflamed gut.
247 *Science*, 2013. **339**(6120): p. 708-11.
- 248 38. Petersen, A.M., S.I. Halkjaer, and L.L. Gluud, Intestinal colonization with
249 phylogenetic group B2 *Escherichia coli* related to inflammatory bowel disease: a
250 systematic review and meta-analysis. *Scand J Gastroenterol*, 2015. **50**(10): p. 1199-
251 207

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kornbluth, A. and D.B. Sachar, *Ulcerative colitis practice guidelines in adults (update): American College of Gastroenterology, Practice Parameters Committee*. Am J Gastroenterol, 2004. **99**(7): p. 1371-85.
2. Solberg, I.C., et al., *Clinical course during the first 10 years of ulcerative colitis: results from a population-based inception cohort (IBSEN Study)*. Scand J Gastroenterol, 2009. **44**(4): p. 431-40.
3. Thompson, A.I. and C.W. Lees, *Genetics of ulcerative colitis*. Inflamm Bowel Dis, 2011. **17**(3): p. 831-48.
4. Kirsner, J.B., *Historical origins of current IBD concepts*. World J Gastroenterol, 2001. **7**(2): p. 175-84.
5. Hindryckx, P., et al., *Clinical trials in ulcerative colitis: a historical perspective*. J Crohns Colitis, 2015. **9**(7): p. 580-8.
6. Morson, B.C. and H.E. Lockhart-Mummery, *Crohn's disease of the colon*. Gastroenterologia, 1959. **92**: p. 168-73.
7. Denson, L.A., et al., *Challenges in IBD research: update on progress and prioritization of the CCFA's research agenda*. Inflamm Bowel Dis, 2013. **19**(4): p. 677-82.
8. Hendrickson, B.A., R. Gokhale, and J.H. Cho, *Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease*. Clin Microbiol Rev, 2002. **15**(1): p. 79-94.
9. Baumgart, D.C. and W.J. Sandborn, *Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies*. Lancet, 2007. **369**(9573): p. 1641-57.
10. Ungaro, R., et al., *Ulcerative colitis*. Lancet, 2017. **389**(10080): p. 1756-1770.
11. Lewis, J.D., et al., *Use of the noninvasive components of the Mayo score to assess clinical response in ulcerative colitis*. Inflamm Bowel Dis, 2008. **14**(12): p. 1660-6.

12. D'Haens, G., et al., *A review of activity indices and efficacy end points for clinical trials of medical therapy in adults with ulcerative colitis*. *Gastroenterology*, 2007. **132**(2): p. 763-86.
13. Stange, E.F., et al., *European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis: Definitions and diagnosis*. *J Crohns Colitis*, 2008. **2**(1): p. 1-23.
14. Molodecky, N.A., et al., *Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review*. *Gastroenterology*, 2012. **142**(1): p. 46-54 e42; quiz e30.
15. Victoria, C.R., L.Y. Sassak, and H.R. Nunes, *Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of Sao Paulo State, Brazil*. *Arq Gastroenterol*, 2009. **46**(1): p. 20-5.
16. Souza, M.H., et al., *[Trends in the occurrence (1980-1999) and clinical features of Crohn's disease and ulcerative colitis in a university hospital in southeastern Brazil]*. *Arq Gastroenterol*, 2002. **39**(2): p. 98-105.
17. Dani, R., *Gastroenterologia Essencial*, ed. edição2006. 1203.
18. Brant, S.R. and G.C. Nguyen, *Is there a gender difference in the prevalence of Crohn's disease or ulcerative colitis?* *Inflamm Bowel Dis*, 2008. **14 Suppl 2**: p. S2-3.
19. Cosnes, J., et al., *Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases*. *Gastroenterology*, 2011. **140**(6): p. 1785-94.
20. Travis, S.P., et al., *European evidence-based Consensus on the management of ulcerative colitis: Current management*. *J Crohns Colitis*, 2008. **2**(1): p. 24-62.
21. Ghouri, Y.A., et al., *Systematic review of randomized controlled trials of probiotics, prebiotics, and synbiotics in inflammatory bowel disease*. *Clin Exp Gastroenterol*, 2014. **7**: p. 473-87.
22. Mahadevan, U., *Medical treatment of ulcerative colitis*. *Clin Colon Rectal Surg*, 2004. **17**(1): p. 7-19.

