



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA**

**PEDRO HENRIQUE QUINTELA SOARES DE MEDEIROS**

**UM NOVO MODELO MURINO DE INFECCÃO ENTÉRICA POR *Shigella flexneri* E  
TESTE VACINAL DE CEPA DE *S. flexneri* ATENUADA**

**FORTALEZA**

**2019**

**PEDRO HENRIQUE QUINTELA SOARES DE MEDEIROS**

**UM NOVO MODELO MURINO DE INFECCÃO ENTÉRICA POR *Shigella flexneri* E  
TESTE VACINAL DE CEPA DE *S. flexneri* ATENUADA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Microbiologia Médica. Área de concentração: Microbiologia Humana e Animal.

Orientador: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima.

Coorientador: Prof. Richard Littleton Guerrant.

**FORTALEZA**

**2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- M44n Medeiros, Pedro Henrique.  
Um novo modelo murino de infecção entérica por *Shigella flexneri* e teste vacinal de cepa de *S. flexneri* atenuada / Pedro Henrique Medeiros. – 2019.  
139 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2019.  
Orientação: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima .  
Coorientação: Prof. Dr. Richard Littleton Guerrant.
1. *Shigella*. 2. Diarreia. 3. Modelo pré-clínico. 4. Vacinas. 5. Zinco. I. Título.

CDD 616.9

---

**PEDRO HENRIQUE QUINTELA SOARES DE MEDEIROS**

**UM NOVO MODELO MURINO DE INFECCÃO ENTÉRICA POR *Shigella flexneri* E  
TESTE VACINAL DE CEPA DE *S. flexneri* ATENUADA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Microbiologia Médica. Área de concentração: Microbiologia Humana e Animal.

Aprovada em: 19/09/2019.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Geraldo Bezerra da Silva Júnior  
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

---

Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

---

Prof. Dr. Fábio Miyajima  
Fundação Oswaldo Cruz

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); aos Institutos Nacionais de Saúde dos Estados Unidos da América (*National Institutes of Health – NIH*); e à Fundação *Bill & Melinda Gates*, financiadores dos experimentos aqui descritos.

À Universidade Federal do Ceará (UFC) e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica (PPGMM) pela estrutura e suporte proporcionados para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima, primeiramente pela oportunidade dada para realizar este trabalho, possibilitando que eu utilizasse a colaboração que ele mesmo construiu e consolidou por mais de 30 anos com a Universidade de Virgínia (Estados Unidos da América) e, mais recentemente, com a *Imperial College London* (Reino Unido). Também pela grande experiência e entusiasmo científicos transmitidos a cada conversa, e pela paciência com minha teimosia nas discussões científicas.

Ao Prof. Richard Littleton Guerrant, pela sua generosidade e excelente orientação oferecida na Universidade de Virgínia, por acreditar em mim e por ser inspiração e modelo para a minha formação científica.

Ao David Bolick, por ser o melhor companheiro de experimentos, por sua imensurável ajuda e pelas discussões científicas e não-científicas ao longo deste trabalho.

À Deiziane Costa, pelo apoio nos experimentos, discussões e amizade durante minha passagem pela Universidade de Virginia.

Aos outros integrantes do laboratório do Dr. Guerrant durante minha estadia em Charlottesville, que me ajudaram nos experimentos e discussões nas reuniões de laboratório: Ellen Ledwaba, Reinaldo Oriá e Glynis Kolling.

À Dra. Eileen Barry, da Universidade de Maryland, pela colaboração no projeto de desenvolvimento de modelo de shigelose em camundongos e teste de sua cepa vacinal (CVD 1208S).

Ao Dr. Hervé Agaisse, pela parceria e sua expertise em shigelose durante o desenvolvimento do trabalho, por ceder a cepa mutante e ajudar na realização dos experimentos em microscopia.

Ao Dr. Jonathan Swann e à Dra. Natasa Giallorou, da *Imperial College London* (Reino Unido), pela valiosa colaboração e ensinamentos sobre análise metabolômica.

Às amigas Mariana Bona e Samilly Ribeiro pela revisão do trabalho escrito e suas contribuições valiosas.

A todos os integrantes do grupo de pesquisa do professor Aldo, desde sua parte administrativa até os estudantes e técnicos de laboratório, pelo carinho, receptividade e bom convívio nesses anos.

À minha mãe, pelo amor e suporte sem igual em todos os momentos dessa trajetória de doutorado – e de outras.

À minha esposa, Elana Figueiredo, pelo apoio e paciência constantes durante o processo de elaboração deste trabalho, bem como pela ajuda na formatação e revisão do trabalho escrito.

“A coisa mais bela que podemos vivenciar é o mistério, fonte de toda verdadeira arte e ciência”.

(Albert Einstein)

## RESUMO

**Introdução:** A ausência de um modelo pré-clínico robusto de infecções por *Shigella flexneri* é um dos principais entraves para o desenvolvimento de vacinas para tais infecções. **Objetivo:** Desenvolver um modelo de infecção por *S. flexneri* em camundongos pré-tratados com antimicrobianos (ATM) que mimetize desfechos clínicos e possibilite a investigação do papel da deficiência em micronutriente zinco (DZ) e a avaliação de vacinas. **Material e Métodos:** Camundongos C57/BL6 foram submetidos a dietas nutrida (DN) ou DZ e tratados com ATM (colistina, gentamicina, metronidazol e vancomicina) por três dias prévios à inoculação oral de *S. flexneri* 2457T  $10^8$  UFC/animal. Diarreia e peso corpóreo foram observados diariamente, e amostras de fezes e tecidos intestinais foram coletadas para detecção molecular de *S. flexneri* e para determinação de biomarcadores inflamatórios e citocinas por ensaios imunoenzimáticos. Amostras de urinas e fezes foram coletadas para análise metabolômica por ressonância magnética nuclear e de microbioma por sequenciamento gênico do 16S rRNA, respectivamente. Uma cepa atenuada de *S. flexneri* (com deleção dos genes *guaBA*, *sen* e *set*) foi avaliada como candidato vacinal por via nasal para eficácia e imunogenicidade. **Resultados:** Animais DN pré-tratados com ATM mostraram excreção fecal de *S. flexneri* por pelo menos uma semana, enquanto não houve detecção em animais que não receberam ATM. A infecção causou diarreia, perda de peso e aumento de inflamação intestinal entres os dias 2-4 pós-infecção (pi). Tais consequências mostraram dependência do sistema de secreção tipo 3 de *S. flexneri*, colonização preferencial do cólon com localização intra e extracelular, ruptura do epitélio, produção de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10) e modulação de gêneros bacterianos (aumento de *Turicibacter* spp. e *Eubacterium* spp.; e redução de *Blautia* spp.). A infecção em animais DZ pré-tratados com ATM promoveu colonização persistente por pelo menos 50 dias pi, e perda de peso, diarreia e inflamação intestinal de modo tardio em comparação com os animais DN, além de formação de *S. flexneri* extracelular em estrutura semelhante a biofilme. A análise metabolômica mostrou que distúrbios na  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, no metabolismo de taurina e na degradação de triptofano são associados à infecção em DZ. Animais DN pré-vacinados não apresentaram perda de peso ou diarreia e tiveram menor colonização, além de apresentarem produção de anticorpos específicos para *S. flexneri*. **Conclusão:** Apresentamos um novo modelo murino de shigelose que mimetiza desfechos clínicos. DZ promove colonização persistente, formação de biofilme e alterações metabólicas na resposta contra a infecção. A cepa vacinal atenuada de *S. flexneri* mostrou-se eficaz na prevenção dos sintomas de diarreia e perda de peso, e imunogênica contra lipopolissacarídeo específico de *S. flexneri*.

**Palavras-chave:** *Shigella*. Diarreia. Modelo pré-clínico. Vacinas. Zinco.



## ABSTRACT

**Background:** The absence of a robust pre-clinical model of *S. flexneri* infections is major barrier for the vaccine development for these infections. **Objective:** To develop an infection model of *S. flexneri* in antibiotic pre-treated mice which could mimic clinical outcomes and enable investigating the role of micronutrient zinc deficiency (ZD) and evaluation of vaccines. **Material and Methods:** C57/BL6 mice were fed nourished (ND) or ZD diets and treated with antimicrobials (colistin, gentamycin, metronidazole and vancomycin) for three days prior to oral inoculation with *S. flexneri* 2457T strain  $10^8$  CFU/mouse. Diarrhea and bodyweight were observed daily and fecal samples and intestinal tissues were collected for molecular detection of *S. flexneri* and measurement of inflammatory biomarkers and cytokines by immunoenzymatic assays. Urine and fecal samples were collected for metabolomics analysis by gas nuclear magnetic resonance and microbiome analysis by sequencing of 16S RNAr, respectively. An attenuated *S. flexneri* strain (with deletion of genes *guaBA*, *sen* and *set*) was tested intranasally as vaccine candidate for efficacy and immunogenicity. **Results:** ND mice pretreated with antimicrobials showed *S. flexneri* fecal excretion for at least a week, while there was no detection in mice that did not receive antimicrobials. *S. flexneri* infection caused diarrhea, weight loss and increased intestinal inflammation between days 2-4 post-infection (pi). These outcomes were dependent on the type 3 secretion system, preferential colonization to the colon with intra and extracellular localization, epithelial disruption, cytokines production (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10), and modulation of bacterial genera (increased *Turicibacter* spp. and *Eubacterium* spp.; and decreased *Blautia* spp). Infection in ZD antibiotic pre-treated mice led to persistent colonization for at least 50 days pi and delayed weight loss, diarrhea and intestinal inflammation in comparison with DN mice, as well as extracellular localization of *S. flexneri* with biofilm-like structures. Metabolomics analysis showed that defects on fatty acid  $\beta$ -oxidation, taurine metabolism and degradation of tryptophan are associated with infection in ZD. Pre-vaccinated ND mice did not present weight loss or diarrhea and had shorter courses of pathogen colonization and presented *S. flexneri* specific antibody responses. **Conclusion:** We present a new murine model of shigellosis, which mimics common clinical outcomes in children. ZD promotes persistent colonization, biofilm formation and metabolic alterations in the response to infection. An attenuated strain of *S. flexneri* was efficacious and immunogenic in ND mice.

**Key-words:** *Shigella*. Diarrhea. Pre-clinical model. Vaccines. Zinc.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Distribuição dos sorogrupos <i>Shigella sonnei</i> e <i>Shigella flexneri</i> no mundo: razão de prevalência <i>S. sonnei</i> / <i>S. flexneri</i> .....	25
Figura 2 – Fotografia de modelo celular de infecção por <i>Shigella</i> : linhagem de fibroblastos L2 de camundongos infectados por <i>S. flexneri</i> .....	27
Figura 3 – Esquema do processo de patobiologia (invasão, propagação e inflamação gerada) pela infecção por <i>Shigella</i> .....	29
Figura 4 – Linha temporal do modelo de infecção por <i>S. flexneri</i> em camundongos C57BL/6 proposto neste trabalho, caracterizando os parâmetros e os respectivos tempos de análise utilizados.....	49
Figura 5 – Linha temporal para teste vacinal no modelo de infecção por <i>S. flexneri</i> em camundongos C57BL/6 proposto neste trabalho, caracterizando os parâmetros e os respectivos tempos de análise utilizados.....	52
Figura 6 – Modulação da excreção fecal de <i>S. flexneri</i> em camundongos nutridos pelo uso de antimicrobianos.....	62
Figura 7 – Indução de diarreia e redução de peso corpóreo por <i>S. flexneri</i> em camundongos nutridos.....	64
Figura 8 – Efeito dose-resposta da infecção oral por <i>S. flexneri</i> em camundongos nutridos pré-tratados com antimicrobianos: peso corpóreo, diarreia e excreção fecal de <i>S. flexneri</i> .....	66
Figura 9 – Infecção por cepa de <i>S. flexneri</i> mutante para o sistema de secreção tipo 3 (SST3) em camundongos nutridos.....	68
Figura 10 – Modulação do microbioma intestinal pela infecção por <i>S. flexneri</i> em camundongos nutridos.....	71
Figura 11 – Modulação da excreção fecal de <i>S. flexneri</i> em camundongos desnutridos pelo uso de antimicrobianos.....	73
Figura 12 – Identificação de <i>S. flexneri</i> viável em amostras fecais dos camundongos infectados.....	75
Figura 13 – Indução de diarreia e redução de peso corpóreo por <i>S. flexneri</i> em camundongos deficientes em zinco.....	77
Figura 14 – Inflamação intestinal causada por <i>S. flexneri</i> em camundongos nutridos e deficientes em zinco.....	79

Figura 15 – Colonização intestinal e localização de <i>S. flexneri</i> em camundongos nutridos e deficientes em zinco infectados por <i>S. flexneri</i> .....	81
Figura 16 – Alterações histológicas promovidas por <i>S. flexneri</i> em camundongos nutridos e deficientes em zinco infectados por <i>S. flexneri</i> .....	83
Figura 17 – Produção de citocinas induzida por infecção por <i>S. flexneri</i> em camundongos nutridos e deficientes em zinco.....	85
Figura 18 – Correlação de mediadores inflamatórios de imunidade inata com escores histopatológicos em animais nutridos infectados por <i>S. flexneri</i> .....	87
Figura 19 – Tratamento com zinco em camundongos deficientes em zinco e infectados por <i>S. flexneri</i> .....	89
Figura 20 – Modulação do metaboloma de amostra de urina por <i>S. flexneri</i> em camundongos.....	92
Figura 21 – Proteção contra doença a partir de segunda infecção homóloga por <i>S. flexneri</i> em camundongos nutridos.....	94
Figura 22 – Proteção vacinal contra <i>S. flexneri</i> em camundongos nutridos.....	96
Figura 23 – Efeito da vacina em camundongos deficientes em zinco infectados por <i>S. flexneri</i> .....	98

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição de macronutrientes e calorias das dietas nutrida (DN) e deficientes em zinco (DZ) e proteína (DP).....	46
Tabela 2 – Parâmetros utilizados no desenvolvimento do modelo e seus respectivos tempos de análise.....	50
Tabela 3 – Características do modelo murino de infecção por <i>S. flexneri</i> proposto, com relação aos seus pontos positivos e potenciais limitações/lacunas.....	112

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>2-MOV</b>	3-Metil-2-oxovalerato
<b>2-OG</b>	2-Oxoglutarato
<b>2-OIC</b>	2-Oxoisocaproato
<b>2-OIV</b>	2-Oxoisovalerato
<b>2-PY</b>	N-metil-2-piridona-5-carboxamida
<b>2-PY</b>	N-metil-2-piridona-5-carboxamida
<b>2-PY</b>	N-metil-2-piridona-3-carboxamida
<b>3-IS</b>	3-Indoxilsulfato
<b>3-UPA</b>	Ácido 3-ureidopropiônico
<b>4-HPA</b>	4-Hidroxifenilacetato
<b>4-PY</b>	N-metil-4-piridona-3-carboxamida
<b><i>A. castellanii</i></b>	<i>Acanthamoeba castellanii</i>
<b>AAALAC</b>	<i>Association for the Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care</i> / Associação Internacional de Avaliação e Acreditação de Cuidado de Animais de Laboratório
<b>Ágar EMB</b>	<i>Agar Eosin Methylene Blue</i> / Ágar Eosina Azul de Metileno
<b>Ágar XLD</b>	<i>Xylose Lysine Deoxycholate agar</i> / Ágar de Desoxicolato-Lisina-Xilose
<b>anti-LPS</b>	<i>Anti-Lipopolysaccharides</i> / Anti-Lipopolissacarídeos
<b>ATM</b>	Antimicrobianos
<b>BBI</b>	<i>Broad Band Inverse Detection</i> / <i>Detecção Inversa de Banda Larga</i>
<b>BG</b>	Butirilglicina
<b>CDC</b>	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i> / Centro de Controle e Prevenção de Doenças
<b>CFU / UFC</b>	<i>Colony Forming Unit</i> / Unidade de Formação de Colônias
<b>Ct</b>	<i>Cycle threshold</i> / Ciclo limiar
<b>D<sub>2</sub>O</b>	<i>Deuterium oxide</i> / Óxido de deutério
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> / Meio de Eagle modificado por Dulbecco
<b>DN</b>	Dieta nutrida
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> / Ácido Desoxirribonucleico
<b>DO</b>	Densidade óptica
<b>DP</b>	Dieta deficiente em proteína

<b>DZ</b>	Dietas deficientes de zinco
<b>EAEC</b>	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
<b>EDTA</b>	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> / Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
<b>ESPGHAN</b>	<i>European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition</i> / Sociedade Europeia de Pediatria, Gastroenterologia, Hepatologia e Nutrição
<b>ETEC</b>	<i>Enterotoxigenic Escherichia coli</i> / <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
<b>FDR</b>	<i>False Discovery Rate</i> / Taxa de falsas descobertas
<b>GAA</b>	Guanidinoacetato
<b>G-CSF</b>	<i>Granulocyte colony stimulating fator</i> / Fator estimulador de colônias de granulócitos
<b>GEMS</b>	<i>The Global Enterics MultiCenter Study</i> / Estudo Multicêntrico Entérico Global
<b>H&amp;E</b>	<i>Hematoxylin and Eosin</i> / Hematoxilina e Eosina
<b>HG</b>	Hexanoglicina
<b>HIV</b>	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> / Vírus da Imunodeficiência Humana
<b>HSH</b>	Homens que fazem sexo com homens
<b>IFN- <math>\gamma</math></b>	<i>Interferon gamma</i> / Interferon gama
<b>IgG</b>	<i>Immunoglobulin G</i> / Imunoglobulina G
<b>IL</b>	<i>Interleukin</i> / Interleucina
<b>IVG</b>	Isovalerilglicina
<b>LCN</b>	<i>Lipocalin</i> / Lipocalina
<b>LPS</b>	<i>Lipopolysaccharides</i> / Lipopolissacarídeos
<b>MALDI-TOF</b>	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption. Ionization – Time of Flight</i> / Ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisador de tempo-de-voe
<b>MAL-ED</b>	<i>The Interactions of Malnutrition &amp; Enteric Infections: Consequences for Child Health and Development</i> / Interações da Desnutrição e Infecções Entéricas: Consequências para a Saúde e Desenvolvimento Infantil
<b>m-HPPS</b>	M-hidroxilfenilpropiobisulfato
<b>MPO</b>	<i>Myeloperoxidase</i> / Mieloperoxidase
<b>MS</b>	Ministério da Saúde
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>NAG</b>	N-acetil-glutamina

<b>NF- <math>\kappa</math>B</b>	<i>Factor Nuclear kappa B</i> / Fator de Transcrição Nuclear kappa B
<b>NIH</b>	<i>National Institutes of Health</i> / Institutos Nacionais de Saúde
<b>NK</b>	<i>Natural Killer cell</i> / Células Natural Killer
<b>NMND</b>	N-metil-nicotinamida
<b>OCT</b>	<i>Optimal Cutting Temperature</i> / Temperatura Ótima de Corte
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>OPLS-DA</b>	<i>Orthogonal Projections to Latent Structures Discriminant Analysis</i> / Análise Discriminante por Projeções Ortogonais a Estruturas Latentes
<b>OTU</b>	<i>Operational Taxonomic Unit</i> / Unidade taxonômica operacional
<b><i>P. shigelloides</i></b>	<i>Plesiomonas shigelloides</i>
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i> / Tampão Fosfato-Salino
<b>PCA</b>	<i>Principal Componente Analysis</i> / Análise de Componentes Principais
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> / Reação de Polimerase em Cadeia
<b>pi</b>	Pós-infecção
<b>PMN</b>	<i>Polymorphonuclear Leukocytes</i> / Leucócitos Polimorfonucleares
<b>RIPA</b>	<i>RadioImmuno Precipitation Assay</i> / Radioimunoensaio de precipitação
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic Acid</i> / Ácido Ribonucleico
<b>RNM</b>	Ressonância Magnética Nuclear
<b><i>S. boydii</i></b>	<i>Shigella boydii</i>
<b><i>S. dysenteriae</i></b>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<b><i>S. flexneri</i></b>	<i>Shigella flexneri</i>
<b><i>S. sonnei</i></b>	<i>Shigella sonnei</i>
<b>SDS</b>	<i>Sodium Dodecylsulphat</i> / Dodecilsulfato de sódio
<b>ShET1</b>	<i>Shigella enterotoxin 1</i> / Enterotoxina 1 de <i>Shigella</i>
<b>ShET2</b>	<i>Shigella enterotoxin 2</i> / Enterotoxina 2 de <i>Shigella</i>
<b>ShETs</b>	<i>Shigella enterotoxins</i> / Enterotoxinas de <i>Shigella</i>
<b>SST3</b>	Sistema de secreção tipo III
<b>TMA</b>	Trimetilamina
<b>TMAO</b>	Óxido de N-trimetilamina
<b>TMB</b>	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<i>Tumor necrosis factor alpha</i> / Fator de Necrose Tumoral Alfa
<b>TSP</b>	3-Trimetilsilil-1-[2,2,3,3- <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ] propionato

## LISTA DE SÍMBOLOS

<b><math>\alpha</math></b>	Alfa
<b><math>\beta</math></b>	Beta
<b><math>\gamma</math></b>	Gama
<b>g</b>	Gramas
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>Hz</b>	Hertz
<b>=</b>	Igual
<b>K</b>	Kelvin
<b>Kg</b>	Kilograma
<b>L</b>	Litros
<b>®</b>	Marca Registrada
<b><math>\mu</math>L</b>	Microlitros
<b><math>\mu</math>m</b>	Micrômetro
<b>mg</b>	Miligramas
<b>mL</b>	Mililitros
<b>mm</b>	Milímetro
<b>mM</b>	Milimol
<b>ms</b>	Milissegundos
<b>min</b>	Minuto
<b>n</b>	Número inteiro
<b>ppm</b>	Partes por milhão
<b>pg</b>	Picograma
<b>%</b>	Porcentagem
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>kcal</b>	Quilocalorias
<b>s</b>	Segundos
<b>U</b>	Unidade
<b>Zn</b>	Zinco



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	19
<b>2.1</b>	<b>Impacto das infecções entéricas na saúde infantil</b> .....	19
<b>2.2</b>	<b>Shigelose: definição</b> .....	22
<b>2.3</b>	<b>Epidemiologia da shigelose</b> .....	23
<b>2.4</b>	<b>Patobiologia da shigelose</b> .....	26
<b>2.4.1</b>	Microbioma intestinal e shigelose.....	32
<b>2.5</b>	<b>Manifestações clínicas da shigelose</b> .....	33
<b>2.6</b>	<b>Diagnóstico laboratorial em shigelose</b> .....	35
<b>2.7</b>	<b>Tratamento, controle e prevenção da shigelose</b> .....	36
<b>2.7.1</b>	Shigelose e zinco.....	38
<b>2.7.2</b>	Vacinas para shigelose.....	39
<b>2.8</b>	<b>Modelos <i>in vivo</i> em Shigelose</b> .....	41
<b>2.9</b>	<b>Justificativa</b> .....	42
<b>3</b>	<b>HIPÓTESES</b> .....	43
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	44
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	45
<b>5.1</b>	<b>Considerações éticas e uso de animais</b> .....	45
<b>5.2</b>	<b>Dietas, antimicrobianos e zinco</b> .....	45
<b>5.3</b>	<b>Cepas de <i>S. flexneri</i></b> .....	47
<b>5.4</b>	<b>Inóculos de infecção e de cepa vacinal</b> .....	47
<b>5.5</b>	<b>Desenho experimental</b> .....	49
<b>5.6</b>	<b>Parâmetros avaliados</b> .....	53
<b>5.6.1</b>	Análise clínica: perda de peso e diarreia.....	53
<b>5.6.2</b>	Análise de <i>S. flexneri</i> em fezes e tecidos.....	53
<b>5.6.3</b>	Análise de microbioma bacteriano em amostras de fezes.....	54
<b>5.6.4</b>	Análise de mieloperoxidase e lipocalina fecais.....	55
<b>5.6.5</b>	Análise histopatológica.....	56
<b>5.6.6</b>	Localização de <i>S. flexneri</i> no intestino.....	56
<b>5.6.7</b>	Análise das concentrações de citocinas intestinais.....	57
<b>5.6.8</b>	Análise metabólica em amostras de urina.....	57
<b>5.6.9</b>	Análise de anticorpos séricos específicos para <i>Shigella</i> .....	58

5.7	Análise de dados.....	59
6	<b>RESULTADOS</b> .....	61
6.1	Modulação da excreção fecal de <i>S. flexneri</i> pelo uso de antimicrobianos em camundongos nutridos.....	61
6.2	Indução de diarreia e redução de peso corpóreo por <i>S. flexneri</i> em camundongos nutridos.....	62
6.3	Avaliação dose-resposta de redução de peso corpóreo, diarreia e excreção fecal de <i>S. flexneri</i> em camundongos nutridos.....	65
6.4	Infecção por cepa de <i>S. flexneri</i> mutante para o sistema de secreção tipo 3 (SST3) em camundongos nutridos.....	67
6.5	Modulação do microbioma intestinal pela infecção por <i>S. flexneri</i> em camundongos nutridos.....	69
6.6	Modulação da excreção fecal de <i>S. flexneri</i> pelo uso de antimicrobianos em camundongos desnutridos.....	72
6.7	Indução de diarreia e redução de peso corpóreo por <i>S. flexneri</i> em camundongos deficientes em zinco.....	76
6.8	Inflamação intestinal causada por <i>S. flexneri</i> em camundongos nutridos e deficientes em zinco.....	78
6.9	Colonização intestinal, alteração histológica e presença de <i>S. flexneri</i> sistêmica em camundongos nutridos e deficientes em zinco infectados por <i>S. flexneri</i> .....	80
6.10	Produção de citocinas induzida por infecção por <i>S. flexneri</i> em camundongos nutridos e deficientes em zinco.....	84
6.11	Tratamento com zinco em camundongos deficientes em zinco e infectados por <i>S. flexneri</i> .....	88
6.12	Modulação do metaboloma por <i>S. flexneri</i> em camundongos.....	90
6.13	Proteção contra doença a partir de segunda infecção homóloga por <i>S. flexneri</i> em camundongos.....	93
6.14	Proteção vacinal contra <i>S. flexneri</i> em camundongos nutridos.....	95
6.15	Efeito da vacina em camundongos deficientes em zinco infectados por <i>S. flexneri</i> .....	97
7	<b>DISCUSSÃO</b> .....	99

<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>115</b>
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>116</b>
<b>10</b>	<b>ANEXO A: Protocolo do Comitê de Ética.....</b>	<b>134</b>
<b>11</b>	<b>ANEXO B: Publicações relacionadas à tese.....</b>	<b>135</b>
<b>12</b>	<b>ANEXO C: Lista de publicações durante o período de doutorado (Agosto/2016 a Setembro/2019).....</b>	<b>137</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As infecções causadas pelas bactérias do gênero *Shigella*, também chamadas shigeloses, representam um dos principais problemas de saúde pública em crianças de países em desenvolvimento, causando cerca de 200 mil mortes por ano no mundo (TROEGER, C. *et al.*, 2018). No Brasil, estima-se que a prevalência destas infecções seja de 8 a 10% em menores de 1 ano e de 15 a 18% em maiores de 2 anos, merecendo maior destaque para a população das regiões Norte e Nordeste (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). A shigelose é classicamente caracterizada pela presença de sintomas gastrointestinais, como diarreia, dores abdominais, desidratação e vômitos (KOTLOFF *et al.*, 2018).

O progresso recente no diagnóstico de doenças pelo uso de técnicas moleculares possibilitou um maior reconhecimento do impacto da shigelose na saúde humana (LINDSAY *et al.*, 2013). Dois recentes estudos multicêntricos em crianças da África subsaariana, América Latina e sul da Ásia apontaram estas bactérias como os principais enteropatógenos associados com disenteria e diarreia aquosa (LIU *et al.*, 2016; KOTLOFF *et al.*, 2019; PLATTS-MILLS *et al.*, 2018). *Shigella* spp. são também um dos principais patógenos detectados em crianças sem diarreia, sendo associados a prejuízos no crescimento e inflamação intestinal crônica (ROGAWSKI *et al.*, 2018).

O desenvolvimento de uma vacina para a shigelose é de urgência na atualidade e diversos grupos têm empregado diferentes abordagens visando a sua obtenção (BAKER *et al.*, 2018; CHEN *et al.*, 2016; KAMINSKI *et al.*, 2014). Entretanto, a inexistência de um modelo pré-clínico robusto, que mimetize as características da doença em humanos, constitui um dos principais entraves a esse desenvolvimento, principalmente para testes de eficácia vacinal (KOTLOFF *et al.*, 2018).

Vários estudos têm mostrado uma contribuição importante do microbioma intestinal para as consequências das infecções entéricas e desnutrição (BLANTON *et al.*, 2016; LINDSAY *et al.*, 2015; MILLION *et al.*, 2017). A influência de fatores ambientais nas infecções, como a dieta e o uso de antimicrobianos, tem sido cada vez mais evidenciada. Neste contexto, a importância do micronutriente zinco para o desfecho das infecções entéricas é amplamente reconhecida, sendo recomendado para tratamento de diarreia em crianças de países em desenvolvimento desde 2004 pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Além disso, a sua deficiência é associada ao prejuízo global da saúde de crianças e maior suscetibilidade a infecções e diarreia. Entretanto, pouco se sabe sobre os mecanismos celulares envolvidos (YOUNG *et al.*, 2014).

O presente estudo se mostra como uma tentativa de elucidar tais lacunas. Propusemos o desenvolvimento de um novo modelo murino de infecção entérica por *S. flexneri* a fim de melhor reproduzir as características da doença em humanos, e avaliamos o uso de uma cepa vacinal neste modelo. Esta abordagem experimental permite reproduzir os desfechos clínicos da doença em crianças, permitindo o teste de intervenções profiláticas e terapêuticas, além de ajudar a compreender os mecanismos de patobiologia associados. Neste contexto, nós investigamos a influência da deficiência de zinco na patobiologia descrita. Além disso, a análise metabolômica de urina de camundongos infectados por *S. flexneri* foi realizada, abrindo perspectivas no entendimento dos mecanismos da patobiologia em shigelose.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 IMPACTO DAS INFECÇÕES ENTÉRICAS NA SAÚDE INFANTIL**

As infecções entéricas representam um grande problema de saúde pública e apresentam uma grande variedade de agentes etiológicos, os quais abrangem bactérias, vírus e protozoários (enteropatógenos). O espectro clínico destas infecções é classicamente caracterizado por episódios de diarreia, acompanhados ou não por dores abdominais, vômitos, febre e desidratação. A apresentação clínica pode ser ampla, variando desde sintomas gastrointestinais leves até disenteria e desidratação grave. Infecções subclínicas (assintomáticas) também são bastante frequentes. A transmissão ocorre usualmente por água ou alimentos contaminados, de pessoa a pessoa ou por resultado de higiene, saneamento básico e nutrição precários (LANATA *et al.*, 2013; PETRI *et al.*, 2008).

A diarreia, definida como a ocorrência de três ou mais fezes líquidas ou pastosas em um período de 24 horas, representa a quinta maior causa de morte em crianças abaixo de cinco anos de idade. O último grande estudo epidemiológico sobre diarreia infantil no mundo em 2016 mostrou que 1.105 bilhões de episódios de diarreia ocorreram em crianças abaixo de cinco anos de idade e cerca de 446 mil episódios diarreicos levaram à morte (TROEGER, C. *et al.*, 2018).

No final do século passado, os esforços da Organização Mundial de Saúde (OMS) e dos governos em implementar medidas para o controle das diarreias infecciosas em crianças, possibilitaram considerável queda das taxas de mortalidade, de 4,5 milhões de mortes/ano ao final dos anos 90 para 1,5 milhão de mortes/ano em 2010. Dentre as medidas, estão a vacina para rotavírus, investimento em saneamento básico e terapia do soro para reidratação oral (BLACK *et al.*, 2010). Entretanto, o ainda elevado número de mortes por doenças diarreicas e,

principalmente, as altas taxas de morbidade devem ainda servir de preocupação para a sociedade (BARTELT *et al.*, 2013). Uma maior gravidade do problema é percebida na África subsaariana e Sudeste asiático, locais com difícil acesso a serviços de saúde, água limpa e saneamento básico (LIU *et al.*, 2012).

Um fator de risco importante para a ocorrência de diarreias infecciosas é a desnutrição. O comprometimento da resposta imune inata pode levar a uma maior suscetibilidade ao estabelecimento de infecções entéricas que, por sua vez, desencadeiam um estado de má-absorção de nutrientes, além de dano tecidual e inflamação intestinal. Neste contexto, ocorre o que autores referem como o ciclo vicioso infecções entéricas-desnutrição. Este ciclo, na presença ou ausência de diarreia, tem sido associado a diversas consequências negativas ao desenvolvimento humano, como retardo no crescimento e prejuízo cognitivo da criança (GUERRANT *et al.*, 2013). Pesquisadores têm proposto o termo “Disfunção Entérica Ambiental” para designar um conjunto de alterações morfológicas e funcionais do intestino, sem a apresentação de sintomatologia, em indivíduos que vivem em ambientes com alta contaminação ambiental por enteropatógenos. Esta condição, que carece de mais estudos para ser caracterizada, parece estar associada a vários prejuízos na saúde infantil, como maior suscetibilidade a infecções, baixa resposta vacinal, prejuízo cognitivo e no crescimento (HARPER *et al.*, 2018).

Os resultados de dois grandes estudos multicêntricos realizados nos últimos anos, financiados pela Fundação *Bill and Melinda Gates*, têm contribuído de forma significativa para o entendimento atual sobre as infecções entéricas (MOKOMANE *et al.*, 2018; KOTLOFF *et al.*, 2018; SCHARF *et al.*, 2014). Uma pesquisa científica intitulada Estudo Multicêntrico Entérico Global (*The Global Enterics MultiCenter Study - GEMS*) foi a maior análise já realizada para o estudo da diarreia infantil moderada a grave no mundo, englobando mais de 22 mil crianças de sete países da África e Ásia (Mali, Gâmbia, Kênia, Moçambique, Bangladesh, Índia e Paquistão), com até cinco anos de vida, em um desenho caso-controle. Este estudo elencou quatro patógenos como os principais causadores de diarreia moderada a grave: rotavírus, *Cryptosporidium*, *Shigella* spp. e *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) (KOTLOFF *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2016). O outro estudo, denominado Interações da Desnutrição e Infecções Entéricas: Consequências para a Saúde e Desenvolvimento Infantil (*The Interactions of Malnutrition & Enteric Infections: Consequences for Child Health and Development – MAL-ED*), acompanhou crianças desde o nascimento até os dois anos de vida em oito países (Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal, Paquistão, Peru, África do Sul e Tanzânia) para investigação de enteropatógenos em crianças assintomáticas ou que apresentavam diarreia

da comunidade, que não necessita de um atendimento médico de emergência. Este coorte listou os patógenos rotavírus, norovírus, *Campylobacter* spp., astrovírus, *Shigella* spp. e *Cryptosporidium*, como os principais causadores da diarreia da comunidade (PLATTS-MILL *et al.*, 2015).

Diversos estudos têm associado eventos diarreicos a prejuízos no desenvolvimento físico infantil (KEUSCH *et al.*, 2014; KOSEK *et al.*, 2013; RICHARD *et al.*, 2013). Richard e colaboradores (2013) mostraram, através da análise conjunta de dados de sete diferentes coortes de Bangladesh, Brasil, Guiné-Bissau e Peru, que a ocorrência de diarreia foi consistentemente associada à redução de peso nas crianças a curto prazo, enquanto a redução na altura das crianças a longo prazo. O desenvolvimento cognitivo prejudicado já foi também associado a eventos diarreicos na infância precoce por vários estudos (FISCHER WALKER *et al.*, 2012; ‘LORNTZ *et al.*, 2006; NIEHAUS *et al.*, 2002).

O estudo MAL-ED tem ainda contribuído para o entendimento sobre o impacto das infecções entéricas subclínicas (ou disfunção entérica ambiental) em crianças de países em desenvolvimento, principalmente em relação à potencial indução de desnutrição. A alta carga de enteropatógenos em amostras não-diarreicas foram associadas a decrementos no peso e altura em crianças com 24 meses de idade na população total dos oito países envolvidos (REDE MAL-ED, 2017). Além disso, os resultados apontaram uma associação entre as alterações de peso e altura e exposição a enteropatógenos mediada, principalmente, por biomarcadores de inflamação sistêmica e, em menor grau, por biomarcadores de inflamação intestinal nestas crianças (KOSEK *et al.*, 2017). Mais especificamente, dois estudos mostraram contribuição das infecções por enteropatógenos individuais *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) (ROGAWSKI *et al.*, 2017) e *Campylobacter jejuni* (AMOUR *et al.*, 2016) para o prejuízo físico dessas crianças abaixo de dois anos de idade.

Em relação aos efeitos das infecções entéricas no desenvolvimento cognitivo, dados provenientes do estudo MAL-ED também mostram que altas taxas de frequências de enteropatógenos em crianças durante os dois primeiros anos de vida estão associadas a baixos escores cognitivos aos dois anos de idade, embora outros fatores, como ocorrência de doenças e concentração de hemoglobina, também exerçam importante contribuição (REDE MAL-ED, 2018). Considerando os efeitos cognitivos em crianças aos cinco anos de idade, outros fatores associados são nível educacional da mãe, dieta adequada de micronutrientes e nível socioeconômico da família (MCCORMICK *et al.*, 2019). Apesar dos avanços recentes nesta área, os mecanismos biológicos associados ainda não estão elucidados.

Outros estudos sugerem também que crianças com crescimento prejudicado e infecções entéricas repetidas são mais propícias a desenvolver obesidade e morbidades cardiovasculares mais tarde na vida (DEBOER *et al.*, 2013; GUERRANT *et al.*, 2013). Neste contexto, embora mais estudos precisem ser desenvolvidos para confirmar e elucidar estes efeitos, a ruptura na barreira intestinal associada à modificação da microbiota, com inflamação crônica sistêmica, bem como alterações epigenéticas, parecem estar envolvidas (ORIÁ *et al.*, 2016).

## 2.2 SHIGELOSE: DEFINIÇÃO

O termo shigelose se refere à infecção causada por bactérias do gênero *Shigella*. Estas bactérias foram primeiramente descritas no ano de 1898 pelo médico japonês Kyoshi Shiga após a investigação de um grande surto de disenteria no Japão. A epidemia de 1897 afetou mais de 90 mil indivíduos, com uma taxa de mortalidade acima de 20%. Shiga havia sido inspirado pelo renomado doutor Shibasaburo Kitasato, que estudou com Robert Koch, e ingressou no Instituto de Doenças Infecciosas de Tóquio para estudar doenças infecciosas sob os postulados de Koch. Após o isolamento do microrganismo das fezes e a demonstração de que esta bactéria causava diarreia em cachorros saudáveis, Shiga demonstrou a capacidade de esse microrganismo aglutinar com o soro de pacientes convalescentes, gerando a publicação de suas observações. Inicialmente, a bactéria foi denominada *Bacillus dysenterie*. Shiga descreveu também a produção de fatores tóxicos, dentre eles a atualmente conhecida toxina Shiga. Após a identificação da *Shigella dysenteriae* por Shiga, outros pesquisadores identificaram organismos semelhantes, como Flexner em 1900 e Sonne em 1915, que mais tarde seriam denominadas *Shigella flexneri* e *Shigella sonnei*, respectivamente. O gênero *Shigella* foi assim denominado somente em 1930 (TROFA *et al.*, 1999).

O gênero *Shigella* compreende um grupo de bactérias Gram-negativas pertencentes à tribo *Escherichieae* da família *Enterobacteriaceae*. São descritas como pequenos bacilos Gram-negativo, imóveis, sem cápsulas, não-fermentadores de lactose e anaeróbios facultativos (NIYOGI, 2005).

As diferentes espécies de *Shigella*, também denominadas sorogrupos, são: *S. dysenteriae* (sorogrupo A, constituído por 15 sorotipos); *S. flexneri* (sorogrupo B, composto por 6 sorotipos); *S. boydii* (sorogrupo C, formado por 18 sorotipos); e *S. sonnei* (sorogrupo D, consistindo em um sorotipo). Esta classificação é baseada na composição do antígeno O do lipopolissacarídeo da membrana externa da parede celular. Sorogrupos A, B e C são mais semelhantes entre si com base em testes bioquímicos, enquanto a *S. sonnei* pode ser



diferenciada pelas reações positivas de beta-D-galactosidase e ornitina-descarboxilase (LIMA *et al.*, 2015). Outras características bioquímicas gerais das bactérias deste gênero incluem a incapacidade de utilizar ácido cítrico como a única fonte de carbono, serem oxidase-negativas, não produzirem ácido sulfídrico, não produzirem gás a partir de glicose, serem inibidas por cianeto de potássio e não sintetizarem lisina descarboxilase (MAURELLI, 2013).

### 2.3 EPIDEMIOLOGIA DA SHIGELOSE

A incidência anual de diarreia devido a *Shigella* spp. no mundo é estimada em 191 milhões, sendo mais de 100 milhões de casos em países em desenvolvimento (KLIRCK *et al.*, 2015). Estima-se ainda que 5 a 15% dos episódios de diarreia e 30 a 50% dos episódios de disenteria no mundo podem ser atribuídos à infecção por *Shigella* (NIYOGI *et al.*, 2005). Em um estudo multicêntrico realizado em seis países asiáticos, a taxa de incidência de shigelose foi de 13% (VON SEIDLEN *et al.*, 2006). Apesar de a taxa de mortalidade por shigelose em países em desenvolvimento ter decrescido na última década, não houve grande alteração na taxa de morbidade (BARDHAN *et al.*, 2010).

Nos Estados Unidos da América (EUA), aproximadamente 15 mil casos de shigelose confirmados em laboratório são reportados anualmente ao Centro de Controle e Prevenção de Doenças (*Centers for Disease Control and Prevention – CDC*) (SCALLAN *et al.*, 2011). Entretanto, considerando as subnotificações, estima-se que este número seja um décimo do valor real (JOH *et al.*, 2013). A não realização de técnicas moleculares para o diagnóstico laboratorial contribui para a subnotificação (VON SEIDLEN *et al.*, 2006).

Embora os casos mais graves sejam relacionados a epidemias de *S. dysenteriae*, a maior prevalência se deve à shigelose endêmica, manifestada principalmente em crianças de países em desenvolvimento. A associação entre *Shigella* e diarreia varia com a localidade e a idade das crianças, como demonstrado em um estudo multicêntrico. Neste estudo, observou-se uma maior associação entre a quantidade de *Shigella* spp. nas fezes e diarreia com o aumento da idade (LINDSAY *et al.*, 2015). Em geral, a maior incidência ocorre em crianças de um a quatro anos de idade. Além disso, durante epidemias de *S. dysenteriae* sorotipo 1, todas as faixas etárias são afetadas. Em crianças desnutridas, *Shigella* causa o ciclo vicioso de desnutrição, infecção recorrente e consequente retardo de crescimento (NIYOGI *et al.*, 2005).

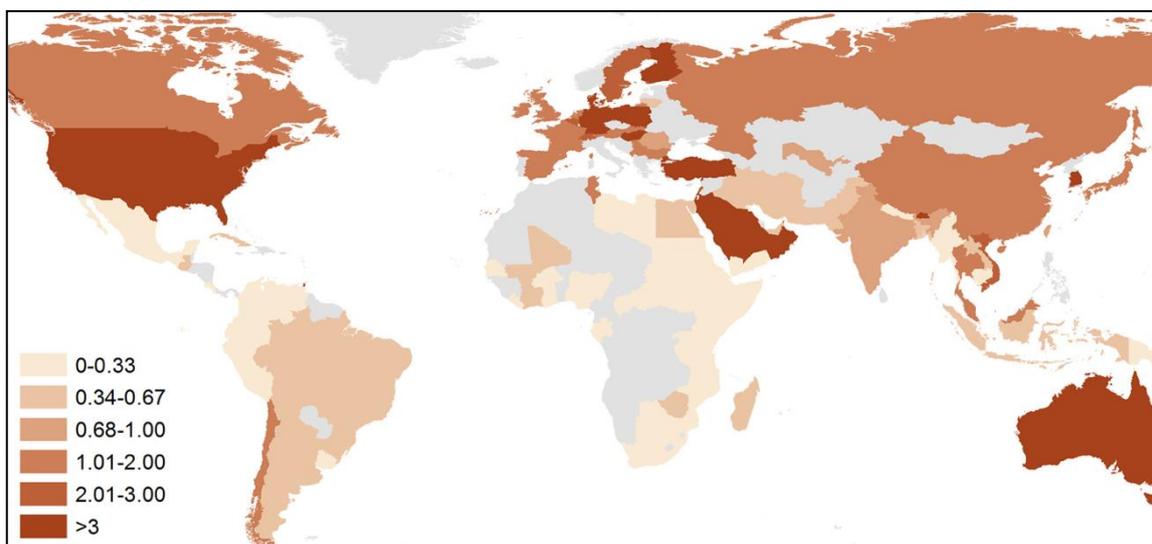
Dois recentes estudos epidemiológicos multicêntricos reforçaram a importância da *Shigella* spp. em crianças de países em desenvolvimento como causadora de diarreia, elencando o patógeno como um dos mais prevalentes, além de mostrar associação com disenteria

(KOTLOFF *et al.*, 2013; PLATTS-MILL *et al.*, 2015). Outros estudos também têm demonstrado a importância da *Shigella* spp. como causa de diarreia em países em desenvolvimento (BONKOUNGOU *et al.*, 2013; SAMBE-BA *et al.*, 2013). Em um estudo realizado em Bangladesh que investigou especificamente a etiologia da disenteria em mais de duas mil crianças abaixo de cinco anos de idade, *Shigella* spp. foi o principal agente causador, representando 32% dos casos (FERDOUS *et al.*, 2014). Em países desenvolvidos, diversos surtos diarreicos têm suas causas reportadas por espécies de *Shigella* spp. (GUZMAN *et al.*, 2013; KOZAK *et al.*, 2013).

A shigelose também é relatada em casos de “diarreia do viajante”, geralmente ocorrendo em indivíduos de países desenvolvidos que adquirem a infecção em viagens a países em que há maior prevalência de infecções (países em desenvolvimento). Em casos de diarreia adquirida em viagens de indivíduos de Quebec, Canadá, a regiões da América Central, Caribe e México, observou-se uma grande prevalência de *Shigella* spp. (TRÉPANIER *et al.*, 2014). Em outro estudo realizado com pacientes adultos com diarreia devido à *Shigella* spp. na Espanha, identificou-se uma grande proporção de pacientes que havia regressado de viagens internacionais recentes (TORO *et al.*, 2015).

