

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**DESVENDANDO O POTENCIAL DE *Escherichia coli* ENTEROTOXIGÊNICA NA  
MODULAÇÃO DA MICROBIOTA E DA RESPOSTA IMUNE  
NO EIXO INTESTINO-PULMÃO EM SUÍNOS**

**Gabriela Merker Breyer**

**PORTO ALEGRE**

**2024**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**DESVENDANDO O POTENCIAL DE *Escherichia coli* ENTEROTOXIGÊNICA NA  
MODULAÇÃO DA MICROBIOTA E DA RESPOSTA IMUNE  
NO EIXO INTESTINO-PULMÃO EM SUÍNOS**

**Autora: Gabriela Merker Breyer**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Ciências Veterinárias na área de Microbiologia Veterinária - Bacteriologia

Orientadora: Prof<sup>fa</sup>. Dr<sup>a</sup>. Franciele Maboni Siqueira

**PORTO ALEGRE**

**2024**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

---

#### CIP - Catalogação na Publicação

Merker Breyer, Gabriela  
Desvendando o potencial de Escherichia coli  
enterotoxigênica na modulação da microbiota e da  
resposta imune no eixo intestino-pulmão em suínos /  
Gabriela Merker Breyer. -- 2024.  
109 f.  
Orientadora: Franciele Maboni Siqueira.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre,  
BR-RS, 2024.

1. ETEC. 2. RT-qPCR. 3. microbiota. 4. eixo  
intestino-pulmão. 5. saúde intestinal . I. Maboni  
Siqueira, Franciele, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Gabriela Merker Breyer

DESVENDANDO O POTENCIAL DE *Escherichia coli* ENTEROTOXIGÊNICA NA  
MODULAÇÃO DA MICROBIOTA E DA RESPOSTA IMUNE NO EIXO INTESTINO-  
PULMÃO EM SUÍNOS

Aprovado em 23 FEV 2024

APROVADO POR:

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Franciele Maboni Siqueira

Orientador e Presidente da Comissão

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Fabiana Quoos Mayer

Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Jeverson Frazzon

Membro da Comissão

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Flávia Figueira Aburjaile

Membro da Comissão

## AGRADECIMENTOS

A meus familiares, especialmente a meus pais, Fabiana e Rogério, por serem suporte e abrigo, sempre me incentivando a buscar meus objetivos e apoiando minhas aventuras.

A Vitor por estar presente em cada momento, ouvindo minhas histórias e sabendo me distrair delas. Obrigada por ser meu parceiro de vida.

A minha orientadora, Franciele, pela orientação, amizade e constante incentivo. Obrigada por acreditar no meu trabalho e por instigar o meu melhor.

Às colegas e amigas do Laboratório de Bacteriologia Veterinária (LaBacVet) pelo companheirismo e troca constante. Em especial à Duda e à Mari, pela parceria e amizade, que fizeram meus dias de Doutorado mais leves mesmo quando tudo parecia dar errado.

A meus amigos da vida toda, Carol, Laís, Karina e Solon, presentes mesmo a distância. Obrigada pelas conversas e risadas trocadas.

Aos professores e colegas que encontrei durante minha trajetória acadêmica, por compartilharem seu tempo e conhecimento.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, que já soa como se fosse casa, pelo ensino público de qualidade e referência.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e pelas oportunidades acadêmicas, que contribuíram imensamente para a minha formação.