23. Burger, M., et al., *Medical Therapy of Active Ulcerative Colitis*. *Viszeralmedizin*, 2015. **31**(4): p. 236-45.
24. Vaughn, B.P. and A.C. Moss, *Novel treatment options for ulcerative colitis*. *Clin Investig (Lond)*, 2013. **3**(11): p. 1057-1069.
25. Cohen, J.L., et al., *Practice parameters for the surgical treatment of ulcerative colitis*. *Dis Colon Rectum*, 2005. **48**(11): p. 1997-2009.
26. Derikx, L.A., L.A. Dieleman, and F. Hoentjen, *Probiotics and prebiotics in ulcerative colitis*. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2016. **30**(1): p. 55-71.
27. Rembacken, B.J., et al., *Non-pathogenic Escherichia coli versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial*. *Lancet*, 1999. **354**(9179): p. 635-9.
28. Kruis, W., et al., *Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic Escherichia coli Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine*. *Gut*, 2004. **53**(11): p. 1617-23.
29. Kruis, W., et al., *Double-blind comparison of an oral Escherichia coli preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis*. *Aliment Pharmacol Ther*, 1997. **11**(5): p. 853-8.
30. Kumagai, H., et al., *Failure of Fecal Microbiota Transplantation in a Three-Year-Old Child with Severe Refractory Ulcerative Colitis*. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr*, 2016. **19**(3): p. 214-220.
31. Gupta, S., E. Allen-Vercoe, and E.O. Petrof, *Fecal microbiota transplantation: in perspective*. *Therap Adv Gastroenterol*, 2016. **9**(2): p. 229-39.
32. Colman, R.J. and D.T. Rubin, *Fecal microbiota transplantation as therapy for inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis*. *J Crohns Colitis*, 2014. **8**(12): p. 1569-81.
33. Halme, L., et al., *Family and twin studies in inflammatory bowel disease*. *World J Gastroenterol*, 2006. **12**(23): p. 3668-72.

34. Jostins, L., et al., *Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease*. Nature, 2012. **491**(7422): p. 119-24.
35. Chan, I., et al., *The molecular basis of lipoid proteinosis: mutations in extracellular matrix protein 1*. Exp Dermatol, 2007. **16**(11): p. 881-90.
36. Fujimoto, N., et al., *Extracellular matrix protein 1 inhibits the activity of matrix metalloproteinase 9 through high-affinity protein/protein interactions*. Exp Dermatol, 2006. **15**(4): p. 300-7.
37. Louis, E., et al., *Genetics of ulcerative colitis: the come-back of interleukin 10*. Gut, 2009. **58**(9): p. 1173-6.
38. Fisher, S.A., et al., *Genetic determinants of ulcerative colitis include the ECM1 locus and five loci implicated in Crohn's disease*. Nat Genet, 2008. **40**(6): p. 710-2.
39. Loftus, E.V., Jr., *Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences*. Gastroenterology, 2004. **126**(6): p. 1504-17.
40. Ananthakrishnan, A.N., *Environmental triggers for inflammatory bowel disease*. Curr Gastroenterol Rep, 2013. **15**(1): p. 302.
41. Calkins, B.M., *A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease*. Dig Dis Sci, 1989. **34**(12): p. 1841-54.
42. Frolkis, A.D., et al., *The Association of Smoking and Surgery in Inflammatory Bowel Disease is Modified by Age at Diagnosis*. Clin Transl Gastroenterol, 2016. **7**: p. e165.
43. Cosnes, J., et al., *Gender differences in the response of colitis to smoking*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2004. **2**(1): p. 41-8.
44. Deng, P. and J. Wu, *Meta-analysis of the association between appendiceal orifice inflammation and appendectomy and ulcerative colitis*. Rev Esp Enferm Dig, 2016. **108**(7): p. 401-10.
45. Miyoshi, J. and E.B. Chang, *The gut microbiota and inflammatory bowel diseases*. Transl Res, 2016.