A *S. flexneri* é classicamente mais relacionada a infecções de países em desenvolvimento, enquanto a *S. sonnei* é mais encontrada em países desenvolvidos, embora estudos epidemiológicos recentes apontem uma tendência para um aumento da prevalência global de *S. sonnei* (ANDERSON *et al.*, 2016). Essa diferença pode ser caracterizada pela razão *S. sonnei/S. flexneri* global apresentada na FIGURA 1, onde os países mais ricos possuem razão acima de 2.01 (THOMPSON *et al.*, 2015).

**Figura 1: Distribuição dos sorogrupos *Shigella sonnei* e *Shigella flexneri* no mundo: razão de prevalência *S. sonnei*/*S. flexneri*.**



Fonte: THOMPSON *et al.*, 2015

No Brasil, devido à larga extensão territorial e contrastes socioeconômicos evidentes, há uma grande variação na distribuição dos sorogrupos. Enquanto em Minas Gerais e em São Paulo, há alta prevalência de *S. sonnei* (PENATTI *et al.*, 2007; SOUSA *et al.*, 2013), no Amazonas, Piauí e Rondônia, há predomínio de *S. flexneri* (CRUZ *et al.*, 2014; NUNES *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2008).

Thompson e colaboradores (2015) revisaram as duas hipóteses acerca das diferenças de distribuição entre *S. sonnei* e *S. flexneri*. Primeiramente, a alta prevalência de *Plesiomonas shigelloides* (um bacilo Gram-negativo) em áreas com elevada contaminação ambiental promove aos indivíduos, após frequente exposição a esse microorganismo, o desenvolvimento de resposta imune protetora contra *S. sonnei*, devido a *P. shigelloides* compartilhar similaridades estruturais na cadeia O do lipopolissacarídeo, importante antígeno de superfície para a produção de resposta imune adaptativa. Dessa forma, em áreas com contaminação ambiental, a proteção contra *S. sonnei* favorece a diminuição do número de infecções por este sorogrupo. Outra hipótese se refere à capacidade fagocítica da ameba *Acanthamoeba castellanii*, frequente em ambientes aquáticos, frente a bactérias do gênero *Shigella*, contribuindo para a proteção da bactéria contra tratamentos químicos da água. Contudo, as propriedades de virulência de *Shigella flexneri* impedem a *A. castellanii* de atuar como reservatório para este sorogrupo, levando o protozoário à morte celular por apoptose. Assim, este protozoário serve como reservatório de *S. sonnei* (THOMPSON *et al.*, 2015).

As espécies menos prevalentes da grande maioria dos países, *Shigella boydii* e *Shigella dysenteriae*, são encontradas em frequências similares de 6% dos casos (LIMA *et al.*, 2015). Contudo, a distribuição de *S. boydii* concentra-se em maior parte em Bangladesh e Sudeste Asiático, enquanto *S. dysenteriae* é mais encontrada em casos de surtos graves, sendo o sorotipo 1 a causa da forma mais grave da doença e alvo de grande preocupação mundial (ANDERSON *et al.*, 2016; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2005). Este último sorogrupo, embora muito prevalente no século 19 e começo de século 20, tornou-se raro por razões não conhecidas (ANDERSON *et al.*, 2016).

O processo de transmissão ocorre geralmente por água e alimento contaminados, além de contato direto pessoa-pessoa, embora outras vias de transmissão não sejam descartadas em shigelose (NIYOGI *et al.*, 2005). A transmissão sexual tem sido cada vez mais reportada, sendo mais prevalente em homens que fazem sexo com homens (HSH) (SIMMS *et al.*, 2015). Neste contexto, Toro e colaboradores (2015) recomendam a análise de infecção por HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) em homens adultos com shigelose.

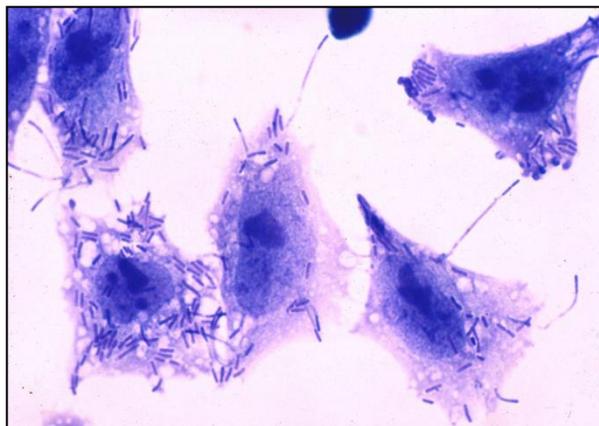
## 2.4 PATOBIOLOGIA DA SHIGELOSE

O gênero *Shigella* é bastante infeccioso, necessitando de pouco menos de 100 micro-organismos para causar a doença (MAURELLI *et al.*, 2013). Diversos estudos *in vivo* e *in vitro* já investigaram os mecanismos moleculares clássicos envolvidos na patogênese deste grupo de bactérias (JENNISON *et al.*, 2003). Neste contexto, o sorogrupo *S. flexneri* (mais especificamente os sorotipos 2a e 5a) é predominantemente utilizado como modelo para o conhecimento da patogênese (SCHNUPF *et al.*, 2019). Por outro lado, Anderson e colaboradores (2016) alertam para a ausência de conhecimentos mais amplos sobre as outras espécies de *Shigella*, principalmente *S. sonnei*, de modo a investigar possíveis relações entre diferentes eventos de transmissão identificados em estudos epidemiológicos e os mecanismos moleculares dos sorogrupos.

A capacidade da bactéria de resistir à acidez do estômago humano e ultrapassar as barreiras físicas do trato gastrointestinal é essencial para o estabelecimento da shigelose. Ao alcançar o cólon, o bacilo invade a mucosa epitelial e inicia ciclos de replicação e colonização intracelular, que resultam em intensa resposta inflamatória. Este processo gera as manifestações clínicas da doença (JENNISON *et al.*, 2003). A especificidade da invasão epitelial ao cólon em detrimento de regiões do intestino delgado ainda não foi completamente elucidada

(ANDERSON *et al.*, 2016). A **Figura 2** mostra a visualização de invasão de *Shigella* em fibroblastos de camundongos (MAURELLI *et al.*, 2013).

**Figura 2: Fotografia de modelo celular de infecção por *Shigella*: linhagem de fibroblastos L2 de camundongos infectados por *S. flexneri*.**



Fonte: MAURELLI *et al.*, 2013

Uma dificuldade que deve ser superada pela bactéria no trato gastrointestinal é a temperatura. O mecanismo de regulação gênica de *Shigella* spp. é intimamente influenciado pelas variações de temperatura, através de sequências de RNA mensageiro de genes mediadores de choque térmico. A absorção de ferro em *Shigella* spp., regulada pela proteína ShuA, é fundamental para a replicação intracelular da bactéria e parece estar regulada por este mecanismo associado à temperatura (LIMA *et al.*, 2015).

Um outro fator importante no processo de colonização de *Shigella* spp. é a camada de muco do intestino. É sugerido que a bactéria reorganiza as moléculas de mucina, promovendo acúmulo na superfície de células infectadas e facilitando o acesso ao epitélio. A *S. flexneri* altera a transcrição gênica de várias mucinas em um processo dependente a proteína MxiD, componente do sistema de secreção da bactéria (ANDERSON *et al.*, 2016). Ainda outro componente físico envolvido na patobiologia da shigelose é o oxigênio. Recentemente, foi descrito como as bactérias de *Shigella* usam o oxigênio intestinal para facilitar a colonização na mucosa intestinal, gerando hipóxia tecidual. Esse processo é dependente do sistema de secreção do tipo III (SST3) (TINEVEZ *et al.*, 2019) – importante estratégia de virulência encontrado em várias bactérias (como *E. coli*, *Yersinia* e *Salmonella*) e que permite translocação de proteínas produzidas por elas para as células infectadas (KONEMAN *et al.*, 2008).

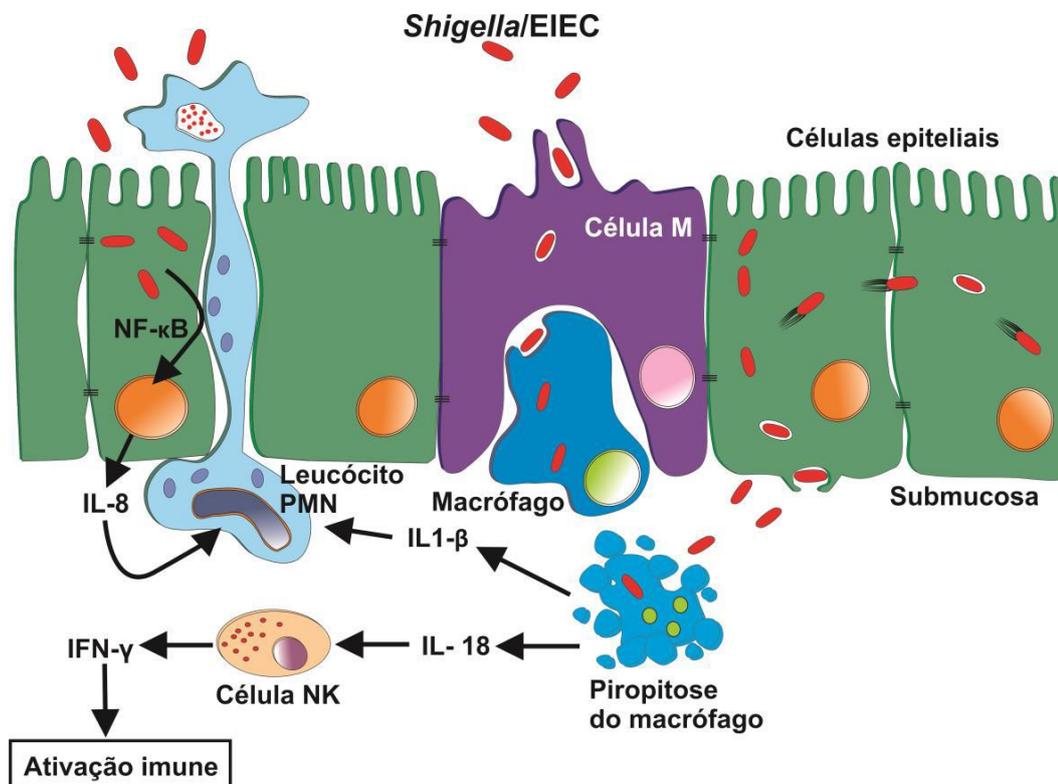
Após se instaurar no cólon, o processo de patogênese em shigelose pode ser dividido em quatro estágios: (1) invasão celular; (2) multiplicação intracelular; (3) propagação inter e

intracelular; e (4) morte da célula hospedeira (MAURELLI *et al.*, 2013; NIYOGI *et al.*, 2005). A bactéria invade o epitélio intestinal, usando como “rota” as células M (células epiteliais membranosas que transportam antígenos do lúmen pela barreira intestinal para ação de linfócitos e macrófagos). Em seguida, alcançam a lâmina própria, infectando macrófagos e reinvadindo o epitélio pela membrana basolateral. Dentro do macrófago, a *Shigella* consegue sobreviver no pH ácido por meio de bombas de efluxo (PASQUA *et al.*, 2019). Os macrófagos são induzidos à piroptose, liberando grandes quantidades de fatores inflamatórios, como IL-8, IL-18 e IL-1 $\beta$ , que contribuem para o recrutamento de células polimorfonucleares para o sítio de infecção. Neste contexto, a *Shigella* interage com as células da lâmina própria de várias maneiras, seja invadindo ou apenas secretando efetores dentro de linfócitos T, e prejudica a resposta imune (SALGADO-PABÓN *et al.*, 2014). Livre na lâmina própria, o influxo de *Shigella* pela camada epitelial danifica a integridade do epitélio, permitindo a entrada de mais bactérias do lúmen através de mecanismos independentes das células M, por via basolateral (JENNISON *et al.*, 2004). Este processo ocorre por intermédio de interação com integrinas e receptor CD44 (AGAISSSE *et al.*, 2016).

Um estudo recente de Ferrari e colaboradores (2019) mostrou que a *Shigella* secreta fatores de virulência (IpaJ e VirA) que desregulam o transporte intracelular da célula epitelial, impedindo a reciclagem de receptores e assim promovendo a invasão na célula. Uma vez dentro do citosol, a *Shigella* tem o potencial de replicação, que é facilitado pela liberação de efetores do SST3 que inibem a resposta inflamatória do hospedeiro, promovendo sobrevivência da *Shigella* na célula e caracterizando sua propriedade intracelular (SCHNUPF *et al.*, 2019).

O processo de adesão da *Shigella* ainda é pouco investigado, apesar de ser uma etapa essencial para o desenvolvimento da patogênese de patógenos intracelulares. Outros fatores de virulência com função de adesão devem ser caracterizados em estudos futuros (LIMA *et al.*, 2015). A invasão e a colonização do epitélio intestinal são fatores determinantes para a patogênese da shigelose e, para isso, são necessárias ações de múltiplos genes, os quais são extensivamente estudados. A **Figura 3** esquematiza os eventos mais importantes da patobiologia em shigelose.

**Figura 3: Esquema do processo de patobiologia (invasão, propagação e inflamação gerada) pela infecção por *Shigella*.**



Fonte: Dissertação de mestrado de Mariana Duarte Bona, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Ceará. A **Figura 3** esquematiza os eventos da patobiologia em shigelose. A bactéria invade o epitélio intestinal através das células M, por meio de um processo de endocitose. Os macrófagos da lâmina própria a reconhecem e são induzidos à morte por piroptose. Dessa forma, a bactéria fica livre para reinvadir o epitélio pela via basolateral, sendo capaz de se multiplicar e se locomover entre diferentes células do epitélio. De forma concomitante, diversos mediadores inflamatórios, como IL-8, IL-18, IL-1β, são liberados e medeiam o recrutamento de leucócitos polimorfonucleares (PMN), além de induzir a ativação de células NK e produção de IFN-γ. A lesão da barreira epitelial intestinal permite ainda que outras bactérias (*Shigella*) do lúmen invadam a lâmina própria por vias independentes da célula M.

Os estudos de invasão celular de *Shigella* spp. apontam que este processo é mediado pelo plasmídeo de virulência *inv*. Nele, o locus *ipa* seria responsável pela produção dos antígenos plasmidiais de invasão (IpaA, B, C e D), além de outros fatores importantes para a invasão, como a proteína SepA. O locus *mxi-spa* é responsável pela produção dos componentes do SST3, que tem a função de liberar diversas proteínas efetoras do citoplasma bacteriano para a célula hospedeira. O gene *virK* foi relatado como sendo um dos reguladores deste processo de liberação (SIDIK *et al.*, 2014). Tais efetores têm a função de invasão celular, sobrevivência

intracelular e evasão de resposta imune, a partir de atuação em diferentes processos celulares (ASHIDA *et al.*, 2015). Neste contexto, um emergente alvo das funções efetoras em *Shigella* é o sistema de ubiquitina do hospedeiro, envolvido em variados processos celulares (TANNER *et al.*, 2015). A estrutura do SST3 de *Shigella* foi melhor caracterizada a partir de tomografia eletrônica (HU *et al.*, 2015).

A família de proteínas IpaH compreende um grupo de efetores caracterizado por atuarem na sobrevivência bacteriana, ativando morte celular de macrófagos e inibindo NFκB (ASHIDA *et al.*, 2016). Após a entrada, a *Shigella* é capaz de se mover dentro do citoplasma e entrar em células epiteliais adjacentes. Para esta propagação intra e intercelular, a proteína IcsA é crucial, interagindo com fatores do hospedeiro e usando a polimerização de actina para a motilidade. Mais recentemente, IcsA tem sido implicada no processo de adesão, propiciando o contato com a célula do hospedeiro, sendo dependente da ativação do SST3 por sais biliares (ZUMSTEG *et al.*, 2014). Neste processo, a proteína IcsB é importante para evitar reconhecimento autofágico do hospedeiro (SCHROEDER *et al.*, 2008).

Outro gene relacionado à invasão bacteriana e sobrevivência intracelular é o *ial*, que por sua vez é regulado pelo gene *virB*. A regulação da expressão do *virB* acontece pela expressão do gene *virF*. Vários outros genes produtores de fatores de virulência estão envolvidos na patogênese da shigelose, como *pic* e *sigA*, localizados no cromossomo e responsáveis pela expressão das proteases com atividade de mucinase e hemaglutinação (JENNISON *et al.*, 2004; SCHROEDER *et al.*, 2008; FAHERTY *et al.*, 2012). Zhang e colaboradores (2013) demonstraram que a deleção do gene *pic* em cepa de *S. flexneri* isolada na China diminuiu a virulência a partir de análises *in vitro* de invasão celular e *in vivo* de dano tecidual em camundongos.

O grande dano tecidual causado pela *Shigella* resulta em absorção deficiente de água, nutrientes e solutos, que pode causar diarreia, bem como a presença de sangue e muco nas fezes. Neste processo, algumas toxinas são descritas como atuantes. A enterotoxina 1 de *Shigella*, ou ShET1, (codificada pelo gene *set*) e a enterotoxina 2 de *Shigella*, ou ShET2 (codificada pelo gene *sen*), induzem secreção de fluidos para o intestino, contribuindo para a diarreia aquosa (FARFÁN *et al.*, 2011). ShET1 e ShET2 são reconhecidamente importantes fatores de virulência em *Shigella*, sendo avaliadas como potenciais alvos para vacinas (KOTLOFF *et al.*, 2004). Além delas, a toxina Shiga (codificado pelo gene *stx*), presente na *Shigella dysenteriae* tipo 1, é citotóxica para variados tipos celulares e responsável pelo desenvolvimento de lesões vasculares no cólon, rim e sistema nervoso central (NIYOGI *et al.*, 2005; SCHROEDER *et al.*, 2008).



Vários estudos têm descrito exemplos de interações entre a *Shigella* spp. e componentes do hospedeiro, com envolvimento de subversão da resposta imune, importante para a sobrevivência da bactéria (LOPEZ-MONTERO *et al.*, 2017). Um exemplo que ilustra os mecanismos de subversão da resposta imune pela *Shigella* foi recentemente descrito por Wandel e colaboradores (2017), que descreveram que proteínas ligadoras de guanilato são importantes componentes do sistema imune induzidos por resposta inflamatória caracterizada por IFN- $\gamma$ . Tais proteína podem proteger o hospedeiro se ligando às bactérias e impedindo a disseminação das mesmas pelo epitélio. Entretanto, os autores demonstraram que a *Shigella* pode contra-agir neste mecanismo por meio da ligase de ubiquitina IpaH9.8 E3 bacteriana, permitindo a liberação das bactérias e sua disseminação no epitélio. No epitélio, a *Shigella* promove o equilibrado balanço entre indução e inibição de morte celular, a partir da modulação dos mecanismos da resposta inflamatória, de modo a continuar no seu principal nicho, o citosol da célula epitelial (ASHIDA *et al.*, 2015).

Apesar dos avanços no entendimento da patogênese de shigelose até os dias de hoje, principalmente em relação à atuação dos fatores de virulência, Anderson e colaboradores (2016) apontam para a necessidade de uma maior realização de pesquisa básica para o avanço na compreensão da colonização por *Shigella*. A complexa combinação do papel de diferentes fatores de virulência deve contribuir para o aparecimento dos sintomas clínicos em shigelose, porém esta integração de funções é pouco avaliada. Neste contexto, a investigação das espécies mais dominantes na comunidade, com o uso de sequenciamento do genoma inteiro e genopatigem, deve permitir a identificação de potenciais combinações de estratégias de virulência, que podem também ajudar no desenvolvimento de vacinas (MATTOCK *et al.*, 2017).

Além dos estudos mecanísticos celulares e moleculares em modelos *in vitro* e *in vivo*, em que as funções dos fatores de virulência em cepas são caracterizadas e relacionadas ao sistema imune, a investigação de genes de virulência em uma maior variedade de cepas de *Shigella* spp. da comunidade tem contribuído para o avanço do entendimento em shigelose. Tais estudos buscam caracterizar a prevalência de genes de virulência, bem como associá-los a desfechos clínicos na população (FARSHAD *et al.*, 2006; GHOSH *et al.*, 2014; LLUQUE *et al.*, 2015; SANGEETHA *et al.*, 2014; SOUSA *et al.*, 2013). Neste sentido, nosso grupo de pesquisa recentemente investigou genes de virulência de *Shigella* em crianças brasileiras de baixo nível socioeconômico. Em um estudo que analisou cepas isoladas de 63 cepas de *Shigella* spp. de crianças com diarreia moderada a grave de Fortaleza-Brasil, descrevemos que infecções por *S. flexneri* desencadeavam desfechos clínicos mais graves do que infecções por *S. sonnei*, e

que isso se associava à presença do gene *sepA* (que codifica uma protease extracelular) e a um maior nível de resistência antimicrobiana (MEDEIROS *et al.*, 2018). Na tentativa de se aprofundar no desvendamento de determinantes genéticos da bactéria que levam à diarreia em shigelose, realizamos também um grande estudo caso-controle de diarreia que utilizou 1.200 crianças de seis cidades do semiárido brasileiro. O estudo identificou um grupo de genes mais associado a eventos de diarreia quando comparados a crianças saudáveis: *sen* – enterotoxina 2 de *Shigella*; *ipgB2* e *ipgB1* – efetores do SST3 que modula os filamentos de actina; e *ospF* – efetor do SST3 que promove supressão da resposta imune do hospedeiro) (BONA *et al.*, 2019).

#### 2.4.1 MICROBIOMA INTESTINAL E SHIGELOSE

Nos últimos anos, observou-se grandes avanços no entendimento da importância do microbioma intestinal para a saúde humana. Vários estudos têm procurado correlacionar grupos microbianos com diferentes condições fisiológicas ou patogênicas, contudo tais correlações têm se mostrado complexas (RINNINELA *et al.*, 2019). Além disso, relações de causa-efeito nem sempre são observadas. Neste sentido, diversos fatores do hospedeiro e do microorganismo, incluindo idade, duração da colonização, quantificação do microorganismo e fatores ambientais podem definir o potencial benéfico ou prejudicial de microorganismos para o hospedeiro (CIRSTEA *et al.*, 2018).

No contexto das infecções entéricas, alguns avanços já foram alcançados sobre o entendimento da influência do microbioma na virulência de patógenos (VOGT *et al.*, 2017). Diversas moléculas produzidas por componentes da microbiota intestinal, como ácidos graxos de cadeia curta, succinato, glicanos, ácidos biliares secundários e indutores de *quórum sensing*, são descritas como moduladoras do crescimento ou da virulência de patógenos entéricos, embora poucos estudos se dedicam ao desvendamento dos mecanismos moleculares exatos (DUCARMON *et al.*, 2019; VOGT *et al.*, 2015).

Uma abordagem bastante utilizada é a investigação das consequências do uso de antimicrobianos na alteração de suscetibilidade a infecções entéricas (ISAAC *et al.*, 2017; KHLAN *et al.*, 2016). Mais especificamente, vários modelos experimentais em camundongos de infecção por patógenos entéricos têm utilizado o tratamento com antimicrobianos para induzir suscetibilidade a sintomas, como diarreia e perda de peso (BARTELT *et al.*, 2017; BOLICK *et al.*, 2014; BOLICK *et al.*, 2018; GIALLOUROU *et al.*, 2018). O uso de diferentes dietas em modelos pré-clínicos para entendimento de alterações no microbioma intestinal também tem sido observado (MAYNERIS-PERXACHS *et al.* 2016; MU *et al.*, 2016).

As interações entre *Shigella* spp. e o microbioma comensal intestinal ainda são pouco compreendidas (ANDERSON *et al.*, 2016; BAKER *et al.*, 2018). O estudo de Lindsay e colaboradores (2015) analisou mais de três mil amostras de fezes de crianças com e sem diarreia de países em desenvolvimento, utilizando sequenciamento do gene da subunidade 16S do RNA ribossômico. Os autores identificaram quatro grupos de *Lactobacillus* relacionados com proteção contra a doença associada à *Shigella* spp. (LINDSAY *et al.*, 2015). A observação de que espécies de *Lactobacillus* spp. são benéficas ao homem corrobora com estudos prévios já consolidados de microbioma intestinal. Em um estudo realizado em macacos de diferentes localidades geográficas submetidos à infecção por *Shigella dysenteriae*, observou-se alteração na suscetibilidade à infecção em associação com variações na microbiota intestinal (SEEKATZ *et al.*, 2013).

É importante ainda destacar que, em modelos clínicos ou pré-clínicos, a expansão de grupos bacterianos, onde incluem-se *Shigella* spp., é frequentemente associada com processos patogênicos associados à inflamação intestinal aguda/crônica (MU *et al.*, 2016). Um estudo inédito que realizou análise metagenômica de amostras fecais de 475 pacientes com sintomas de gastroenterite aguda demonstrou abundância aumentada de bactérias pertencentes ao grupo *Escherichia/Shigella* (CASTAÑO-RODRIGUES *et al.*, 2018). Li e colaboradores (2018), após análise metagenômica de fezes de veados saudáveis e com diarreia, mostraram que as bactérias do grupo *Escherichia/Shigella* são os principais grupos da microbiota intestinal associados à diarreia em veados de cativeiro. Em conjunto, estes dados reforçam o envolvimento de *Shigella* em composição de microbioma intestinal associada a condições de doença, o que deve reforçar mais estudos para identificar o papel da *Shigella* em microbiomas saudáveis ou suscetíveis à patologias.

## 2.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA SHIGELOSE

Embora tradicionalmente associada à diarreia com presença de sangue, o espectro clínico da shigelose pode variar, desde diarreia aquosa leve até casos mais severos com sangue e grave desidratação (NIYOGI *et al.*, 2005). Além disso, estudos recentes têm mostrado a alta prevalência de *Shigella* spp. em indivíduos assintomáticos (BLISS *et al.*, 2018), com destaque para crianças de países em desenvolvimento (ROGAWSKI *et al.*, 2018).

A clínica em shigelose pode ser caracterizada por manifestações intestinais e, com menor frequência, extraintestinais. O período de incubação é de 1 a 7 dias, mas os sintomas geralmente ocorrem dentro de 3 dias. Apesar da gravidade, a infecção é autolimitada e, se não

tratada, tem geralmente duração de uma a duas semanas, embora possa durar até um mês (MAURELLI *et al.*, 2013). O estágio de disenteria pode ou não ser precedido da diarreia aquosa, que é provavelmente associada à passagem da bactéria pelo intestino delgado e indução de secreção intestinal (MAURELLI *et al.*, 2013). Outros sintomas não específicos podem acompanhar a infecção, como febre e dores abdominais. Cerca de um terço dos pacientes apresentam febre (DUPONT *et al.*, 2005). *S. dysenteriae* sorotipo 1 causa a forma mais grave da doença, enquanto *S. sonnei* é caracterizada pela forma mais leve. *S. flexneri* e *S. boydii* possuem espectros mais variados da doença (MAURELLI *et al.*, 2013).

*Shigella* spp. é a principal causa de disenteria no mundo (FERDOUS *et al.*, 2014). Em um estudo de caso-controle em crianças de comunidades do Paquistão que buscou comparar a diarreia causada por *Shigella* spp. com a causada por espécies de *Campylobacter* spp., outra bactéria reconhecida pela associação com disenteria, a shigelose apresentou indivíduos mais frequentemente acometidos com dores abdominais e disenteria (SOOFI *et al.*, 2011).

A presença de *Shigella* spp. já foi relatada em indivíduos assintomáticos, com maior prevalência em adultos, porém também em crianças de comunidade da Índia. É sugerido que tais indivíduos são determinantes no ciclo de transmissão da doença (BLISS *et al.*, 2018; GHOSH *et al.*, 2014). Em estudo de coorte que buscou investigar a associação de retardo no crescimento infantil com importantes patógenos bacterianos (*Shigella* spp., *Escherichia coli* enterotoxigênica e *Campylobacter* spp.), *Shigella* spp. foi o único associado com redução de crescimento linear (LEE *et al.*, 2014). *Shigella/Escherichia coli* enteroinvasiva foi também associada com desnutrição em estudo caso-controle realizado em crianças de seis meses a dois anos de Bangladesh (PLATTS-MILLS *et al.*, 2017).

As manifestações extraintestinais da shigelose foram demonstradas em estudo realizado em Bangladesh, identificando reação leucemóide, síndrome hemolítica urêmica, hiponatremia grave e distúrbios neurológicos. Neste estudo, *S. dysenterie* tipo 1 foi o sorotipo mais prevalente associado a essas manifestações (KHAN *et al.*, 2013). Estados de imunossupressão, como infecção pelo vírus do HIV e desnutrição, podem estar associados, em casos mais atípicos, a uma infecção sistêmica de *Shigella* (“shigellemia”). Em estudo realizado na África do Sul, 429 casos de shigelose sistêmica foram detectados entre os anos de 2003 e 2009, sendo *S. flexneri* 2a o sorotipo mais prevalente (30%). Além disso, a presença da infecção por HIV foi associada a maior taxa de mortalidade (KEDDY *et al.*, 2012).

## 2.6 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL EM SHIGELOSE

O diagnóstico laboratorial da shigelose pode ser realizado por técnicas que envolvam identificação bioquímica, sorológica ou molecular. Atualmente, os métodos microbiológicos convencionais ainda são os mais utilizados na rotina. Utiliza-se meios de cultura seletivos, como Ágar Salmonela-Shigella (em que as espécies exibem inibição do crescimento variável e colônias incolores sem enegrecimento), Ágar Hektoen (onde formam colônias verde-escuras), Ágar MacConkey (onde formam colônias incolores), Ágar EMB (onde formam colônias transparentes) e Ágar XLD (onde formam colônias transparentes) (KONEMAN *et al.*, 2008). O processo de identificação é seguido por testes bioquímicos, que permitem a confirmação do gênero *Shigella*, como fermentação de lactose, descarboxilação de lisina, hidrólise de ureia, utilização de citrato e produção de gás sulfídrico, e sorológicos, compreendendo um processo que pode levar de 3 a 5 dias para a obtenção do resultado (LI *et al.*, 2009).

Diante desta realidade, muitos estudos têm sugerido novas metodologias, com princípios moleculares, para a detecção de *Shigella* (MOKHTARI *et al.*, 2012). É bem documentado que as espécies de *Shigella* são organismos frágeis que podem não ser identificados por metodologias microbiológicas de rotinas. Um estudo multicêntrico realizado na Ásia aponta que a incidência da shigelose deve exceder as estimativas prévias, já que o DNA (ácido desoxirribonucleico) da *Shigella* pôde ser detectado em até um terço das amostras com cultura negativa (VON SEIDLEN *et al.*, 2006).

As técnicas moleculares de detecção de genes para diagnóstico utilizam em geral o gene *ipaH* como alvo. IpaH é uma proteína que compõe o complexo de invasão celular, sendo presente em múltiplas cópias (4 a 10) distribuídas no plasmídeo e no cromossomo (LI *et al.*, 2009; MOKHTARI *et al.*, 2012; OJHA *et al.*, 2013; THIEM *et al.*, 2004; ZHAO *et al.*, 2013). As principais vantagens dos métodos moleculares para diagnóstico de *Shigella* são a rapidez dos resultados e os melhores valores de sensibilidade e especificidade, como demonstrados por alguns estudos que compararam a Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) em relação à cultura microbiológica convencional (LINDSAY *et al.*, 2015; MOKHTARI *et al.*, 2012; THIEM *et al.*, 2004). Outras metodologias baseadas em quimioluminescência (LUMINEX®), sondas acopladas a reações de PCR (Taqman) e espectrometria de massa (MALDI-TOF) também têm sido desenvolvidas (KHOT *et al.*, 2013; LINDSAY *et al.*, 2013).

Um grande desafio para o diagnóstico de *Shigella* é a diferenciação das cepas de *Escherichia coli* enteroinvasiva. Técnicas de sorotipagem são frequentemente utilizadas, porém não possuem eficiência completa (LIMA *et al.*, 2015). Ambas as espécies possuem 80-90% de

similaridade quanto ao genoma (ambas possuem o gene *ipaH*) e é sugerido que estas bactérias surgiram de um mesmo ancestral e que poderiam estar agrupadas como um subgrupo dentro do gênero *Escherichia* (LAN *et al.*, 2004). Entretanto, por razões históricas e médicas, estes dois grupos de patógenos mantiveram-se como diferentes (STROCKBINE *et al.*, 2005). Os estudos mais recentes, baseados em análises de filogenômica, têm confirmado a alta similaridade e sugerido a redefinição da classificação taxonômica de espécies de *Shigella*, considerando-as como pertencentes um subtipo de *E. coli* (PETTENGIL *et al.*, 2016). De forma geral, o uso dos testes bioquímicos permite a diferenciação das duas bactérias, pois cepas de *E. coli* são geralmente móveis, positivas para descarboxilase, fermentam glicose com formação de gás e são indol-negativo, enquanto cepas de *Shigella* spp. se comportam de modo contrário (VAN DEN BELD *et al.*, 2012).

As técnicas moleculares podem também ajudar no manejo da doença, apontando espécies mais susceptíveis a antimicrobianos, através da detecção de genes codificadores de proteínas envolvidas em mecanismos de resistência antimicrobiana, ou avaliando a gravidade da infecção, através da quantificação microbiana de *Shigella* spp. (LINDSAY *et al.*, 2013; TARIQ *et al.*, 2012). Além disso, há a capacidade da diferenciação das espécies, usualmente por PCR múltiplos ou microarranjo de DNA (LI *et al.*, 2009; OJHA *et al.*, 2013).

## **2.7 TRATAMENTO, CONTROLE E PREVENÇÃO DA SHIGELOSE**

A maioria das estratégias de intervenção existentes para tratamento, controle e prevenção em shigelose são recomendadas para outras infecções entéricas. A abordagem clássica do uso do soro para reidratação oral contribui para a redução de morbidade e mortalidade, porém outras medidas, como o uso de antimicrobianos, probióticos e micronutrientes também são descritas. Além disso, intervenções no ciclo de transmissão da doença, como melhora do saneamento básico e higiene pessoal, mostram ser eficazes (DAS *et al.*, 2014).

O uso de antimicrobianos em shigelose classicamente se justifica pelo potencial de: 1) diminuição da duração e gravidade da doença; 2) bloqueio da transmissão; e 3) redução do risco de potenciais complicações (KLONTZ *et al.*, 2015; SANGEETHA *et al.*, 2014). A OMS recomenda o uso de ciprofloxacina como primeira linha de tratamento. O uso de outras fluoroquinolonas, da ceftriaxona ou da azitromicina é sugerido somente em casos de resistência (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2005). A Sociedade Europeia de Pediatria, Gastroenterologia, Hepatologia e Nutrição (ESPGHAN) preconiza a azitromicina como

fármaco de primeira escolha para o tratamento da shigelose. Ceftriaxona, ácido nalidíxico e ciprofloxacina são agentes alternativos, sendo este último reservado para pacientes com idade superior a 17 anos (GUARINO *et al.*, 2008). O Ministério da Saúde recomenda a associação sulfametoxazol-trimetoprima como primeira opção no tratamento de casos severos de infecção por *Shigella* spp.. É importante ressaltar que o problema da resistência antimicrobiana em shigelose é grave e merece importante destaque. Vários estudos têm descrito cepas de *S. flexneri* e *S. sonnei* resistentes a antimicrobianos, como macrolídeos, quinolonas e cefalosporinas de terceira geração (KLONTZ *et al.*, 2015). A existência dessas cepas de *Shigella* spp. multirresistentes também tem sido descrita recentemente em diferentes localidades, como em pacientes pediátricos do Irã (ABBASI *et al.*, 2019) e China (ZHANG *et al.*, 2019). Além disso, o uso de abordagens genômicas têm explicado como a transferência horizontal de genes de resistência antimicrobiana promove o aparecimento de epidemias de shigelose no mundo (ABELMAN *et al.*, 2019; BAKER *et al.*, 2018).

Vários trabalhos têm avaliado o resultado de outras estratégias para o controle da shigelose. Um recente estudo testou o uso de um coquetel com cinco bacteriófagos em modelo murino de colonização por *Shigella sonnei* e mostrou resultados promissores (MAI *et al.*, 2015). Na prática clínica, o aleitamento materno exclusivo mostrou-se protetor da diarreia causada por *Shigella* spp. em estudo multicêntrico caso-controle de diarreia (LINDSAY *et al.*, 2015). Em relação a medidas de saneamento básico e melhora na higiene pessoal, em estudo realizado na província de Jiangsu, a não lavagem de mãos antes do jantar e a falta de acesso a fontes seguras de água foram associadas à shigelose (TANG *et al.*, 2014). Carias e colaboradores (2019) mostraram que, em creches, quando uma criança é infectada com *Shigella* spp., a exigência de resultado de PCR negativo para shigelose antes de retorno da criança é uma medida eficaz para reduzir o risco de transmissão de shigelose. Além disso, o aleitamento materno e a suplementação de nutrientes também parecem ser benéficos (DAS *et al.*, 2014).

O avanço no entendimento da influência da microbiota intestinal na patogênese de infecções entéricas, incluindo a shigelose, também tem sugerido que o uso de probióticos pode ser promissor no manejo da doença. Além disso, os recentes estudos multicêntricos GEMS e MAL-ED confirmaram a existência de consequências deletérias pós-doença em crianças com shigelose, como prejuízos físico e cognitivo, mesmo na ausência de diarreia (REDE MAL-ED, 2017). Dessa forma, novas estratégias de intervenção são necessárias para estes novos contextos (MOKOMANE *et al.*, 2018).

### 2.7.1 SHIGELOSE E ZINCO

O zinco é um micronutriente disponível em uma grande variedade de alimentos, sendo principalmente abundante em ostras, carne vermelha, fígado de carneiro e queijo. A biodisponibilidade do zinco a partir de diferentes alimentos pode variar bastante, sendo prontamente absorvido em produtos animais, crustáceos e moluscos, enquanto em menor proporção em alimentos vegetais, como grãos, legumes e nozes (SAMMAN *et al.*, 2012).

A importância do zinco para a saúde humana é inquestionável, consistindo em elemento essencial para o crescimento e desenvolvimento do organismo. O zinco está largamente distribuído no músculo esquelético e no osso, e é capaz de regular mais de 300 enzimas envolvidas em processos como síntese proteica e metabolismo de carboidratos (YAIR *et al.*, 2011).

No contexto das infecções entéricas, o zinco é reconhecidamente benéfico para o tratamento de diarreia. A deficiência de zinco está associada a aumento da morbidade e mortalidade na população infantil (KREBS *et al.*, 2014; YOUNG *et al.*, 2014). A OMS recomenda o tratamento de zinco a qualquer criança com diarreia de países em desenvolvimento (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2006). Lukacik e colaboradores (2008) realizaram uma meta-análise analisando diversos ensaios clínicos controlados e randomizados e concluíram que o zinco tem papel benéfico no tratamento de doença diarreia aguda. Além disso, há uma provável relação entre deficiência de zinco e infecções entéricas/disfunção entérica ambiental, porém os exatos mecanismos da atuação do zinco não estão claros (YOUNG *et al.*, 2014; LINDENMAYER *et al.*, 2014). Além disso, um estudo recente de Long e colaboradores (2019) mostrou que crianças de Bangladesh em risco de enteropatia ambiental possuem prejuízo na absorção de zinco. Os efeitos do zinco na diminuição da virulência de enteropatógenos também têm sido descritos, como alteração na expressão de genes de virulência bacterianos (CRANE *et al.*, 2014; MEDEIROS *et al.*, 2013; BOLICK *et al.*, 2014). Além disso, a atuação deste micronutriente na regulação específica da resposta mediada por neutrófilos, na indução da resposta humoral, no aumento de citocinas próinflamatórias e no controle do estresse oxidativo estão descritas em diferentes contextos (GAMMOH *et al.*, 2017).

Em shigelose, o tratamento com zinco já foi mostrado ser capaz de reduzir a duração da diarreia, promover a recuperação do ganho de peso após a infecção e diminuir a morbidade de diarreia em crianças abaixo de cinco anos de idade de Bangladesh (ROY *et al.*, 2008). O zinco também foi capaz de modular a resposta imune dessas crianças, aumentando a soroconversão e a proporção de linfócitos B circulantes contra *S. flexneri* (RAHMAN *et al.*, 2005). Mais



recentemente, o zinco mostrou efeito protetor sobre a resposta inflamatória e disfunção da barreira epitelial induzida por shigelose em modelos *in vivo* e *in vitro*, regulando os níveis de claudina 2 e 4 (SARKAR *et al.*, 2019). Apesar de poucos, os estudos publicados que investigam o zinco no contexto da shigelose mostram efeitos benéficos e promissores.

### 2.7.2 VACINAS PARA SHIGELOSE

A vacina para shigelose é uma urgente necessidade na atualidade, dada a sua gravidade clínica e grande prevalência em crianças abaixo de cinco anos de idade em países em desenvolvimento. Apesar de mais de 60 anos de esforços, uma vacina segura e eficaz ainda não está disponível (KLONTZ *et al.*, 2015; KOTLOFF *et al.*, 2017). Entretanto, o uso de abordagens genômicas mais modernas têm ajudado no seu desenvolvimento (ROSSI *et al.*, 2015).

Devido à resposta imune na shigelose ser sorogrupo-específica, a eficácia de uma vacina deve considerar a importância epidemiológica e distribuição dos sorogrupos de cada localidade, sendo este conhecimento de crucial importância para o seu desenvolvimento (NIYOGI *et al.*, 2005). Para a prevenção universal da shigelose, portanto, uma vacina multivalente e capaz de causar proteção heteróloga é necessária (SEIDLEN *et al.*, 2006). Os estudos multicêntricos são boas ferramentas para compreender a distribuição dos sorotipos mais prevalentes e que devem ser alvos de vacina (LIVIO *et al.*, 2014). De forma específica, Niyogi e colaboradores (2005) afirmam a necessidade de se produzir uma vacina contra *S. dysenteriae* sorotipo 1 e *S. flexneri* sorotipo 2a, responsáveis pelo maior impacto de morbidade e mortalidade em países em desenvolvimento. Entretanto, diante do constante progresso em saneamento básico e consequente melhoria na qualidade da água em todo o mundo e do acelerado desenvolvimento de resistência antimicrobiana, estima-se que o impacto de *S. sonnei* deve aumentar, sendo também necessária a produção de vacina contra este sorogrupo (THOMPSON *et al.*, 2015). Ademais, o uso de cepa de *S. flexneri* 2a com modificação do gene da polimerase do antígeno O do lipopolissacarídeo mostrou imunidade cruzada contra *S. flexneri* 2a, *S. flexneri* 3a, *S. flexneri* 6 e *S. sonnei*, mostrando papel promissor como uma vacina universal para shigelose (KIM *et al.*, 2018).

As tentativas de desenvolvimento de uma vacina para shigelose são variadas e se iniciam com o teste de candidatos em modelos pré-clínicos. IpaB e IpaD, antígenos candidatos por estarem presentes em todas as cepas de *Shigella* spp., já mostraram ser indutores de imunização humoral e celular, além de protegerem contra infecção letal pulmonar em camundongos

(MARTINEZ-BECERRA *et al.*, 2012). Kaminski e colaboradores (2017) desenvolveram uma potencial vacina multivalente, que consiste na inativação de um conjunto de cepas de *Shigella* (*S. flexneri* 2a, *S. sonnei* e *S. flexneri* 3a). Tal vacina produziu resposta imunogênica em modelos de camundongos e porcos contra os três sorotipos (KAMINSKI *et al.*, 2014). De forma geral, diversas abordagens têm sido utilizadas para vacina contra shigelose, como vacinas de cepas atenuadas, vacinas de cepas inativadas por formalina, vacinas obtidas por processos de glicoconjugação e antígenos específicos (MANI *et al.*, 2016).

Alguns candidatos vacinais para shigelose já estão em testes clínicos. Riddle e colaboradores (2016) demonstraram efeitos satisfatórios de uma vacina que utilizou bioconjugação – uma nova ferramenta no desenvolvimento de vacinas (RAVENSCROFT *et al.*, 2016) – conjugando o componente polissacarídico do antígeno O de *S. flexneri* 2a com a proteína A exotoxina de *Pseudomonas aeruginosa*. Os estudos clínicos de fase 1 em adultos, avaliando segurança e imunogenicidade, demonstraram que esta vacina possui parâmetros satisfatórios, apresentando-se como um candidato promissor (RIDDLE *et al.*, 2016; CHEN *et al.*, 2016). Na busca da determinação de antígenos que promovam melhor proteção na clínica, modelos matemáticos são empregados, utilizando-se de dados de vários ensaios clínicos combinados de décadas passadas. Neste estudo, os autores concluíram que potenciais alvos para vacina deveriam incluir uma variedade de antígenos correspondentes a diferentes etapas da patobiologia em shigelose (DAVIS *et al.*, 2017). Em relação a esforços para vacina contra *S. sonnei*, alguns estudos têm sido realizados, com avanço de testes de vacina em fase clínica (I) (FRENCK *et al.*, 2018; RAQIB *et al.*, 2019). Obiero e colaboradores (2017) realizaram estudo randomizado de fase 2 e mostraram que uma vacina (antígeno O de *S. sonnei* em sistema) foi bem tolerada e imunogênica em adultos saudáveis do Quênia.

Uma estratégia que tem sido desenvolvida mais recentemente para acelerar o desenvolvimento de uma vacina para shigelose é o uso de modelos de infecção humana controlada, pois podem gerar conhecimento relevante a nível de patogênese, bem como o potencial de rapidamente testar candidatos à vacina e identificar marcadores imunológicos correlacionados com proteção (GIERSING *et al.*, 2019).

Os esforços para o desenvolvimento de uma vacina para shigelose são constantemente associados ao desenvolvimento de uma vacina para a infecção por ETEC (HOSANGADI *et al.*, 2018; WALKER *et al.*, 2017). Ambas são bactérias de grande importância em saúde pública para crianças abaixo de cinco anos de idade. Neste sentido, McArthur e colaboradores (2017) reforçaram a importância de uma rede de pesquisadores que compartilhem metodologias de identificação de marcadores de imunidade e contribuam para a padronização dos ensaios. Mani

e colaboradores (2019) destacam a importância da busca de marcadores de imunidade celular, sejam derivados de células T ou B a nível sistêmico ou de mucosa, para a existência de uma vacina eficaz. Ademais, um importante evento científico acontecido na Cidade do México em junho de 2018 e organizado pela OMS reuniu grandes especialistas na área. Como importante conclusão do evento, a necessidade de estudos que avaliem o potencial impacto de vacinas para ETEC e *Shigella* na economia, no uso de antibióticos e nas consequências a longo prazo, como prejuízos físico e cognitivo, foi reforçada (BARRY *et al.*, 2019).

Um dos principais entraves para o desenvolvimento de vacinas em shigelose é a inexistência de um modelo pré-clínico com bons parâmetros de eficácia clínica. A dificuldade de reprodução dos sintomas clínicos que acontecem em humanos para modelos em camundongos, que seriam de fácil acesso e manipulação, impossibilita maiores avanços (BARRY *et al.*, 2013; KOTLOFF *et al.*, 2018). Todavia, alguns estudos demonstram bom potencial imunogênico em modelos com camundongos (KIM *et al.*, 2018; SHIM *et al.*, 2007; SREEROHINI *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2014).

## 2.8 MODELOS *IN VIVO* EM SHIGELOSE

Diversos modelos experimentais de estudo de shigelose já foram desenvolvidos e propostos na literatura, utilizando primatas (SHIPLEY *et al.*, 2010), porquinhos da Índia (SHIM *et al.*, 2007), coelhos (YUM *et al.*, 2019), peixes-zebra (DUGGAN *et al.*, 2018) e camundongos (MARTINO *et al.*, 2005). Tais modelos são úteis para o entendimento atual sobre shigelose, contudo todos apresentam vantagens e desvantagens. Neste sentido, muitos esforços são feitos para o desenvolvimento de um modelo mais robusto e eficaz para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas e profiláticas em shigelose (BARRY *et al.*, 2019).

O modelo em macacos é considerado o mais apropriado para o estudo de shigelose, resultando em colite aguda similar a humanos. É um modelo robusto e, dada a similaridade genética com humanos, pode ajudar na identificação de marcadores de proteção imunológica (SHIPLEY *et al.*, 2010). Contudo, o uso desse modelo não é frequente, e pontua-se que os custos e problemas éticos limitam esta expansão (MARTEYN *et al.*, 2012).

Um modelo que promoveu inúmeros avanços em shigelose é o modelo ileal de coelho. Este modelo permite avaliação precisa do fenótipo de invasão, sendo chave para a identificação da função anti-inflamatória de fatores de virulência (LIU *et al.*, 2015). Mais recentemente, Liu e colaboradores (2019) discutiram a importância e o impacto dos achados do modelo ileal de coelho para o entendimento da patobiologia da shigelose. Entretanto, a impossibilidade de

mostrar os efeitos patológicos no cólon, nicho preferencial em humanos e com características distintas do íleo, limita a amplitude de tais estudos. Recentemente, um modelo em filhotes de coelhos de *S. flexneri* foi desenvolvido, apresentando efeitos similares a humanos, com intensa inflamação na mucosa do cólon e diarreia sanguinolenta (YUM *et al.*, 2019), porém, por apresentar inoculação do patógeno por via retal, se afasta da realidade clínica.

Um outro modelo de destaque é o modelo em porquinhos da Índia, permitindo a reprodução de características importantes da shigelose, como inflamação no cólon, diarreia e perda de peso, porém sem a possibilidade de reproduzir tais efeitos pela inoculação oral de *Shigella* (SHIM *et al.*, 2007). O modelo em peixe-zebra (*Danio rerio*) também já foi proposto e mostra-se bastante útil para o estudo da biologia celular da infecção por *Shigella*, embora perca sua aplicabilidade clínica pelas diferenças biológicas em relação a humanos. Mais especificamente, as interações entre as bactérias e fagócitos podem ser visualizadas em alta resolução (MOSTOWY *et al.*, 2013; DUGGAN *et al.*, 2018).

Os modelos em camundongos são vastamente descritos. O modelo murino pulmonar é vastamente utilizado e tem a vantagem sobre os outros modelos da possibilidade de uso de manipulação genética dos animais (VAN DE VERG *et al.*, 1995). Os modelos de infecção entérica são limitados, pela resistência dos animais a desenvolverem shigelose. O grupo de Yang e colaboradores (2014) desenvolveu modelo de diarreia e inflamação intestinal por *Shigella* a partir da via intraperitoneal. Em relação à tentativa de modelo murino por via oral, Martino e colaboradores (2005) utilizaram tratamento com estreptomicina que permitiu a colonização intestinal, porém sem a ocorrência de eventos inflamatórios ou episódios de diarreia. Apesar dos vários avanços alcançados pelos modelos *in vivo* de shigelose vigentes, mais estudos são necessários, principalmente para o teste de eficácia clínica de candidatos a vacinas.

## 2.9 JUSTIFICATIVA

O trabalho aqui apresentado justifica-se primeiramente pela importância clínica e epidemiológica da infecção entérica por *Shigella* spp. com altos índices de mortalidade e morbidade em países em desenvolvimento, aliada à necessidade de desenvolvimento de um modelo pré-clínico de shigelose que sirva para testes de eficácia de potenciais vacinas (KOTLOFF *et al.*, 2018). Além disso, o trabalho avalia de forma inédita a eficácia de um candidato vacinal para shigelose (cepa atenuada de *S. flexneri* 2a com deleção dos genes *guaBA*,

*sen* e *set*) já em testes de fase clínica I (KOTLOFF *et al.*, 2007) contra sintomas da doença no modelo proposto. Por fim, a patobiologia relacionada à deficiência de zinco nas infecções entéricas (incluindo a shigelose) permanece não elucidada (YOUNG *et al.*, 2014) e é investigada no presente estudo, especificamente os parâmetros de persistência da colonização intestinal, resposta imune e alterações metabólicas. Dessa forma, os estudos aqui propostos têm a potencialidade de gerar um modelo/plataforma de testes de abordagens terapêuticas e profiláticas em shigelose, além de ajudar no entendimento dos efeitos do zinco nesta doença.

### 3. HIPÓTESES

Este estudo apresentou quatro principais hipóteses norteadoras: a) postulamos que um novo modelo murino de infecção entérica por inoculação oral de *Shigella flexneri*, e que mimetize desfechos clínicos comumente observados em crianças e eventos da patobiologia da shigelose (como inflamação e dano epitelial, produção de citocinas e modulação do microbioma intestinal) pode ser desenvolvido a partir do uso de tratamento de camundongos com coquetel de antimicrobianos já estabelecido na literatura como promotor de suscetibilidade a infecções entéricas; b) postulamos que o desenvolvimento de um modelo murino que mimetize desfechos clínicos comumente observados em crianças é útil para o teste de um candidato de vacina para shigelose já existente (cepa atenuada de *S. flexneri* 2a com deleção dos genes *guaBA*, *sen* e *set*); c) postulamos que o estudo da deficiência de zinco em associação com a shigelose abre novas perspectivas no entendimento dos mecanismos de patobiologia induzidos pela bactéria e resposta vacinal; e d) postulamos que o uso de análise metabolômica neste modelo ajuda no entendimento das vias bioquímicas envolvidas na patobiologia da shigelose.

## 4. OBJETIVOS

### Objetivo Geral:

Desenvolver um modelo de infecção oral por *Shigella flexneri* induzida em camundongos C57/BL6 pré-tratados com antimicrobianos que mimetize desfechos clínicos em crianças e possibilite a investigação do papel da deficiência de zinco e avaliação de resposta vacinal.

### Objetivos específicos:

- Desenvolver e caracterizar um modelo murino de infecção por *Shigella flexneri* que mimetize os desfechos clínicos em crianças: diarreia e perda de peso;
- Determinar alterações do microbioma intestinal no modelo murino de infecção por *Shigella flexneri*;
- Avaliar a influência da deficiência de zinco nos parâmetros de clínica, inflamação e colonização do patógeno em modelo murino de infecção por *Shigella flexneri*;
- Investigar o metaboloma por meio da análise de metabólitos em amostras de urina no modelo murino de *Shigella flexneri* em animais nutridos e deficientes em zinco;
- Avaliar o efeito de vacina (cepa atenuada de *S. flexneri* com deleção dos genes *guaBA*, *sen* e *set*) no modelo murino de infecção por *Shigella flexneri*, quanto à proteção contra os sintomas clínicos (diarreia e perda de peso) e imunogenicidade (anticorpos séricos IgG anti-LPS *Shigella* específico).

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS E USO DE ANIMAIS

Este estudo foi realizado de acordo com as recomendações do “Guia para Cuidado e Uso de Animais de Laboratório” (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*), elaborado pelos Institutos Nacionais de Saúde (*National Institutes of Health*) dos Estados Unidos da América (EUA). O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentos em Animais da Universidade de Virgínia (Charlottesville, Virginia, EUA) com o número 3315 (**Anexo A**). Os experimentos foram realizados com a tentativa de minimizar o sofrimento dos animais. O biotério da Universidade de Virgínia é acreditado pela “Associação Internacional de Avaliação e Acreditação de Cuidado de Animais de Laboratório” (*Association for the Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care – AAALAC*).

Os camundongos C57BL/6 utilizados neste estudo eram machos, tinham 4 semanas de idade, pesavam cerca de 12g na chegada, e foram adquiridos da empresa *Jackson Laboratories* (Bar Harbor, ME, EUA). Os animais foram alocados em grupos de cinco por caixa com livre acesso a água e ração (sem mensuração de consumo destes ao longo do experimento). O biotério foi mantido à temperatura ambiente de 20 a 24°C com exaustão de ar e ciclos de 14 horas de claro e 10 horas de escuro.

### 5.2 DIETAS, ANTIMICROBIANOS E ZINCO

As dietas utilizadas neste estudo foram: dieta caseira padrão do biotério da instituição (*Harlan Laboratories*, Indianapolis, Indiana, EUA) para controle nutrido (DN); dieta deficiente em proteína (2%) (DP); e dieta deficiente em zinco (DZ). Todas as dietas foram consumidas *ad libitum*. As dietas DP e DZ foram especificamente formuladas e adquiridas pela empresa *Research Diets* (New Brunswick, New Jersey, EUA) para este estudo, enquanto a dieta DN era a dieta padrão utilizada pelo biotério da Universidade de Virgínia obtida pela empresa *Teklad Diets* (Madison, Wisconsin). As calorias dos componentes de gordura, proteína e carboidratos destas novas dietas (DP e DZ) são descritas na **Tabela 1**. Todas as dietas possuem quantidades calóricas semelhantes. A dieta DZ por 14 dias mostrou ser eficiente em induzir deficiência de zinco em camundongos C57BL/6, como demonstrado anteriormente pelos níveis teciduais e séricos de zinco (BOLICK *et al.*, 2014; MAYNERIS-PERXACHS *et al.*, 2016). A dieta DP já

foi utilizada em outros modelos de desnutrição proteica e infecção intestinal (MAYNERIS-PERXACHS *et al.*, 2016; COSTA *et al.*, 2012).

**Tabela 1:** Composição de macronutrientes e calorias das dietas nutrida (DN) e deficientes em zinco (DZ) e proteína (DP).

Componentes	DN <sup>a</sup>		DZ <sup>b</sup>		DP <sup>b</sup>	
	%	g	g	kcal	g	kcal
Proteína	19,1	25	20	20,5	2	2
Carboidrato	62,6	58	66,3	68	84	86
Gordura	5,8	17	5	11,5	5	12
Total		100		100		100
kcal/g		3,1		3,9		3,9

<sup>a</sup>Ingredientes: milho moído; farinha de soja; aveia moída; farelo de trigo; farinha de alfafa desidratada; óleo de soja; glúten de milho; carbonato de cálcio; levedura seca de cerveja; minerais 7012; mistura de vitaminas 7012. Dieta obtida da empresa Teklad Diets (Madison, WI).

<sup>b</sup>Ingredientes: claras de ovo em pó desidratadas; amido de milho; sucrose; celulose; óleo de milho; mistura mineral (S19401); mistura de vitaminas (V10001); bitartrato de colina; biotina; carbonato de zinco. Dietas obtidas da empresa Research Diets (New Brunswick, NJ). \*Mistura mineral para a dieta ZD foi livre de zinco.

Um coquetel de antimicrobianos foi utilizado para promover a ruptura da microbiota intestinal nativa, diminuindo a resistência e, assim, facilitando o estabelecimento de infecções. O coquetel foi constituído por metronidazol (215 mg/L), colistina (850 U/mL), gentamicina (35 mg/L) e vancomicina (45 mg/L) na água de consumo por três dias antes da inoculação de *S. flexneri*. Após este período, água livre de antimicrobianos foi provida aos animais por um dia até a infecção, e esta água livre de antimicrobianos foi utilizada durante o restante do experimento. Outros estudos já utilizaram este coquetel para promover susceptibilidade a infecções entéricas (BOLICK *et al.*, 2014; BARTELT *et al.*, 2017). Este coquetel foi originalmente utilizado como parte de um tratamento para estabelecer um modelo murino de *Clostridium difficile* (CHEN *et al.*, 2008).

Para os experimentos em que a suplementação de zinco foi avaliada, o sulfato de zinco (Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA) foi dissolvido em água e filtrado antes de administrar na água de beber na concentração de 150 mg/L, já utilizada em camundongos C57/BL6 sem efeitos tóxicos e sem alterar o padrão de consumo de água (BOLICK *et al.*, 2014). Esta concentração foi baseada na equivalência aproximada da estimativa de dose/peso para zinco em crianças, de acordo com as recomendações diárias da Organização Mundial de Saúde (GIBSON *et al.*, 2016).



### 5.3 CEPAS DE *S. flexneri*

A cepa 2457T de *Shigella flexneri* sorotipo 2a foi utilizada neste estudo para desenvolvimento do modelo. Esta cepa é a mais utilizada em estudos genéticos e clínicos de shigelose, mostrando alta virulência em diversos modelos (MARTINO *et al.*, 2005; SHIM *et al.*, 2007; WEI *et al.*, 2003), além de apresentar grande prevalência em países em desenvolvimento (THOMPSON *et al.*, 2015). Uma cepa mutante para o sistema de secreção tipo 3 (SST3), não funcional para o gene *mxiG*, e gerada a partir da cepa 2457T, foi também utilizada neste estudo. Esta cepa foi obtida previamente pelo grupo do doutor Hervé Agaisse da Universidade de Virginia (Charlottesville, Virginia, EUA) (KUEHL *et al.*, 2014), que a cedeu gentilmente ao presente trabalho.

Para os testes em protocolo de vacina, a cepa vacinal CVD 1208S foi utilizada. A CVD 1208S é um candidato a vacina em shigelose desenvolvido pelo Centro de Desenvolvimento de Vacinas da Universidade de Maryland. Estudos prévios demonstraram a boa tolerabilidade e o potencial imunogênico em humanos voluntários desta vacina nas doses de até 10<sup>9</sup> unidades formadoras de colônia (UFC) que induziram produção significativa de anticorpos anti-LPS em 14 indivíduos sadios de 18 a 45 anos de idade (KOTLOFF *et al.*, 2007). A vacina é a cepa 2457T de *S. flexneri* atenuada pela deleção do locus *guaBA*, uma região cromossômica que regula a síntese das enzimas desidrogenase monofosfato 5-inosina e sintetase monofosfato guanosina, importantes para a via metabólica de síntese de purinas em *Shigella*. Além disso, a CVD1208S possui mutações nos genes *set* e *sen*, que codificam, respectivamente, as enterotoxinas 1 e 2 de *Shigella* (*Shigella enterotoxins* – ShETs) (KOTLOFF *et al.*, 2004; DELAINE *et al.*, 2016).

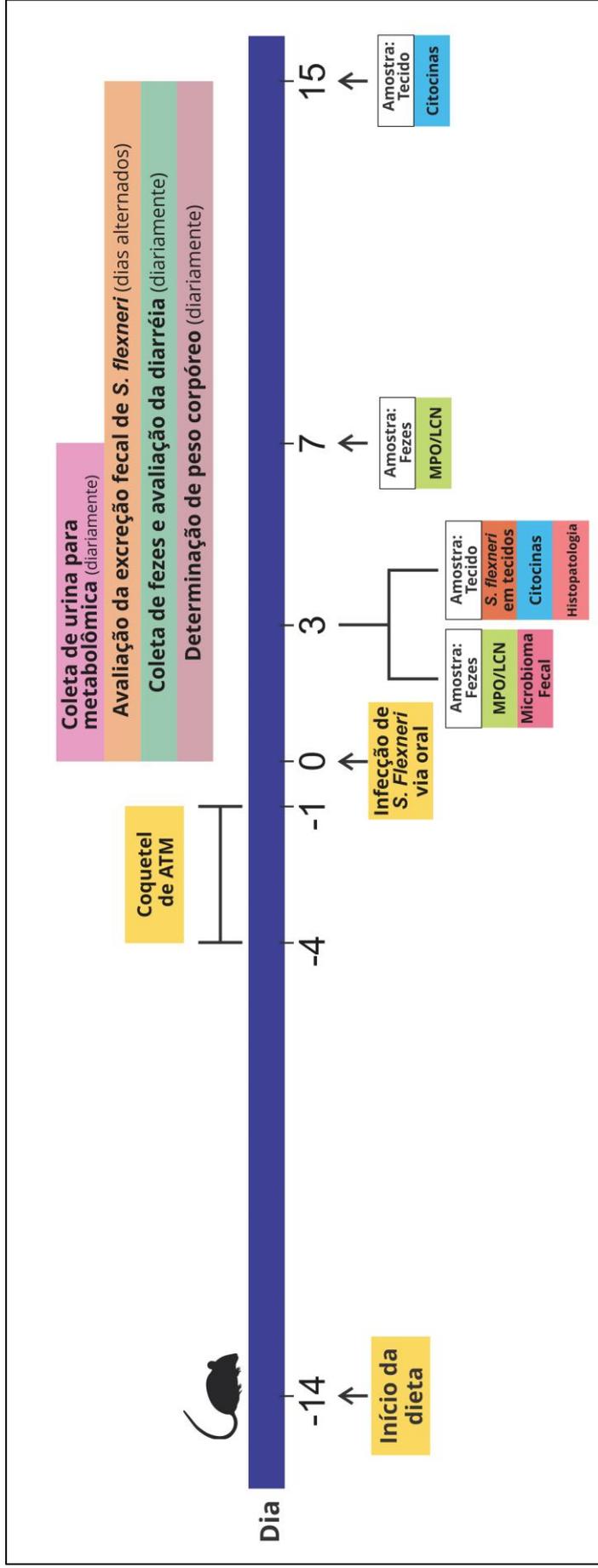
### 5.4 INÓCULOS DE INFECÇÃO E DE CEPA VACINAL

Para o preparo do inóculo de infecção de *S. flexneri* no modelo, o seguinte procedimento foi realizado. Um dia antes da infecção, estoques das bactérias em glicerol previamente armazenados em -80°C foram retirados para iniciar o crescimento em meio líquido de Luria Bertani a 37°C. Após 18 horas, 200 uL da cultura foram adicionados a 20 mL de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) e colocados em novo crescimento em incubador com agitação por 4 a 5 horas. A densidade óptica (DO) de 600nm foi utilizada para monitoramento do crescimento. O valor de DO de 1,2 foi utilizado como ponto de parada no crescimento para centrifugação (10.000 g por 10 min) e ressuspensão em 2 mL de DMEM. A contagem em placas

foi utilizada para confirmação da dose do inóculo: diluições seriadas foram realizadas em salina e plaqueadas em meio MacConkey para contagem de colônias no dia seguinte. Este protocolo foi validado, de modo a obter uma dose de infecção de aproximadamente  $10^8$  UFC por camundongo, suspensas em 100  $\mu$ L de DMEM. O uso das condições de meios, temperatura e tempos foi baseado em estudos prévios do grupo de modelos de infecção intestinal de bactérias em camundongos (BOLICK *et al.*, 2014; BARTELT *et al.*, 2017). Os controles receberam apenas 100  $\mu$ L de DMEM. Em relação ao preparo da cepa vacinal, estoques da CVD 1208S em glicerol e armazenados em  $-80^{\circ}\text{C}$  foram retirados para iniciar o crescimento em meio líquido de Luria Bertani a  $37^{\circ}\text{C}$ . O crescimento microbiano em fase estacionária ( $10^8$  UFC/mL) do dia posterior foi utilizado para o preparo de suspensão da CVD 1208S  $10^8$  UFC/mL em salina.

## 5.5 DESENHO EXPERIMENTAL

Antes do início dos protocolos experimentais, os animais permaneceram de dois a cinco dias para adaptação ao ambiente. Em seguida, os animais foram separados nos grupos com as dietas específicas (nutrida - DN, deficiente em proteína - DP e deficiente em zinco - DZ) a depender da necessidade do experimento. A infecção foi induzida após duas semanas do início das dietas e os animais permaneceram nessas dietas até o fim do experimento. Quatro dias antes da infecção, um coquetel de antimicrobianos de amplo espectro foi ofertado na água de consumo por três dias aos animais. Em seguida, a água com antimicrobianos foi removida e substituída com água livre de antimicrobianos por um dia antes da infecção. A inoculação da cepa de *S. flexneri* ocorreu por via oral (gavagem) na concentração de  $10^8$  UFC/camundongo no volume de 100  $\mu$ L de DMEM. Os animais foram acompanhados diariamente para medidas de peso e coletas de fezes e urinas. A eutanásia foi realizada para coleta de tecidos intestinais em diferentes tempos pós-infecção (pi). Utilizou-se cloridrato de cetamina (100mg/kg animal) e xilazina (dose 10mg/kg animal) para a solução anestésica, com posterior deslocamento cervical. A **Figura 4** caracteriza a linha temporal do estudo, descrevendo os parâmetros com os respectivos tempos de análise.



**Figura 4: Linha temporal do modelo de infecção por *S. flexneri* em camundongos C57BL/6 proposto neste trabalho, caracterizando os parâmetros e os respectivos tempos de análise utilizados.** ATM: antimicrobianos; MPO: mieloperoxidase; LCN: lipocalina. A dieta foi iniciada duas semanas antes do momento da infecção em camundongos com quatro semanas de idade. Quatro dias antes da infecção, a água dos animais foi tratada com coquetel de antimicrobianos (colistina, gentamicina, vancomicina e metronidazol) por três dias. Um dia antes da infecção, água livre de antibióticos foi recolocada para os animais. A infecção ocorreu por gavagem via oral no inóculo de  $10^8$  UFC/camundongo no volume de  $100 \mu\text{L}$  de DMEM, enquanto os controles receberam apenas o veículo. Os animais foram acompanhados diariamente para medidas de peso corpóreo e coleta de fezes para observação de diarreia. Em dias alternados, fezes foram utilizadas para determinação molecular de *S. flexneri*. Amostras de urina foram coletadas diariamente durante a primeira semana pós-infecção. No dia 3 pós-infecção, amostras de fezes foram utilizadas para determinação de MPO/LCN, bem como de microbioma fecal, enquanto amostras de tecido intestinal foram utilizadas para determinação dos níveis de *S. flexneri*, quantificação de citocinas e análise histopatológica. Nos dias 7 e 15 pós-infecção, amostras fecais foram utilizadas novamente para determinação de MPO/LCN e amostras de tecido intestinal para determinação de citocinas, respectivamente.

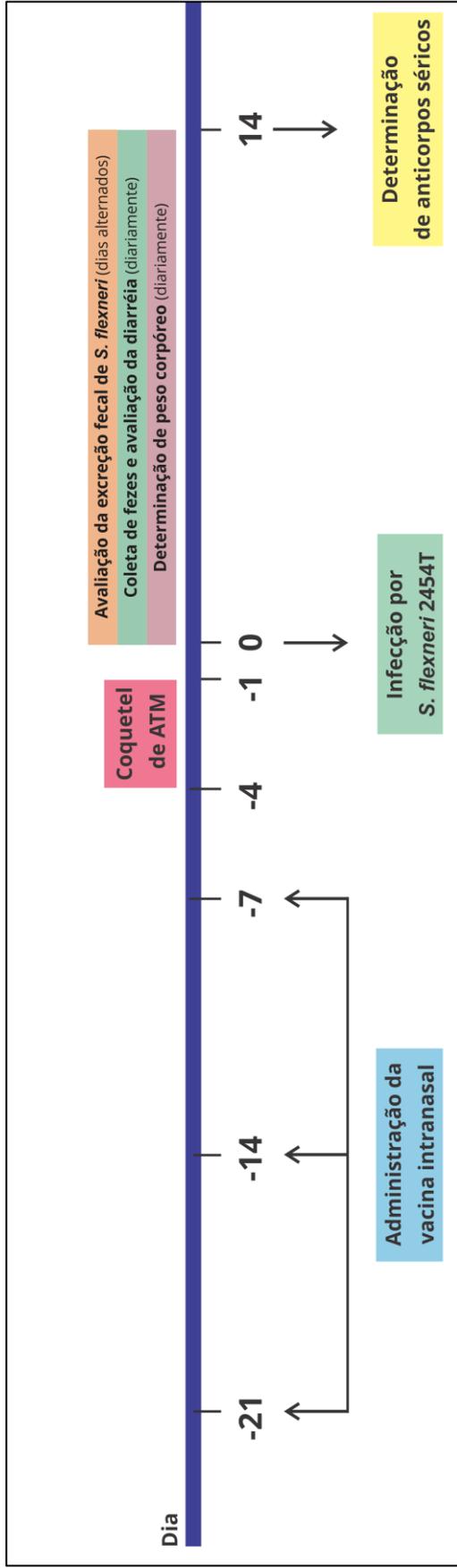
Ao longo do procedimento experimental, diversos parâmetros foram analisados para a caracterização do modelo proposto: variação de peso corpóreo, ocorrência de diarreia, concentrações de mieloperoxidase e lipocalina fecais, excreção fecal de *S. flexneri*, níveis intestinais e extra-intestinais de *S. flexneri*, microbioma fecal, citocinas intestinais, histopatologia intestinal e metaboloma das amostras de urina. A **Tabela 2** apresenta os parâmetros, que serão caracterizados na próxima seção, com os respectivos tempos de análise utilizados. Observa-se que os primeiros dias pós-infecção (até o dia 3) correspondem ao período de pico de infecção no modelo, caracterizando assim a maior parte das análises. Avaliações mais tardias relacionam-se a potenciais efeitos crônicos da infecção. Não foram realizadas mensurações de consumo de água ou dieta por animal ou grupo durante os experimentos. O tamanho amostral padrão dos experimentos foi de 8 animais/grupo, sendo reduzido mediante necessidade de cada análise. Os resultados obtidos foram realizados pelo menos duas vezes para todos os parâmetros.

**Tabela 2: Parâmetros utilizados no desenvolvimento do modelo e seus respectivos tempos de análise.**

<b>Parâmetros</b>	<b>Tempos de análise</b>
Peso	Todos os dias pós-infecção
Diarreia	Todos os dias pós-infecção
Mieloperoxidase fecal	Dias 3 e 7 pós-infecção
Lipocalina fecal	Dias 3 e 7 pós-infecção
Excreção fecal de <i>S. flexneri</i>	Todos os dias pós-infecção durante a 1ª semana e alternadamente em seguida
Microbioma bacteriano das amostras de fezes	Dia 3 pós-infecção
Presença de <i>S. flexneri</i> nos tecidos intestinais e extra-intestinais	Dia 3 pós-infecção
Citocinas do cólon e conteúdo cecal	Dias 3 e 15 pós-infecção
Histologia do cólon	Dia 3 pós-infecção
Metaboloma de urina	Todos os dias pós-infecção durante a 1ª semana

Para os experimentos em que se tentou avaliar a proteção homóloga (contra à mesma cepa) no modelo, seguiu-se o mesmo protocolo inicial descrito acima, porém somente em animais nutridos, a fim de se investigar efeitos vacinais em um organismo saudável. Após três semanas da primeira infecção, os camundongos foram reinfetados com a mesma cepa selvagem de *S. flexneri* 2457T. Animais controles da mesma idade receberam a infecção pela primeira vez.

Para os experimentos de teste da vacina CVD 1208S, três doses intranasais semanais foram administradas nos animais (dias -21, -14 e -7) antes da infecção (dia 0). A inoculação da cepa de *S. flexneri* vacinal ocorreu por via intranasal na concentração de  $10^6$  UFC/camundongo no volume de 10  $\mu$ L de salina. As dietas foram iniciadas no dia -21. O protocolo de infecção ocorreu de forma igual ao explicado anteriormente, com tratamento com antimicrobianos e mesma preparação do inóculo de *S. flexneri*. A **Figura 5** mostra a linha temporal dos experimentos em que testes de vacina foram realizados, com os respectivos parâmetros e tempos de análise utilizados.



**Figura 5: Linha temporal para teste vacinal no modelo de infecção por *S. flexneri* em camundongos C57BL/6 proposto neste trabalho, caracterizando os parâmetros e os respectivos tempos de análise utilizados.** ATM: antimicrobianos (colistina, gentamicina, vancomicina e metronidazol); MPO: mieloperoxidase; LCN: lipocalina-2. Iniciou-se o protocolo vacinal três semanas antes da infecção em camundongos com quatro semanas de idade, que consistiu na administração intranasal de cepa atenuada de *S. flexneri* 2a com deleção dos genes *guaBA*, *sen* e *set* semanalmente por três vezes. Quatro dias antes da infecção, a água dos animais foi tratada com coquetel de antimicrobianos (colistina, gentamicina, vancomicina e metronidazol) por três dias. Um dia antes da infecção, água livre de antibióticos foi recolocada para os animais. A infecção ocorreu por gavagem via oral no inóculo de  $10^8$  UFC/camundongo no volume de  $100 \mu\text{L}$  de DMEM, enquanto os controles receberam apenas o veículo. Os animais foram acompanhados diariamente para medidas de peso corpóreo e coleta de fezes para observação de diarreia. Em dias alternados, fezes foram utilizadas para detecção molecular de *S. flexneri*. No dia 14 pós-infecção, amostras de sangue foram coletadas para determinação de anticorpos séricos IgG anti-LPS *Shigella*-específico.

## 5.6 PARÂMETROS AVALIADOS

### 5.6.1 ANÁLISE CLÍNICA: PERDA DE PESO E DIARREIA

Após a infecção, os animais foram acompanhados diariamente para avaliar presença ou ausência de diarreia e mensurar o peso corpóreo. Os pesos foram medidos em balança de precisão, e a diarreia foi avaliada pela observação da região anal do animal após imobilização do mesmo. Foi realizada análise semi-quantitativa da ocorrência de episódios diarreicos nos camundongos. Estabeleceu-se escores para as fezes, baseados na forma e no estado delas, de modo que: 0 = fezes sólidas consistentes em formato padrão; 1 = fezes moles em formato padrão (pastosas); 2 = fezes líquidas (diarreia propriamente dita); 3 = fezes aquosas; 4 = fezes com sangue. Este método foi desenvolvido com base em estudos prévios do laboratório não publicados. Imagens fotográficas também foram utilizadas para registro dos episódios. Todos os animais foram manipulados de forma similar.

### 5.6.2 ANÁLISE DE *S. flexneri* EM FEZES E TECIDOS

A pesquisa de *S. flexneri* em fezes e intestino (duodeno, jejuno, íleo e cólon) de animais infectados por esse patógeno foi realizada primariamente por identificação molecular, utilizando o gene *ipaH* (*invasion plasmid antigen H*, antígeno H plasmidial de invasão), que é um gene envolvido no aparato de invasão celular pelo patógeno e amplamente utilizado como marcador de diagnóstico molecular em *Shigella* (MEDEIROS *et al.*, 2018). As amostras de fezes foram coletadas diariamente a partir do manuseio individual de cada camundongo com massageamento de sua região abdominal e uso de tubo de tamanho 2 mL para coleta das fezes, que foi conservado em -20°C até a análise. As amostras de intestino foram coletadas durante procedimento de cirurgia após eutanásia dos camundongos.

As amostras biológicas foram processadas para extração de DNA, utilizando os kits *QIAamp DNA stool mini* e *QIAamp DNA tissue* (Qiagen, Hidden, Alemanha) para fezes e tecidos intestinais, respectivamente. Para aumentar a eficiência do processo de extração, uma etapa de homogeneização vigorosa das amostras, utilizando 300 mg de *beads* de 1,0 mm em máquina de homogeneização *Mini bead beater* (BioSpec, Bartlesville, EUA), foi adicionada. Após a extração, as amostras de DNA foram eluídas em tampão fornecido pelo kit e armazenadas em freezer -20°C. A reação de PCR em tempo real foi realizada em equipamento

CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Biorad, Hercules, CA, EUA). A interpolação dos valores de Ct (*cycle threshold*, limiar de ciclo) de cada corrida foi feita por meio de curva padrão de quantidades pré-determinadas de DNA de *S. flexneri* e transformados em números de microorganismos por miligrama de amostra fecal. As concentrações dos reagentes de PCR foram utilizadas de acordo com recomendações do kit PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Os iniciadores com alvo para o gene *ipaH* foram baseados em estudo prévio: senso: 5'-GTGCAGTTGTGAGCCGTTTT-3' e anti-senso: 5'-ATGCGTGAGACTGAACAGCA-3'. A amplificação consistiu de 3 min a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15 s a 95°C, 60 s a 58°C.

Para a confirmação do diagnóstico microbiológico, buscou-se isolar *S. flexneri* viáveis em amostras fecais de animais nutridos e deficientes em zinco por técnicas de microbiologia convencional de cultura. Placas de MacConkey e ágar vermelho de Congo foram utilizadas para isolamento de colônias de *S. flexneri* e avaliação de virulência, respectivamente. Cepas virulentas de *Shigella* apresentam-se vermelhas, enquanto cepas avirulentas apresentam-se brancas em placas contendo vermelho de Congo, devido à capacidade de modulação da expressão gênica de *Shigella* spp. (SANKARAN *et al.*, 1989).

### 5.6.3 ANÁLISE DE MICROBIOMA BACTERIANO EM AMOSTRAS DE FEZES

As amostras de DNA extraídas das fezes de animais nutridos infectados ou não por *S. flexneri* foram utilizadas para investigação da influência da infecção no microbioma bacteriano intestinal. Utilizamos amostras do dia 3 pi, pois refletia o pico aproximado da infecção com ocorrência de sintomas de diarreia e perda de peso nos animais.

A região V4 do gene 16S do RNA ribossômico foi amplificada e sequenciada utilizando a plataforma de sequenciamento *Illumina MiSeq* (San Diego, EUA) (KOZICH *et al.*, 2013). Utilizou-se o kit v2 do *MiSeq Reagent Kit*, que produz até 25 milhões de leituras de 250 pares de bases (pb) (x2) por corrida no centro de Genômica da Universidade de Virginia (GIALLOROU *et al.*, 2018). As leituras foram atribuídas às amostras usando a ferramenta do *Illumina BaseSpace demultiplexing*. Em seguida, o processamento das leituras foi feito utilizando a plataforma *Mothur* (v.1.42.0), ferramenta de bioinformática para análise de comunidades microbianas (SCHLOSS *et al.*, 2009). Para cada amostra, as leituras de cada iniciador (*forward* e *reverse*) foram pareadas para formação da região consenso. Após definição de tamanho máximo de 253 pb, sequências ambíguas e com erros foram excluídas. Em seguida, as sequências das bibliotecas foram alinhadas com o banco de dados Silva (QUAST *et al.*,



2013), que contém cerca de 370.00 sequências de bactérias e *Archaea* pré-alinhada, para posterior exclusão de artefatos quiméricos e agrupamento das OTUs (*operational taxonomic unit*, unidade taxonômica operacional – menor agrupamento de organismos com base na similaridade de sequência de DNA).

A tabela de OTUs gerada pelo *Mothur* foi utilizada para análise estatística na plataforma *Microbiome Analyst* (DHARIWAL *et al.*, 2017), onde os cálculos dos índices de diversidade e testes de hipótese foram realizados. Os dados foram filtrados de modo a não considerar componentes ausentes em todas as amostras ou presentes em apenas uma amostra, componentes com baixa abundância por erros de sequenciamento ou contaminação e componentes com baixa variância. Antes da análise, os dados foram também normalizados por método de rarefação, de modo a manter as amostras com mesmo nível de cobertura de sequenciamento (número de leituras únicas para cada região).

Os índices de  $\alpha$ -diversidade, que representa a diversidade microbiana dentro de cada amostra, são baseados nos parâmetros de riqueza – número de OTUs únicas em cada amostra (*Chao1*) – e uniformidade – que considera as OTUs únicas, mas também a prevalência/distribuição das OTUs (*Simpson* e *Shannon*) – e foram calculados pelo *Microbiome Analyst*. A análise de  $\beta$ -diversidade, que compara a diversidade microbiana entre as amostras, foi feita por cálculo das distâncias de dissimilaridade entre as amostras, que foram ordenadas por análises de PCoA (*Principal Coordinates Analysis*, análises das coordenadas principais) para representação visual em duas dimensões. Os índices usados foram dissimilaridade de *Bray-Curtis* e divergência de *Jensen-Shannon* (DHARIWAL *et al.*, 2017).

#### 5.6.4 ANÁLISE DE MIELOPEROXIDASE E LIPOCALINA FECAIS

As amostras de fezes e conteúdo cecal foram utilizadas para a quantificação dos biomarcadores de inflamação intestinal mieloperoxidase (MPO) e lipocalina-2 (LCN). Tais substâncias são secretadas por neutrófilos e utilizadas como biomarcadores de inflamação intestinal em estudos clínicos (GUERRANT *et al.*, 2016). Após a rápida dissecação dos intestinos dos animais eutanasiados, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido no momento da coleta e, em seguida, armazenadas em freezer -80°C. Para a análise dos biomarcadores, as amostras foram lisadas em tampão RIPA – *RadioImmunoPrecipitation Assay* (20mM de Tris, pH 7,5, NaCl a 150mM, P-40 a 1%, deoxicolato de sódio a 0,5%, EDTA a 1mM e SDS a 0,1%), contendo coquetel de inibidores de protease (Roche, Basel, Suíça). Em seguida, os lisados foram centrifugados e os sobrenadantes foram coletados. A proteína total da

amostra foi quantificada, utilizando recomendações do kit *Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay* baseado no método do ácido bicinonínico (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). A determinação dos analitos de MPO e LCN foram realizados conforme recomendações de kits de ensaios imunoenzimáticos específicos (R&D systems, Minneapolis, EUA). A absorbância das amostras foi mensurada utilizando um leitor de placas da Bio-tek Instruments (Winooski, VT, EUA). As unidades foram expressas em pg / mg de proteína total.

### 5.6.5 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Os segmentos de cólon de aproximadamente 2 cm de tamanho foram fixados em formol tamponado por 18 horas. Em seguida, os segmentos intestinais foram retirados do formol e inseridos em álcool 70%, sendo posteriormente parafinizados para a obtenção de cortes histológicos (5 µm de espessura) em micrótomo. Os cortes dos segmentos intestinais foram processados e corados em hematoxilina e eosina (H&E) no centro de Histologia da Universidade de Virginia. A análise microscópica por escores histopatológicos foram realizados por pesquisador cego e baseados em estudos prévios (APPLEYARD *et al.*, 1995; RATH *et al.*, 1996). As categorias incluíram: perda da arquitetura da mucosa, infiltração celular na mucosa, infiltração celular na submucosa, densidade vascular (hemorragia) e infiltração celular na camada muscular. Para cada categoria, escores de 0 a 3 foram indicados, correspondendo às classificações de efeito ausente, leve, moderado e severo, respectivamente.

### 5.6.6 LOCALIZAÇÃO DE *S. flexneri* NO INTESTINO

Para investigar a localização de *S. flexneri* no cólon de camundongos infectados, empregou-se imunofluorescência. Segmentos do cólon de aproximadamente 3 cm foram abertos longitudinalmente, enrolados em um palito de madeira, fixados em paraformaldeído a 4%, desidratados em sacarose, embebidos no composto O.C.T - *optimal cutting temperature* (temperatura ótima de corte) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), e armazenados em freezer -80°C. Após congelados, obtiveram-se cortes histológicos (10 µm de espessura) em criostato. A recuperação antigênica foi realizada em solução baseada em citrato (Vector Labs, H-3300) a 95°C por 20 min. As lâminas foram bloqueadas em soro de cabra em PBS 2% por 1 hr e então incubadas em soro de cabra em PBS 2% com os anticorpos primários (1:100) contra *Shigella* spp. (ViroStat, #0901) e caderina-E (BD Transduction Laboratories, #610181) por 18 horas a 4°C. Em seguida, as lâminas foram lavadas rapidamente em PBS e incubadas por 2 hr

em soro de cabra em PBS 2% com os anticorpos secundários (1:100) (Life Technologies, #P10994 e #A31555). Finalmente, as lâminas foram montadas com reagente *ProLong Gold antifade* (Invitrogen, #P36934) e visualizadas em microscópio de fluorescência TE2000 (Nikon).

### 5.6.7 ANÁLISE DAS CONCENTRAÇÕES DE CITOCINAS INTESTINAIS

As amostras de colon e conteúdo cecal foram coletadas dos animais eutanasiados e armazenadas em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$ . As amostras foram lisadas em tampão RIPA – *RadioImmunoPrecipitation Assay* (20mM de Tris, pH 7,5, NaCl a 150mM, P-40 a 1%, deoxicolato de sódio a 0,5%, EDTA a 1mM e SDS a 0,1%), contendo coquetel de inibidores de protease (Roche®). Em seguida, os lisados foram centrifugados e os sobrenadantes foram coletados. A proteína total da amostra foi quantificada, utilizando recomendações do kit *Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay* baseado no método do ácido bicinonínico (ThermoScientific®). A quantificação dos marcadores imunológicos foi realizada por análise múltipla utilizando o sistema de Luminex® (Luminex® 100 IS System), que utiliza microesferas que podem ser acopladas covalentemente a múltiplos anticorpos, cada um com diferentes fluoróforos que possuem comprimentos de onda (cores) específicos. Os valores dos marcadores foram normalizados pela quantidade de proteína de cada amostra. As citocinas e outros mediadores de inflamação analisados foram: TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-4, TLR-4, IFN- $\gamma$ , além de proteína inflamatória de macrófago 2 - *macrophage inflammatory protein 2*, MIP-2; proteína quimioatraente de monócitos 1- *monocyte chemoattractant protein 1*, MCP1; KC-homólogo de IL-8; e fator estimulante de colônia de granulócitos – *granulocyte colony stimulating factor*, G-CSF, de acordo com kits específicos do fabricante (Biorad, Hercules, CA, EUA). Os dados foram expressos em pg/mg de proteína total.

### 5.6.8 ANÁLISE METABOLÔMICA EM AMOSTRAS DE URINA

As amostras de urina foram analisadas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), método analítico que permite a identificação (avaliação qualitativa) de uma vasta gama de compostos de baixo peso molecular ( $< 1.000$  Daltons) com rapidez e reprodutividade. O princípio da técnica baseia-se no fato de como os núcleos atômicos reagem a radiação eletromagnética, resultando em frequências de ressonância distintas e oferecendo assim “assinaturas” para estruturas químicas.

Neste projeto, cada amostra foi preparada combinando 30 uL de urina com 30 uL de tampão fosfato (pH 7,4, 100% D<sub>2</sub>O), contendo 1mM do padrão interno: 3-trimetilsilil-1-[2,2,3,3-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>] propionato (TSP). As amostras foram misturadas por *vortex* e centrifugadas (10.000 g) por 10 min a 4°C e, em seguida, o sobrenadante transferido para o tubo padrão de RMN de 1.7 mm. As análises espectroscópicas foram realizadas por meio de espectrômetro RMN 700MHz Bruker (Billerica, MA, EUA), acoplado a uma sonda de detecção de modo inverso BBI (*Broad Band Inverse Detection*). Espectros unidimensionais padrões das amostras de urinas foram adquiridos pela saturação da ressonância da água, utilizando uma sequência de pulso padrão. Para cada amostra, oito varreduras iniciais foram seguidas de 128 varreduras coletadas em pontos de domínio de tempo 64K e com uma regulação de janela espectral para 20 ppm. Os parâmetros de tempo de atraso de 2 s, tempo de mistura de 10 ms, tempo de aquisição de 3.8 s e ampliação de linha de 0,3 Hz foram utilizados. Os espectros foram referenciados à ressonância do TSP. Os espectros de RMN foram digitalizados em regiões espectrais consecutivas integradas de igual largura a partir de programa MATLAB (The *Math-Works*, Natwick, MA, EUA). As regiões de espectro correspondentes ao TSP, água e uréia foram removidas. Por fim, os espectros gerados foram atribuídos a moléculas e metabólitos foram identificados com base em banco de dados *in house* de padrões e programa Chenomx NMR Suite 8.4 (Chenomx Inc).

### 5.6.9 ANÁLISE DE ANTICORPOS SÉRICOS ESPECÍFICOS PARA *Shigella*

Os anticorpos IgG foram mensurados em amostras séricas por meio de ensaios imunoenzimáticos específicos. O antígeno utilizado foi o lipopolissacarídeo (LPS) extraído da cepa de *S. flexneri* 2a 2457T (CURTIS *et al.*, 2016). Para preparação da análise, diluições na razão 1:3 dos soros em solução de bloqueio com Tween-20 0,05% foram adicionadas nas placas pré-preparadas com antígeno específico e incubadas por 18 horas a 4°C. Anticorpos secundários marcados com peroxidase foram desenvolvidos com o substrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) por 15min à temperatura ambiente. A densidade óptica em 450nm foi determinada em leitor de microplacas (Multiscan Ascent; Thermo LabSystems, Helsinki, Finlândia). Análises de regressão linear foram produzidas para cada corrida, e os títulos foram calculados pelo inverso da diluição seriada que produz uma densidade óptica de 0,2 acima do branco.