46. Mshvildadze, M., et al., *Intestinal microbial ecology in premature infants assessed with non-culture-based techniques*. J Pediatr, 2010. **156**(1): p. 20-5.
47. DiGiulio, D.B., et al., *Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation*. PLoS One, 2008. **3**(8): p. e3056.
48. Gensollen, T., et al., *How colonization by microbiota in early life shapes the immune system*. Science, 2016. **352**(6285): p. 539-44.
49. Bokulich, N.A., et al., *Antibiotics, birth mode, and diet shape microbiome maturation during early life*. Sci Transl Med, 2016. **8**(343): p. 343ra82.
50. Frank, D.N., et al., *Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(34): p. 13780-5.
51. Jandhyala, S.M., et al., *Role of the normal gut microbiota*. World J Gastroenterol, 2015. **21**(29): p. 8787-803.
52. Kaper, J.B., J.P. Nataro, and H.L. Mobley, *Pathogenic Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol, 2004. **2**(2): p. 123-40.
53. Danese, S. and C. Fiocchi, *Ulcerative colitis*. N Engl J Med, 2011. **365**(18): p. 1713-25.
54. Abreu, M.T., *Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(2): p. 131-44.
55. Machiels, K., et al., *A decrease of the butyrate-producing species Roseburia hominis and Faecalibacterium prausnitzii defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis*. Gut, 2014. **63**(8): p. 1275-83.
56. Orel, R. and T. Kamhi Trop, *Intestinal microbiota, probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(33): p. 11505-24.
57. Winter, S.E., et al., *Host-derived nitrate boosts growth of E. coli in the inflamed gut*. Science, 2013. **339**(6120): p. 708-11.

58. Petersen, A.M., et al., *A phylogenetic group of Escherichia coli associated with active left-sided inflammatory bowel disease*. BMC Microbiol, 2009. **9**: p. 171.
59. Chen, H.D. and G. Frankel, *Enteropathogenic Escherichia coli: unravelling pathogenesis*. FEMS Microbiol Rev, 2005. **29**(1): p. 83-98.
60. Alterthum, L.R.T.e.F., *Microbiologia*, ed. edição2015. 888.
61. Darfeuille-Michaud, A., *Adherent-invasive Escherichia coli: a putative new E. coli pathotype associated with Crohn's disease*. Int J Med Microbiol, 2002. **292**(3-4): p. 185-93.
62. Martinez-Medina, M., et al., *Similarity and divergence among adherent-invasive Escherichia coli and extraintestinal pathogenic E. coli strains*. J Clin Microbiol, 2009. **47**(12): p. 3968-79.
63. Rasheed, M.U., et al., *Antimicrobial drug resistance in strains of Escherichia coli isolated from food sources*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2014. **56**(4): p. 341-6.
64. Tadesse, D.A., et al., *Antimicrobial drug resistance in Escherichia coli from humans and food animals, United States, 1950-2002*. Emerg Infect Dis, 2012. **18**(5): p. 741-9.
65. Li, D., et al., *A multiplex PCR method to detect 14 Escherichia coli serogroups associated with urinary tract infections*. J Microbiol Methods, 2010. **82**(1): p. 71-7.
66. Bjarnsholt, T., *The role of bacterial biofilms in chronic infections*. APMIS Suppl, 2013(136): p. 1-51.
67. Nataro, J.P. and J.B. Kaper, *Diarrheagenic Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev, 1998. **11**(1): p. 142-201.
68. Kauffmann, F., *The serology of the coli group*. J Immunol, 1947. **57**(1): p. 71-100.
69. Stoodley, P., et al., *Biofilms as complex differentiated communities*. Annu Rev Microbiol, 2002. **56**: p. 187-209.
70. Naves, P., et al., *Measurement of biofilm formation by clinical isolates of Escherichia coli is method-dependent*. J Appl Microbiol, 2008. **105**(2): p. 585-90.