## 5.7 ANÁLISE DE DADOS

Os dados coletados dos experimentos foram digitados e revisados em planilhas de Excel Microsoft® (New York, NY, EUA). A maioria das análises de dados (curvas de peso, cargas de *S. flexneri*, escores histopatológicos, marcadores inflamatórios, anticorpos) foi realizada pelo programa *GraphPad Prism 7* (San Diego, CA, EUA). A variância dos dados foi analisada para cada teste estatístico utilizado de modo a definir a normalidade dos dados (testes de Komogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk). Para dados paramétricos, testes T de Student e análise de variância (ANOVA) seguido por teste de Bonferroni foram aplicados, enquanto para dados não-paramétricos, utilizou-se teste de Mann-Whitney e teste de Kruskal-Wallis. Os dados estão apresentados em médias +/- erro padrão da média para dados paramétricos e mediana e níveis mínimo-máximo ou faixa interquartil para dados não-paramétricos. Para análises de correlação, utilizou-se teste de correlação de Spearman. Foram considerados os dados que se mostraram reprodutíveis (pelo menos duas vezes para cada resultado) e significantes pela análise estatística. As diferenças foram consideradas significantes se o P valor < 0.05.

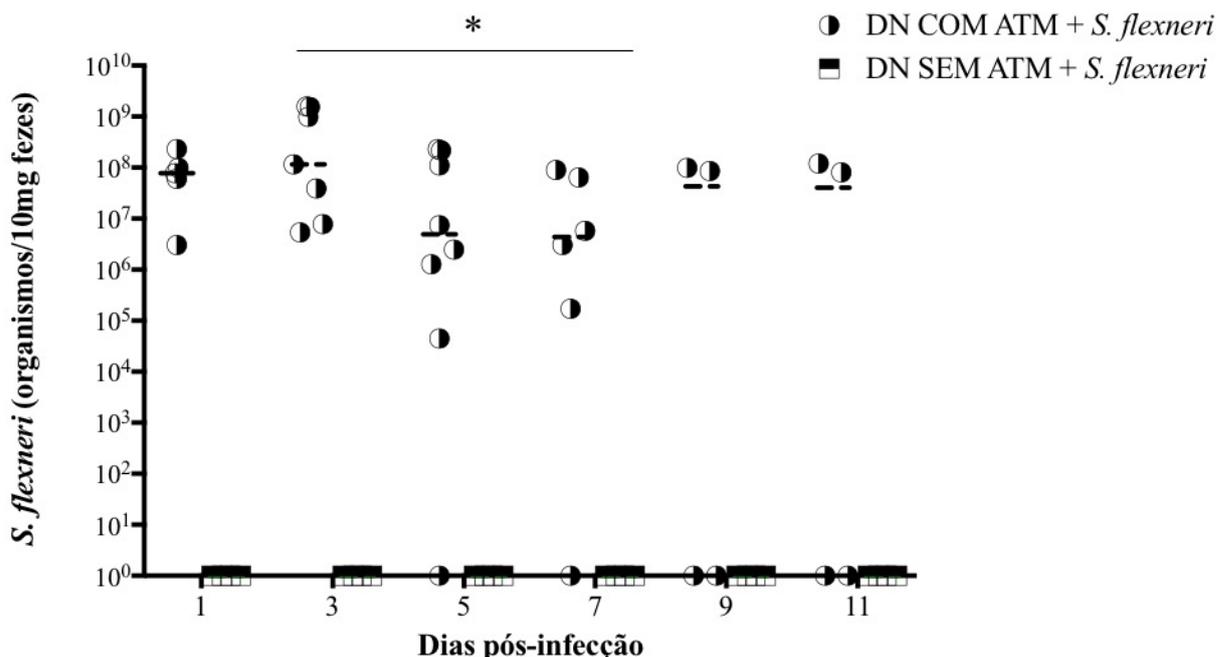
Para a análise específica dos dados metabólômicos, os dados espectrais resultantes foram normalizados para a unidade da área. Modelos estatísticos multivariados foram utilizados a partir de códigos *in-house* em programa MATLAB (The *Math-Works*, Natwick, MA, EUA), que incluiu a Análise de Componentes Principais (*Principal Componente Analysis – PCA*) e a Análise Discriminante por Projeções Ortogonais a Estruturas Latentes (*Orthogonal Projections to Latent Structures Discriminant Analysis - OPLS-DA*). As análises não-supervisionadas de PCAs com a representação de escores forneceram uma ideia das potenciais diferenças entre os grupos e sugeriram metabólitos potencialmente mais responsáveis por essas diferenças. Modelos gerados a partir de análise OPLS-DA foram construídos para facilitar a interpretação dos dados, avaliando a significância dos modelos de comparação entre dois grupos (infectado vs controle). Nestas análises, os perfis espectroscópicos (informação metabólica) serviram como matriz descritora e os grupos (animais não-infectados *versus* animais infectados por *S. flexneri*) foram utilizados como variáveis de resposta. As performances preditoras dos modelos foram calculadas com o uso de um método de validação cruzada. Testes de permutações (1000 permutações) foram utilizados para avaliar a significância do poder preditivo de cada modelo, montando matrizes aleatórias virtuais onde observações (variável X) são associadas a classes corretas ou incorretas (variável Y). Nesta análise, o ranqueamento destas 1000 permutações em relação ao modelo real é realizado, e este modelo é considerado significativo se classificado nos 5% dos melhores modelos virtuais (melhores performances preditivas). Pelos modelos

significantes gerados pela análise de OPLS-DA, os metabólitos significantes foram identificados e suas correlações com os componentes preditivos foram extraídas dos modelos e resumidas em mapas de calor. Para as análises dos dados de microbioma: cálculos dos índices  $\alpha$ -diversidade,  $\beta$ -diversidade e análises univariadas (teste t de Student) de cada grupo taxonômico; utilizou-se a plataforma Microbiome Analyst. Para as análises univariadas, foram considerados significantes os resultados com FDR (*False Discovery Rate*, taxa de descoberta falsa)  $< 0,05$ , de modo a corrigir o caráter multivariado da análise.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 MODULAÇÃO DA EXCREÇÃO FECAL DE *S. flexneri* PELO USO DE ANTIMICROBIANOS EM CAMUNDONGOS NUTRIDOS

Com o intuito de induzir suscetibilidade à infecção por *S. flexneri* em camundongos C57BL/6, um coquetel de antimicrobianos de amplo espectro (metronidazol, colistina, gentamicina e vancomicina) foi utilizado por três dias prévios à infecção. Iniciamos os testes com camundongos nutridos, utilizados como modelo alvo do trabalho, a fim de avaliar os potenciais efeitos da infecção em um organismo saudável com posterior recuperação após episódios agudos de diarreia (RAQIB *et al.*, 1995; RAQIB *et al.*, 2000). Camundongos pré-tratados com antimicrobianos mostraram maiores níveis de excreção fecal de *S. flexneri* do que camundongos não-tratados (**Figura 6**). A maioria dos animais nutridos e pré-tratados com antimicrobianos apresentaram números elevados (em torno de  $10^8$  UFC/ 10mg de fezes) de *S. flexneri* nas fezes durante a primeira semana pós-infecção, enquanto os animais nutridos e não-tratados com antimicrobianos não apresentaram detecção de *S. flexneri* nas fezes em nenhum dos períodos avaliados pós-infecção ( $P = 0,002$  por Mann-Whitney). Considerando que o pré-tratamento com antimicrobianos favoreceu a indução de colonização e crescimento de *S. flexneri* nos animais nutridos, seguiu-se à avaliação dos demais parâmetros indicativos de doença por este patógeno nesses animais utilizando o coquetel de antimicrobianos.



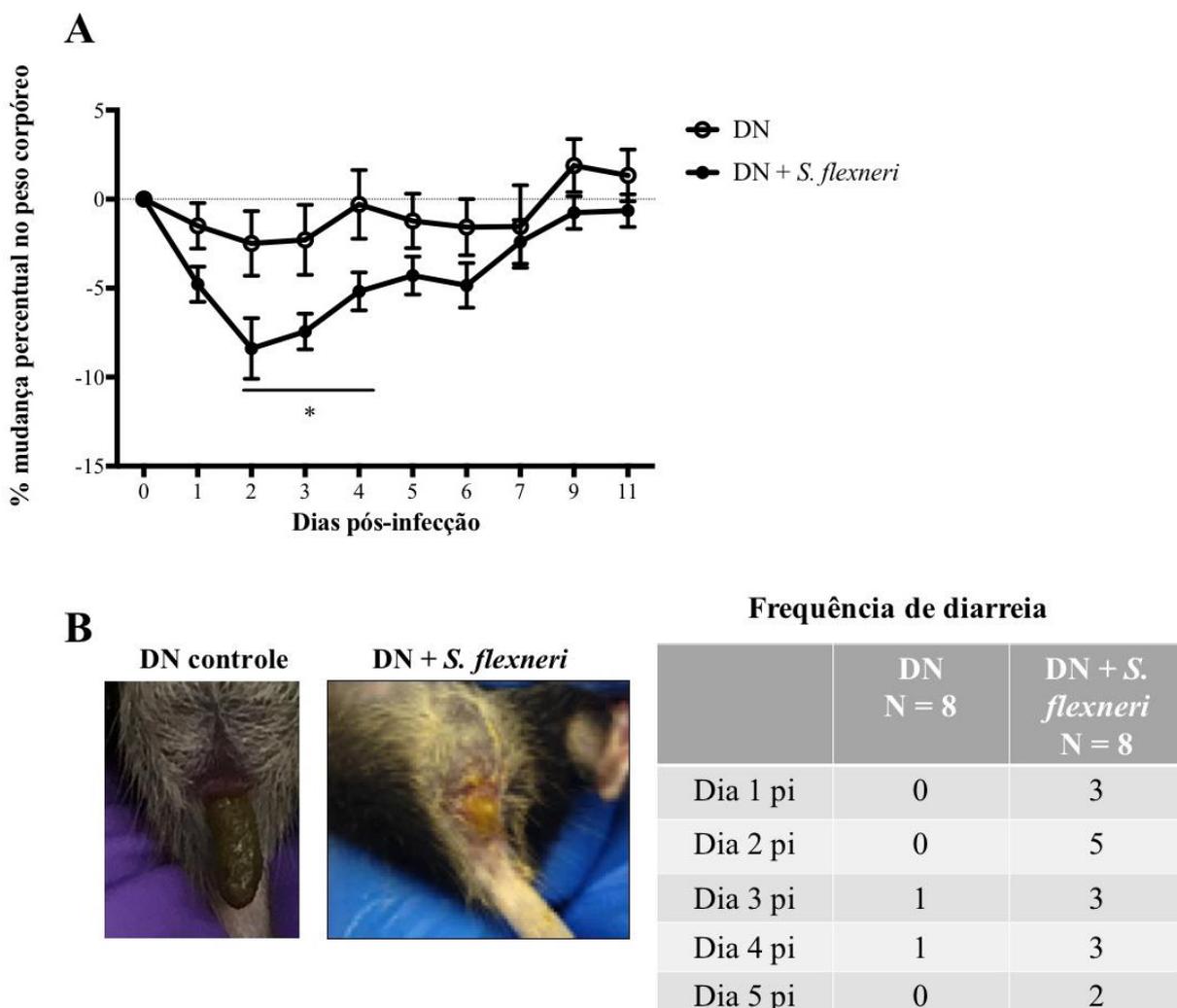
**Figura 6: Modulação da excreção fecal de *S. flexneri* em camundongos nutridos pelo uso de antimicrobianos.** Excreção fecal de *S. flexneri* nos dias 1, 3, 5, 7, 9 e 11 pós-infecção (pi) em camundongos sob dietas DN pré-tratados ou não com antimicrobianos. \* DN COM ATM vs DN SEM ATM;  $P = 0,002$  por teste de Mann-Whitney. A detecção molecular de *S. flexneri* (gene *ipaH*) foi realizada por qPCR do DNA extraído das amostras fecais dos camundongos. A análise foi feita por meio de curva padrão realizada com DNA extraído de cepa de *S. flexneri* 2457T. O coquetel de antimicrobianos consistiu de colistina, gentamicina, metronidazol e vancomicina. Os dados são apresentados como mediana. DN: dieta nutrida, ATM: antimicrobianos.  $N=8$ /grupo.

## 6.2 INDUÇÃO DE DIARREIA E REDUÇÃO DE PESO CORPÓREO POR *S. flexneri* EM CAMUNDONGOS NUTRIDOS

A caracterização do fenótipo clínico do modelo iniciou-se pela avaliação de desfechos da doença, tais como peso corpóreo e diarreia, que são comumente observados em crianças infectadas por cepas de *Shigella* spp. na comunidade. Em animais nutridos pré-tratados com antimicrobianos, a infecção oral por *S. flexneri* causou perda de peso aguda e diarreia dentro dos primeiros quatro dias pi, sendo que no dia 2 pi ambos diarreia e perda de peso foram mais acentuadas. Diferenças significativas de peso corpóreo entre animais não-infectados e



infectados foram observadas nos dias 2, 3 e 4 pi ( $P < 0,05$  por two-way ANOVA) (**Figura 7A**). Em diferentes experimentos, os níveis de redução no peso corpóreo tiveram média de variação entre 5 a 15% do peso do momento da infecção. A **Figura 7B** mostra imagens representativas dos episódios de diarreia em animais nutridos após infecção e tabela descrevendo as frequências das observações de presença ou ausência de diarreia dos animais pré-tratados com antimicrobianos infectados ou não por *S. flexneri*. Os camundongos geralmente mostravam recuperação depois do dia 5 pi para ambos os impactos de prejuízo de peso corpóreo e diarreia. Diarreia não foi observada em camundongos infectados, porém não-tratados com antimicrobianos.

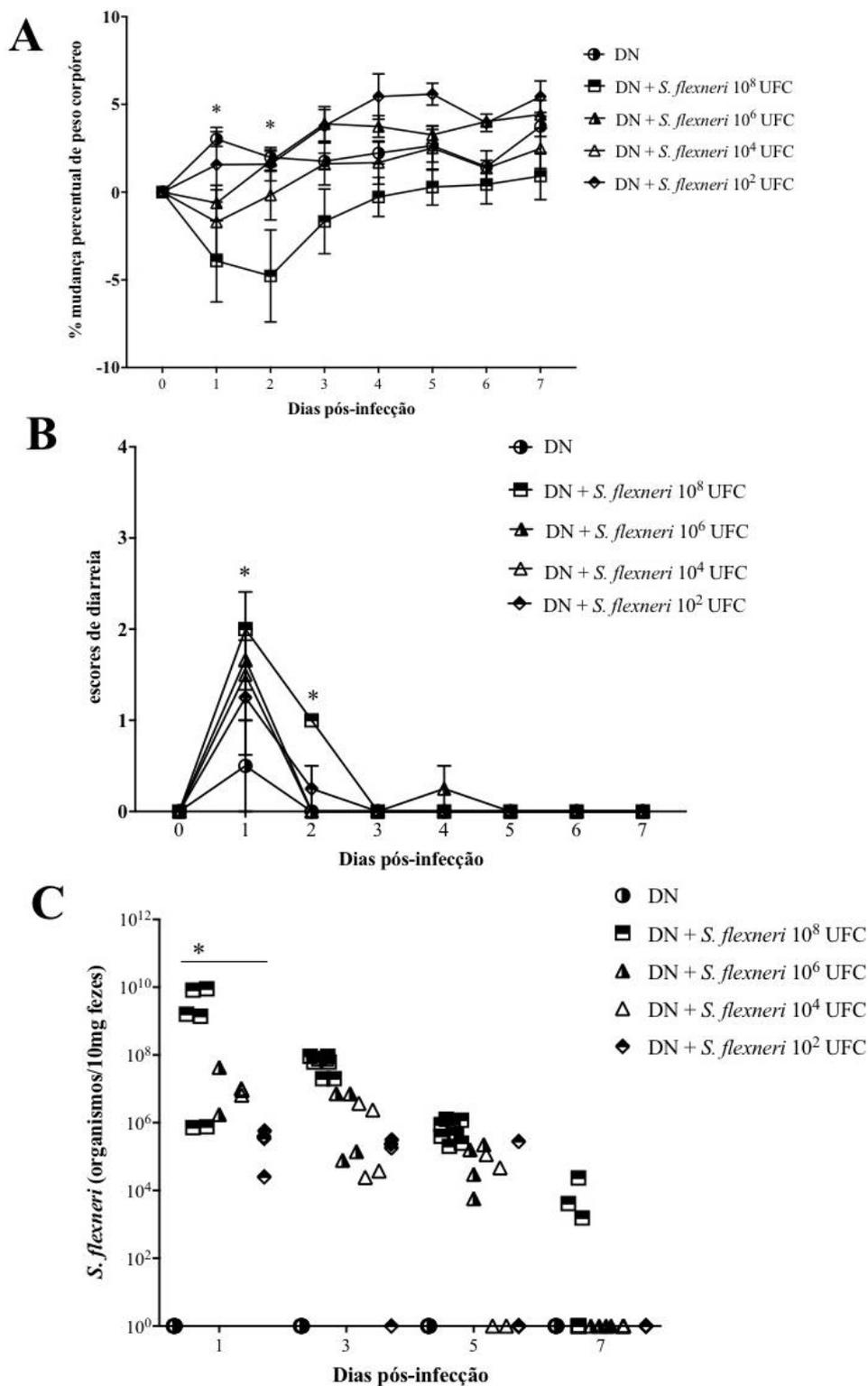


**Figura 7: Indução de diarreia e redução de peso corpóreo por *S. flexneri* em camundongos nutridos.** **A)** Mudança em porcentagem do peso corpóreo induzida pela infecção oral por *S. flexneri* em camundongos DN. \* DN + *S. flexneri* vs DN  $P < 0,05$  por two-way ANOVA seguido por Bonferroni nos dias 2, 3 e 4 pi; **B)** Imagens representativas da diarreia induzida por *S. flexneri* em camundongos DN no dia 2 pi e tabela descritiva da quantidade de animais por grupo que apresentaram diarreia a cada pi. Camundongos nutridos e pré-tratados com antimicrobianos foram infectados por *S. flexneri* 2457T  $10^8$  UFC/animal, sendo que o grupo controle (DN) não recebeu o inóculo. O peso corpóreo e a consistência das fezes foram avaliados diariamente após a infecção. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. DN: dieta nutrida. pi = pós-infecção. N=8/grupo.

### 6.3 AVALIAÇÃO DOSE-RESPOSTA DE REDUÇÃO DE PESO CORPÓREO, DIARREIA E EXCREÇÃO FECAL DE *S. flexneri* EM CAMUNDONGOS NUTRIDOS

A fim de se avaliar o efeito dose-resposta do inóculo de *S. flexneri* no modelo, diluições seriadas (razão de 100) foram produzidas a partir do inóculo de *S. flexneri*, de modo a obter inóculos nas concentrações de  $10^6$ ,  $10^4$  e  $10^2$  UFC/camundongo e compará-los ao inóculo de  $10^8$  UFC/camundongo, utilizados nos dados apresentados anteriormente. Investigamos a capacidade de tais inóculos causarem doença (redução de peso corpóreo, diarreia e excreção fecal de *S. flexneri*) em camundongos nutridos pré-tratados com antimicrobianos. Em relação à perda de peso corpóreo, como esperado, o inóculo de  $10^8$  UFC/camundongo induziu perda de peso significativa em relação ao grupo controle não-infectado nos dias 1 e 2 pi ( $P = 0,0009$ -dia 1 pi e  $P = 0,0014$ -dia 2 pi por two-way ANOVA). Os camundongos que receberam inóculos menores de *S. flexneri* não apresentaram diferença no peso corpóreo em relação aos camundongos não-infectados. Além disso, o grupo infectado por  $10^8$  UFC/camundongo foi também diferente de forma significativa do grupo com  $10^2$  UFC/camundongo no dia 1 pi ( $P = 0,0072$  por two-way ANOVA) e dos grupos  $10^6$ ,  $10^4$  e  $10^2$  UFC/camundongo no dia 2 pi ( $P < 0,05$  por two-way ANOVA) (**Figura 8A**). Do mesmo modo, quando avaliamos a influência da carga de *S. flexneri* na ocorrência de eventos diarreicos (a partir da determinação de escores de diarreia e, dessa forma, uma medida quantitativa do fenômeno), o único grupo que mostrou diferença significativa em relação ao grupo controle foi o que recebeu inóculo de  $10^8$  UFC/camundongo ( $P < 0,0001$ -dia 1 pi e  $P = 0,0007$ -dia 2 pi por two-way ANOVA), com posterior resolução da diarreia, enquanto os outros grupos infectados, apesar de apresentarem alguns animais com diarreia, não se observou de forma consistente. Os escores de diarreia do grupo com  $10^8$  UFC/camundongo apresentaram média de 2, caracterizando fezes diarreicas líquidas. Houve ocorrência de fezes pastosas (não-rígidas) em todos os grupos, incluindo os animais não-infectados (**Figura 8B**). Por fim, avaliamos a influência do inóculo na detecção de *S. flexneri* nas fezes durante a primeira semana pós-infecção. O grupo dos animais que receberam o maior inóculo ( $10^8$  UFC/camundongo) apresentou diferença significativa em relação a todos os outros grupos no dia 1 pi ( $P < 0,0001$  vs controle;  $P = 0,0033$  vs  $10^6$  UFC;  $P = 0,0004$  vs  $10^4$  UFC;  $P < 0,0001$  vs  $10^2$  UFC por two-way ANOVA). O inóculo de  $10^6$  UFC/camundongo possibilitou níveis de detecção similares ao inóculo maior ( $10^8$  UFC) nos dias 3 e 5 pi, enquanto os inóculos de  $10^4$  e  $10^2$  UFC/camundongo apresentaram níveis menores (**Figura 8C**). De modo geral, observou-se que o único inóculo capaz de gerar perda de peso

corpóreo e diarreia foi o de  $10^8$  UFC/camundongo, embora os inóculos menores também possibilitaram a detecção fecal de *S. flexneri* durante a primeira semana pós-infecção.



**Figura 8: Efeito dose-resposta da infecção oral por *S. flexneri* em camundongos nutridos pré-tratados com antimicrobianos: peso corpóreo, diarreia e excreção fecal de *S. flexneri*.**

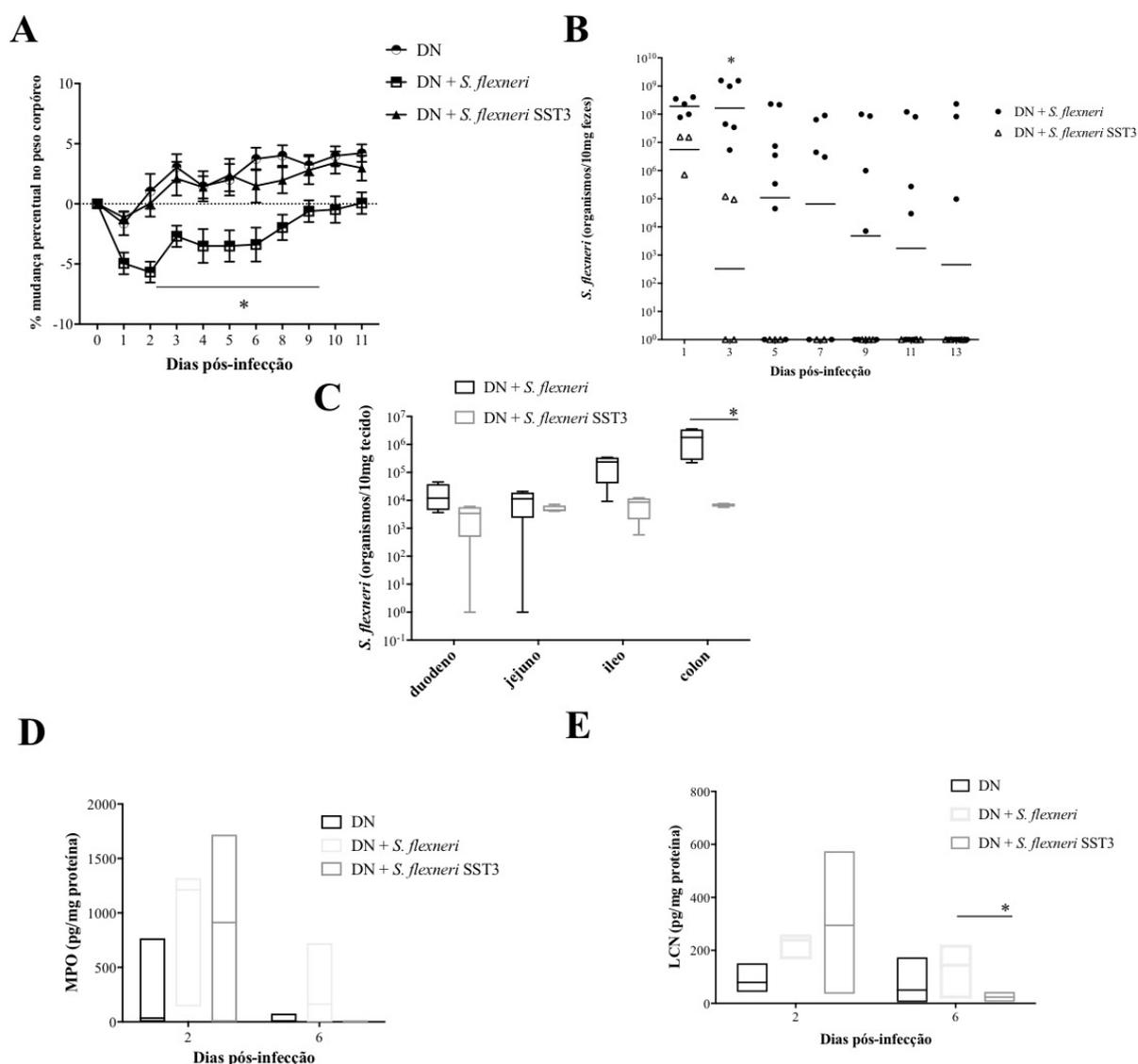
**A)** Mudança em porcentagem do peso corpóreo induzida pela infecção oral por *S. flexneri* em camundongos DN. \* DN + *S. flexneri* 10<sup>8</sup> UFC vs DN P < 0,05 por two-way ANOVA seguido por Bonferroni nos dias 1 e 2 pi; **B)** Escores de diarreia de camundongos nutridos pré-tratados com antimicrobianos. \* DN + *S. flexneri* 10<sup>8</sup> UFC vs DN P < 0,05 por two-way ANOVA seguido por Bonferroni nos dias 1 e 2 pi. **C)** Excreção fecal de *S. flexneri* nos dias 1, 3, 5 e 7 pós-infecção (pi) em camundongos nutridos pré-tratados com antimicrobianos. \* DN + *S. flexneri* 10<sup>8</sup> UFC vs todos os grupos P < 0,05 por two-way ANOVA seguido por Bonferroni no dia 1 pi. Os dados são apresentados como média ± EPM. DN: dieta nutrida. N=4/grupo exceto N=8/DN + *S. flexneri* 10<sup>8</sup> UFC.

#### **6.4 INFECÇÃO POR CEPA DE *S. flexneri* MUTANTE PARA O SISTEMA DE SECREÇÃO TIPO 3 (SST3) EM CAMUNDONGOS NUTRIDOS**

Baseado no princípio dos postulados moleculares de Koch, o trabalho seguiu-se com a tentativa de investigar se os efeitos observados no modelo seriam causados pelos fatores de virulência específicos da cepa de *S. flexneri* inoculada. O sistema de secreção do tipo 3 (SST3) é considerado um dos mais importantes fatores de virulência de *Shigella*, capaz de determinar sua capacidade patogênica. Dessa forma, realizamos infecção com cepa de *S. flexneri* 2457T mutada para o gene do SST3 (*S. flexneri* SST3), comparando-a com a infecção pela cepa de *S. flexneri* 2457T selvagem em animais DN. Os parâmetros de perda de peso, diarreia, excreção fecal de *S. flexneri* e inflamação intestinal foram avaliadas.

Os animais infectados pela *S. flexneri* SST3 não apresentaram as mesmas consequências que os animais infectados pela cepa selvagem. A análise do peso corpóreo mostrou que os animais infectados pela cepa *S. flexneri* SST3 não apresentaram diferença em relação aos não-infectados, porém foram significativamente diferentes dos animais infectados pela cepa selvagem dos dias 2 a 8 pi (P < 0,05 por two-way ANOVA) (**Figura 9A**). A análise da excreção fecal da cepa mutante mostrou que durou apenas até o dia 3 pi, enquanto os níveis fecais da cepa selvagem duraram por pelo menos 10 dias pi. No dia 3 pi, os níveis de excreção fecal da cepa mutante foram significativamente diferentes em relação aos níveis da cepa selvagem com quase 3 logs de diferença (cerca de 10<sup>9</sup> vs 10<sup>5</sup> organismos/10 mg fezes; P = 0,0095 por teste t de Student) (**Figura 9B**). Além disso, os níveis de colonização tecidual no dia 3 pi foram consistentemente reduzidos em diferentes porções do intestino. A quantidade de *S. flexneri*

SST3 foi significativamente reduzida quando comparada à quantidade da *S. flexneri* selvagem no cólon (cerca de  $10^6$  vs  $10^4$  organismos / 10mg de tecido;  $P = 0,0013$  por two-way ANOVA) (**Figura 9C**). A inflamação intestinal induzida pela cepa mutante, medida pelas concentrações de MPO e LCN, mostrou tendência de decréscimo no dia 6 pi. Para a LCN, os níveis foram significativamente diminuídos no dia 6 pi ( $P < 0,05$  por Oneway ANOVA) (**Figura 9D**).



**Figura 9: Infecção por cepa de *S. flexneri* mutante para o sistema de secreção tipo 3 (SST3) em camundongos nutridos.** Peso corpóreo, excreção fecal do patógeno, colonização intestinal e inflamação foram avaliados. **A)** Mudança em porcentagem do peso corpóreo induzida pela infecção oral por *S. flexneri* mutante para o SST3 em camundongos DN. \* DN + *S. flex* vs DN + *S. flex* SST3  $P < 0,05$  por two-way ANOVA seguido de Bonferroni,  $N=8$ /grupo; **B)** Excreção

fecal de *S. flexneri* selvagem ou mutante para o SST3 até o dia 9 pós-infecção (pi). \* DN + *S. flex* vs DN + *S. flex* SST3 P = 0,0095 por teste T de Student no dia 3 pi, N=8/grupo; **C)** Quantificação de *S. flexneri* selvagem ou mutante para o SST3 presente nas diferentes seções de intestino (duodeno, jejuno, íleo e cólon) no dia 3 pós-infecção (pi). \* DN + *S. flex* vs DN + *S. flex* SST3 P = 0,0013 por two-way ANOVA seguido de Bonferroni no dia 3 pi no cólon, N=4/grupo; **D)** Concentrações fecais de mieloperoxidase-MPO nos dias 2 e 6 pi; **E)** Concentrações fecais de lipocalina-LCN nos dias 2 e 6 pi. Os camundongos foram infectados com a cepa de *S. flexneri* 2457T selvagem ou mutante para o SST3. \* DN + *S. flex* vs DN + *S. flex* SST3 P < 0,05 por One-way ANOVA no dia 6 pi. Dados representados como mediana e faixa interquartil. DN = dieta nutrida. N=4/grupo.

Os achados em conjunto indicam que o fator de virulência SST3 de *S. flexneri* é importante para a patogênese da infecção por essa bactéria em camundongos no que diz respeito à colonização, sinais clínicos (perda de peso corpóreo) e inflamação intestinal.

## 6.5 MODULAÇÃO DO MICROBIOMA INTESTINAL PELA INFECÇÃO POR *S. flexneri* EM CAMUNDONGOS NUTRIDOS

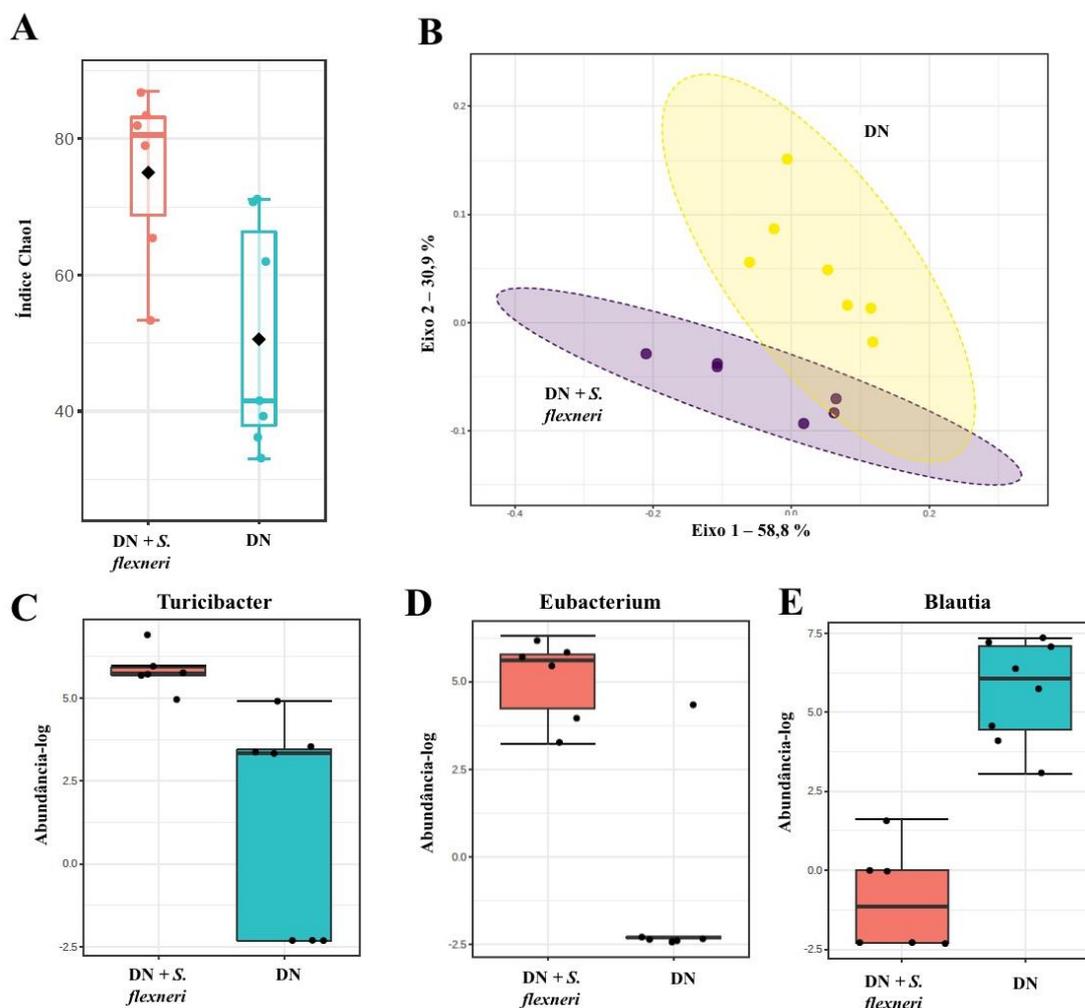
O uso de antimicrobianos para indução de suscetibilidade à doença neste modelo indica um potencial envolvimento do microbioma intestinal dos camundongos para os desfechos de doença em shigelose. Neste sentido, realizamos a análise do microbioma de amostras fecais dos animais nutridos infectados ou não por *S. flexneri* 2457T selvagem no dia 3 pi, tempo aproximado que corresponde ao pico de infecção no modelo, a fim de investigar as alterações promovidas pela *S. flexneri* na comunidade bacteriana do intestino.

O estudo de diversidade microbiana mostrou, pelo índice Chao1, parâmetro de  $\alpha$ -diversidade que relaciona-se à riqueza (número de espécies únicas na comunidade), mostrou diferença significativa entre amostras infectadas e controles, mostrando que os animais infectados apresentaram aumento moderado de riqueza microbiana em comparação com os animais nutridos não-infectados (P = 0,012) (**Figura 10A**). A análise de  $\beta$ -diversidade (diversidade microbiana entre as amostras) mostrou alterações significantes promovidas pela infecção por *S. flexneri* com agrupamento dos grupos infectados em comparação com os não-infectados (P < 0,044 pelo índice de dissimilaridade de *Bray-Curtis*) (**Figura 10B**).

Em relação a alterações em grupos bacterianos específicos, as análises destes dados mostraram que alguns gêneros foram alterados significativamente (*Eubacterium*, *Turicibacter*,

*Blautia*), além de alteração de bactérias do filo Bacteroidetes não identificadas a nível de gênero. Os camundongos infectados por *S. flexneri* apresentaram aumento dos níveis das bactérias do gênero *Turicibacter* em pelo menos duas vezes em relação aos camundongos não-infectados ( $P = 0,0032$  e taxa de falsa descoberta =  $0,041$  por teste t de Student) (**Figura 10C**). As bactérias do gênero *Eubacterium* também se mostraram aumentadas nos animais infectados em relação aos controles não-infectados, dessa vez em proporção maior do que cinco vezes ( $P = 0,0053$  e taxa de falsa descoberta =  $0,041$  por teste t de Student) (**Figura 10D**). Por fim, o outro gênero com alteração significativa foi o *Blautia*, que, por sua vez, se mostrou diminuído em relação aos animais não-infectados ( $P = 0,0022$  e taxa de falsa descoberta =  $0,016$  por teste t de Student) (**Figura 10E**). Além disso, os animais infectados por *S. flexneri* também apresentaram diminuição nos níveis de bactérias do filo Bacteroidetes não-identificadas a nível de gênero ( $P = 0,0063$  e taxa de falsa descoberta =  $0,041$  por teste t de Student).

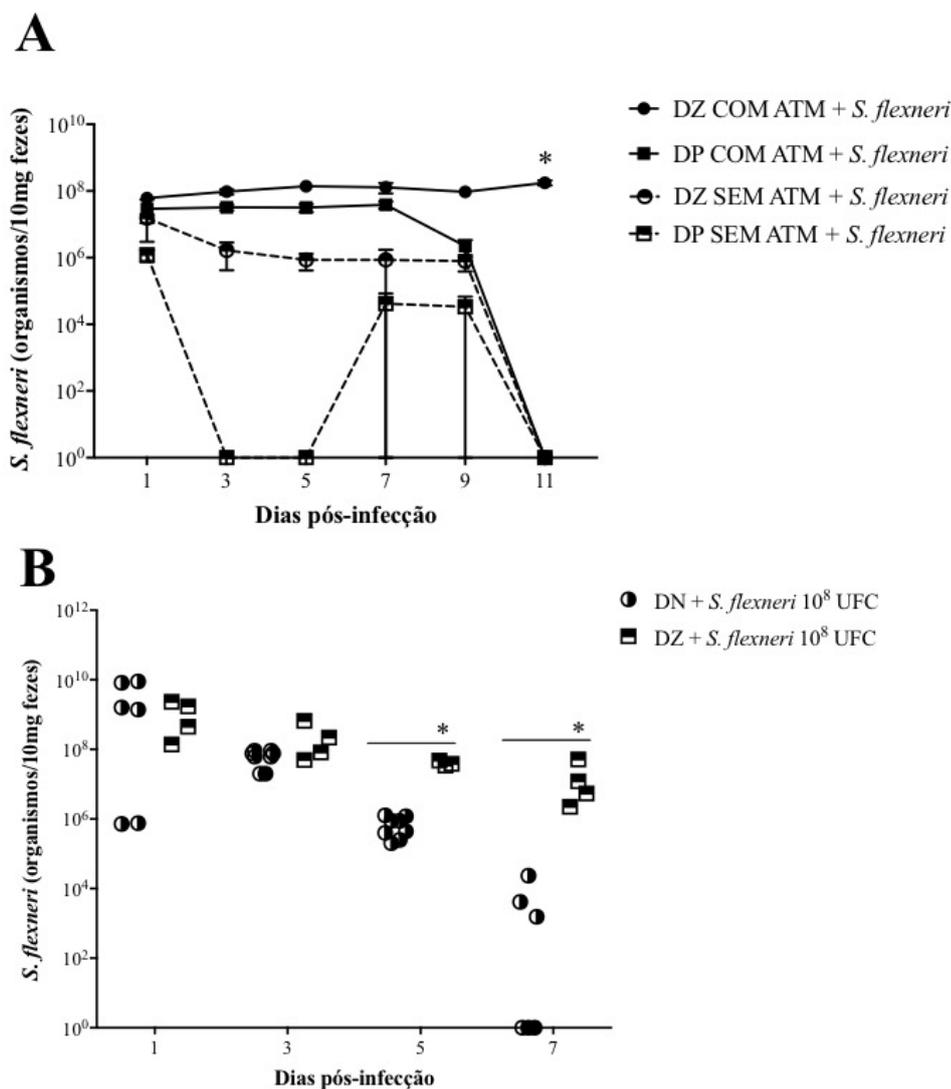




**Figura 10: Modulação do microbioma intestinal pela infecção por *S. flexneri* em camundongos nutridos.** **A)** Análise de  $\alpha$ -diversidade (índice de Chao1) de camundongos nutridos infectados ou não.  $P = 0,012873$  DN + *S. flexneri* vs DN; **B)** Análise de  $\beta$ -diversidade (índice de dissimilaridade de *Bray-Curtis*) de camundongos nutridos infectados ou não.  $P < 0,044$  DN + *S. flexneri* vs DN; **C)** Níveis de *Turicibacter* em camundongos nutridos infectados ou não.  $P = 0,0032$  DN + *S. flexneri* vs DN; **D)** Níveis de *Eubacterium* em camundongos nutridos infectados ou não.  $P = 0,0032$  DN + *S. flexneri* vs DN; **E)** Níveis de *Blautia* em camundongos nutridos infectados ou não.  $P = 0,0022$  DN + *S. flexneri* vs DN. As amostras fecais foram coletadas no dia 3 pós-infecção de animais nutridos infectados ou não por *S. flexneri* e submetidas à extração de DNA e amplificação e sequenciamento da região V4 do gene 16S do RNA ribossômico. DN: dieta nutrida. N=8/grupo.

## 6.6 MODULAÇÃO DA EXCREÇÃO FECAL DE *S. flexneri* PELO USO DE ANTIMICROBIANOS EM CAMUNDONGOS DESNUTRIDOS

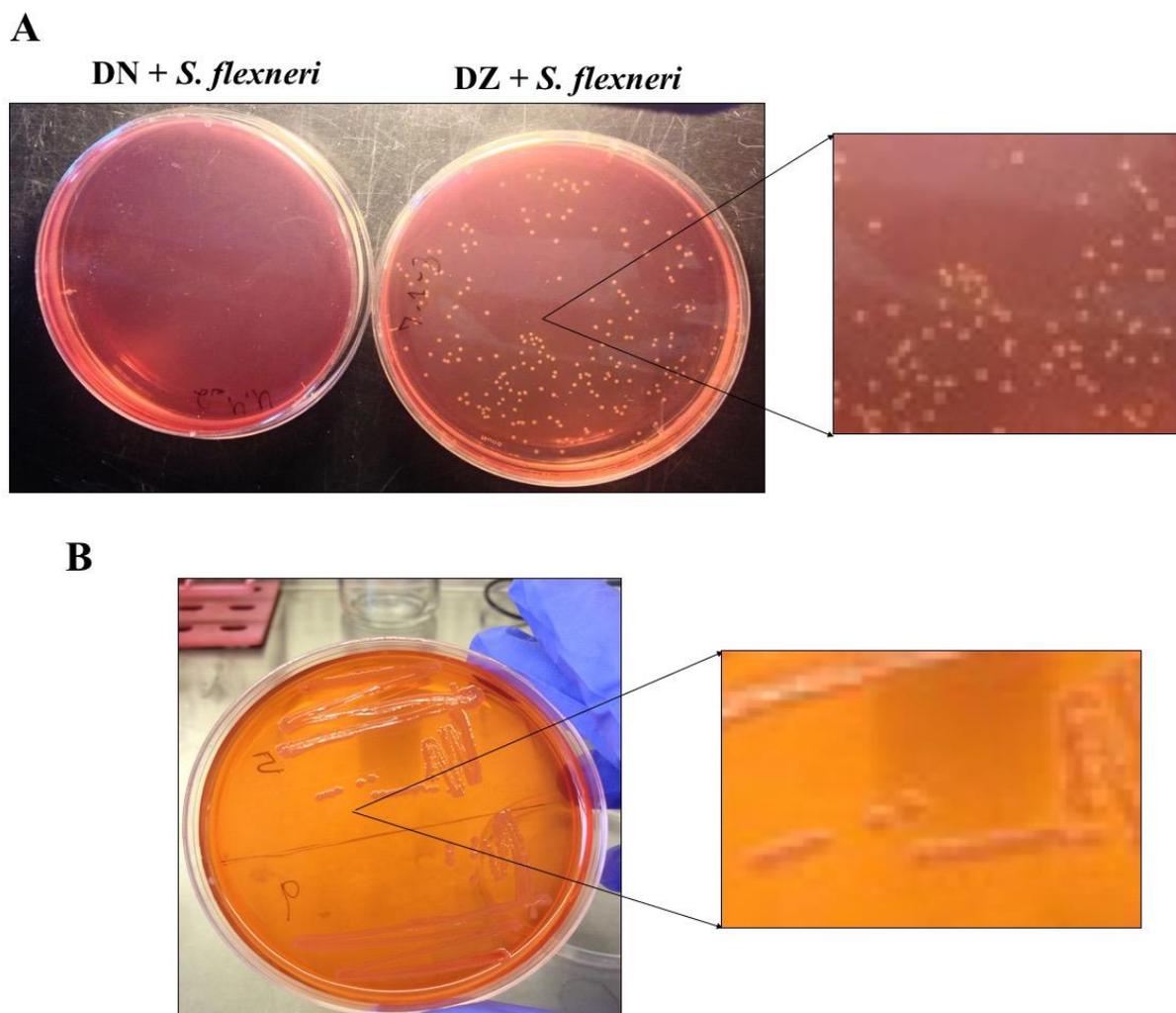
Após a caracterização geral do modelo de infecção entérica por *S. flexneri* em camundongos nutridos, avaliamos o mesmo protocolo em camundongos deficientes em zinco. A dieta de deficiência em zinco (DZ) já foi utilizada em outros modelos murinos de infecções bacterianas intestinais (BOLICK *et al.*, 2014; BOLICK *et al.*, 2018; GIALLOUROU *et al.*, 2018). Paralelamente, testou-se também a dieta deficiente em proteínas (DP), já validada em modelo de infecção pelo protozoário *Cryptosporidium parvum* (COSTA *et al.*, 2012). Avaliamos se animais submetidos a tais dietas com ou sem o uso de antimicrobianos apresentariam maior ou menor nível de infecção por *S. flexneri* pela análise da excreção fecal de *S. flexneri*. Animais do grupo DP com antimicrobianos apresentaram eliminação total de *S. flexneri* após o dia 9 pi. Os animais DZ pré-tratados com antimicrobianos excretaram *S. flexneri* nas fezes em níveis elevados de forma persistente – cerca de  $10^8$  organismos / 10 mg de fezes até pelo menos 50 dias pi. Os níveis de excreção fecal de *S. flexneri* no grupo DZ foram significativamente aumentados nos dias 3, 5, 7 e 11 pi ( $P < 0,05$  por two-way ANOVA) em relação ao grupo DP, bem como em relação aos grupos DZ e DP sem pré-tratamento com antimicrobianos. Camundongos não-tratados com antimicrobianos e submetidos à DP apresentaram baixos níveis de excreção fecal de *S. flexneri* por uma semana, enquanto os animais DZ e não-tratados com antimicrobianos apresentaram excreção fecal robusta de *S. flexneri* pelo mesmo período, porém em níveis menores do que com tratamento de antimicrobianos (cerca de  $10^6$  organismos / 10 mg de fezes) (**Figura 11A**). Quando comparadas médias dos níveis de detecção de *S. flexneri* entre os grupos de animais DN e DZ em experimento isolado, houve níveis mais elevados no grupo DZ ( $\sim 10^8$  vs  $\sim 10^6$  UFC / 10 mg fezes no dia 5 pi,  $P = 0,0121$  por Teste Mann-Whitney; e  $\sim 10^7$  vs  $10^4$  UFC / 10 mg fezes no dia 7 pi,  $P = 0,0095$  por Teste Mann-Whitney) (**Figura 11B**).



**Figura 11: Modulação da excreção fecal de *S. flexneri* em camundongos desnutridos pelo uso de antimicrobianos.** **A)** Excreção fecal de *S. flexneri* nos dias 1, 3, 5, 7, 9 e 11 pós-infecção (pi) em camundongos sob dietas DP e DZ, e pré-tratados ou não com antimicrobianos. \* DZ vs todos os outros grupos  $P < 0,05$  por two-way ANOVA nos dias 3, 5, 7 e 11 pi; **B)** Excreção fecal de *S. flexneri* nos dias 1, 3, 5 e 7 pi em camundongos em dietas DN e DZ e pré-tratados com antimicrobianos. \* DN vs DZ, dia 5 pi  $P = 0,0121$  por Teste de Mann-Whitney e DN vs DZ, dia 7 pi  $P = 0,0095$  por Teste de Mann-Whitney. Camundongos submetidos a dieta DN, DP ou DZ por duas semanas e submetidos ou não ao tratamento com antimicrobianos por três dias antes da infecção oral por *S. flexneri* no dia 0. As amostras fecais foram coletadas para a extração de DNA fecal e a detecção molecular de *S. flexneri* (gene *ipaH*) por PCR em tempo real. A análise foi feita por meio de curva padrão realizada com DNA extraído de cepa de *S. flexneri* 2457T. O coquetel de antimicrobianos consistiu de colistina, gentamicina,

metronidazol e vancomicina. DN: dieta nutrida, DP: dieta deficiente em proteína e DZ: dieta deficiente em zinco. ATM = antimicrobianos. N=8/grupo.

A detecção molecular da cepa de *S. flexneri* por PCR quantitativo não é suficiente para a confirmação de que a bactéria se replica e se mostra viável e virulenta no interior do camundongo. Além disso, a detecção de *S. flexneri* em fezes de camundongos deficientes em zinco em até 50 dias pi reforçou a necessidade da busca por *S. flexneri* viável. Dessa forma, buscou-se isolar *S. flexneri* viáveis em amostras fecais de animais nutridos e deficientes em zinco por técnicas de microbiologia convencional de cultura no dia 28 pi. Amostras fecais de animais DZ propiciaram o isolamento de colônias viáveis em placas de ágar MacConkey. Dez colônias foram selecionadas para o teste de presença do gene *ipaH* por PCR quantitativo, confirmando que eram colônias de *Shigella*. Todas as colônias foram positivas para o gene *ipaH* e cresceram com coloração rósea em meio ágar vermelho de Congo, o que confirmou a sua capacidade de virulência. Amostras fecais de animais DN não apresentaram colônias na placa de ágar MacConkey. A **Figura 12A e 12B** mostram imagens representativas de placas de ágar MacConkey e ágar vermelho de Congo, respectivamente, no dia 28 pi.

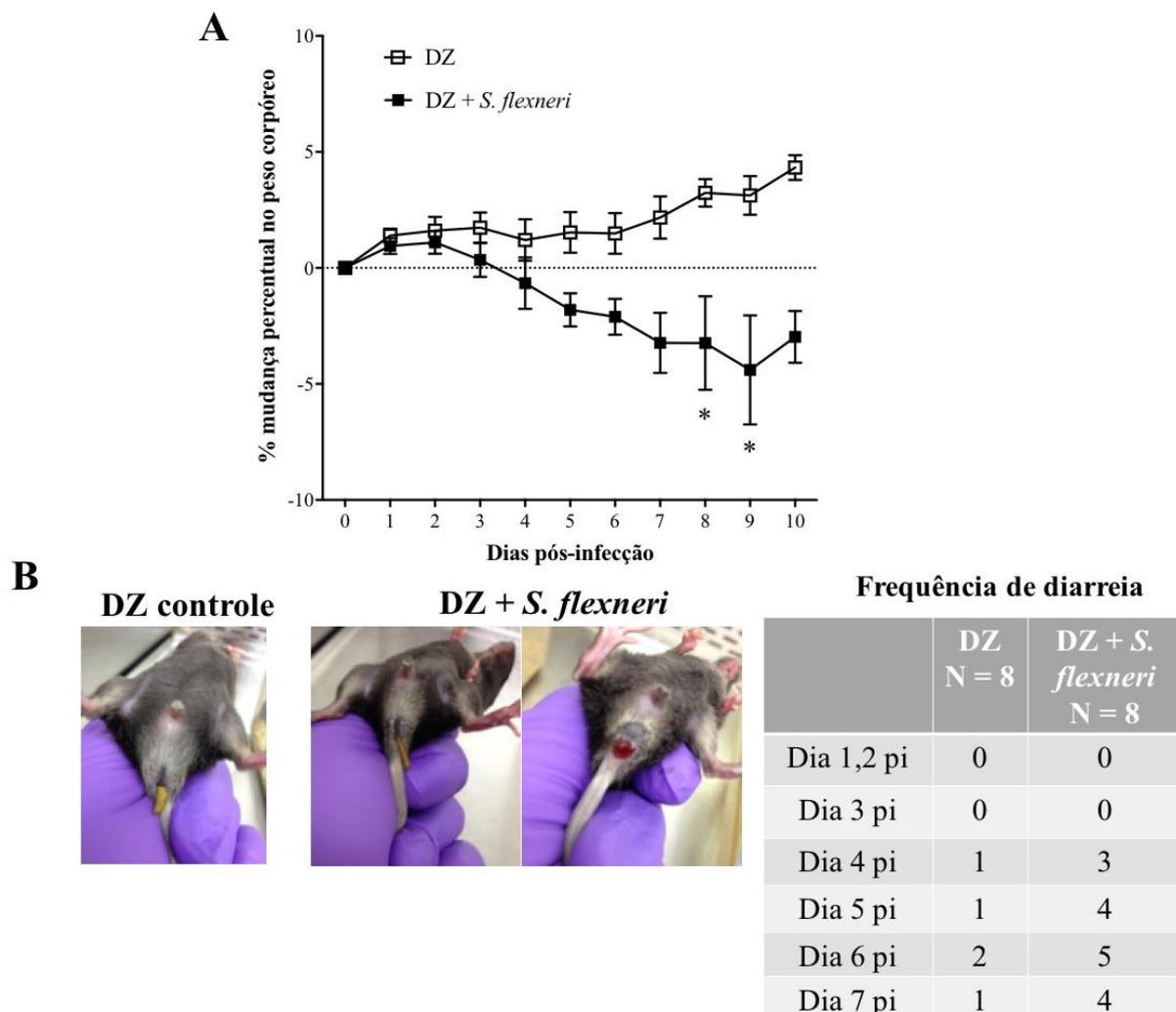


**Figura 12: Identificação de *S. flexneri* viável em amostras fecais dos camundongos infectados.** A) Isolamento de colônias bacterianas oriundas de amostras fecais de animais DN ou DZ no dia 28 pós-infecção (pi) em placas de ágar MacConkey: placa representativa do animal DN à esquerda e placa representativa do animal DZ à direita; B) Isolamento de colônias de *S. flexneri* provenientes da placa MacConkey em placa de ágar vermelho de Congo. DN: dieta nutrida e DZ: dieta deficiente em zinco.

Tendo em vista os resultados consistentes do grupo DZ com antimicrobianos, a caracterização do modelo quanto aos diversos parâmetros de infecção continuou com foco nos animais pré-tratados com antimicrobianos DN e DZ.

## 6.7 INDUÇÃO DE DIARREIA E REDUÇÃO DE PESO CORPÓREO POR *S. flexneri* EM CAMUNDONGOS DEFICIENTES EM ZINCO

Em relação aos animais DZ, a infecção por *S. flexneri* também promoveu perda de peso corpóreo e diarreia, porém com diferente evolução cinética quando comparados aos animais nutridos. O pico de infecção dos camundongos DZ infectados por *S. flexneri* variou entre os dias 4 e 9 pi, um pouco tardio em relação ao grupo DN infectado por *S. flexneri*. Camundongos DZ e infectados apresentaram significante perda de peso quando comparados aos não-infectados deficientes em zinco nos dias 8 e 9 pi ( $P < 0,01$  por two-way ANOVA) (**Figura 13A**). Tal redução ocorreu de 5 a 10% em diferentes experimentos. A **Figura 13B** mostra imagens representativas de episódios de diarreia em animais DZ pi, além da tabela descrevendo as observações de presença ou ausência de diarreia dos animais DZ pré-tratados com antimicrobianos infectados ou não por *S. flexneri*. Apesar de apresentarem um fenótipo de doença mais prolongado, os animais DZ recuperam-se clinicamente da diarreia após uma semana do pico de infecção, porém a maioria deles não se recupera do decréscimo no ganho de peso corpóreo.

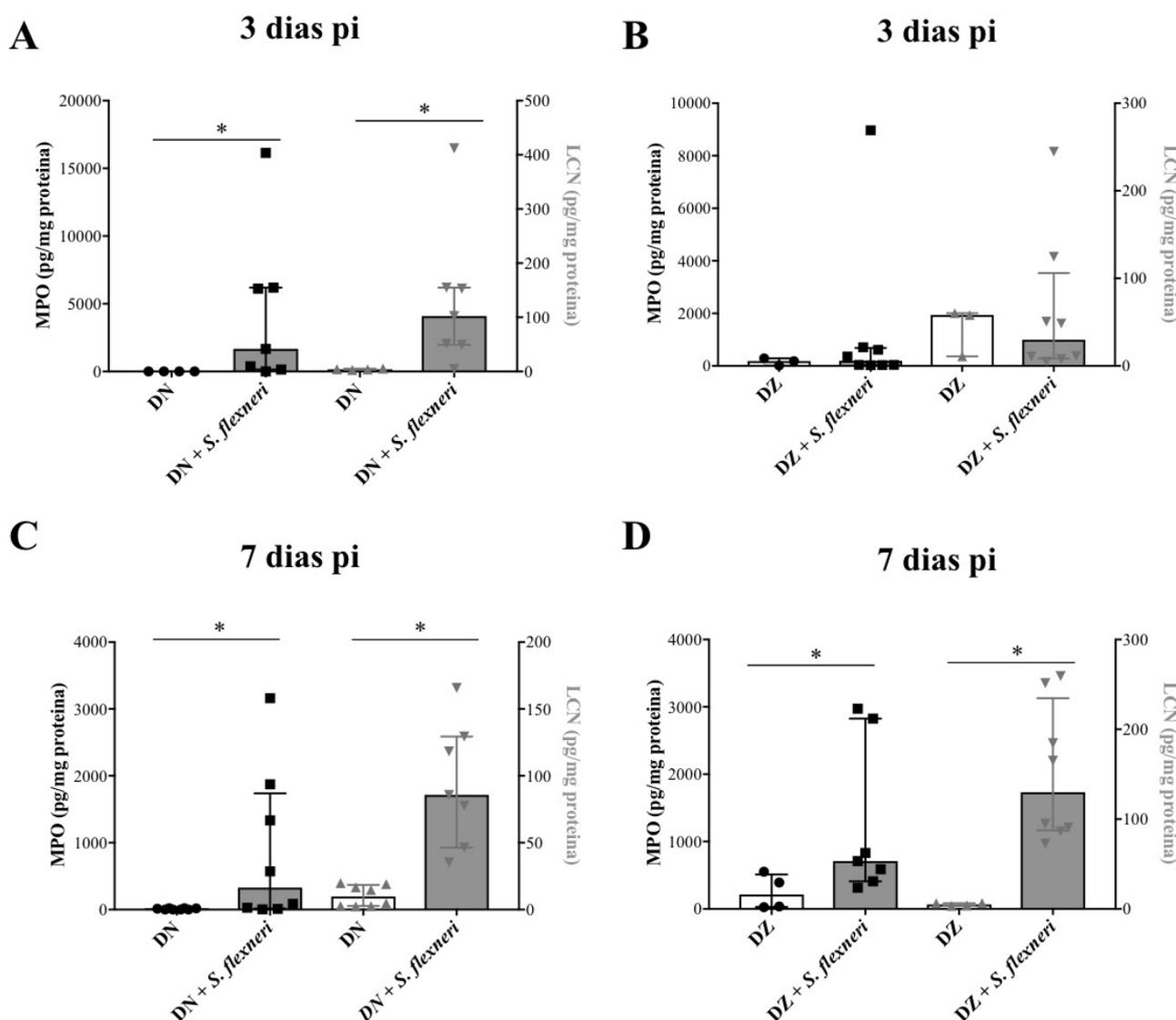


**Figura 13: Indução de diarreia e redução de peso corpóreo por *S. flexneri* em camundongos deficientes em zinco. A) Mudança em porcentagem do peso corpóreo induzida pela infecção oral por *S. flexneri* em camundongos DZ. \* DZ + *S. flex* vs DZ  $P < 0,05$  por two-way ANOVA nos dias 8 e 9 pi; B) Imagens representativas da diarreia induzida por *S. flexneri* em camundongos DZ no dia 7 pi e tabela descritiva da quantidade de animais por grupo que apresentaram diarreia a cada pi. Camundongos deficientes em zinco e pré-tratados com antimicrobianos foram infectados por *S. flexneri* 2457T  $10^8$  UFC/animal. O peso corpóreo e a consistência das fezes foram avaliados diariamente após a infecção. DZ: dieta deficiente em zinco. N=8/grupo.**

## 6.8 INFLAMAÇÃO INTESTINAL CAUSADA POR *S. flexneri* EM CAMUNDONGOS NUTRIDOS E DEFICIENTES EM ZINCO

A análise da inflamação intestinal no modelo consistiu na medição de biomarcadores fecais de mieloperoxidase (MPO) e lipocalina (LCN). Determinamos os níveis fecais de MPO e LCN no dia 3 pi, representando o pico de infecção principalmente para os animais DN, e os níveis do conteúdo cecal dos mesmos biomarcadores no dia 7pi, representando uma medida cumulativa da primeira semana de infecção. Os níveis fecais de MPO e LCN no dia 3 pi foram significativamente aumentados em DN com infecção quando comparados aos animais nutridos não-infectados (média 4.378 vs 2.621 pg/ mg de proteína,  $P = 0,0242$  para MPO; e 132,5 vs 4,2 pg / mg de proteína,  $P = 0,0121$  para LCN, ambos por Teste Mann-Whitney) (**Figura 14A**). Entretanto, a infecção em animais DZ não promoveu alteração de MPO e LCN no dia 3 pi (**Figura 14B**). Quando analisados os biomarcadores no dia 7 pi, os níveis de MPO e LCN do conteúdo cecal foram aumentados significativamente por *S. flexneri* em animais de ambas as dietas. Em animais nutridos, a infecção desencadeou níveis médios de MPO de 884 vs 9,4 pg / mg de proteína em controles ( $P = 0,0095$  por Teste Mann-Whitney), e níveis médios de 94 vs 10.4 pg / mg de proteína ( $P = 0,0003$  por Teste Mann-Whitney) (**Figura 14C**). Em animais deficientes em zinco, a infecção desencadeou níveis médios de MPO de 1235 vs 251 pg / mg de proteína em controles ( $P = 0,0424$  por Teste Mann-Whitney), e níveis médios de 150 vs 66 pg / mg de proteína ( $P = 0,0162$  por Teste Mann-Whitney) (**Figura 14D**). Estes dados mostram que a infecção por *S. flexneri* induz inflamação intestinal em ambas as dietas, porém de forma aguda somente em animais nutridos, mas não em animais deficientes em zinco.





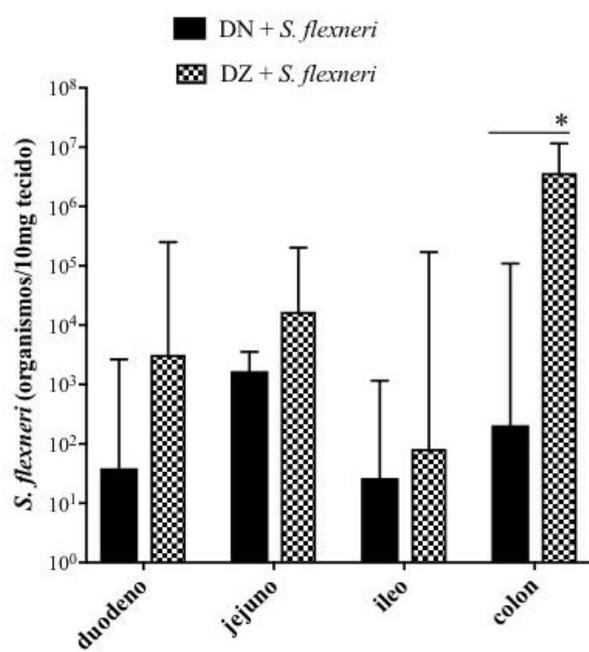
**Figura 14: Inflamação intestinal causada por *S. flexneri* em camundongos nutridos e deficientes em zinco. A)** Níveis fecais de MPO e LCN no dia 3 pós-infecção (pi) em animais nutridos (DN) infectados por *S. flexneri* ou não. \* DN vs DN + *S. flexneri* P = 0,0242 para MPO e P = 0,0121 para LCN por Teste Mann-Whitney; **B)** Níveis fecais de MPO e LCN no dia 3 pós-infecção (pi) em animais deficientes em zinco (DZ) infectados por *S. flexneri* ou não. **C)** Níveis de MPO e LCN no conteúdo cecal no dia 7 pós-infecção (pi) em animais nutridos (DN) infectados por *S. flexneri* ou não. \* DN vs DN + *S. flexneri* P = 0,0095 para MPO e P = 0,0003 para LCN por Teste Mann-Whitney; **D)** Níveis de MPO e LCN no conteúdo cecal no dia 7 pós-infecção (pi) em animais deficientes em zinco (DZ) infectados por *S. flexneri* ou não. \* DZ vs DZ + *S. flexneri* P = 0,0424 para MPO e P = 0,0162 para LCN por Teste Mann-Whitney. As amostras de fezes ou conteúdo cecal foram submetidas à extração protéica com uso de tampão RIPA adicionado de inibidores de protease. Os biomarcadores de inflamação intestinal MPO e

LCN foram determinados por meio de protocolo de ensaio imunoenzimático específico, de acordo com as orientações do fabricante, e normalização pela concentração de proteína da amostra. MPO: mieloperoxidase; LCN: lipocalina; DN: dieta nutrida; DZ: dieta deficiente em zinco. Dados representados como mediana e faixa interquartil. N=8/grupo.

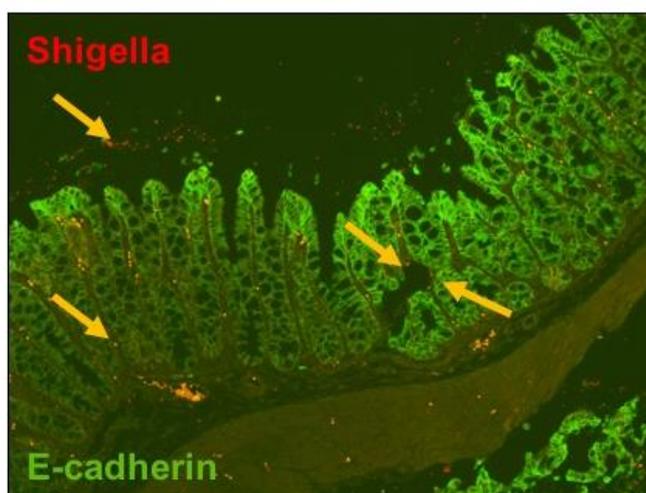
### **6.9 COLONIZAÇÃO INTESTINAL, ALTERAÇÃO HISTOLÓGICA E PRESENÇA DE *S. flexneri* SISTÊMICA EM CAMUNDONGOS NUTRIDOS E DEFICIENTES EM ZINCO INFECTADOS POR *S. flexneri***

Para uma caracterização mais completa do modelo aqui proposto, realizamos a busca por detecção de *S. flexneri* nas diferentes partes do intestino. Realizamos a quantificação molecular de gene *ipaH* em amostras de DNA extraídas de diferentes seções intestinais de animais DN e DZ no dia 3 pi (tempo do pico de infecção para os animais DN). Camundongos DZ apresentaram níveis aumentados de *S. flexneri* quando comparados com animais DN no cólon (cerca de  $10^6$  vs  $10^4$  organismos/10 mg tecido;  $P = 0.008$  por Teste de Mann-Whitney). Para ambos os grupos (nutridos e deficientes em zinco), o cólon foi a região mais colonizada. Em relação às outras seções (duodeno, jejuno e íleo), os animais DZ apresentaram tendência de níveis maiores de *S. flexneri* (**Figura 15A**).

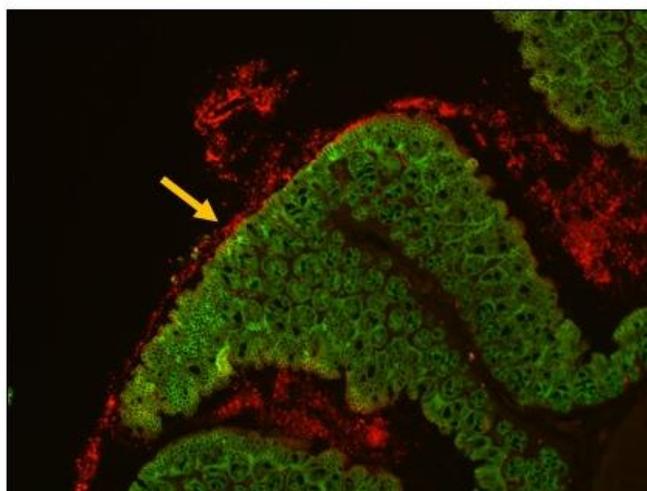
Após a identificação da secção do intestino mais colonizada por *S. flexneri*, buscamos identificar a localização da *S. flexneri* no cólon. Realizou-se imunomarcação com anticorpo específico para a identificação de *S. flexneri*, sendo realizado concomitantemente com caderina-E, proteína responsável pela adesão intercelular e expressa em células epiteliais. A **Figura 15B** mostra que a *S. flexneri* foi encontrada de forma predominante no lúmen do cólon com algumas bactérias na região da lâmina própria nos animais nutridos, enquanto foi altamente predominante em estruturas semelhantes a biofilme em contato próximo com as células epiteliais em animais deficientes em zinco.

**A****B**

DN

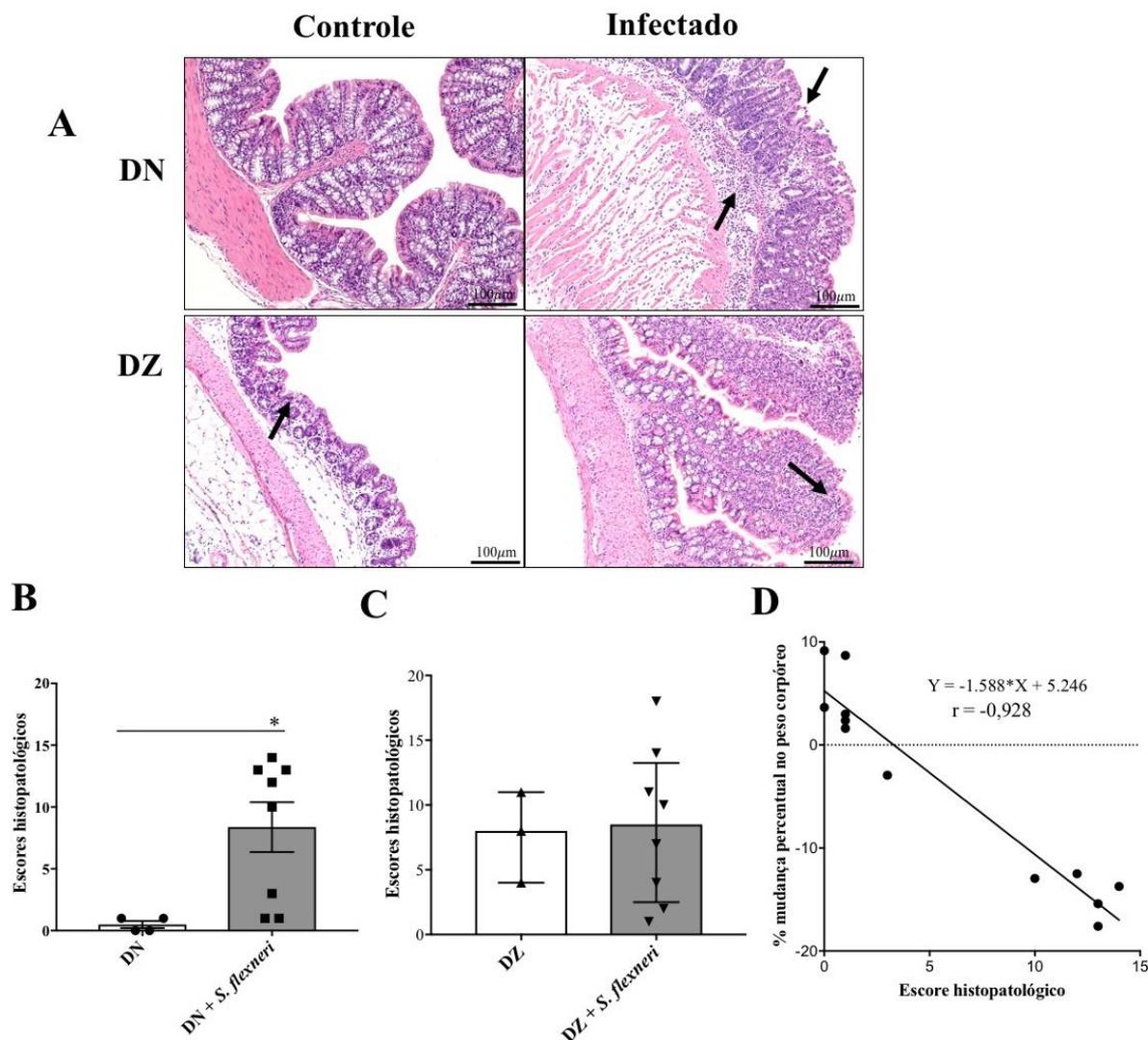


DZ



**Figura 15: Colonização intestinal e localização de *S. flexneri* em camundongos nutridos e deficientes em zinco infectados por *S. flexneri*.** **A)** Quantificação de *S. flexneri* presente nas diferentes seções de intestino (duodeno, jejuno, íleo e cólon) no dia 3 pós-infecção (pi) em camundongos em dietas DN e DZ. \* DZ vs DN  $P = 0,008$   $0,05$  por Teste de Mann-Whitney no cólon. Dados representados como mediana e faixa interquartil. As amostras de tecido intestinal foram coletadas de animais infectados por *S. flexneri* para extração de DNA fecal. A quantificação de *S. flexneri* (gene *ipaH*) ocorreu por meio de PCR em tempo real. A análise foi feita por meio de curva padrão realizada com DNA extraído de cepa de *S. flexneri* 2457T. **B)** Imagem representativa de seção de cólon corado mostrando *S. flexneri* em vermelho e caderina-E em verde, evidenciando *S. flexneri* aderidas à mucosa e epitélio, bem como na lâmina própria em animais nutridos (cima), e *S. flexneri* extracelular abundante em animais infectados deficientes em zinco (abaixo). Aumento: 20x. Animais infectados nutridos e deficientes em zinco foram eutanasiados e tiveram suas amostras de intestino coletadas. As seções de cólon dos animais deficientes em zinco foram marcadas com anticorpos específico para *S. flexneri* e caderina-E (marcador de células epiteliais). N=8/grupo.

Em seguida, tendo em vista a maior colonização do cólon no modelo assim como descrito na literatura, realizamos análise histopatológica desta região ainda no dia 3 pi. A **Figura 16A** mostra imagens microscópicas de cólon de animais controles e infectados para ambas as dietas (DN e DZ). Observou-se dano epitelial, infiltrado celular inflamatório e hemorragia vascular em amostras de animais infectados, comparados aos grupos controles que apresentaram intacta estrutura de todas as camadas. A análise dos escores histopatológicos mostrou que houve diferença significativa entre animais nutridos não-infectados e infectados ( $P = 0,018$  por Teste de Mann-Whitney), com ausência de alterações pela infecção nos animais deficientes em zinco (**Figura 16B-C**). Além disso, o escore de dano do cólon foi inversamente correlacionado com a variação de peso corpóreo entre os animais nutridos ( $P < 0,0001$ ,  $r = -0,928$  por Teste de correlação de Spearman) (**Figura 16D**).



**Figura 16: Alterações histológicas promovidas por *S. flexneri* em camundongos nutridos e deficientes em zinco infectados por *S. flexneri*.** **A)** Imagem representativa da coloração hematoxilina-eosina (H&E) de seção de cólon de animal deficiente em zinco não-infectado. Setas indicam dano epitelial e infiltrado celular inflamatório. Aumento 20x; **B)** Análise de escores histopatológicos de cólon de animais nutridos não-infectados e infectados. \* DN vs DN + *S. flexneri* P = 0,018 por Teste de Mann-Whitney; **C)** Análise de escores histopatológicos de cólon de animais deficientes em zinco não-infectados e infectados. \* DN vs DN + *S. flexneri* P = 0,018 por Teste de Mann-Whitney; **D)** Correlação entre variação de peso corpóreo e escores histopatológicos de cólon em animais nutridos infectados. r = -0,928 por Teste de Spearman. DN = dieta nutrida. DZ = deficiente em zinco. A análise microscópica por escores histopatológicos foram realizados por pesquisador cego. As categorias incluíram: perda da arquitetura da mucosa, infiltração celular na mucosa, infiltração celular na submucosa, densidade vascular (hemorragia) e infiltração celular na camada muscular. Para cada categoria,

escores de 0 a 3 foram indicados, correspondendo às classificações de efeito ausente, leve, moderado e severo, respectivamente. Dados representados como mediana e faixa interquartil. N=8/grupo.

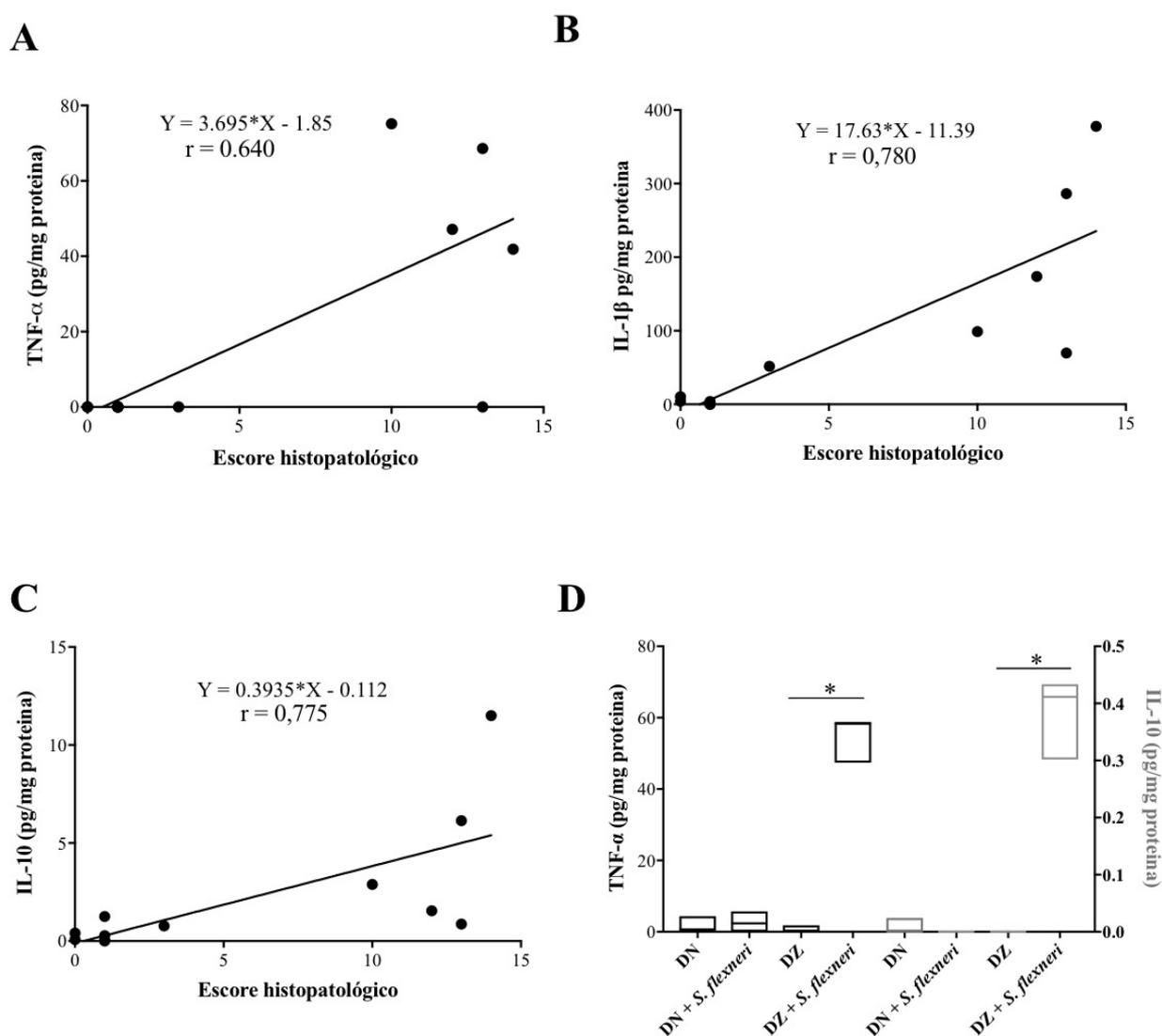
Por fim, realizou-se ainda a investigação de níveis de *S. flexneri* em outros órgãos (baço e fígado), incluindo o sangue no dia 3 pi, por PCR quantitativo para avaliar a translocação deste patógeno. Em ambos animais nutridos e deficientes em zinco, coletamos amostras de sangue, baço e fígado no dia 3 pi. Animais deficientes em zinco apresentaram níveis detectáveis de *S. flexneri* nos tecidos sistêmicos. Especificamente, 25% (2/8) das amostras sanguíneas, 75% (6/8) das amostras de baço e 100% (8/8) das amostras de fígado dos animais deficientes em zinco foram positivas para *S. flexneri*. Entretanto, nenhum animal nutrido infectado apresentou positividade para *S. flexneri* nos mesmos tipos de amostra. Os animais deficientes em zinco foram mais associados com positividade de *S. flexneri* nas amostras extraintestinais analisadas em comparação com animais nutridos ( $P < 0,0001$  por teste exato de Fisher).

## **6.10 PRODUÇÃO DE CITOCINAS INDUZIDA POR INFECÇÃO POR *S. flexneri* EM CAMUNDONGOS NUTRIDOS E DEFICIENTES EM ZINCO**

Para a avaliação da resposta imune à infecção por *S. flexneri* neste modelo, extraímos proteína de seções intestinais (cólon e conteúdo cecal) para a detecção de marcadores de resposta imune (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10). Realizamos análises do cólon, tecido preferencial de infecção por *S. flexneri*, no dia 3 pi, representando o pico de infecção principalmente para os animais DN, e análises do conteúdo cecal no dia 15 pi, representando uma medida mais crônica do modelo, quando os animais já haviam se recuperado da perda de peso corpóreo e diarreia.

A produção de citocinas no dia 3 pi mostrou variações entre os camundongos. Entretanto, os níveis proteicos de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10 no cólon foram significativamente correlacionadas com o dano intestinal representado pelo escore histopatológico para o dia 3 pi em animais nutridos ( $P = 0,0285$ ,  $r = 0,640$  para TNF- $\alpha$ ;  $P = 0,004$ ,  $r = 0,780$  para IL-1 $\beta$ ; e  $P = 0,004$ ,  $r = 0,775$  para IL-10 por Testes de correlação de Spearman) (**Figura 17A-C**). Da mesma forma, estes marcadores foram inversamente correlacionados com o ganho de peso corpóreo no mesmo período nestes mesmos animais (dia 3 pi) ( $P = 0,0431$ ,  $r = -0,599$  para TNF- $\alpha$ ;  $P = 0,015$ ,  $r = -0,693$  para IL-1 $\beta$ ; e  $P = 0,142$ ,  $r = -0,6993$  para IL-10 por Testes de correlação de Spearman).

Em relação à investigação da produção crônica de citocinas, os níveis proteicos de TNF- $\alpha$  do conteúdo cecal no dia 15 pi foram significativamente aumentados na infecção por *S. flexneri*, porém somente em animais DZ (P = 0,043 por Teste Mann-Whitney). De forma similar, os níveis protéicos de IL-10 do conteúdo cecal também foram aumentados nos animais infectados e DZ (P = 0,0286 por Teste Mann-Whitney). A infecção nos animais DN não mostraram aumento dos marcadores neste período (**Figura 17D**).

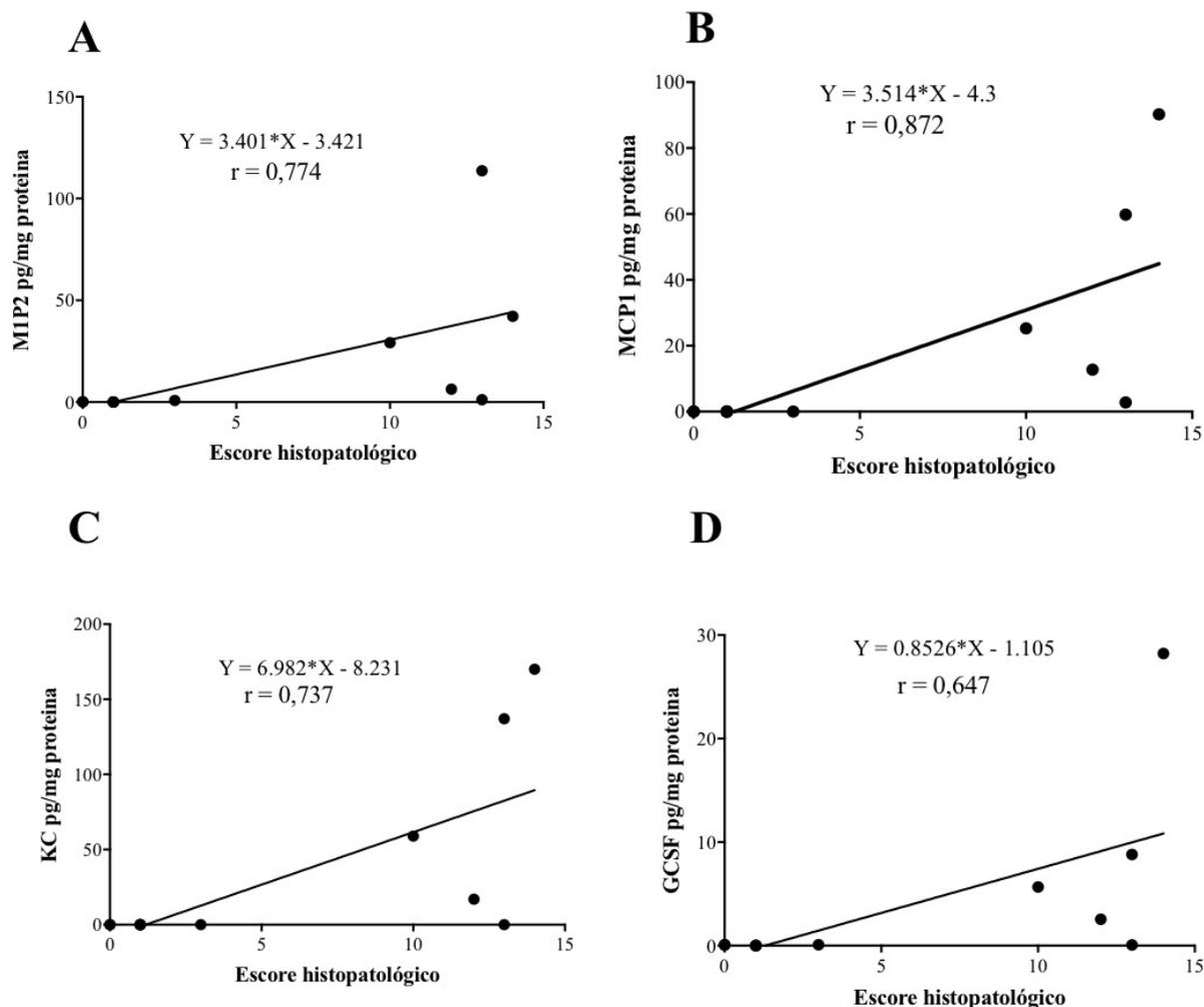


**Figura 17: Produção de citocinas induzida por infecção por *S. flexneri* em camundongos nutridos e deficientes em zinco. A) Correlação entre níveis proteicos de TNF- $\alpha$  e escore de dano intestinal no dia 3 pós-infecção (pi) em animais DN. P = 0,0285, r = 0,640 por teste de correlação de Spearman; B) Correlação entre níveis proteicos de IL-1 $\beta$  e escore de dano intestinal no dia 3 pós-infecção (pi) em animais DN. P = 0,004, r = 0,780 por teste de correlação**

de Spearman; **C)** Correlação entre níveis proteicos de IL-10 e escore de dano intestinal no dia 3 pós-infecção (pi) em animais DN.  $P = 0,004$ ,  $r = 0,780$  por teste de correlação de Spearman; **D)** Níveis proteicos de TNF- $\alpha$  e IL-10 no conteúdo cecal de animais no dia 15 pós-infecção (pi) \* DZ vs DZ + *S. flex*  $P < 0,05$  por One-way ANOVA. Dados representados como mediana e mínimo-máximo. Proteínas foram extraídas das seções intestinais para a determinação de marcadores de resposta imune nos dias 3 e 15 pi. DN: dieta nutrida e DZ: dieta deficiente em zinco. N=4-8/grupo.

A análise de outros mediadores inflamatórios característicos de imunidade inata (MIP-2, MCP1, KC e G-CSF) também mostrou concordância destes com os escores histopatológicos do dia 3 pi em animais nutridos, enquanto em animais deficientes em zinco infectados, estas correlações também não ocorreram, demonstrando maior variabilidade dos dados e ausência de aumento agudo de marcadores inflamatórios em associação com peso corpóreo e dano intestinal. MIP-2 foi significativamente correlacionado com os escores histopatológicos associados aos danos do epitélio intestinal ( $P = 0,004$ ,  $r = 0,774$  por teste de correlação de Spearman), assim como MCP1 ( $P = 0,003$ ,  $r = 0,872$ ), KC ( $P = 0,008$ ,  $r = 0,737$ ) e G-CSF ( $P = 0,026$ ,  $r = 0,647$ ) (**Figura 18**).