71. Kostakioti, M., M. Hadjifrangiskou, and S.J. Hultgren, *Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2013. **3**(4): p. a010306.
72. Bachmann, B.J., *Pedigrees of some mutant strains of Escherichia coli K-12*. Bacteriol Rev, 1972. **36**(4): p. 525-57.
73. Blount, Z.D., *The unexhausted potential of E. coli*. Elife, 2015. **4**.
74. Croxen, M.A., et al., *Recent advances in understanding enteric pathogenic Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev, 2013. **26**(4): p. 822-80.
75. Donnenberg, M.S., *Escherichia coli Pathotypes and Principles of Pathogenesis 2^a edição ed2013*.
76. Fleckenstein, J.M., et al., *Molecular mechanisms of enterotoxigenic Escherichia coli infection*. Microbes Infect, 2010. **12**(2): p. 89-98.
77. Varma, J.K., et al., *An outbreak of Escherichia coli O157 infection following exposure to a contaminated building*. JAMA, 2003. **290**(20): p. 2709-12.
78. Estrada-Garcia, T. and F. Navarro-Garcia, *Enterotoxigenic Escherichia coli pathotype: a genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2012. **66**(3): p. 281-98.
79. Servin, A.L., *Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev, 2005. **18**(2): p. 264-92.
80. Thomazini, C.M., et al., *High prevalence of aggregative adherent Escherichia coli strains in the mucosa-associated microbiota of patients with inflammatory bowel diseases*. Int J Med Microbiol, 2011. **301**(6): p. 475-9.
81. Sartor, R.B., *Microbial influences in inflammatory bowel diseases*. Gastroenterology, 2008. **134**(2): p. 577-94.
82. Du, Z., et al., *Development of gut inflammation in mice colonized with mucosa-associated bacteria from patients with ulcerative colitis*. Gut Pathog, 2015. **7**: p. 32.

83. Garrett, W.S., et al., *Communicable ulcerative colitis induced by T-bet deficiency in the innate immune system*. Cell, 2007. **131**(1): p. 33-45.
84. Tabaqchali, S., D.P. O'Donoghue, and K.A. Bettelheim, *Escherichia coli antibodies in patients with inflammatory bowel disease*. Gut, 1978. **19**(2): p. 108-13.
85. Swidsinski, A., et al., *Mucosal flora in inflammatory bowel disease*. Gastroenterology, 2002. **122**(1): p. 44-54.
86. Martin, H.M., et al., *Enhanced Escherichia coli adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer*. Gastroenterology, 2004. **127**(1): p. 80-93.
87. de Souza, H.L., et al., *Mucosa-associated but not luminal Escherichia coli is augmented in Crohn's disease and ulcerative colitis*. Gut Pathog, 2012. **4**(1): p. 21.
88. Naves, P., et al., *Correlation between virulence factors and in vitro biofilm formation by Escherichia coli strains*. Microb Pathog, 2008. **45**(2): p. 86-91.
89. Martinez-Medina, M., et al., *Biofilm formation as a novel phenotypic feature of adherent-invasive Escherichia coli (AIEC)*. BMC Microbiol, 2009. **9**: p. 202.
90. Clermont, O., S. Bonacorsi, and E. Bingen, *Rapid and simple determination of the Escherichia coli phylogenetic group*. Appl Environ Microbiol, 2000. **66**(10): p. 4555-8.
91. Kotlowski, R., et al., *High prevalence of Escherichia coli belonging to the B2+D phylogenetic group in inflammatory bowel disease*. Gut, 2007. **56**(5): p. 669-75.
92. Gordon, D.M., et al., *Assigning Escherichia coli strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method*. Environ Microbiol, 2008. **10**(10): p. 2484-96.
93. Rodrigues, J., *Pathotypes and probiotics: response to a commentary on the detection of a Shiga toxin producing Escherichia coli in a Crohn's disease patient*. Gut Pathog, 2015. **7**: p. 17.

94. Martinez-Medina, M., Garcia-Gil L. J., *Escherichia coli* in chronic inflammatory bowel diseases: An update on adherent invasive *Escherichia coli* pathogenicity. *World J Gastrointest Pathophysiol*, 2014. **5**(3): p. 213-227.