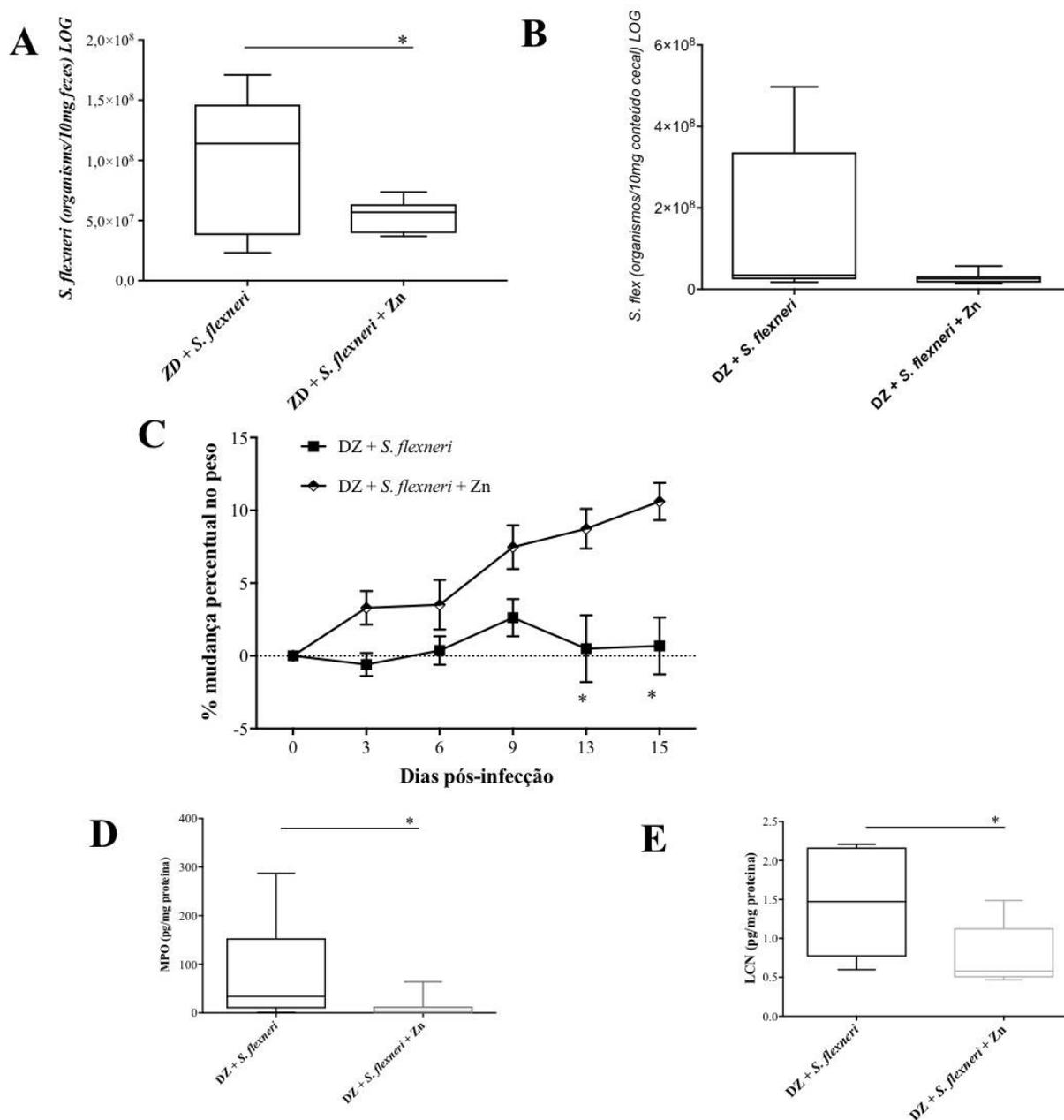


**Figura 18: Correlação de mediadores inflamatórios de imunidade inata com escores histopatológicos em animais nutridos infectados por *S. flexneri*.** **A)** Correlação entre níveis proteicos de MIP2 e escore histopatológico no dia 3 pós-infecção (pi) em animais nutridos.  $P = 0,004$ ,  $r = 0,774$  por teste de correlação de Spearman; **B)** Correlação entre níveis proteicos de MCP1 e escore histopatológico no dia 3 pós-infecção (pi) em animais nutridos.  $P = 0,003$ ,  $r = 0,872$  por teste de correlação de Spearman; **C)** Correlação entre níveis proteicos de KC e escore histopatológico no dia 3 pós-infecção (pi) em animais nutridos.  $P = 0,008$ ,  $r = 0,737$  por teste de correlação de Spearman; **D)** Correlação entre níveis proteicos de GCSF e escore histopatológico no dia 3 pós-infecção (pi) em animais nutridos.  $P = 0,026$ ,  $r = 0,647$  por teste de correlação de Spearman. Proteínas foram extraídas do cólon intestinal para a determinação de marcadores inflamatórios por plataforma de Luminex no dia 3 pi. MIP2: proteína inflamatória de macrófago 2 - *macrophage inflammatory protein 2*; MCP1: proteína quimioatratante de monócitos 1- *monocyte chemoattractant protein 1*; KC- homólogo de IL-8;

e G-CSF: fator estimulante de colônia de granulócitos – *granulocyte colony stimulating factor*.  
N = 8/grupo.

### **6.11 TRATAMENTO COM ZINCO EM CAMUNDONGOS DEFICIENTES EM ZINCO E INFECTADOS POR *S. flexneri***

Devido à colonização persistente de *S. flexneri* em animais DZ com potencial inflamação crônica, decidimos avaliar se a suplementação com zinco poderia levar à redução da carga do patógeno e reverter potenciais consequências de peso corpóreo e inflamação intestinal relacionadas à *S. flexneri* na condição de deficiência em zinco. No dia 33 pi (período em que os animais já não apresentavam diarreia e perda de peso, configurando uma fase crônica da doença), zinco foi dado na água de consumo (sulfato de zinco a 150 mg/L) e os animais foram acompanhados até o dia 48 pi (15 dias de tratamento), quando as amostras foram coletadas. Camundongos em tratamento com zinco mostraram significativa redução na excreção fecal de *S. flexneri* quando comparados aos animais deficientes em zinco não-tratados ( $10^8$  vs  $10^6$  organismos/10 mg fezes;  $P < 0,05$  por teste T de Student) (**Figura 19A**). O número de organismos de *S. flexneri* no conteúdo cecal mostraram a mesma tendência, embora não significativa (**Figura 19B**). A suplementação com zinco também promoveu aumento de cerca de 10% do peso corpóreo dos animais DZ e infectados após 15 dias de tratamento ( $P < 0,0001$  por two-way ANOVA) (**Figura 19C**). A inflamação intestinal também foi avaliada e os camundongos que receberam zinco mostraram níveis significativamente menores de MPO e LCN do que animais não-tratados ( $P < 0.05$  por teste T de Student) (**Figura 19D e Figura 19E**).



**Figura 19: Tratamento com zinco em camundongos deficientes em zinco e infectados por *S. flexneri*.** **A)** Excreção fecal de *S. flexneri* em camundongos deficientes em zinco tratados ou não com zinco por 15 dias \* DZ + *S. flexneri* vs DZ + *S. flexneri* + Zn P < 0,05 por teste T de Student; **B)** Quantificação de *S. flexneri* em conteúdo cecal de camundongos deficientes em zinco tratados ou não com zinco por 15 dias; **C)** Mudança em porcentagem do peso corpóreo induzida pelo tratamento com zinco em camundongos deficientes em zinco e infectados \* DZ + *S. flexneri* vs DZ + *S. flexneri* + Zn P < 0,0001 por two-way ANOVA no dia 15 pi; **D)** Níveis fecais de MPO no dia 48 pi \* DZ + *S. flexneri* vs DZ + *S. flexneri* + Zn P < 0,05 por teste T de student; **E)** Níveis fecais de LCN no dia 48 pi \* DZ + *S. flexneri* vs DZ + *S.*

*flexneri* + Zn  $P < 0,05$  por teste T de student  $N=8$ /grupo. Os animais infectados por *S. flexneri* e deficientes em zinco começaram o tratamento com zinco no dia 33 pi (fase crônica da infecção) até o dia 48 pi (total de 15 dias). Sulfato de zinco foi dissolvido em água e dado na água de consumo. A excreção fecal do patógeno, as mudanças no peso corpóreo e a inflamação intestinal foram determinadas por mieloperoxidase-MPO e lipocalina-LCN no conteúdo cecal. DZ: dieta deficiente em zinco.  $N=8$ /grupo.

## 6.12 MODULAÇÃO DO METABOLOMA POR *S. flexneri* EM CAMUNDONGOS

A fim de investigar os mecanismos metabólicos envolvidos na patobiologia da shigelose, a análise metabolômica de amostras de urina foi realizada no presente modelo. Os perfis metabólicos dos animais DN ou DZ infectados por *S. flexneri* foram comparados com os respectivos controles não-infectados (mesmo tempo e dieta) com a intenção de identificar metabólitos alterados pela infecção por *S. flexneri*. Além disso, as alterações induzidas pela infecção com a cepa de *S. flexneri* mutante para SST3 foram comparadas com as da cepa selvagem de *S. flexneri* 2457T (**Figura 20**).

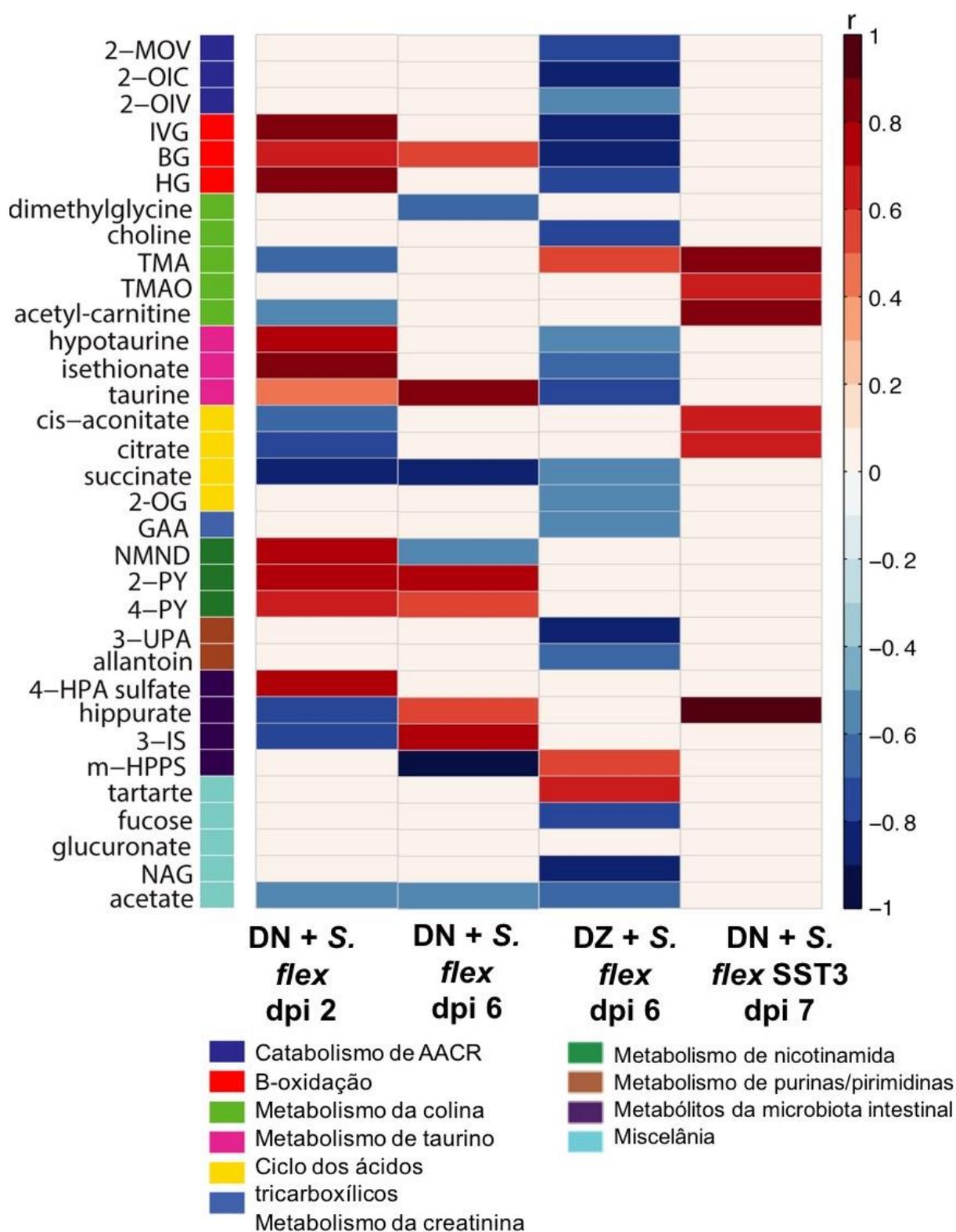
De forma consistente com a dinâmica dos desfechos clínicos e inflamatórios causados pela infecção por *S. flexneri* em animais DN ou DZ, alterações foram observadas em tempos similares, sendo mais precoce nos animais DN e mais tardia nos animais DZ. Analisamos amostras de urina de cada dia pi, porém os resultados mais significantes causados pela infecção aconteceram no dia 2 pi para os animais DN e no dia 6 pi para os animais DZ.

Os perfis metabólicos foram alterados de forma significativa no dia 2 pi nos animais DN, quando comparados aos animais não-infectados e submetidos à mesma dieta ( $Q^2Y = 0,37$ ,  $P = 0,03$ ). Porém, no mesmo período, não observamos alterações da infecção nos animais DZ. Os animais DZ infectados no dia 6 pi apresentaram alterações significantes ( $Q^2Y = 0,65$ ,  $P = 0,02$ ), enquanto os distúrbios bioquímicos permaneceram nos animais DN infectados no dia 6 pi com pequenas diferenças e de forma mais moderada.

O aumento da excreção de derivados da via da quinurenina-triptofano: N-metil-nicotinamida (NMND), N-metil-2-piridona-5-carboxamida (2-PY) e N-metil-4-piridona-3-carboxamida (4-PY) – foi observado nos animais nutridos infectados no dia 2 pi, indicando mudanças no gasto energético e resposta inflamatória no hospedeiro. No dia 6 pi, 2-PY e 4-PY permaneceram elevados, enquanto os níveis de NMND foram excretados em menor quantidade quando comparados aos nutridos não-infectados. Os animais infectados e deficientes em zinco não mostraram alteração na excreção destes metabólitos.

No dia 2 pi, os animais nutridos apresentaram níveis elevados intermediários conjugados à glicina da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos (isovalerilglicina, butirilglicina, hexanoilglicina). Nos animais deficientes em zinco infectados, isovalerilglicina, butirilglicina e hexanoilglicina foram excretados em menores quantidades no dia 6 pi quando comparados aos animais não-infectados submetidos à mesma dieta. Além disso, os animais nutridos infectados apresentaram níveis elevados de taurina e metabólitos relacionados a taurina (hipotaurina, isotionato) no dia 2 pi (em comparação aos nutridos não-infectados), enquanto estes mesmos metabólitos foram detectados em níveis menores no dia 6 pi em animais deficientes em zinco infectados (em comparação ao grupo não-infectado deficiente em zinco). Os animais deficientes em zinco não-infectados apresentaram excreção reduzida de catabólitos de aminoácidos de cadeia ramificada (2-MOV, 2-OIC, 2OIV) em relação aos animais nutridos. No dia 6 pi, estes mesmos catabólitos foram mais reduzidos nos animais deficientes em zinco infectados. A excreção de acetato foi menor após infecção em ambos os animais nutridos e deficientes em zinco. Modulações de metabólitos relacionados à dinâmica da microbiota intestinal (4-HPA sulfato, 3-indoxil sulfato e hipurato) também foram observadas após infecção em ambas as dietas.

Os distúrbios metabólicos em animais nutridos infectados pela cepa mutante de *S. flexneri* para SST3 foram observados no dia 7 pi, quando comparados aos não-infectados submetidos à mesma dieta ( $Q^2Y = 0,48$ ,  $P = 0,03$ ). Foi observado um aumento na excreção de metabólitos de colina, trimetilamina (TMA), óxido de N-trimetilamina (TMAO) e acetilcarnitina nos animais infectados pela cepa mutante. Tais alterações foram o oposto das vistas com a infecção pela cepa selvagem, que promoveu decréscimo de TMA e acetilcarnitina. De modo similar, a infecção com a cepa mutante SST3 desencadeou aumento na excreção de intermediários do ciclo do ácido tricarbóxico (cis-aconitato e citrato) e do hipurato (associado ao metabolismo da microbiota) no dia 7 pi. Estes metabólitos foram excretados em quantidades menores nos animais nutridos infectados no dia 2 pi.



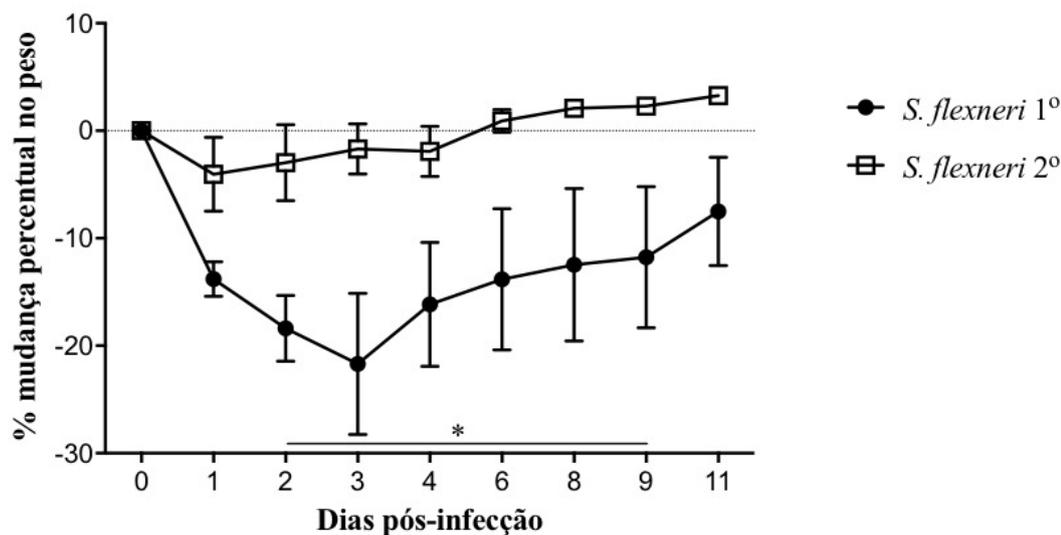
**Figura 20: Modulação do metaboloma de amostras de urina por *S. flexneri* em camundongos.** Mapa de calor resumindo as alterações metabólicas induzidas por *S. flexneri* identificadas pelos modelos de OPLS-DA. Os resultados são apresentados como coeficientes

de correlação (r) em comparação aos respectivos controles não-infectados de cada grupo (com mesmo tempo e dieta). A cor vermelha indica a excreção aumentada e a azul indica excreção diminuída dos metabólitos 1) em camundongos nutridos infectados nos dias 2 e 6 pós-infecção (pi) comparados a camundongos não-infectados submetidos à mesma dieta e idade; 2) em camundongos deficientes em zinco e infectados no dia 6 pi comparados camundongos não-infectados submetidos à mesma dieta e idade; e 3) em camundongos nutridos infectados com a cepa de *S. flexneri* mutante para o SST3 comparados a camundongos infectados com a cepa de *S. flexneri* selvagem. Abreviações: 2-OG = 2-oxoglutarato; 2-OIV = 2-oxoisovalerato; 2-OIC = 2-oxoisocaproato; 2-MOV = 3-metil-2-oxovalerato; 2-PY = N-metil-2-piridona-5-carboxamida; 3-IS = 3-indoxilsulfato; 3-UPA = ácido 3-ureidopropiônico; 4-HPA = 4-hidroxifenilacetato; 4-PY = N-metil-4-piridona-3-carboxamida; BG = butirilglicina; GAA = guanidinoacetato; HG = hexanoglicina; IVG = isovalerilglicina; m-HPPS = m-hidroxifenilpropionbisulfato; NAG = N-acetil-glutamina; NMND = N-metilnicotinamida; TMA = trimetilamina; TMAO = trimetilamina-N-óxido. N=10/grupo.

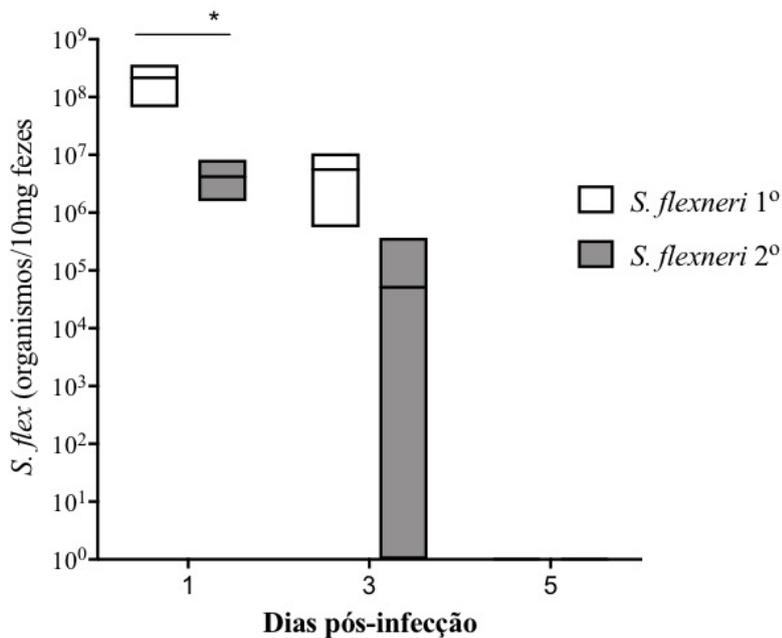
### 6.13 PROTEÇÃO CONTRA DOENÇA A PARTIR DE SEGUNDA INFECÇÃO HOMÓLOGA POR *S. flexneri* EM CAMUNDONGOS

A fim de investigar o potencial do papel da resposta imune adaptativa neste modelo, nós reinfectamos camundongos DN com o mesmo inóculo e avaliamos a possível proteção homóloga contra a doença. Três semanas após a primeira infecção por *S. flexneri* 2457T, os camundongos foram tratados novamente pelo mesmo coquetel de antibiótico na água por três dias prévios a uma segunda infecção pela mesma cepa de *S. flexneri* 2457T. Utilizamos como controle camundongos da mesma idade que foram infectados pela primeira vez com o mesmo inóculo. Camundongos previamente expostos à infecção não perderam peso, enquanto os animais da mesma idade infectados pela primeira vez apresentaram redução de quase 20% do peso corpóreo no dia 3 pi. As médias de pesos entre os grupos foram significativamente diferentes durante os dias 2 a 9 pi ( $P < 0,05$  por two-way ANOVA) (**Figura 21A**). Além disso, os níveis de excreção fecal de *S. flexneri* foram significativamente menores nos camundongos pré-expostos a *S. flexneri* no dia 1 pi (cerca de  $10^8$  vs  $10^6$  organismos/10 mg fezes;  $P = 0,0053$  por two-way ANOVA) (**Figura 21B**).

A



B



**Figura 21: Proteção contra doença a partir de segunda infecção homóloga por *S. flexneri* em camundongos nutridos.** A) Mudança em porcentagem do peso corpóreo induzida pela primeira e segunda infecção oral por *S. flexneri*. \* *S. flexneri* 1º vs *S. flexneri* 2º P < 0,05 por One-way ANOVA B) Excreção fecal de *S. flexneri* nos dias 1, 3 e 5 pós-infecção (pi) \* *S. flexneri* 1º vs *S. flexneri* 2º P = 0,0053 por two-way ANOVA no dia 1 pi. Após 3 semanas da infecção prévia pela cepa de *S. flexneri* 2457T, camundongos nutridos receberam outro tratamento de antimicrobianos e foram reinfecados com a mesma cepa (*S. flexneri* 2º). Animais



controles da mesma idade foram infectados pela primeira vez com o mesmo inóculo (*S. flexneri* 1°). Mudanças do peso e excreção fecal de *S. flexneri* foram avaliadas. As amostras fecais foram coletadas para a extração de DNA fecal e a detecção molecular de *S. flexneri* (gene *ipaH*) por PCR em tempo real. N=4/grupo.

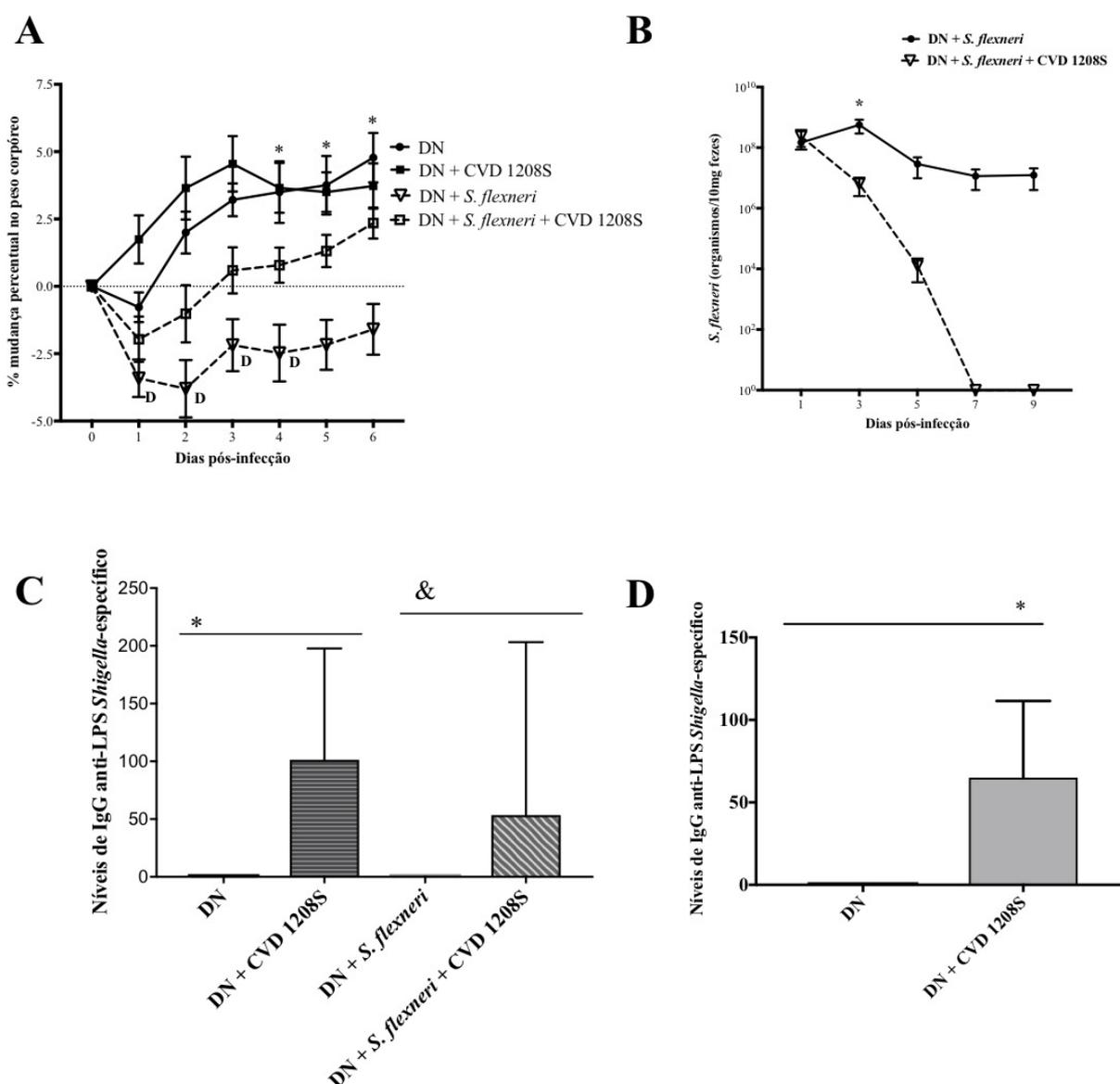
#### 6.14 PROTEÇÃO VACINAL CONTRA *S. flexneri* EM CAMUNDONGOS NUTRIDOS

Após a caracterização do modelo e visualização de potencial resposta adaptativa nos animais infectados por *S. flexneri*, pretendemos avaliar o uso do modelo para o teste de vacinas em shigelose. Para isso, utilizamos o candidato à vacina CVD 1208S do Centro de Desenvolvimento de Vacinas da Universidade de *Maryland* (*Baltimore*, EUA), o qual já havia demonstrado boa tolerabilidade e potencial imunogênico em humanos (KOTLOFF et al., 2007). O protocolo do modelo foi adaptado de modo a permitir a aplicação de três doses intranasais da vacina, permanecendo os animais em dieta por 3 semanas antes da infecção. Resultados preliminares do laboratório demonstraram que esta metodologia não influenciaria a análise das características importantes do modelo, como perda de peso e diarreia, apesar da idade mais avançada dos animais.

A análise da vacina CVD 1208S no modelo sugere que esta forneceu boa proteção contra a infecção por *S. flexneri*. A análise do peso corpóreo mostrou que o grupo infectado e vacinado (DN + *S. flexneri* + CVD 1208S) exibiu perda de peso menor em comparação com os animais infectados e não-vacinados (DN + *S. flexneri*), com posterior recuperação. A curva de mudança de peso corpóreo foi significativamente diferente entre estes grupos dos dias 4 a 6 pós-infecção ( $P < 0.05$  por two-way ANOVA). O grupo controle que recebeu só a vacina apresentou comportamento de peso similar ao grupo não-infectado durante todo o experimento (**Figura 22A**). Além disso, a vacinação com CVD 1208S preveniu diarreia nos dias 1, 2, 3 e 4 pós-infecção. A análise da excreção fecal de *S. flexneri* mostrou redução da duração da excreção no grupo CVD 1208S, com os animais vacinados apresentando níveis de *S. flexneri* apenas até o dia 3 pi, enquanto os animais não-vacinados apresentaram excreção do patógeno pelo menos até o dia 13 pi (**Figura 22B**).

Para a avaliação do potencial imunogênico da CVD 1208S, coletamos soro dos camundongos antes da infecção (quatro semanas após a última imunização) e duas semanas após a infecção para determinação da produção de anticorpos anti-LPS *Shigella*-específico. Camundongos que receberam a vacina CVD 1208S mostraram níveis aumentados de anticorpo no soro independentemente da infecção (8/8 de animais infectados e 6/8 de animais não-

infectados; em comparação a 0/10 de animais não-vacinados). Além disso, a infecção por *S. flexneri* não induziu produção significativa de anticorpos no dia 14 pi (1/8 camundongos mostraram produção aumentada). A CVD 1208S sozinha aumentou a produção de anticorpos significativamente ( $P = 0,0007$  por Teste de Mann-Whitney). Além disso, em animais infectados, a vacina também aumentou a produção de anticorpos ( $P = 0,0018$  por Teste de Mann-Whitney) (**Figura 22C**). Quando mensurada a produção de anticorpos antes da infecção, a vacina também já havia mostrado produção aumentada de forma significante ( $P = 0,0286$  por Teste de Mann-Whitney) (**Figura 22D**).

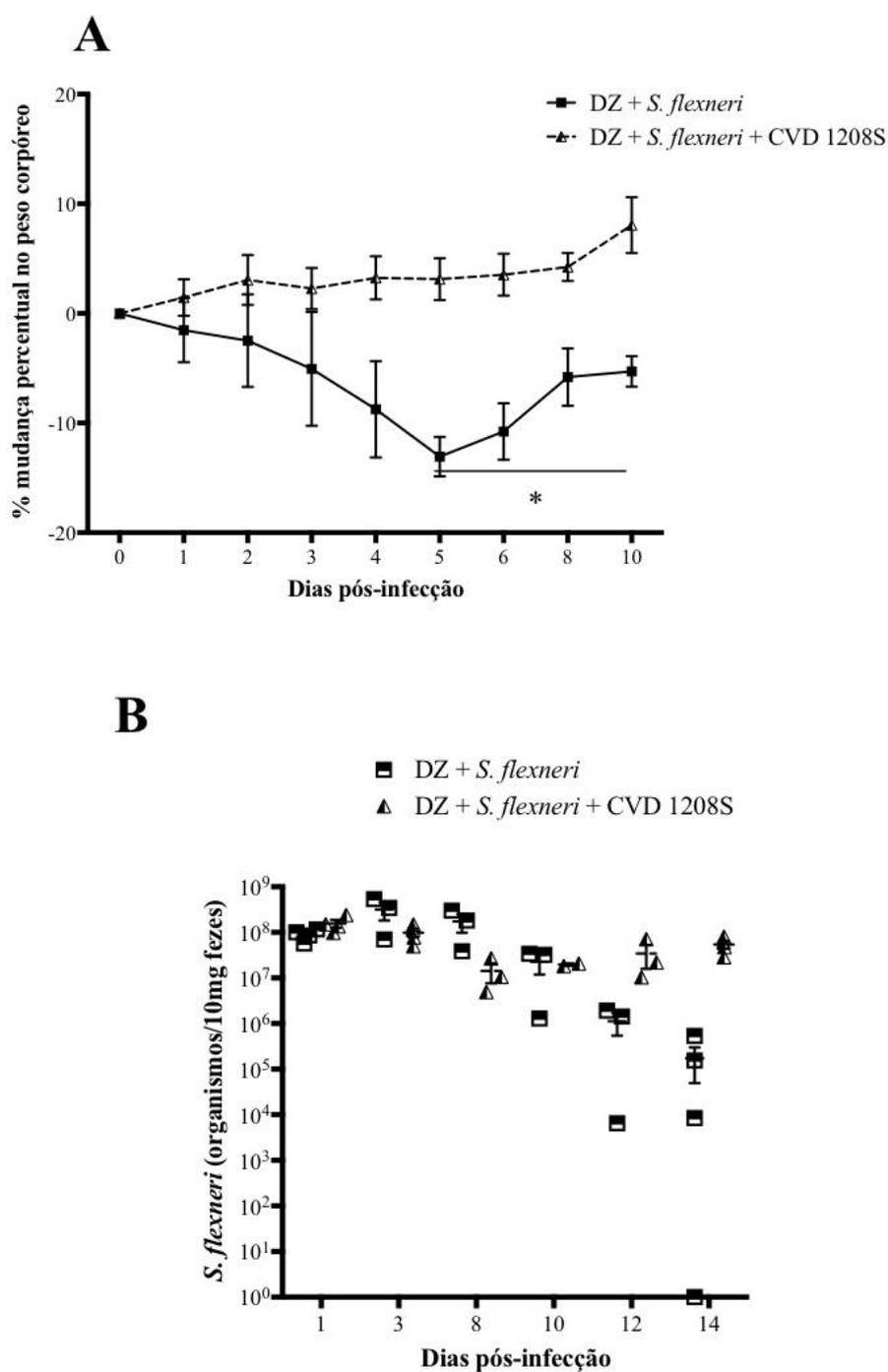


**Figura 22: Proteção vacinal contra *S. flexneri* em camundongos nutridos. A)** Mudança em porcentagem do peso corpóreo e diarreia induzidas pela infecção por *S. flexneri* em animais DN

vacinados ou não. \* DN + *S. flexneri* vs DN + *S. flexneri* + CVD 1208S  $P < 0,05$  por two-way ANOVA nos dias 4-6 pi; D = Diarreia. **B)** Excreção fecal de *S. flexneri* em animais DN vacinados ou não até o dia 13 pi \* DN + *S. flexneri* vs DN + *S. flexneri* + CVD 1208S  $P < 0,05$  por Teste Mann-Whitney. **C)** Níveis de anticorpo anti-LPS *Shigella*-específico em amostras séricas após duas semanas de infecção. \* DN vs DN + CVD 1208S,  $P = 0,0007$  por Teste de Mann-Whitney; & DN + *S. flexneri* vs DN + *S. flexneri* + CVD 1208S,  $P = 0,0018$  por Teste de Mann-Whitney. **D)** Níveis de anticorpo anti-LPS *Shigella*-específico antes da infecção. \*  $P = 0,0286$  DN vs DN + CVD 1208S por Teste de Mann-Whitney. Um protocolo vacinal com três doses intranasais semanais foram administradas nos animais nutridos antes da infecção pela cepa de *S. flexneri* 2457T. Mudanças do peso e excreção fecal de *S. flexneri* foram avaliadas. As amostras fecais foram coletadas para a extração de DNA fecal e a detecção molecular de *S. flexneri* (gene *ipaH*) por PCR em tempo real. Amostras de soro foram coletadas no dia da infecção e no dia 14 pi para determinação de anticorpos. DN: dieta nutrida; D = diarreia. pi = pós-infecção. Dados representados como mediana e faixa interquartil. N=8/grupo.

### **6.15 EFEITO DA VACINA EM CAMUNDONGOS DEFICIENTES EM ZINCO INFECTADOS POR *S. flexneri***

Após a observação dos efeitos protetores e imunogênicos da vacina em animais nutridos, fizemos uma análise preliminar do mesmo protocolo para animais deficientes em zinco, embora sem realizar a mensuração de anticorpos séricos. De forma similar aos animais nutridos, observamos proteção da vacina CVD 1208S contra a infecção por *S. flexneri* em animais deficientes em zinco. Os animais deficientes em zinco, quando vacinados, não apresentaram redução de peso após a infecção por *S. flexneri*, sendo diferentes significativamente dos animais infectados sem vacina ( $P < 0,05$  por One-way ANOVA) entre os dias 4 e 14 pi (**Figura 23A**). Contudo, os níveis de excreção fecal de *S. flexneri* permaneceram inalterados entre os grupos (**Figura 23B**).



**Figura 23: Efeito da vacina em camundongos deficientes em zinco infectados por *S. flexneri*.** **A)** Mudança em porcentagem do peso corpóreo induzida pela infecção por *S. flexneri* em animais DZ vacinados ou não. \* DZ + *S. flexneri* vs DZ + *S. flexneri* + Vx  $P < 0,05$  por One-way ANOVA entre os dias 5 e 10 pi; **B)** Excreção fecal de *S. flexneri* em animais DZ vacinados ou não até o dia 14 pi. Um protocolo vacinal com três doses intranasais semanais foram administradas nos animais DZ antes da infecção pela cepa de *S. flexneri* 2457T. Mudanças do peso e excreção fecal de *S. flexneri* foram avaliadas. As amostras fecais foram

coletadas para a extração de DNA fecal e a detecção molecular de *S. flexneri* (gene *ipaH*) por PCR em tempo real. DZ: dieta deficiente em zinco, Vx: vacina. N=4/grupo.

## 7. DISCUSSÃO

A shigelose é uma importante infecção intestinal que tem ganhado mais atenção nos últimos anos (KOTLOFF *et al.*, 2018). Estudos multicêntricos recentes, com o emprego de técnicas de diagnóstico molecular, têm evidenciado: (1) um maior impacto da infecção por *Shigella* spp. como causa de diarreia em crianças de países em desenvolvimento (LIU *et al.*, 2016; PLATTS-MILLS *et al.*, 2018) e (2) uma alta prevalência deste patógeno em infecções assintomáticas na população infantil, com a ocorrência de prejuízo no crescimento e inflamação intestinal como desfechos associados (ROGAWSKI *et al.*, 2018). Nesse contexto, a necessidade de modelos de estudo para uso em testes de vacinas é observada (BARRY *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2016). Este é o primeiro estudo a descrever um modelo murino de shigelose mimetizando os desfechos clínicos comumente observados em crianças de países em desenvolvimento, como diarreia e perda de peso, a partir da inoculação oral de *S. flexneri*. Nosso estudo destaca ainda o papel da deficiência de zinco na modificação do momento do aparecimento de sintomas e na persistência da colonização por *S. flexneri* em camundongos. Ademais, os achados de metaboloma no modelo contribuem para um melhor entendimento do desenvolvimento da resposta imune em shigelose e sugerem potenciais alvos de intervenção. Além disso, este estudo mostra que a cepa vacinal (cepa atenuada de *S. flexneri*, CVD 1208S) possui efeito protetor e imunogênico contra infecção por *S. flexneri*.

O uso de camundongos para modelos pré-clínicos de doenças é amplamente observado na literatura. As principais vantagens destes modelos são relacionadas ao fácil manuseio dos animais e à possibilidade de manipulação genética dos mesmos. Vários estudos têm tentado desenvolver um modelo animal de shigelose (TRAN *et al.*, 2015; GOMEZ *et al.*, 2002; PORE *et al.*, 2011; MARTINO *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2014). Entretanto, o uso de vias de administração não-naturais do inóculo de infecção e a ausência de desfechos de doenças característicos da clínica humana são limitações dos modelos atuais. O estudo de Martino e colaboradores (2005) utilizou a via oral para a administração de *Shigella* spp. em camundongos pré-tratados com estreptomicina, observando capacidade de invasão da bactéria no epitélio do cólon, porém sem ocasionar os efeitos clínicos esperados. Dessa forma, configura-se como sendo um “modelo de colonização”, sem evidente relevância para estudo dos mecanismos de doença. Outros modelos conseguiram reproduzir os efeitos clínicos de shigelose, evidenciados

por diarreia grave e/ou mortalidade em animais, porém com indução da infecção por via intraperitoneal (YANG *et al.*, 2014) ou pulmonar (PORE *et al.*, 2011; TRAN *et al.*, 2015). Nenhum modelo murino até o presente estudo foi capaz de reproduzir os efeitos clínicos humanos por meio de administração oral de *S. flexneri*. No modelo aqui apresentado, diarreia e perda de peso, acompanhados de inflamação intestinal, caracterizaram as consequências clínicas da infecção por *S. flexneri* 2a.

A escolha da cepa pertencente ao sorogrupo *S. flexneri* sorotipo 2a utilizada neste estudo ocorreu devido à maior virulência, à sua gravidade clínica e à grande prevalência deste tipo de bactéria em países em desenvolvimento (THOMPSON *et al.*, 2015). Além disso, vários estudos comprovam que a proporção de *S. flexneri*/*S. sonnei* de uma comunidade é inversamente relacionada ao seu nível socioeconômico: quanto menor o nível socioeconômico, maior a frequência de *S. flexneri* (THOMPSON *et al.*, 2015), sendo esta espécie merecedora de maior atenção em populações mais carentes. No Brasil, a grande disparidade socioeconômica refletiu-se na importância dos dois sorogrupos (CRUZ *et al.*, 2014; NUNES *et al.*, 2012; MEDEIROS *et al.*, 2018; PENATTI *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2008; SOUSA *et al.*, 2013). Por fim, a cepa de *S. flexneri* 2457T é também amplamente utilizada como modelo para estudo em shigelose (WEI *et al.*, 2003).

Diferentes tratamentos com antimicrobianos podem gerar diferentes condições de suscetibilidade ao hospedeiro frente a infecções, evidenciando que o tipo de microbioma intestinal de um organismo é fator determinante no desfecho de uma potencial infecção entérica (VOGT *et al.*, 2017). Neste contexto, destaca-se que esta é a primeira vez que um coquetel de antimicrobianos de amplo espectro (colistina, gentamicina, metronidazol e vancomicina) é utilizado para induzir suscetibilidade à shigelose em camundongos. Diferente do presente trabalho, o estudo de Martino e colaboradores (2005) usou somente estreptomicina. É importante reconhecer que, embora esta abordagem distancie o modelo da realidade clínica, o uso do coquetel foi crucial para promover a colonização de *S. flexneri* neste modelo, que não mostrou colonização robusta ou desfechos clínicos em animais não-tratados com o coquetel. Dessa forma, os animais não tratados com antimicrobianos de amplo espectro não foram utilizados para as análises dos demais parâmetros deste estudo. Neste estudo, vale ainda observar que a avaliação dos efeitos dos antimicrobianos em parâmetros funcionais e morfológicos do intestino também não foi realizada e merece ser explorada em trabalhos futuros. É possível também que os antimicrobianos possam ter interferido também no crescimento e viabilidade da *S. flexneri* nos camundongos, embora isso não tenha sido investigado aqui.

Com foco similar ao do presente estudo, outros trabalhos que usaram o mesmo coquetel de antimicrobianos mostraram suscetibilidade similar a outras infecções entéricas experimentais, com indução de diarreia e perda de peso a partir de infecções por *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* enteroagregativa e *Escherichia coli* enterotoxigênica (BOLICK *et al.*, 2018; BOLICK *et al.*, 2014; GIALLOUROU *et al.*, 2018; SHIN *et al.*, 2018). É importante destacar que a literatura propõe que os efeitos da microbiota intestinal comensal na proteção contra enteropatógenos ocorrem tanto por ações diretas – inibição dos patógenos por competição ou produção de metabólitos inibidores – como por ações indiretas – modulação das funções do hospedeiro por promoção da barreira intestinal e estimulação da resposta imune (VOGT *et al.*, 2017). A importância da microbiota intestinal em shigelose já foi mostrada em estudo com crianças de países em desenvolvimento, sendo grupos específicos de *Lactobacillus* associados com proteção contra eventos de diarreia (LINDSAY *et al.*, 2015).

No presente trabalho, mostramos que o inóculo de infecção mínimo de *S. flexneri* para desencadear pronunciada perda de peso e diarreia em camundongos foi de  $10^8$  UFC / animal. *Shigella* spp. é um grupo de microorganismos classicamente reconhecido por apresentar baixa dose de infecção em comparação com outras bactérias, com apenas 10 a 100 bactérias suficientes para causar doença em humanos (DUPONT *et al.*, 1989). Em nosso modelo, mesmo utilizando o pré-tratamento com antimicrobianos que aumentam a suscetibilidade à infecção, não foi possível reproduzir sintomas de doença ao utilizar doses de até  $10^6$  UFC / camundongo. Além disso, o inóculo de *S. flexneri* capaz de promover doença nos camundongos causou também maiores níveis de *S. flexneri* nas fezes, embora as outras doses de infecção também permitiram a detecção do patógeno por tempo similar. É possível que camundongos apresentem maior resistência à infecção por *Shigella* spp. em relação a humanos devido a fatores como: 1) difícil adaptação bacteriana no ambiente intestinal, com microbioma, mucinas e produtos antimicrobianos; 2) reduzida resposta inflamatória em camundongos; e 3) diferenças em receptores epiteliais, porém mais estudos são necessários para desvendar tal fenômeno (MARTINO *et al.*, 2005).

A avaliação da inflamação intestinal no presente modelo caracterizou-se pela determinação dos biomarcadores mieloperoxidase (MPO) e lipocalina-2 (LCN). Estes marcadores caracterizam-se como proteínas secretadas por neutrófilos, componente essencial na resposta imune às infecções entéricas e extensivamente avaliados em crianças com enteropatia ambiental (GUERRANT *et al.*, 2016). O estudo de Prata e colaboradores (2016) caracterizou a boa aplicabilidade destes marcadores ao compará-los com lactoferrina (também encontrada em grânulos de neutrófilos) e calprotectina (componente importante do citosol

neutrófilico) em amostras de fezes de crianças desnutridas de Fortaleza, Brasil. Os autores indicaram ainda que MPO é o marcador indicado para comparação de estudos em modelos animais e humanos, e LCN é um bom marcador complementar de dano epitelial. O aumento dos níveis desses biomarcadores pela infecção por *S. flexneri* está em acordo com os achados de diarreia e perda de peso do modelo. É importante ressaltar que tais respostas do hospedeiro, refletidas nos fenótipos de diarreia e perda de peso, são importantes sinais do desenvolvimento de resposta contra o patógeno. Isso pode ajudar a entender a recuperação dos animais nutridos ao final de uma semana pós-infecção.

Neste modelo, *S. flexneri* colonizou a região do cólon em maiores níveis, de forma similar ao que acontece na doença em humanos. Além disso, inflamação intestinal e dano epitelial foram observados em nosso modelo e corroboram para a patobiologia descrita em shigelose (SANSONETTI *et al.*, 2006). A colonização, embora em menor grau, de outras partes do intestino está em acordo com outros modelos pré-clínicos (MARTINO *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2014). Nos animais nutridos infectados do presente estudo, *S. flexneri* mostrou-se presente na lâmina própria ou aderida ao epitélio. De modo interessante, nos animais deficientes em zinco, as bactérias estavam predominantemente na área extracelular do epitélio intestinal, indicando também a existência de uma estrutura semelhante a biofilme na superfície do epitélio. Esta observação pode estar relacionada a um aumento da produção de muco em animais deficientes em zinco (BOLICK *et al.*, 2014), que poderia também bloquear a penetração de *S. flexneri* no epitélio intestinal. A ocorrência de *S. flexneri* extracelular em linfócitos foi recentemente descrita (PINAUD *et al.*, 2017) e vem ganhando mais destaque na literatura. Os mecanismos de formação de biofilme em *S. flexneri* parecem envolver a ação de proteínas de adesão específicas, como a proteína autotransportadora IcsA e a presença de sais biliares (KÖSEOĞLU *et al.*, 2019). Além disso, evidências recentes de inflamação intestinal e prejuízo de crescimento em infecções assintomáticas por *Shigella* spp. têm contribuído para uma mudança nas perspectivas clássicas sobre shigelose (ROGAWSKI *et al.*, 2018), o que poderiam sugerir outros mecanismos de patogênese. A produção de biofilme indica que a bactéria pode causar efeitos mais persistentes no hospedeiro, apresentando menor suscetibilidade a antimicrobianos e resposta imune, aumentando a colonização (DEL POZO, 2018), conforme os achados evidenciados em camundongos com deficiência em zinco e infectados por *S. flexneri*. Dessa forma, apesar da *S. flexneri* intracelular representar o fenótipo clássico da shigelose na literatura, nossos dados indicam a necessidade de maior investigação da patogênese da *S. flexneri* extracelular.



Um outro achado interessante do presente trabalho e que corrobora para a especificidade do modelo de patogênese da shigelose foi os efeitos clínicos dependentes ao SST3 observados. Em comparação com a infecção pela cepa selvagem de *S. flexneri*, a infecção com a cepa mutante para o SST3 foi relacionada à ausência de diarreia e perda de peso, à menor carga de patógeno no intestino, à menor duração da excreção fecal do patógeno e a menores níveis de inflamação intestinal. O SST3 constitui uma estratégia de virulência bem descrito em *S. flexneri* e é utilizada para a injeção de fatores de virulência dentro da célula hospedeira, sendo crucial para o processo de patogênese (CARAYOL *et al.*, 2013; HU *et al.*, 2015). Os resultados das análises metabolômicas corroboraram com tal achado, sugerindo menor virulência da cepa mutante. As perturbações metabólicas induzidas pela cepa selvagem – reduzida excreção de metabólitos derivados da colina, do ciclo de ácido tricarboxílico e de hipurato – foram revertidas pela cepa mutante. Outros estudos mostraram que infecções parasitárias estão associadas com redução de excreção de hipurato, um metabólito que é proveniente de reações que envolvem tanto o metabolismo microbiano como o do hospedeiro, sendo resultado da conjugação de ácido benzoico com glicina na matriz mitocondrial. A excreção reduzida de hipurato é consistente com distúrbios funcionais do microbioma intestinal (WANG *et al.*, 2004). Além disso, as alterações metabólicas são consistentemente acompanhadas da excreção de intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (LEES *et al.*, 2013), como também observado neste estudo. Dessa forma, pode-se sugerir que as funções mitocondriais tenham se mantido intactas nos animais infectados com a cepa mutante, permitindo que os metabólitos do ácido tricarboxílico e hipurato aparecessem em níveis elevados. Outros modelos *in vivo* já mostraram o papel essencial do SST3 para a virulência de *S. flexneri*, demonstrando que cepas com deleção deste sistema não possuem habilidade de invadir o epitélio intestinal (YANG *et al.*, 2014; MOSTOWY *et al.*, 2013).

Neste modelo, os animais nutridos apresentaram resposta inflamatória aguda robusta precocemente contra *S. flexneri*, caracterizada pelo aumento dos níveis fecais de MPO e LCN, bem como pelo aumento da excreção dos metabólitos do metabolismo do triptofano pela via da quinurenina/nicotinamida: 2-PY e 4-PY. A degradação do triptofano pela via da quinurenina/nicotinamida tem sido associada a diversos eventos inflamatórios, e a indução desta via pode acontecer por IFN- $\gamma$  ou óxido nítrico (ROUTY *et al.*, 2016). Por outro lado, esta resposta inflamatória aguda contra a infecção no dia 3 pi, caracterizada tanto por parâmetros de marcadores de inflamação intestinal como de metabólitos da urina, não ocorreu em animais deficientes em zinco. Um estudo prévio de nosso grupo mostrou que os animais deficientes em zinco apresentavam menores níveis de leucócitos do que animais submetidos a dieta normal em

zinco (BOLICK *et al.*, 2014). Leucócitos são células ricas em taurina, a qual pode agir em respostas imunes agudas ou crônicas como antioxidante ou citoprotetora (WANG *et al.*, 2009). Dessa forma, a leucopenia nos camundongos deficientes em zinco potencialmente reflete a disponibilidade sistêmica baixa de taurina e explica a excreção reduzida de metabólitos derivados de taurina em relação aos animais nutridos. O papel importante de neutrófilos na resposta contra *Shigella* já foi demonstrado (FRANÇOIS *et al.*, 2000), e, dessa forma, o relacionamento entre a disbiose da microbiota e o recrutamento de neutrófilos (WATANABE *et al.*, 2017) requer maiores investigações neste modelo. Em estudo de Deshmukh e colaboradores (2014), onde investigou-se o papel do microbioma intestinal em modelo de sepse neonatal, os autores demonstraram que o microbioma controla a granulocitose por mediação da IL-17 e assim a resistência à sepse. Nós hipotetizamos que este mecanismo pode ocorrer de forma similar em nosso modelo, onde a deficiência de zinco, em associação com o uso de antimicrobianos, promovem disbiose e potencial prejuízo da ação de neutrófilos, com aumento da colonização por *S. flexneri*. Uma melhor caracterização dos mediadores imunológicos envolvidos neste fenômeno é necessária.

O desenvolvimento de uma resposta imune normal para a eliminação rápida do patógeno e a recuperação clínica em shigelose já foi demonstrado em humanos (RAQIB *et al.*, 2000). Neste sentido, este modelo também reflete componentes-chave da shigelose humana, como aumento dos perfis de citocina pró e antiinflamatórios (RAQIB *et al.*, 1995; SAMANDARI *et al.*, 2000). A persistência da colonização por *S. flexneri* observada nos animais deficientes em zinco foi acompanhada por aumento nos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-10 no conteúdo cecal após a recuperação. A persistência de produção local de citocinas em shigelose em estágios agudo e convalescente foi também observada em humanos (RAQIB *et al.*, 1995). Neste contexto, é possível também inferir que a ocorrência de produção de IL-10 em concomitância a marcadores pró-inflamatórios, como TNF- $\alpha$ , reflete o balanço pró e antiinflamatório do maquinaria do sistema imune inato, em que há uma resposta compensatória e protetora anti-inflamatória frente ao dano epitelial, atenuando o processo inflamatório na mucosa (MORHARDT *et al.*, 2019).

Nossos achados sugerem que a disbiose do microbioma intestinal e a deficiência de zinco contribuem de forma significativa para a dinâmica da infecção por *S. flexneri*, aumentando a colonização do patógeno. Os efeitos combinados da deficiência de zinco e dos antimicrobianos promoveram uma colonização persistente por pelo menos 50 dias pós-infecção neste modelo com as bactérias de *S. flexneri* em estrutura semelhante a biofilme. Um recente estudo mostrou que o estado inicial do microbioma intestinal é um fator chave para a promoção da resposta do hospedeiro frente ao tratamento por antimicrobianos (JU *et al.*, 2017), sugerindo

que a modulação do microbioma intestinal pela dieta deficiente em zinco por duas semanas desempenha importante papel neste modelo. Estas observações também corroboram a ideia de que o coquetel de antimicrobianos utilizado neste estudo, apesar de ser de amplo espectro, não normaliza os grupos experimentais ou elimina completamente a microbiota comensal. A influência de micronutrientes, como o zinco, no microbioma intestinal tem sido objeto de intenso estudo atualmente. Novos modelos utilizando camundongos gnotobióticos com microbioma humano têm ajudado a entender os mecanismos de doença gerados pelas deficiências destas substâncias (HIBBERD *et al.*, 2017). Reed e colaboradores (2015) mostraram que a deficiência de zinco crônica em galinhas altera a microbiota intestinal, diminuindo a diversidade e estabelecendo um perfil microbiano similar a outros estados patogênicos. A avaliação do microbioma intestinal se mostra essencial para a compreensão deste fenômeno.

A importância do micronutriente zinco para a diarreia infecciosa é indubitável, sendo os benefícios do tratamento com zinco e as consequências da deficiência de zinco para as infecções entéricas em humanos extensivamente descritas (LUKACIK *et al.*, 2008). A OMS recomenda o tratamento com zinco a qualquer criança que apresenta diarreia de países em desenvolvimento (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2006), porém não se conhece ao certo qual mecanismo de ação melhor contribui para os efeitos benéficos do zinco no tratamento da diarreia. A deficiência de zinco associa-se com aumento da suscetibilidade a infecções (GAMMOH *et al.*, 2017; KREBS *et al.*, 2014). Além disso, a relação entre enteropatia ambiental (condição assintomática com prejuízos morfofuncionais do intestino que causam falha no crescimento infantil) e deficiência de zinco foi recentemente descrita, apesar de pouco se conhecer sobre os mecanismos envolvidos. Especula-se que a deficiência em zinco contribuiria para a enteropatia ambiental por meio do aumento da inflamação intestinal, aumento da permeabilidade intestinal, diminuição da absorção e prejuízo na resposta imune (YOUNG *et al.*, 2014; LINDENMAYER *et al.*, 2014). Compreender a relação entre estas condições mostra-se crítico para o desenvolvimento de intervenções efetivas. Sarkar e colaboradores (2019) mostraram que o zinco tem efeito protetor sobre a resposta inflamatória e disfunção da barreira epitelial induzida por shigelose em modelos *in vivo* e *in vitro*.

No presente modelo, o aparecimento mais tardio dos sintomas da doença (diarreia, perda de peso e inflamação intestinal) e a colonização crônica de *S. flexneri* foram observados em camundongos deficientes em zinco e infectados. Nos animais nutridos, houve uma resposta bioquímica precoce à infecção, que incluíram mudanças em vias relacionadas a gasto de energia, como  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, ciclo do ácido tricarboxílico e metabolismo da

nicotinamida. Tais achados podem refletir tentativas do hospedeiro de gerar a energia necessária para uma resposta imune apropriada quando exposto à infecção por *S. flexneri*. Enquanto os dados sugerem uma elevação da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos nos animais nutridos no dia 2 pi, os animais deficientes em zinco apresentaram uma redução na oxidação no dia 6 pi. Estudos clássicos já demonstraram uma relação direta entre o status de zinco e o metabolismo de ácidos graxos (BETTGER *et al.*, 1979; EDER *et al.*, 1995). Dessa forma, nossas observações podem sugerir uma baixa flexibilidade metabólica nos animais deficientes em zinco, o que pode prejudicar a habilidade de desenvolver uma resposta imune rápida e robusta.

Corroborando para esta hipótese, a suplementação destes animais com zinco reduziu a excreção fecal de *S. flexneri* e a inflamação intestinal, além de melhorar o crescimento corpóreo. Tal resultado ocorreu potencialmente devido à restauração da homeostase metabólica. Em crianças, a suplementação de zinco diminuiu a duração da shigelose aguda, promovendo ganho de peso durante a recuperação e aumentou a soroconversão (RAHMAN *et al.*, 2005; ROY *et al.*, 2008). Adicionalmente, foi recentemente demonstrado que o zinco pode proteger a barreira epitelial intestinal contra danos causados por *Shigella* por meio de modulação de claudinas (SARKAR *et al.*, 2019). Este conjunto de achados ajuda a elucidar os mecanismos dos efeitos da deficiência de zinco na shigelose e na enteropatia ambiental. Além disso, estes fenômenos são observados de forma semelhante em modelos experimentais de infecções por outros enteropatógenos (BOLICK *et al.*, 2018; GIALLOUROU *et al.*, 2018), indicando que a deficiência de zinco pode ser uma característica essencial da enteropatia ambiental por meio da promoção da colonização persistente de patógenos. Mais estudos para a caracterização dos efeitos crônicos da infecção por *S. flexneri* em animais deficientes em zinco são necessários.

A potencial relação entre os dados metabolômicos e a resposta imune induzida pela *S. flexneri* sugerida no presente trabalho deve ser investigada em estudos futuros. Os avanços recentes da metabolômica têm permitido um melhor entendimento de patogênese e descoberta de biomarcadores de diversas doenças. A metabolômica é definida como a determinação quantitativa da resposta metabólica dinâmica e multifatorial de sistemas vivos a estímulos patofisiológicos ou modificações genéticas. Os metabólitos são produtos ou sub-produtos de uma série de vias catabólicas e anabólicas integradas que ocorrem em sistemas vivos. Enquanto os métodos analíticos tradicionais eram limitados a um certo grupo de moléculas, a abordagem metabolômica permite a detecção de uma vasta quantidade de metabólitos, capaz assim de caracterizar um fenótipo metabólico (NICHOLSON *et al.*, 2002; NICHOLSON *et al.*, 2008). Esta abordagem tem permitido avanços no entendimento de diversas doenças, incluindo as condições infecciosas. No campo das infecções entéricas, pouco se sabe sobre as alterações

metabólicas envolvidas. Nosso grupo de pesquisa tem sido pioneiro na área de metabolômica de amostras de urina e enteropatógenos, caracterizando os perfis metabólicos de infecções por *Escherichia coli* enteroagregativa, *Giardia lamblia* e *Campylobacter jejuni* (BARTELT *et al.*, 2017; BOLICK *et al.*, 2018; GIALLOUROU *et al.*, 2018), bem como de desnutrições proteica e em zinco (MAYNERIS-PERXACHS *et al.*, 2016). Em shigelose, nenhum outro trabalho realizou análise metabolômica. Os dados metabolômicos aqui apresentados sugerem que distúrbios na  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, no metabolismo de taurina e na degradação do triptofano pela via da quinurenina/nicotinamida são componentes associados ao fenótipo de doença com ocorrência de sintomas mais tardiamente e colonização persistente de *S. flexneri* no hospedeiro deficiente em zinco. Tais vias podem servir como alvo de estudos futuros para desvendamento de seus papéis. Entretanto, é preciso considerar que os metabólitos citados no presente estudo foram detectados a partir de metodologia de ressonância magnética nuclear, uma abordagem não-direcionada e que não possui altos níveis de sensibilidade e especificidade analíticas (NICHOLSON *et al.*, 2008). Dessa forma, mais estudos sobre vias bioquímicas específicas com o uso de técnicas mais sensíveis e específicas, como a espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida, podem indicar outras vias bioquímicas relevantes, bem como caracterizar melhor a importância das vias aqui indicadas.

O estudo anterior de análise metabolômica e microbiômica em modelo em camundongos C57BL/6 submetidos à infecção experimental por *Campylobacter jejuni* permite traçar um interessante paralelo com a infecção por *S. flexneri* em relação às modificações metabólicas (GIALLOUROU *et al.*, 2018). Em animais nutridos, a infecção por *C. jejuni* não promove a grande variedade de alterações metabólicas precoces, como *S. flexneri* induziu. Especula-se que o comportamento fastidioso de *C. jejuni* possa explicar uma demora de alterações na homeostase do hospedeiro. No hospedeiro nutrido, a *S. flexneri* parece ser capaz de se estabelecer mais facilmente. Giallorou e colaboradores (2018) também utilizaram a mesma dieta deficiente em zinco do presente estudo. De forma similar, ambos os patógenos promoveram alterações de  $\beta$ -oxidação e catabolismo de aminoácidos de cadeia ramificada em animais deficientes em zinco. Além disso, em ambas as infecções, o estado de deficiência de zinco parece causar um estresse metabólico que não permite a eliminação do patógeno no organismo. A infecção por *C. jejuni* induziu a via da quinurenina, o que pode explicar uma infecção de maior gravidade em relação à *S. flexneri*. Tais observações reforçam a importância da deficiência de zinco para os desfechos de infecções entéricas e ajudam no entendimento dos mecanismos envolvidos.

Tendo em vista a estreita relação mostrada no presente trabalho entre dieta, uso de antimicrobianos e consequências da infecção com *S. flexneri* para o organismo, a investigação do microbioma intestinal neste modelo é também necessária. Realizamos a análise do microbioma bacteriano intestinal dos animais nutridos infectados ou não por *S. flexneri* no dia 3 pi, na tentativa de refletir o momento de pico de infecção, e assim buscando alterações bacterianas que possivelmente refletem as consequências de diarreia e perda de peso no modelo (*Eubacterium*, *Turicibacter* e *Blautia*).

Nosso estudo mostrou um aumento de bactérias dos gêneros *Eubacterium* e *Turicibacter* em animais nutridos infectados. Tais grupos são comensais frequentes do intestino, ambos do filo Firmicutes e pertencem às classes Clostridia e Erysipelotrichia, respectivamente. Espécies de *Eubacterium* estão reduzidas em pacientes com colite ulcerativa e doença de Crohn (HIIPPALA *et al.*, 2018), enquanto *Turicibacter* apresenta-se reduzido em cachorros com doença inflamatória do intestino (ALSHAWAQFEH *et al.*, 2017) e em associação inversa com inflamação elevada em camundongos obesos (JIAO *et al.*, 2018). Dessa forma, nossos dados corroboram a ideia de que tais bactérias refletem uma resposta inflamatória aguda no organismo, possivelmente contribuindo para o processo de doença em shigelose.

Por outro lado, os camundongos infectados por *S. flexneri* possuíram drástica redução de bactérias do gênero *Blautia*, em comparação aos animais não-infectados. O gênero *Blautia* refere-se a bactérias anaeróbicas pertencentes à família Lachnospiraceae e filo Firmicutes. Corroborando com esse achado, as bactérias deste grupo foram mais abundantes em indivíduos saudáveis do que em pacientes com infecções intestinais em estudo nos Estados Unidos (SINGH *et al.*, 2015). O estudo de Hsiao e colaboradores (2014) também associou o gênero *Blautia* a indivíduos saudáveis em comparação a indivíduos acometidos por diarreia por *Vibrio cholerae* em Bangladesh. Além disso, Jenq e colaboradores (2015) sugeriram que estas bactérias possuem efeitos anti-inflamatórios em pacientes transplantados, o que corrobora com os eventos inflamatórios associados ao pico de infecção por *S. flexneri* em animais com redução de *Blautia*.

O achado de diminuição dos níveis de certas bactérias do filo Bacteroidetes em animais infectados por *S. flexneri* pode estar envolvido com grupos bacterianos importantes na regulação da resposta imune contra a infecção, porém o detalhamento dessas bactérias a nível de gênero seria necessário para maiores conclusões. O filo Bacteroidetes é bastante diverso e suas espécies podem estar envolvidas em efeitos benéficos e deletérios para a saúde humana (WEXLER, 2007). Entretanto, um estudo de meta-análise mostrou que baixos níveis de *Bacteroides* (gênero importante do filo Bacteroidetes) no microbioma intestinal são associados

com doença inflamatória do intestino (ZHOU *et al.*, 2016), o que poderia sugerir seu envolvimento direto com resposta anti-inflamatória, corroborando os dados do presente estudo.

Apesar de tais achados não concluírem se estes grupos bacterianos são causa ou consequência do processo inflamatório observado no modelo, os dados mostram que a infecção por *S. flexneri* modula o microbioma intestinal em camundongos nutridos pré-tratados com antimicrobianos e aponta potenciais alvos de intervenção probiótica em shigelose e investigações futuras. Entretanto, a mesma análise dessas alterações em camundongos deficientes em zinco poderão sugerir grupos bacterianos mais associados à resposta imune e colonização persistente, como sugerem os dados do presente estudo. Além disso, análises mais específicas para desvendar as bactérias a nível de espécie são necessárias.

A avaliação de potenciais efeitos vacinais foi realizada neste estudo. A proteção por infecção prévia homóloga (mesma cepa) está em acordo com o que a literatura preconiza e indica que há no modelo o desenvolvimento de resposta de memória contra a infecção por *S. flexneri*. O uso da potencial vacina CVD 1208S da Universidade de *Maryland* mostrou como esse modelo pode ser útil para a validação da eficácia clínica de vacinas em shigelose. Além de prevenir perda de peso e diarreia, a CVD 1208S reduziu os níveis de excreção fecal de *S. flexneri* em animais nutridos e induziu produção de anticorpos específicos. A CVD 1208S já se mostrou tolerável e imunogênica em humanos (KOTLOFF *et al.*, 2007), além de induzir imunidade celular mediada por células T, o que provavelmente deve complementar a resposta humoral induzida (TOAPANTA *et al.*, 2018). O uso de anticorpo sérico IgG anti-LPS de *Shigella* como marcador correlacionado com proteção em estudos de vacina em shigelose é bastante evidente (WALKER *et al.*, 2017). Cohen e colaboradores (2019) mostraram que há uma relação de dose-resposta entre níveis destes anticorpos e eficácia de proteção em adultos jovens e crianças. Nossos resultados podem acelerar o processo de desenvolvimento e licenciamento do produto (BARRY *et al.*, 2019). Neste contexto, a avaliação desta vacina frente a outras bactérias do gênero *Shigella*, como principalmente a *S. sonnei* devido a sua alta prevalência, será importante.

O uso clínico da vacina CVD 1208S para a prevenção de infecção por *S. flexneri* em crianças é promissor. Entretanto, estudos clínicos devem ser realizados para confirmar a translacionalidade. Além disso, a via intranasal aqui utilizada não é ideal para a população alvo (crianças) em comparação com a via oral devido à dificuldade da administração. Vacinas orais também apresentam vantagem de induzir estimulação de respostas imune humoral e celular a nível local e sistêmico, promovendo proteção mais prolongada (RAMIREZ *et al.*, 2018). Dessa forma, a imunização oral com CVD 1208S deve ser testada em estudos futuros.

Uma melhor caracterização da resposta imune induzida pela cepa vacinal também deve ser explorada em estudos futuros. Apesar de já demonstrada em humanos (TOAPANTA *et al.*, 2018), a capacidade de a vacina promover imunidade celular no modelo, como pela análise de perfil populacional linfocitário por citometria de fluxo, não foi medida. Além disso, em relação à resposta humoral, a mensuração de anticorpos IgA fecais/intestinais, a classificação dos tipos de IgG mensurados e ensaios de neutralização para medir a funcionalidade dos anticorpos são pontos importantes não investigados neste trabalho..

A priorização da avaliação da vacina CVD 1208S em animais nutridos relaciona-se à comprovação da problemática da diarreia aguda induzida por *S. flexneri* em crianças, a qual foi reproduzida no modelo em animais nutridos, além da melhor caracterização do efeito da infecção pelos parâmetros de histopatologia e produção de citocinas. Contudo, a eficácia da vacina em prevenir perda de peso e diarreia em animais deficientes em zinco, embora sem ter alterado os níveis fecais de *S. flexneri*, reforça a importância de mais estudos com este grupo. Alguns estudos relatam a ineficiência de vacinas em crianças desnutridas (PARKER *et al.*, 2018). Nossos achados podem ajudar a explicar esta observação clínica e sugerem o zinco como um potencial alvo de intervenção. Entretanto, experimentos com a utilização da vacina em associação com tratamento com zinco devem ser realizados neste modelo, além da determinação do potencial imunogênico da vacina nestes animais.

Uma importante limitação do estudo refere-se à não-utilização de uma dieta controle nutrida (DN) de mesma origem às dietas deficientes em micronutrientes (DZ e DP), ou seja, as dietas DN e DZ, apesar de apresentarem quantidades similares de macronutrientes, não apresentam os mesmos constituintes. Dessa forma, apesar de compreender que o zinco é o principal fator modificado na dieta DZ utilizada, como já demonstrado em estudo anterior (BOLICK *et al.*, 2014), e também que o zinco é o principal contribuinte para as consequências da patobiologia de shigelose descritas aqui, outros componentes das dietas podem contribuir para os efeitos observados nos grupos DZ. Mais experimentos são também necessários para comprovar e caracterizar o efeito do zinco neste modelo, tais como investigações da condição DZ com: 1) a infecção pela cepa de *S. flexneri* mutante para o SST3; 2) a curva dose-resposta dos inóculos de *S. flexneri*; e 3) maiores análises sobre o efeito do tratamento com sulfato de zinco. Além disso, em se tratando da aplicabilidade clínica do modelo de infecção em hospedeiro deficiente em zinco, é importante ponderar que a dieta DZ apresenta 0,085 ppm de zinco, o que caracterizam níveis de deficiência muito baixos em relação a outras dietas com deficiência em zinco moderada utilizada em modelos murinos (3 ppm versus 30 ppm em dieta normal) (SIMON *et al.*, 2001), provavelmente não refletindo os níveis moderados de



deficiência em zinco observados na clínica. Enquanto o presente estudo contribui para o entendimento da importância do zinco para as consequências de infecções entéricas, outros modelos que propiciem níveis de deficiência em zinco mais moderados, e assim com maior aproximação da clínica humana, precisam ser realizados. Ainda no que se refere a aspectos nutricionais inerentes e importantes do estudo, a mensuração diária dos consumos de água e comida por animal poderia ajudar a caracterizar melhor o modelo.

A potencialidade deste modelo para o estudo da enteropatia ambiental deve ser mais explorada. Utilizando a cronicidade dos fenômenos nos animais deficientes em zinco, com persistente colonização por *S. flexneri* e potencial formação de biofilme, mais estudos de determinação da função de barreira intestinal, como lactulose/manitol (BARBOZA *et al.*, 1999), translocação bacteriana e quantificação de junções firmes seriam úteis, bem como análise histopatológica em tempos mais crônicos. A ocorrência de shigelose sistêmica em animais deficientes em zinco indica que potenciais alterações morfofuncionais de barreira intestinal estejam alteradas em comparação com animais nutridos. Nossos dados sugerem que o estudo do mecanismo da deficiência de zinco para estas alterações pode contribuir de forma importante para o entendimento e manejo clínico da enteropatia ambiental, reforçando estudos prévios (YOUNG *et al.*, 2014; LINDENMAYER *et al.*, 2014).

Um outro ponto importante a ser observado no uso do presente modelo e seu potencial translacional para a sociedade se refere à idade dos animais. Apesar de modelos murinos serem largamente utilizados em pesquisa biomédica desde o final do século XVIII, camundongos possuem ciclo de vida bem mais curto em relação a humanos (expectativa de vida de camundongo = dois anos; expectativa de vida de humanos = 80 anos) (DUTTA *et al.*, 2016). No presente estudo, os animais utilizados foram da fase jovem. Os experimentos iniciam-se com os animais com quatro semanas de vida, recém-desmamados, o que corresponderia à idade de aproximadamente três anos em humanos (DUTTA *et al.*, 2016). No momento da infecção para o modelo aqui desenvolvido, os camundongos já estão com seis semanas de vida, o que corresponde a aproximadamente 11 anos de vida em humanos. No contexto clínico, a população-alvo prioritária para o manejo de shigelose é crianças, especialmente com até cinco anos de vida (LIU *et al.*, 2016). Entretanto, para os estudos vacinais, de modo a permitir o desenvolvimento da resposta humoral, os camundongos foram infectados com dez semanas de vida, correspondente a aproximadamente 20 anos de vida. Enquanto se reconhece as limitações inerentes ao método utilizado no presente trabalho e a impossibilidade de uma perfeita correlação entre idades de camundongos e humanos nos estudos murinos, principalmente nas

fases infantil e adolescente, é importante destacar os avanços científicos gerados a partir de tais modelos murinos, exemplificados também no presente estudo.

É importante destacar ainda que o modelo aqui apresentado reflete a variabilidade biológica que é também observada em humanos. As análises de correlação entre variação de peso corpóreo, escores histopatológicos e citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10) mostram que os camundongos não respondem à infecção da mesma maneira (mesmo dentro da mesma caixa), de forma que o desenvolvimento de “doença” (redução de peso corpóreo, diarreia e inflamação intestinal) não ocorre para todos os animais que recebem o inóculo. Além disso, variações nos tempos de picos de infecção entre os camundongos submetidos ou não à mesma dieta são observadas. Mais pesquisas são necessárias para melhor entender os fatores do hospedeiro-chaves que levam a uma maior suscetibilidade a desfechos de doença.

Por fim, para uma melhor compreensão das características, vantagens, limitações e potencialidades do modelo aqui descrito, a **Tabela 3** resume os principais pontos abordados nesta discussão:

**Tabela 3: Características do modelo murino de infecção por *S. flexneri* proposto, com relação aos seus pontos positivos e limitações.**

Parâmetros avaliados	Pontos positivos	Limitações
Desfechos clínicos (diarreia e perda de peso)	O modelo reproduz desfechos clínicos comuns de diarreia e perda de peso de crianças de países em desenvolvimento.	-
Colonização	O modelo reproduz a colonização preferencial pelo cólon	-
Localização de <i>S. flexneri</i>	O modelo reproduz a shigelose intracelular	Necessidade de exploração da importância da shigelose extracelular

Alterações histológicas	O modelo reproduz dano epitelial intestinal causado por <i>S. flexneri</i>	-
Virulência de <i>S. flexneri</i>	Os desfechos são dependentes do SST3 de <i>S. flexneri</i> , importante fator de virulência.	-
Ativação do sistema imune	O modelo promove produção de diversas citocinas e mediadores inflamatórios	Necessidade de exploração de células imunológicas (ensaios de citometria de fluxo)
Produção de anticorpos/Teste de vacinas	O modelo promove a produção de anticorpos e factibilidade para testes de vacinas	-
Metaboloma	O modelo sugere vias metabólicas de importância em shigelose para estudos futuros.	Necessidade de exploração de metabólitos de vias específicas por técnicas de maior especificidade e sensibilidade (espectrometria de massas)
Microbioma	O modelo sugere gêneros bacterianos envolvidos na infecção por <i>S. flexneri</i> que devem ser investigados em estudos futuros.	Necessidade de avaliar modulação de microbioma em animais deficientes em zinco
Uso de antimicrobianos	-	O modelo necessita de disbiose intestinal para ocasionar seus desfechos, potencialmente se afastando da realidade clínica
	O modelo reproduz shigelose a partir de sua via	-

Via de inoculação	comum de transmissão (via oral)	
Shigelose sistêmica	-	A importância da shigelose sistêmica não foi avaliada, apesar de o modelo indicar a sua existência em animais deficientes em zinco.
Enteropatia ambiental	-	O modelo é inadequado para reproduzir a condição de enteropatia ambiental, porém sugere que a deficiência de zinco deve ser avaliada em estudos futuros.

## 8. CONCLUSÕES

A partir dos resultados e discussão apresentados, podemos concluir que:

- 1) Camundongos C57/BL6 jovens pré-tratados com antimicrobianos propiciam um novo modelo para a infecção oral por *S. flexneri* que mimetiza desfechos clínicos comuns de shigelose – diarreia, perda de peso e inflamação intestinal. O modelo proposto é caracterizado por inflamação, produção de citocinas e dano epitelial intestinal, invasão e aderência de *S. flexneri* à mucosa do cólon, patologia dependente do SST3;
- 2) A infecção por *S. flexneri* em camundongos nutridos no modelo proposto causa alterações de gêneros bacterianos específicos do microbioma intestinal: aumento de *Turicibacter* e *Eubacterium*, e redução de *Blautia*;
- 3) A deficiência de zinco promove o aparecimento mais tardio dos sintomas clínicos, colonização persistente, produção persistente de citocinas e formação de estrutura semelhante a biofilme de *S. flexneri* em camundongos infectados no modelo proposto;
- 4) As seguintes vias bioquímicas são sugeridas como importantes para a ocorrência tardia da doença e colonização persistente em animais deficientes em zinco: a  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, o metabolismo de taurina e a degradação do triptofano pela via da quinurenina/nicotinamida;
- 5) Os testes vacinais mostraram que o modelo é útil para avaliação de vacinas em shigelose e que a cepa vacinal empregada (cepa atenuada de *S. flexneri* 2457T – CVD 1208S) é eficaz para a profilaxia em animais nutridos, prevenindo a doença e a colonização intestinal, e induzindo a produção de anticorpos específicos contra *S. flexneri*.

Nossos achados apresentam uma nova ferramenta de estudo em shigelose, sendo potencialmente útil para teste de fatores de virulência e resposta imune nesta infecção, apesar da necessidade de uma melhor caracterização dos mecanismos envolvidos na disbiose do microbioma intestinal e nas respostas imune associadas. Dessa forma, este modelo deve também ser aprofundado para o estudo de potenciais candidatos vacinais e fármacos. Além disso, os resultados do metaboloma sugerem potenciais vias bioquímicas para estudos futuros. Os achados aqui apresentados contribuem para o avanço do entendimento da patobiologia em shigelose.

## 9. REFERÊNCIAS

- ABBASI, E. *et al.* Multidrug-resistant *Shigella* infection in pediatric patients with diarrhea from central Iran. **Infection and Drug Resistance**, v. 12, p. 1535–1544, 2019.
- ABELMAN, R. L. *et al.* Use of whole genome sequencing in surveillance for antimicrobial-resistant *Shigella sonnei* infections acquired from domestic and international sources. **Microbial Genomics**, v. 5, n. 5, 2019.
- AGAISSE, H. Molecular and cellular mechanisms of *Shigella flexneri* dissemination. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 26, p. 29, 2016.
- ALSHAWAQFEH, M. K. *et al.* A dysbiosis index to assess microbial changes in fecal samples of dogs with chronic inflammatory enteropathy. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, n. 11, 2017.
- AMOUR C. *et al.* Epidemiology and Impact of *Campylobacter* Infection in Children in 8 Low-Resource Settings: Results From the MAL-ED Study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 9, p. 1171-1179, 2016.
- ANDERSON, M.; SANSONETTI, P. J.; MARTEYN, B. S. *Shigella* Diversity and Changing Landscape: Insights for the Twenty-First Century. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 6, p. 45, 2016.
- APPLEYARD, C.B.; WALLACE, J. L. Reactivation prevention of hapten-induced by anti-inflammatory colitis and its drugs. **Am. J. Physio**, v. 32, p. G119-G123 1995.
- ASHIDA, H.; MIMURO, H.; SASAKAWA, C. *Shigella* manipulates host immune responses by delivering effector proteins with specific roles. **Frontiers in Immunology**, v. 6, p. 219, 2015.
- ASHIDA, H.; SASAKAWA, C. *Shigella* IpaH Family Effectors as a Versatile Model for Studying Pathogenic Bacteria. v. 5, n. January, **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 5, p. 1-6, 2016.
- BAKER, S.; THE, H. C. Recent insights into *Shigella*. **Current opinion in infectious diseases**, v. 31, n. 5, p. 449–454, 2018.
- BARBOZA, M. S. *et al.* Measurement of intestinal permeability using mannitol and lactulose in children with diarrheal diseases. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, n. 12, p. 1499–1504, 1999.
- BARDHAN, P. *et al.* Decrease in shigellosis-related deaths without *Shigella* spp.- specific interventions, Asia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 11, p. 1718–1723, 2010.
- BARRY, E. M. *et al.* Progress and pitfalls in *Shigella* vaccine research. **Nature reviews. Gastroenterology & Hepatology**, v. 10, n. 4, p. 245–255, 2013.
- BARRY, E. M.; LEVINE, M. M. A Tale of two Bacterial Enteropathogens and One Multivalent Vaccine. **Cellular Microbiology**, p. e13067, 2019.

- BARTELT, L. A. *et al.* “Barriers” to Child Development and Human Potential: The Case for Including the “Neglected Enteric Protozoa” (NEP) and Other Enteropathy-Associated Pathogens in the NTDs. **PloS One**, v. 7, n. 4, p. 1–5, 2013.
- BARTELT, L. A. *et al.* Cross-modulation of pathogen-specific pathways enhances malnutrition during enteric co-infection with *Giardia lamblia* and enteroaggregative *Escherichia coli*. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 7, p. 1–28, 2017.
- BETTGER, W. J. *et al.* Interaction of zinc and essential fatty acids in the rat. **The Journal of nutrition**, v. 109, n. 3, p. 480–488, 1979.
- BLACK, R. E. *et al.* Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. **The Lancet**, v. 375, n. 9730, p. 1969–1987, 2010.
- BLANTON, L. V. *et al.* Gut bacteria that prevent growth impairments transmitted by microbiota from malnourished children. **Science**, v. 351, n. 6275, 2016.
- BLISS, J. *et al.* High prevalence of *Shigella* or enteroinvasive *Escherichia coli* carriage among residents of an internally displaced persons camp in South Sudan. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 2, p. 595–597, 2018.
- BOLICK D.T. *et al.* Zinc deficiency alters host response and pathogen virulence in a mouse model of enteroaggregative *Escherichia Coli*-induced diarrhea. **Gut Microbes**, v. 5, n. 5, p. 618–627, 2014.
- BOLICK DT. *et al.* The Critical Role of Zinc in a New Murine Model of Enterotoxigenic *E. coli*. **Infection and Immunity**, v. 86, n. 7, p. e00183–18, 2018.
- BONA, M. D. Infecção por *Shigella/Escherichia coli* enteroinvasiva, genes de virulência e copatógenos em crianças de estudo caso controle no semiárido brasileiro. 2006.114 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.
- BONA, M. *et al.* Virulence-related genes are associated with clinical and nutritional outcomes of *Shigella/Enteroinvasive Escherichia coli* pathotype infection in children from Brazilian semiarid region: A community case-control study. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 309, n. 2, p. 151–158, 2019.
- BONKOUNGOU, I. J. O. *et al.* Bacterial and viral etiology of childhood diarrhea in Ouagadougou, Burkina Faso. **BMC pediatrics**, v. 13, p. 36, 2013.
- CARAYOL, N.; TRAN VAN NHIEU, G. Tips and tricks about *Shigella* invasion of epithelial cells. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 32–37, 2013.
- CARIAS, C. *et al.* Evaluation of the impact of shigellosis exclusion policies in childcare settings upon detection of a shigellosis outbreak. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 172, 2019.

- CASTAÑO-RODRÍGUEZ, N. *et al.* Gut microbiome analysis identifies potential aetiological factors in acute gastroenteritis. **Infect. Immun**, v. 86, n. 7, 2018.
- CHEN, W. H.; KOTLOFF, K. L. *Shigella* vaccine development: Finding the path of least resistance. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 23, n. 12, p. 904–907, 2016.
- CHEN, X. *et al.* A mouse model of *Clostridium difficile* – associated disease. **Gastroenterology**, v. 135, n. 6, p. 1984-1992, 2008.
- CIRSTEA, M.; RADISAVLJEVIC, N.; FINLAY, B. B. Good Bug, Bad Bug: Breaking through Microbial Stereotypes. **Cell Host and Microbe**, v. 23, n. 1, p. 10–13, 2018.
- COHEN, D. *et al.* Serum IgG antibodies to *Shigella* lipopolysaccharide antigens – a correlate of protection against shigellosis. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 15, n. 6, p. 1401-1408, 2019.
- COSTA, L. B. *et al.* Novel in vitro and in vivo models and potential new therapeutics to break the vicious cycle of *Cryptosporidium* infection and malnutrition. **Journal of Infectious Diseases**, v. 205, n. 9, p. 1464–1471, 2012.
- CRANE J.K. *et al.* Zinc protects against shiga-toxicogenic *Escherichia coli* by acting on host tissues as well as on bacteria. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 1-16, 2014.
- CURTIS, B. *et al.* Simple method for purification of enterotoxigenic *E. coli* fimbriae **Protein Expr Purif**, v.119, p. 130-135, 2016.
- DA CRUZ, C. B. N. *et al.* Virulence factors associated with pediatric shigellosis in Brazilian Amazon. **BioMed research international**, v. 2014, p. 539697, 2014.
- DAS, J. K.; SALAM, R. A.; BHUTTA, Z. A. Global burden of childhood diarrhea and interventions. **Current Opinion Infectious Diseases**, p. 451–458, 2014.
- DAVIS, C. L. *et al.* A clinically parameterized mathematical model of *Shigella* immunity to inform vaccine design. **PLOS One**, v. 13, n.1, p. e0189571, 2017.
- DEBOER, M. D. *et al.* Annals of Epidemiology Early childhood diarrhea and cardiometabolic risk factors in adulthood: the Institute of Nutrition of Central America and Panama Nutritional Supplementation Longitudinal Study. **Annals of Epidemiology**, v. 23, n. 6, p. 314–320, 2013.
- DEL POZO, J.L. Biofilm-related disease. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 16, n. 1, p. 51-65, 2018.
- DELAINE, B. O. C. *et al.* Characterization of a multicomponent live, attenuated *Shigella flexneri* vaccine. **Pathogens and disease**, v. 74, n. 5, p. 1–12, 2016.
- DESHMUKH, H.S. *et al.* The microbiota regulates neutrophil homeostasis and host resistance to *Escherichia coli* K1 sepsis in neonatal mice. **Nature Medicine**, v. 20, n. 5, p. 524-530, 2014.



- DHARIWAL, A. *et al.* MicrobiomeAnalyst: A web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. W1, p. W180–W188, 2017.
- DUCARMON, Q. R. *et al.* Gut Microbiota and Colonization Resistance against Bacterial Enteric Infection. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 83, n. 3, p. e00007-19, 2019.
- DUGGAN, G. M.; MOSTOWY, S. Use of zebrafish to study *Shigella* infection. **Disease Models & Mechanisms**, v. 11, n. 2, p. dmm032151, 2018.
- DUPONT, H.L. *Shigella* species (Bacillary dysentery). In: Mandell, G.L., Bennett, J.E., Dolin, R. (Eds.), **Principles and Practice of Infectious Diseases**, 6<sup>a</sup> ed. New York: Churchill Livingstone Inc., 2005. 2655–2661 p.
- DUTTA, S.; SENGUPTA, P. Men and mice: Relating their ages. **Life Sciences**, v. 152, p. 244–248, 2016.
- EDER, K.; KIRCHGESSNER, M. Zinc deficiency and activities of lipogenic and glycolytic enzymes in liver of rats fed coconut oil or linseed oil. **Lipids**, v. 30, n. 1, p. 63-9, 1995.
- FAHERTY, C. *et al.* Chromosomal and Plasmid-Encoded Factors of *Shigella flexneri* Induce Secretogenic Activity Ex Vivo. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. 1-10, 2012.
- FARFÁN, M.J. *et al.* *Shigella* enterotoxin-2 is a type III effector that participates in *Shigella*-induced interleukin 8 secretion by epithelial cells. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 332–339, 2011.
- FARSHAD, S. *et al.* Characterization of *Shigella* strains in Iran by plasmid profile analysis and PCR amplification of ipa genes. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2879–83, 2006.
- FERDOUS, F. *et al.* Aetiology and clinical features of dysentery in children aged <5 years in rural Bangladesh. **Epidemiology and infection**, v. 142, n. 1, p. 90–8, 2014.
- FERRARI, M.L. *et al.* *Shigella* promotes major alteration of gut epithelial physiology and tissue invasion by shutting off host intracellular transport. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 116, n.27, p. 13582-13591, 2019.
- FISCHER WALKER, C. L. *et al.* Does Childhood Diarrhea Influence Cognition Beyond the Diarrhea-Stunting Pathway? **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. e47908, 2012.
- FRANÇOIS, M. *et al.* Induction of necrosis in human neutrophils by *Shigella flexneri* requires type III secretion, IpaB and IpaC invasins, and actin polymerization. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 3, p. 1289–1296, 2000.
- FRENCK, R. W. *et al.* A Phase I trial to evaluate the safety and immunogenicity of WRSs2 and WRSs3; two live oral candidate vaccines against *Shigella sonnei*. **Vaccine**, v. 36, n. 32, p. 4880–4889, 2018.

- GAMMOH, N. Z.; RINK, L. Zinc in infection and inflammation. **Nutrients**, v. 9, n. 6, 2017. **Genomics**, v. 5, n. 5, 2019.
- GHOSH, S. *et al.* Genetic characterization of *Shigella* spp. isolated from diarrhoeal and asymptomatic children. **Journal of medical microbiology**, v. 63, n.7, p. 903–10, 2014.
- GIALLOUROU, T. *et al.* A novel mouse model of *Campylobacter jejuni* enteropathy and diarrhea. **PLoS ONE**, v.14, n. 3 p. 1–23, 2018.
- GIBSON, R. S.; KING, J. C.; LOWE, N. A Review of Dietary Zinc Recommendations. **Food and Nutrition Bulletin**, v. 37, n. 4, p. 443–460, 2016.
- GIERSING, B. K. *et al.* How can controlled human infection models accelerate clinical development and policy pathways for vaccines against *Shigella*? **Vaccine**, v. 37, n. 34, p. 4778–4783, 2019.
- GOMEZ, H. F. *et al.* Lactoferrin protects rabbits from *Shigella flexneri*-induced inflammatory enteritis. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 12, p. 7050–7053, 2002.
- GUARINO, A. *et al.* European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition/European Society for Paediatric Infectious Diseases evidence-based guidelines for the management of acute gastroenteritis in children in Europe. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.**, v. 46, p. S81-122, 2008.
- GUERRANT, R. L. *et al.* Biomarkers of environmental enteropathy, inflammation, stunting, and impaired growth in children in northeast Brazil. **PLoS ONE**, v. 11, n. 9, p. 1–20, 2016.
- GUERRANT, R. L. *et al.* The impoverished gut—a triple burden of diarrhoea, stunting and chronic disease. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 10, n. 4, p. 220–229, 2013.
- GUZMAN-HERRADOR, B. R. *et al.* A *Shigella sonnei* outbreak traced to imported basil - The importance of good typing tools and produce traceability systems, Norway, 2011. **Eurosurveillance**, v. 18, n. 49, p. 20650, 2013.
- HARPER K.M. *et al.* Environmental enteric dysfunction pathways and child stunting: A systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 1, p. 1-23, 2018.
- HIBBERD, M. *et al.* The effects of micronutrient deficiencies on bacterial species from the human gut microbiota. **Science translational medicine**, v. 9, n. 390, p. eaal4069, 2017.
- HIIPPALA, K. *et al.* Mucosal prevalence and interactions with the epithelium indicate commensalism of *Sutterella* spp. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1706, 2016.
- HOSANGADI, D. *et al.* WHO consultation on ETEC and *Shigella* burden of disease, Geneva, 6-7th April 2017: Meeting report. **Vaccine**, n. April, p. 6–7, 2018.
- HSIAO, A, *et al.* Members of the human gut microbiota involved in recovery from *Vibrio cholerae* infection. **Nature**, v. 515, n. 7527, p. 423-426, 2014.

- HU, B. *et al.* Visualization of the type III secretion sorting platform of *Shigella flexneri*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 4, p. 1047–1052, 2015.
- ISAAC, S. *et al.* Short- and long-term effects of oral vancomycin on the human intestinal microbiota. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 1, p. 128–136, 2017.
- JENNISON, A. V.; VERMA, N. K. *Shigella flexneri* infection: Pathogenesis and vaccine development. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, n. 1, p. 43–58, 2004.
- JENQ, R.R. *et al.* Intestinal *Blautia* is associated with reduced death from graft- versus-host disease. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 21, n. 8, p. 1373–1383, 2015.
- JIAO, N. *et al.* Gut microbiome may contribute to insulin resistance and systemic inflammation in obese rodents: A meta-analysis. **Physiological Genomics**, v. 50, n. 4, p. 244–254, 2018.
- JOH, R. I. *et al.* Dynamics of shigellosis epidemics: estimating individual-level transmission and reporting rates from national epidemiologic data sets. **American journal of epidemiology**, v. 178, n. 8, p. 1319–26, 2013.
- JU, T. *et al.* Initial gut microbial composition as a key factor driving host response to antibiotic treatment, as exemplified by the presence or absence of commensal *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 17, p. 1–15, 2017.
- KAMINSKI R.W. *et al.* Development and Preclinical Evaluation of a Trivalent, Formalin-Inactivated *Shigella* Whole-Cell Vaccine. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 21, n. 3, p. 366–382, 2014.
- KEDDY, K. H. *et al.* Systemic shigellosis in South Africa. **Clinical infectious diseases**, v. 54, n. 10, p. 1448–54, 2012.
- KEUSCH, G. T. *et al.* Environmental enteric dysfunction: Pathogenesis, diagnosis, and clinical consequences. **Clinical Infectious Diseases**, v. 59, n. Suppl 4, p. S207–S212, 2014.
- KHAN, I. *et al.* Metagenomic analysis of antibiotic-induced changes in gut microbiota in a pregnant rat model. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, p. 104, 2016.
- KHAN, W. A.; GRIFFITHS, J. K.; BENNISH, M. L. Gastrointestinal and extra-intestinal manifestations of childhood shigellosis in a region where all four species of *Shigella* are endemic. **PLoS one**, v. 8, n. 5, p. e64097, 2013.
- KHOT, P. D.; FISHER, M. A. Novel Approach for Differentiating *Shigella* Species and *Escherichia coli* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight. **JCM**, v. 51, n. 11, p. 3711–3716, 2013.
- KIM, M. J. *et al.* Cross-Protective *Shigella* Whole-Cell Vaccine With a Truncated O-Polysaccharide Chain. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2609, 2018.

KLIRCK, M. D. *et al.* World Health Organization estimates of the global and regional disease burden of 22 foodborne bacterial, protozoal, and viral diseases, 2010: a data synthesis. **PLoS Medicine**, v. 12, n. 12, p. e10001921, 2015.

KLONTZ, K. C.; SINGH, N. Treatment of drug-resistant *Shigella* infections Treatment of drug-resistant *Shigella* infections. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 13, n. 1, 2015.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Ed. Médica e Científica, 2008.

KOSEK M.N *et al.* Causal Pathways from Enteropathogens to Environmental Enteropathy: Findings from the MAL-ED Birth Cohort Study. **EBioMedicine**, v. 18, p. 109-117, 2017.

KOSEK, M. *et al.* Fecal markers of intestinal inflammation and permeability associated with the subsequent acquisition of linear growth deficits in infants. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 2, p. 390–396, 2013.

KÖSEOGLU, V. K. *et al.* The autotransporter IcsA promotes *Shigella flexneri* biofilm formation in the presence of bile salts. **Infection and Immunity**, v. 87, n. 7, 2019.

KOTLOFF, K. L. *et al.* Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. **The Lancet**, v. 382, p. 209–222, 2013.

KOTLOFF, K. L. *et al.* Deletion in the *Shigella* Enterotoxin Genes Further Attenuates *Shigella flexneri* 2a Bearing Guanine Auxotrophy in a Phase 1 Trial of CVD 1204 and CVD 1208. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 21201, p. 1745–1754, 2004.

KOTLOFF, K. L. *et al.* Safety and immunogenicity of CVD 1208S, a live, oral  $\Delta$ guaBA  $\Delta$ sen  $\Delta$ set *Shigella flexneri* 2a vaccine grown on animal-free media. **Human Vaccines**, v. 3, n. 6, p. 268–275, 2007.

KOTLOFF, K. L. *et al.* Shigellosis. **The Lancet**, v. 391, p. 801-812, 2018.

KOTLOFF, K. L. *et al.* The incidence, aetiology, and adverse clinical consequences of less severe diarrhoeal episodes among infants and children residing in low-income and middle-income countries: a 12-month case-control study as a follow-on to the Global Enteric Multicenter Study (GEMS). **The Lancet Global Health**, v. 7, n. 5, p. e568–e584, 2019.

KOTLOFF, K. L. The burden and etiology of diarrheal illness in developing countries. **Pediatric Clinics of North America**, v. 64, p. 799-814, 2017.

KOZAK, G. K. *et al.* Foodborne outbreaks in Canada linked to produce: 2001 through 2009. **Journal of food protection**, v. 76, n. 1, p. 173–83, 2013.

KOZICH, J. J. *et al.* Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the miseq illumina sequencing platform. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 17, p. 5112–5120, 2013.

- KREBS, N. F.; MILLER, L. V.; HAMBIDGE, K. M. Zinc deficiency in infants and children: a review of its complex and synergistic interactions. **Paediatrics and International Child Health**, v. 34, n. 4, 279-288, 2014.
- KUEHL, C. J.; DRAGOI, A. M.; AGAISSE, H. The *Shigella flexneri* type 3 secretion system is required for tyrosine kinase-dependent protrusion resolution, and vacuole escape during bacterial dissemination. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, 2014.
- LAN, R. *et al.* Molecular Evolutionary Relationships of Enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp. **Infection and Immunity**, v.72, n.9, p. 5080–5088, 2004.
- LANATA, C. F. *et al.* Global Causes of Diarrheal Disease Mortality in Children <5 Years of Age: A Systematic Review. **Plos One**, v. 8, p. 1-11, n. 9, 2013.
- LEE, G. *et al.* Effects of *Shigella*-, *Campylobacter*- and ETEC-associated diarrhea on childhood growth. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 33, n. 10, p. 1004–9, 2014.
- LEES, H. J. *et al.* Hippurate: The Natural History of a Mammalian – Microbial Cometabolite. **Journal of proteome research**, v. 12, p. 1527–1546, 2013.
- LI, Y. *et al.* Comparison between the fecal bacterial microbiota of healthy and diarrheic captive musk deer. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. MAR, p. 1–10, 2018.
- LI, Y. *et al.* Molecular detection of all 34 distinct O-antigen forms of *Shigella*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 69–81, 2009.
- LIMA, I. F. N.; HAVT, A.; LIMA, A. A M. Update on molecular epidemiology of *Shigella* infection. **Current opinion in gastroenterology**, v. 31, n. 1, p. 30–7, 2015.
- LINDENMAYER, G. W.; STOLTZFUS, R. J.; PRENDERGAST, A. J. Interactions between Zinc Deficiency and Environmental Enteropathy in Developing Countries. **Advances in Nutrition**, v. 1, n. 5, p. 1–6, 2014.
- LINDSAY, B. *et al.* Association between *Shigella* Infection and Diarrhea Varies Based on Location and Age of Children. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 5, p. 918–924, 2015.
- LINDSAY, B. *et al.* Quantitative PCR for Detection of *Shigella* Improves Ascertainment of *Shigella* Burden in Children with Moderate-to-Severe Diarrhea in Low-Income Countries. **JCM**, v. 51, n. 6, p. 1740–1746, 2013.
- LIU, G.; PILLA, G.; TANG, C. M. *Shigella* host: pathogen interactions: keeping bacteria in the loop. **Cellular Microbiology**, v.28, p. e13062, 2019.
- LIU, J. *et al.* Use of quantitative molecular diagnostic methods to identify causes of diarrhoea in children: a reanalysis of the GEMS case-control study. **The Lancet**, v. 388, n. 10051, p. 1291–1301, 2016.
- LIU, L. *et al.* Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. **The Lancet**, v. 379, p. 2151–2161, 2012.

LIU, X. *et al.* Comparative proteomics of *Shigella flexneri* 2a strain 301 using a rabbit ileal loop model reveals key proteins for bacterial adaptation in host niches. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 40, p. 28–33, 2015.

LIVIO, S. *et al.* *Shigella* isolates from the global enteric multicenter study inform vaccine development. **Clinical Infectious Diseases**, v. 59, n. 7, p. 933–941, 2014.

LLUQUE, A. *et al.* Virulence factors and mechanisms of antimicrobial resistance in *Shigella* strains from periurban areas of Lima (Peru). **International journal of medical microbiology: IJMM**, v. 305, n. 4-5, p. 480–90, 2015.

LONG, J. M. *et al.* Zinc Absorption from Micronutrient Powders Is Low in Bangladeshi Toddlers at Risk of Environmental Enteric Dysfunction and May Increase Dietary Zinc Requirements. **Journal of Nutrition**, v. 149, n. 1, p. 98–105, 2019.

LOPEZ-MONTERO, N.; ENNINGA, J. *Shigella* Stays on the Move. **Cell Host and Microbe**, v. 22, n. 4, p. 432–433, 2017.

LORNTZ, B. *et al.* Early childhood diarrhea predicts impaired school performance. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 25, n. 6, p. 513–520, 2006.

LUKACIK, M.; THOMAS, R. L.; ARANDA, J. V. A Meta-analysis of the Effects of Oral Zinc in the Treatment of Acute and Persistent Diarrhea. **Pediatrics**, v. 121, n. 2, p. 326–336, 2008.

MAI V. *et al.* Bacteriophage administration significantly reduces *Shigella* colonization and shedding by *Shigella*-challenged mice without deleterious side effects and distortions in the gut microbiota. **Bacteriophage**, v. 5, n. 4, p. e1088124, 2015.

MANI S.; WIERBA T. WALKER R.I. Status of vaccine research and development for *Shigella*. **Vaccine**, v. 34, n. 26, p. 2880–2886, 2016.

MANI, S. *et al.* Role of antigen specific T and B cells in systemic and mucosal immune responses in ETEC and *Shigella* infections, and their potential to serve as correlates of protection in vaccine development. **Vaccine**, v. 37, n. 34, p. 4787–4793, 2019.

MARTEYN, B. S.; GAZI, A. D.; SANSONETTI, P. J. *Shigella*: A model of virulence regulation in vivo. **Gut Microbes**, v. 3, n. 2, p. 104–120, 2012.

MARTINEZ-BECERRA, F. J. *et al.* Broadly Protective *Shigella* Vaccine Based on Type III Secretion Apparatus Proteins. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 3, p. 1222–1231, 2012.

MARTINO, M. C. *et al.* Mucosal Lymphoid Infiltrate Dominates Colonic Pathological Changes in Murine Experimental Shigellosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 192, n. 1, p. 136–148, 2005.

MATTOCK E.; BLOCKER A.J. How Do the Virulence Factors of *Shigella* Work Together to Cause Disease? **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. 64, p. 1–24, 2017.

MAURELLI, A. T. *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli*. **Escherichia Coli**, p. 215–245, 2013.

MAYNERIS-PERXACHS, J. *et al.* Protein-and zinc-deficient diets modulate the murine microbiome and metabolic phenotype. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 104, n. 5, p. 1253–1262, 2016.

MAYNERIS-PERXACHS, J. *et al.* Urinary N-methylnicotinamide and  $\beta$ -aminoisobutyric acid predict catch-up growth in undernourished Brazilian children. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–9, 2016.

MCARTHUR, M. A.; MACIEL, M.; PASETTI, M. F. Human immune responses against *Shigella* and enterotoxigenic *E. coli*: Current advances and the path forward. **Vaccine**, v. 35, n. 49, p. 6803–6806, 2017.

MCCORMICK, B.J.J. *et al.* Early life child micronutrient status, maternal reasoning, and a nurturing household environment have persistent influences on child cognitive development at age 5 years: results from MAL-ED. **The Journal of Nutrition**, v. 149, n. 8, p. 1460-1469, 2019.

MEDEIROS P.H.Q.S. *et al.* The micronutrient zinc inhibits EAEC strain 042 adherence, biofilm formation, virulence gene expression, and epithelial cytokine responses benefiting the infected. **Virulence**, v. 4, n. 7, p. 624-633, 2013.

MEDEIROS, P. H. Q. S. *et al.* Molecular characterization of virulence and antimicrobial resistance profile of *Shigella* species isolated from children with moderate to severe diarrhea in northeastern Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 90, n. 3, p. 198–205, 2018.

MILLION, M.; DIALLO, A.; RAOULT, D. Gut microbiota and malnutrition. **Microbial Pathogenesis**, v. 106, p. 127–138, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Doenças infecciosas e parasitárias – Guia de bolso: Série B: Textos Básicos de Saúde**. 8ª ed. Brasília-DF, 2010. 444 p.

MOKHTARI, W. *et al.* Detection and characterization of *Shigella* species isolated from food and human stool samples in Nabeul, Tunisia, by molecular methods and culture techniques. **Journal of Applied Microbiology**, p. 1–14, 2012.

MOKOMANE, M. *et al.* The global problem of childhood diarrhoeal diseases: emerging strategies in prevention and management. **Therapeutic Advances in Infectious Disease Review**, v. 5. n. 1, p. 29–43, 2018.

MORHARDT, T. L. *et al.* IL-10 produced by macrophages regulates epithelial integrity in the small intestine. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 2019.

- MOSTOWY, S. *et al.* The Zebrafish as a New Model for the In Vivo Study of *Shigella flexneri* Interaction with Phagocytes and Bacterial Autophagy. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 9, p. 12–16, 2013.
- MU, C. *et al.* The Colonic Microbiome and Epithelial Transcriptome Are Altered in Rats Fed a High-Protein Diet Compared with a Normal-Protein Diet<sup>1–3</sup>. **The Journal of Nutrition**, v. 146, n. 3, p. 474–483, 2016.
- NICHOLSON, J. K. *et al.* Metabonomics: A platform for studying drug toxicity and gene function. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, n. 2, p. 153–161, 2002.
- NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C. Metabolomics. **Nature**, v. 455, n. 23, p. 1054–56, 2008.
- NIEHAUS, M.D. *et al.* Early childhood diarrhea is associated with diminished cognitive function 4 to 7 years later in children in a northeast Brazilian shantytown. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.66, n. 5, p. 590-3. 2002.
- NIYOGI, S. K. Shigellosis. **The Journal of Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 133–143, 2005.
- NUNES, R. C. M. *et al.* Diarrhea associated with *Shigella* in children and susceptibility to antimicrobials. **Jornal de Pediatria**, v. 88, n. 2, p. 125–128, 2012.
- OBIERO, C. W. *et al.* A phase 2a randomized study to evaluate the safety and immunogenicity of the 1790GAHB generalized modules for membrane antigen vaccine against *Shigella sonnei* administered intramuscularly to adults from a shigellosis-endemic country. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. DEC, p. 1–11, 2017.
- OJHA, S. C. *et al.* A Pentaplex PCR Assay for the Detection and Differentiation of *Shigella* Species. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-9, 2013.
- OMS. Guidelines for the control of shigellosis, including epidemics due to *Shigella* dysenteriae. 2005. Disponível em:  
<<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43252/924159330X.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 05 set 2019.
- OMS. Implementing the new recommendations on the clinical management of diarrhoea. Guidelines for policy makers and programme managers. 2006. Disponível em:  
<[https://www.who.int/maternal\\_child\\_adolescent/documents/9241594217/en](https://www.who.int/maternal_child_adolescent/documents/9241594217/en)>. Acesso em: 05 set 2019.
- ORÍÁ, R. B. *et al.* Early-life enteric infections: relation between chronic systemic inflammation and poor cognition in children. **Nutrition Reviews Advance**, v. 0, n. 0, p. 1–13, 2016.
- PARKER, E. P. *et al.* Causes of impaired oral vaccine efficacy in developing countries. **Future Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 97–118, 2018.
- PASQUA, M. *et al.* The MFS efflux pump EmrKY contributes to the survival of *Shigella* within macrophages. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 2906, 2019.



PENATTI, M. P. A. *et al.* Epidemiological characterization of resistance and PCR typing of *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* strains isolated from bacillary dysentery cases in Southeast Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, n. 2, p. 249–258, 2007.

PETRI JR, W. A. *et al.* Enteric infections, diarrhea, and their impact on function and development. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 4, p. 1277-1290, 2008.

PETTENGILL E.A.; PETTENGILL J.B.; BINET R. Phylogenetic Analyses of *Shigella* and Enteroinvasive *Escherichia coli* for the Identification of Molecular Epidemiological Markers: Whole-Genome Comparative Analysis Does Not Support Distinct Genera Designation. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 1573, 2015.

PINAUD, L. *et al.* Injection of T3SS effectors not resulting in invasion is the main targeting mechanism of *Shigella* toward human lymphocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 37, p. 201707098, 2017.

PLATTS-MILLS J.A. *et al.* Association between enteropathogens and malnutrition in children aged 6–23 mo in Bangladesh: a case-control study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, n. 105, p. 1132-1138, 2017.

PLATTS-MILLS, J. A. *et al.* Pathogen-specific burdens of community diarrhoea in developing countries: a multisite birth cohort study (MAL-ED). **The Lancet Global Health**, v. 3, p. 1-12, 2015.

PLATTS-MILLS, J. A. *et al.* Use of quantitative molecular diagnostic methods to assess the aetiology, burden, and clinical characteristics of diarrhoea in children in low-resource settings: a reanalysis of the MAL-ED cohort study. **The Lancet Global Health**, v. 6, n. 12, p. e1309–e1318, 2018.

PORE, D. *et al.* Outer membrane protein a (OmpA) of *Shigella flexneri* 2a, induces protective immune response in a mouse model. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, 2011.

PRATA, M.M.G. *et al.* Comparisons between myeloperoxidase, lactoferrin, calprotectin and lipocalin-2, as fecal biomarkers of intestinal inflammation in malnourished children. **Journal of Translational Science**, v. 2 n. 2, p. 134-139, 2016.

QUAST, C. *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, p. D590–596, 2013.

RAHMAN, M. J. *et al.* Effects of zinc supplementation as adjunct therapy on the systemic immune responses in shigellosis. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, n. 2, p. 495–502, 2005.

RAQIB, R. *et al.* A phase I trial of WRSS1, a *Shigella sonnei* live oral vaccine in Bangladeshi adults and children. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 15, n. 6, p. 1326-1337, 2019.

RAQIB, R. *et al.* Innate Immune Responses in Children and Adults with Shigellosis. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 6, p. 3620–3629, 2000.

RAQIB, R. *et al.* Persistence of local cytokine production in shigellosis in acute and convalescent stages. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 1, p. 289–296, 1995.

RATH, H. C. *et al.* Normal luminal bacteria, especially bacteroides species, mediate chronic colitis, gastritis, and arthritis in HLA-B27/human  $\beta$ 2 microglobulin transgenic rats. **Journal of Clinical Investigation**, v. 98, n. 4, p. 945–953, 1996.

RAVENSCROFT, N. *et al.* Purification and characterization of a *Shigella* conjugate vaccine, produced by glycoengineering *Escherichia coli*. **Glycobiology**, v. 26, n. 1, p. 51–62, 2016.

REDE MAL-ED. Relationship between growth and illness, enteropathogens and dietary intakes in the first 2 years of life: findings from the MAL-ED birth cohort study. **BMJ Global Health**, v. 2, n. 4, p. e000370, 2017.

REDE MAL-ED. Early childhood cognitive development is affected by interactions among illness, diet, enteropathogens and the home environment: findings from the MAL-ED birth cohort study. **BMJ Global Health**, v. 3, e000752, 2018.

REED, S. *et al.* Chronic zinc deficiency alters chick gut microbiota composition and function. **Nutrients**, v. 7, n. 12, p. 9768–9784, 2015.

RICHARD, S. A. *et al.* Diarrhea in Early Childhood: Short-term Association With Weight and Long-term Association With Length. **American Journal of Epidemiology**, v. 178, n. 7, p. 1129–1138, 2013.

RIDDLE, M. S. *et al.* Safety and immunogenicity of a candidate bioconjugate vaccine against *Shigella flexneri* 2a administered to healthy adults: A single-blind, randomized phase i study. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 23, n. 12, p. 908–917, 2016.

RINNINELLA, E. *et al.* What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. **Microorganisms**, v. 7, n. 1, p. E14, 2019.

ROGAWSKI E.T. *et al.* Epidemiology of enteroaggregative *Escherichia coli* infections and associated outcomes in the MAL-ED birth cohort. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, p. e0005798, 2017.

ROGAWSKI, E. T. *et al.* Use of quantitative molecular diagnostic methods to investigate the effect of enteropathogen infections on linear growth in children in low-resource settings: longitudinal analysis of results from the MAL-ED cohort study. **The Lancet Global Health**, v. 6, n. 12, p. e1319–e1328, 2018.

ROSSI, O. *et al.* Draft genomes of *Shigella* strains used by the STOPENTERICS consortium. **Gut Pathogens**, v. 7, n. 14, p. 1–6, 2015.

- ROUTY, J. P. *et al.* The kynurenine pathway is a double-edged sword in immune-privileged sites and in cancer: Implications for immunotherapy. **International Journal of Tryptophan Research**, v. 9, n. 1, p. 67–77, 2016.
- ROY, S. K. *et al.* Zinc supplementation in the management of shigellosis in malnourished children in Bangladesh. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, n. 7, p. 849–855, 2008.
- SALGADO-PABÓN, W *et al.* New insights into the crosstalk between *Shigella* and T lymphocytes. **Trend in Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 192-198, 2014.
- SAMANDARI, T. *et al.* Production of IFN- $\gamma$  and IL-10 to *Shigella* Invasins by Mononuclear Cells from Volunteers Orally Inoculated with a Shiga Toxin-Deleted *Shigella dysenteriae* Type 1 Strain. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 4, p. 2221–2232, 2000.
- SAMBE-BA, B. *et al.* Community-acquired diarrhea among children and adults in urban settings in Senegal: clinical, epidemiological and microbiological aspects. **BMC Infect Dis**, v. 13, p. 580, 2013.
- SAMMAN, S. *et al.* Trace elements. In: Mann, J. and Truswell, A.S. (eds.) **Essentials of Human Nutrition**. United States: Oxford University Press, 2012, 171-196 p.
- SANGEETHA, A. V *et al.* Clinical and Microbiological Profiles of Shigellosis in Children. **J Health Popul Nutr**, v. 32, p. 580–586, 2014.
- SANKARAN, K. *et al.* Congo red-mediated regulation of levels of *Shigella flexneri* 2a membrane proteins. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 8, p. 2364–2371, 1989.
- SANSONETTI, P. J. The bacterial weaponry: Lessons from *Shigella*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1072, p. 307–312, 2006.
- SARKAR P. *et al.* Zinc ameliorates intestinal barrier dysfunctions in shigellosis by reinstating claudin-2 and -4 on the membranes. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 316, n. 2, p. G229-G246, 2019.
- SCALLAN, E. *et al.* Foodborne illness acquired in the United States-Major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 7–15, 2011.
- SCHARF, R. J.; DEBOER, M. D.; GUERRANT, R. L. Recent Advances in Understanding the Long-Term Sequelae of Childhood Infectious Diarrhea. **Current Infectious Disease Reports**, v. 16, n. 408, p. 1-7, 2014.
- SCHLOSS, P. D. *et al.* Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 23, p. 7537–7541, 2009.
- SCHNUPF, P.; SANSONETTI, P. J. *Shigella* Pathogenesis: New Insights through Advanced Methodologies. **Microbiology Spectrum**, v. 7, n. 2, 2019.

- SCHROEDER, G. N. *et al.* Molecular Pathogenesis of *Shigella* spp.: Controlling Host Cell Signaling, Invasion, and Death by Type III Secretion Molecular Pathogenesis of *Shigella* spp.: Controlling Host Cell Signaling, Invasion, and Death by Type III Secretion. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 1, p. 134-156, 2008.
- SEEKATZ, A. M. *et al.* Differential Response of the Cynomolgus Macaque Gut Microbiota to *Shigella* Infection. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, 2013.
- SHIM, D.H. *et al.* New Animal Model of Shigellosis in the Guinea Pig: Its Usefulness for Protective Efficacy Studies. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 4, p. 2476–2482, 2007.
- SHIN, J. H. *et al.* Innate Immune Response and Outcome of *Clostridium difficile* Infection Are Dependent on Fecal Bacterial Composition in the Aged Host. **Journal of Infectious Diseases**, v. 217, n. 2, p. 188–197, 2018.
- SHIPLEY, S. T. *et al.* A challenge model for *Shigella dysenteriae* 1 in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). **Comparative Medicine**, v. 60, n. 1, p. 54–61, 2010.
- SIDIK, S. *et al.* A *Shigella flexneri* virulence plasmid encoded factor controls production of outer membrane vesicles. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 4, n. 12, p. 2493–2503, 2014.
- SILVA, T. *et al.* Characterization of *Shigella* spp. by antimicrobial resistance and PCR detection of ipa genes in an infantile population from Porto Velho (Western Amazon region). **Mem. Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 731–733, 2008.
- SIMMS, I. *et al.* Intensified shigellosis epidemic associated with sexual transmission in men who have sex with men--*Shigella flexneri* and *S. sonnei* in England, 2004 to end of February 2015. **Euro Surveill**, v. 20, n.15, p. 1–5, 2015.
- SIMON, S.F., TAYLOR, C.G. Dietary zinc supplementation attenuates hyperglycemia in db/dbmice. **Exp Biol Med**, v. 226, n. 1, p.43-51, 2001.
- SINGH, P. *et al.* Intestinal microbial communities associated with acute enteric infections and disease recovery. **Microbiome**, v. 3, p. 45, 2015.
- SOOFI, S. B. *et al.* A comparison of disease caused by *Shigella* and *Campylobacter* species: 24 months community based surveillance in 4 slums of Karachi, Pakistan. **Journal of infection and public health**, v. 4, n. 1, p. 12–21, 2011.
- SOUSA, M. A. B. *et al.* *Shigella* in Brazilian children with acute diarrhoea: prevalence, antimicrobial resistance and virulence genes. **Mem. Inst Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 30–35, 2013.
- SREEROHINI, S.; BALAKRISHNA, K.; PARIDA, M. Oral immunization of mice with *Lactococcus lactis* expressing Shiga toxin truncate confers enhanced protection against Shiga toxins of *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella dysenteriae*. **Apmis**, 2019.
- STROCKBINE, N.A., MAURELLI, A.T. *Shigella*. In: Garrity, G.M. (Ed.), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2<sup>a</sup> ed. The Proteobacteria Part B: The Gammaproteobacteria, vol. 2., New York: Springer, 2005, p. 811–823.

TANG, F. *et al.* Spatio-temporal trends and risk factors for *Shigella* from 2001 to 2011 in Jiangsu Province, People's Republic of China. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e83487, 2014.

TANNER, K.; BRZOVIC, P.; ROHDE, J. R. Microreview The bacterial pathogen – ubiquitin interface: lessons learned from *Shigella*. **Cellular Microbiology**, v. 17, n.1, p. 35–44, 2015.

TARIQ, A. *et al.* Molecular profiling of antimicrobial resistance and integron association of multidrug-resistant clinical isolates of *Shigella* species from Faisalabad, Pakistan. **Can. J. Microbiol.**, v. 58, p. 1047–1054, 2012.

THIEM, V. D. *et al.* Detection of *Shigella* by a PCR assay targeting the *ipaH* gene suggests increased prevalence of shigellosis in Nha Trang, Vietnam. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 5, p. 2031–2035, 2004.

THOMPSON, C. N.; DUY, P. T.; BAKER, S. The Rising Dominance of *Shigella sonnei*: An Intercontinental Shift in the Etiology of Bacillary Dysentery. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 6, p. e0003708, 2015.

TINEVEZ, J.Y. *et al.* *Shigella*-mediated oxygen depletion is essential for intestinal mucosa colonization. **Nature Microbiology**, 2019.

TOAPANTA, F. R. *et al.* T cell mediated immunity induced by the live-attenuated *Shigella flexneri* 2a vaccine candidate CVD 1208S in humans. **Journal of Translational Medicine**, v. 16, n. 1, p. 1–17, 2018.

TORO, C. *et al.* Shigellosis in Subjects with Traveler's Diarrhea Versus Domestically Acquired Diarrhea: Implications for Antimicrobial Therapy and Human Immunodeficiency Virus Surveillance. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 93, n. 3, p. 491–6, 2015.

TRAN, E. N. H. *et al.* *Shigella flexneri* cell-to-cell spread, and growth and inflammation in mice, is limited by the outer membrane protease IcsP. **FEMS Microbiology Letters**, v. 362, n. 12, p. 1–8, 2015.

TRÉPANIÉ, S. *et al.* Travel-related shigellosis in Quebec, Canada: An analysis of risk factors. **Journal of Travel Medicine**, v. 21, n. 5, p. 304–309, 2014.

TROEGER, C. *et al.* Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoea in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 11, p. 1211–1228, 2018.

TROFA, A. F.; UENO-OLSEN, H.; OIWA, R. Dr. Kiyoshi Shiga: Discoverer of the Dysentery Bacillus. **Clinical Infectious Disease**, p. 1303–1306, 1999.

VAN DE VERG, L. L. *et al.* Antibody and cytokine responses in a mouse pulmonary model of *Shigella flexneri* serotype 2a infection. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 5, p. 1947–1954, 1995.

VAN DEN BELD, M. J. C.; REUBSAET, F. A. G. Differentiation between *Shigella*, enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and noninvasive *Escherichia coli*. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v. 31, n. 6, p. 899–904, 2012.

VELA RAMIREZ, J. E.; SHARPE, L. A.; PEPPAS, N. A. Current state and challenges in developing oral vaccines. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 114, p. 116–131, 2017.

VOGT, S. L.; FINLAY, B. B. Gut microbiota-mediated protection against diarrheal infections. **Journal of travel medicine**, v. 24, n. 1, p. S39–S43, 2017.

VOGT, S. L.; PEÑA-DÍAZ, J.; FINLAY, B. B. Chemical communication in the gut: Effects of microbiota-generated metabolites on gastrointestinal bacterial pathogens. **Anaerobe**, v. 34, p. 106–115, 2015.

VON SEIDLEIN, L. *et al.* A multicentre study of *Shigella* diarrhoea in six Asian countries: Disease burden, clinical manifestations, and microbiology. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 9, p. 1556–1569, 2006.

WALKER, R.; DULL, P. Combination vaccine strategies to prevent enteric infections. **Vaccine**, v. 35, n. 49, p. 6790–6792, 2017.

WANDEL, M. P. *et al.* GBPs Inhibit Motility of *Shigella flexneri* but Are Targeted for Degradation by the Bacterial Ubiquitin Ligase IpaH9.8. **Cell Host and Microbe**, v. 22, n. 4, p. 507–518.e5, 2017.

WANG, Y. *et al.* Metabonomic investigations in mice infected with *Schistosoma mansoni*: An approach for biomarker identification. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 34, p. 12676–12681, 2004.

WANG, Y. *et al.* Systems metabolic effects of a *Necator americanus* infection in Syrian hamster. **Journal of Proteome Research**, v. 8, n. 12, p. 5442–5450, 2009.

WATANABE, K. *et al.* Microbiome-mediated neutrophil recruitment via CXCR2 and protection from amebic colitis. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 8, p. 1–20, 2017.

WEI, J. *et al.* Complete Genome Sequence and Comparative Genomics of *Shigella flexneri* Serotype 2a Strain 2457T†. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 5, p. 2775–2786, 2003.

WEXLER, H. M. Bacteroides: The good, the bad, and the nitty-gritty. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 4, p. 593–621, 2007.

YAIR, R.; UNI, Z. Content and uptake of minerals in the yolk of broiler embryos during incubation and effect of nutrient enrichment. **Poultry Science**, v. 90, n. 7, p. 1523–1531, 2011.

YANG, J. Y. *et al.* A mouse model of shigellosis by intraperitoneal infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. 2, p. 203–215, 2014.

YOUNG, G. P. *et al.* Report of a Meeting Zinc deficiency in children with environmental enteropathy — development of new strategies: report from an expert workshop 1 – 4. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 100, n. September 2012, p. 1198–1207, 2014.

YUM, L. K. *et al.* Critical role of bacterial dissemination in an infant rabbit model of bacillary dysentery. **Nature Communications**, v. 10, p. 1826, 2019.

ZHANG, J. *et al.* Deletion of pic results in decreased virulence for a clinical isolate of *Shigella flexneri* 2a from China. **BMC Microbiology**, v. 13, n. 31, p. 1–10, 2013.

ZHANG, W.-X. *et al.* Fluoroquinolone Resistance Mechanisms in *Shigella* Isolates in Shanghai, China, Between 2010 and 2015. **Microbial Drug Resistance**, v. 25, n. 2, p. 212–218, 2019.

ZHAO, J. *et al.* Rapid oligonucleotide suspension array-based multiplex detection of bacterial pathogens. **Foodborne pathogens and disease**, v. 10, n. 10, p. 896–903, 2013.

ZHOU, Y.; ZHI, F. Lower Level of Bacteroides in the Gut Microbiota Is Associated with Inflammatory Bowel Disease: A Meta-Analysis. **BioMed Research International**, v. 2016, 2016.

ZUMSTEG, A. B. *et al.* Article IcsA Is a *Shigella flexneri* Adhesin Regulated by the Type III Secretion System and Required for Pathogenesis. **Cell Host & Microbe**, v. 15, n. 4, p. 435–445, 2014.

## ANEXO A: PROTOCOLO DO COMITÊ DE ÉTICA



08/24/2018

Dr. Richard Guerrant  
 Infectious Diseases & International Health  
 Delivered via email to rig9a@virginia.edu

Dear Dr. Guerrant,

Re: Protocol No. 3315  
 "Study of Nutrient Therapy, of Intestinal and Cognitive Function, and of Susceptibility to Infection in Mice Challenged by Malnutrition"

Initial Review Date: 08/14/2018  
 First Annual Review Date:  
 Second Annual Review Date:

The Animal Care & Use Committee (ACUC) is pleased to inform you that full approval has been given for:

- New Protocol *[Approved for a three year term with annual reviews the month in which the initial approval was given becomes the anniversary month for Annual Review and Continuation after Three Years]*
- Modification *[Approved and added to protocol]*
- Annual Review *[Approved each year in anniversary month during three-year term]*
- Continuation After Three Years *[Approved for additional three year term with annual reviews]*
- Minor Modification *[Approved and added to protocol]*

A copy of the approved protocol is provided for your reference. Notification from the ACUC Office to the Principal Investigator and to the Contact Person will be sent thirty to sixty days prior to the anniversary month. It is the responsibility of the Principal Investigator to ensure that if the protocol is to continue without interruption, Annual Review and Continuation after Three Years proposals must be approved before the end of the anniversary month. **Any change to or deviation from the research described in this protocol must be reviewed and approved by the ACUC prior to implementation!**

Sincerely,

Carl E. Creutz, Ph.D.  
 Chairman, Animal Care & Use Committee  
 Professor of Pharmacology  
 Harrison Professor of Medical Teaching in Pharmacology

Contact Person: Bolick, David (dib5w)

Cobb Hall | Rm. S-051 | P.O. Box 800720  
 Charlottesville, VA 22908-0720  
 Phone: 434-924-0405 | Fax: 434-982-4092  
 Email: acuc@virginia.edu



## ANEXO B: PUBLICAÇÕES RELACIONADAS À TESE

ARTIGO 1 (publicado em *Gut Microbes* – Fator de Impacto: 7,8)

GUT MICROBES  
<https://doi.org/10.1080/19490976.2018.1564430>



**Taylor & Francis**  
Taylor & Francis Group

---

RESEARCH PAPER/REPORT

 OPEN ACCESS
  Check for updates

### A murine model of diarrhea, growth impairment and metabolic disturbances with *Shigella flexneri* infection and the role of zinc deficiency

Pedro Henrique Q.S. Medeiros<sup>a,b</sup>, Solanka E. Ledwaba <sup>a</sup>, David T. Bolick<sup>a</sup>, Natasa Giallourou <sup>c</sup>, Lauren K. Yum<sup>d</sup>, Deiziane V.S. Costa<sup>a,b</sup>, Reinaldo B. Oriá<sup>a,b</sup>, Eileen M. Barry<sup>e</sup>, Jonathan R. Swann <sup>c</sup>, Aldo Ângelo M. Lima<sup>b</sup>, Hervé Agaisse<sup>d</sup>, and Richard L. Guerrant<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Center for Global Health, Division of Infectious Diseases and International Health, University of Virginia, Charlottesville, USA; <sup>b</sup>Institute of Biomedicine, Federal University of Ceara, Fortaleza, Brazil; <sup>c</sup>Division of Computational and Systems Medicine, Department of Surgery and Cancer, Imperial College London, London, UK; <sup>d</sup>Department of Microbiology, Immunology and Cancer Biology, University of Virginia, Charlottesville, USA; <sup>e</sup>Center for Vaccine Development, University of Maryland, Baltimore, USA

**ABSTRACT**

*Shigella* is one of the major enteric pathogens worldwide. We present a murine model of *S. flexneri* infection and investigate the role of zinc deficiency (ZD). C57BL/6 mice fed either standard chow (HC) or ZD diets were pretreated with an antibiotic cocktail and received *S. flexneri* strain 2457T orally. Antibiotic pre-treated ZD mice showed higher *S. flexneri* colonization than non-treated mice. ZD mice showed persistent colonization for at least 50 days post-infection (pi). *S. flexneri*-infected mice showed significant weight loss, diarrhea and increased levels of fecal MPO and LCN in both HC and ZD fed mice. *S. flexneri* preferentially colonized the colon, caused epithelial disruption and inflammatory cell infiltrate, and promoted cytokine production which correlated with weight loss and histopathological changes. Infection with *S. flexneri*  $\Delta$ *mxiG* (critical for type 3 secretion system) did not cause weight loss or diarrhea, and had decreased stool shedding duration and tissue burden. Several biochemical changes related to energy, inflammation and gut-microbial metabolism were observed. Zinc supplementation increased weight gains and reduced intestinal inflammation and stool shedding in ZD infected mice. In conclusion, young antibiotic-treated mice provide a new model of oral *S. flexneri* infection, with ZD promoting prolonged infection outcomes.

**ARTICLE HISTORY**

Received 1 August 2018  
 Revised 24 November 2018  
 Accepted 19 December 2018

**KEYWORDS**

Shigellosis; mouse model; zinc deficiency; urine metabolomics; intestinal microbiota

## ANEXO B: PUBLICAÇÕES RELACIONADAS À TESE

ARTIGO 2 (submetido para *NPJ Vaccines* – Fator de Impacto: 5,0)

De: npjvaccines@nature.com  
 Assunto: NPJVACCINES-00480 Receipt of New Paper by npj Vaccines  
 Fecha: 17 de septiembre de 2019, 12:32  
 Para: phquintela@hotmail.com

N

---

Manuscript Number: NPJVACCINES-00480

Title: A bivalent vaccine confers immunogenicity and protection against *Shigella flexneri* and enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in mice

Authors: Pedro Henrique Medeiros, David Bolick, Ellen Ledwaba, Glynis Kolling, Deiziane Costa, Reinaldo Oriá, Aldo Ângelo Lima, Eileen Barry, and Richard Guerrant

Dear Dr. Medeiros,

I am pleased to confirm that your manuscript entitled "A bivalent vaccine confers immunogenicity and protection against *Shigella flexneri* and enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in mice" by Pedro Henrique Medeiros, David Bolick, Ellen Ledwaba, Glynis Kolling, Deiziane Costa, Reinaldo Oriá, Aldo Ângelo Lima, Eileen Barry, and Richard Guerrant has now passed our initial quality check and has been assigned to the Editors for consideration.

You may check on the status of this manuscript by selecting the "Check Manuscript Status" link under the following URL:

<https://mts-npjvaccines.nature.com/cgi-bin/main.plex?el=A3Th5KT2A3BIP3F5A9tdtpw3VtQF8S7LfWqQFfbJ2gZ>

(Press/Click on the above link to be automatically sent to your journal home.)

Thank you for submitting your manuscript to *npj Vaccines*.  
 Yours sincerely,

Rosie Tobutt  
 Journal Staff  
 npj Vaccines

This email has been sent through the Springer Nature Manuscript Tracking System NY-610A-SN&MTS

*Confidentiality Statement:*

*This e-mail is confidential and subject to copyright. Any unauthorised use or disclosure of its contents is prohibited. If you have received this email in error please notify our Manuscript Tracking System Helpdesk team at [Platform Support Helpdesk](#).*

*Details of the confidentiality and pre-publicity policy may be found here <http://www.nature.com/authors/policies/confidentiality.html>*

[Privacy Policy](#) | [Update Profile](#)

**ANEXO C: LISTA DE PUBLICAÇÕES DURANTE O PERÍODO DE DOUTORADO  
(Agosto/2016-Setembro/2019)**

1. MEDEIROS, PHQS; SOLANKA, EL; BOLICK, DT; *et al.* A murine model of diarrhea, growth impairment and metabolic disturbances with *Shigella flexneri* infection and the role of zinc deficiency. **Gut Microbes**. doi: 10.1080/19490976.2018.1564430, 2019.
2. BONA, M; MEDEIROS, PHQS; SANTOS, AK; *et al.* Virulence-related genes are associated with clinical and nutritional outcomes of *Shigella*/Enteroinvasive *Escherichia coli* pathotype infection in children from Brazilian semiarid region: A community case-control study. **International Journal of Medical Microbiology**. 309 (2): 151-158, 2019.
3. SANTOS, AKS; MEDEIROS, PHQS; BONA, MD; *et al.* Virulence-Related Genes and Coenteropathogens Associated with Clinical Outcomes of Enteropathogenic *Escherichia coli* Infections in Children from the Brazilian Semiarid Region: a Case-Control Study of Diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**. 57 (4). pii: e01777-18, 2019.
4. LIMA, AAM; OLIVEIRA, DB; QUETZ, JS; HAVT, A; PRATA, MMG; LIMA, IFN; SOARES, AM; FILHO, JQ; LIMA, NL; MEDEIROS, PHQS; *et al.* Etiology and severity of diarrheal diseases in infants at the semiarid region of Brazil: A case-control study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. 13(2): e0007154, 2019.
5. PANKOV, RC; GONDIM, RNDG; PRATA, MMG; MEDEIROS, PHQS; *et al.* Rotavirus A Infections in Community Childhood Diarrhea in the Brazilian Semiarid Region During Post-Vaccination Era. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**. doi: 10.1097/MPG.0000000000002416, 2019.
6. PRATA, MMG; CAVALCANTE, PA; DA SILVA, AVA; MEDEIROS, PHQS; *et al.* Alanine-glutamine Protects Against Damage Induced by Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strains in Intestinal Cells. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**. 68(2): 190-198, 2019.

7. LIMA, AAM; MEDEIROS, PHQS; HAVT, A. Enteroaggregative *Escherichia coli* subclinical and clinical infections. **Current Opinions in Infectious Diseases**. 31(5): 433-439, 2018.
8. MEDEIROS, PHQS; PINTO, DV; ALMEIDA, JZ; *et al.* Modulation of Intestinal Immune and Barrier Functions by Vitamin A: Implications for Current Understanding of Malnutrition and Enteric Infections in Children. **Nutrients**. 10 (9), pii: E1128. 2018.
9. GIALLOUROU, N; MEDLOCK, GL; BOLICK, DT; MEDEIROS, PHQS; *et al.* A novel mouse model of *Campylobacter jejuni* enteropathy and diarrhea. **PLoS Pathogens**. 14 (3): e1007083, 2018.
10. BOLICK, DT; MEDEIROS, PHQS; LEDWABA, SE; *et al.* Critical Role of Zinc in a New Murine Model of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Diarrhea. **Infection and Immunity**. 86 (7), pii: e00183-18, 2018.
11. RODRIGUES, FAP; SANTOS ADDC; MEDEIROS, PHQS; *et al.* Gingerol suppresses sepsis-induced acute kidney injury by modulating methylsulfonylmethane and dimethylamine production. **Scientific Reports**. 8 (1): 12154, 2018.
12. VERAS, HN; MEDEIROS, PHQS; RIBEIRO, SA; *et al.* *Campylobacter jejuni* virulence genes and immune-inflammatory biomarkers association with growth impairment in children from Northeastern Brazil. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**. 37 (10): 2011-2020, 2018.
13. GONDIM, RDG; PANKOV, RC; PRATA, MMG; MEDEIROS, PHQS; *et al.* Genetic Diversity of Norovirus Infections, Coinfections, and Undernutrition in Children from Brazilian Semiarid Region. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**. 67 (6): e117-e122, 2018.

14. CAVALCANTE, PA; PRATA, MMG; MEDEIROS, PHQS; *et al.* Intestinal cell migration damage induced by enteropathogenic *Escherichia coli* strains. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 51 (10): e7423, 2018.
15. LIMA, AAM; SOARES, AM; FILHO JQS; HAVT, A; LIMA, IFN; LIMA, NL; MEDEIROS, PHQS, *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* subclinical infection and coinfections and impaired child growth in the MAL-ED cohort study. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**. 66: 325-333, 2018.
16. ROGAWSKI, ET; GUERRANT, RL; HAVT, A; LIMA, IFN; MEDEIROS, PHQS; *et al.* Epidemiology of enteroaggregative *Escherichia coli* infections and associated outcomes in the MAL-ED birth cohort. **Plos Neglected Tropical Diseases**. v11(7), e0005798, 2017.
17. HAVT, A; LIMA, IFN; MEDEIROS, PHQS; *et al.* Prevalence and virulence gene profiling of enteroaggregative *Escherichia coli* in malnourished and nourished Brazilian children. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 89(2), 98-105, 2017.
18. LIMA, AAM; LEITE, AM; MOURA, AD; LIMA, NL; SOARES, AM; ABREU, CB; MEDEIROS, PHQS; *et al.* Determinant variables, enteric pathogen burden, gut function, and immune-related inflammatory biomarkers associated with childhood malnutrition: a prospective case-control study in Northeastern Brazil. **The Pediatric Infectious Disease Journal**. doi: 1097/INF.0000000000001569, 2017.