## RESUMO

A microbiota intestinal de suínos em suas fases iniciais de desenvolvimento, que já sofre em virtude do estresse do desmame e imaturidade do trato gastrointestinal (TGI), se torna ainda mais suscetível à disbiose frente a *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC). Devido à interação entre mucosas, o efeito das modificações na microbiota intestinal causadas por este patógeno gastrintestinal pode se estender para o trato respiratório; no entanto, pouco se sabe sobre como a presença de ETEC atua no eixo intestino-pulmão em leitões. Portanto, este trabalho visa elucidar o papel de ETEC na modulação da microbiota intestinal e pulmonar e na expressão gênica de marcadores do sistema imunológico (SI) de suínos portadores de ETEC assintomáticos e diarreicos. Ademais, considerando a dificuldade em se caracterizar a microbiota do trato respiratório, também se propõe um método alternativo para o sequenciamento por *amplicon* de amostras com baixa densidade microbiana. Foram analisados suínos em diferentes fases de desenvolvimento quanto à presença de ETEC em amostras de fezes, e classificados como carreadores (ETEC+) ou não carreadores (ETEC-). Em seguida, animais selecionados tiveram sua microbiota intestinal e pulmonar caracterizadas por sequenciamento da região V4 do gene *16S-rDNA* pela plataforma Illumina MiSeq, e a caracterização do perfil transcricional de genes marcadores do SI por RT-qPCR. A validação do método alternativo foi realizada através de análises de *mock community* e amostras clínicas sem causar viés nas sequências geradas, permitindo sua aplicação na análise da microbiota pulmonar de leitões. Na microbiota intestinal, houve uma redução na  $\alpha$ -diversidade em animais ETEC+, sendo a fase de desenvolvimento dos suínos um importante fator contribuinte para a modulação da composição das comunidades bacterianas neste sítio. A presença de ETEC também favoreceu a disbiose da microbiota do eixo intestino-pulmão e alteração da resposta imune em nível transcricional não apenas no TGI, mas também sistêmico e no trato respiratório dos animais analisados. Os resultados obtidos apontam que patógenos gastrintestinais, mesmo quando latentes, são capazes de modular a saúde dos suínos, ressaltando a importância do monitoramento e controle da disseminação de ETEC nas granjas, e de estudos sobre a dinâmica do eixo intestino-pulmão na área veterinária.

**Palavras-chave:** ETEC; *16S-rDNA*; RT-qPCR; microbiota; eixo intestino-pulmão; saúde intestinal.

## **ABSTRACT**

*The piglets' gut microbiota, which already undergoes modulations due to the weaning and the gastrointestinal immaturity, becomes even more susceptible to dysbiosis when challenged by enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC). Due to the mucosal interactions, changes in gut microbiota caused by gastrointestinal pathogens can extend to the respiratory tract; however, the role of ETEC in gut-lung axis in pigs remains unclear. Thus, this study aims to unravel the ETEC role in gut-lung microbiota modulation and in immune markers transcription in ETEC carrier asymptomatic or diarrheic pigs. In addition, considering the hurdles in characterizing lung microbiota, we also purpose an alternative method for amplicon sequencing of low-biomass samples. We screened pigs at different stages for the detection of ETEC-markers and classified them into ETEC-carriers (ETEC+) or non-carriers (ETEC-). Then, selected piglets were submitted to the characterization of gut and lung microbiota by 16S-rDNA (V4) amplicon sequencing using Illumina MiSeq, and immune marker relative expression by RT-qPCR. We validated the alternative method for low-biomass samples based on mock community and clinical samples without data bias, allowing its use for pigs' lung microbiota analysis. In the gut microbiota,  $\alpha$ -diversity was reduced in ETEC+ pigs, and pigs' development stage was an important contributing factor for modulating gut bacterial community composition. ETEC presence also contributed to the gut-lung microbiota dysbiosis and immune response not only in gut but also in pigs' respiratory tract and systemically. Overall, these findings point out that gastrointestinal pathogens even when latent can modulate pigs' health, highlighting the importance of monitoring and controlling the ETEC dissemination in swine farms, and the investigation of gut-lung axis for veterinarian purposes.*

**Keywords:** ETEC; 16S-rDNA; RT-qPCR; microbiota; gut-lung axis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

**Figura 1** – Interação patógeno-hospedeiro de *Escherichia coli* enterotoxigênica e células do epitélio intestinal de suínos..... 20

### MATERIAIS E MÉTODOS

**Figura 2** – Desenho experimental empregado nesta Tese..... 34

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

**Tabela 1** – Doenças gastrintestinais causadas por *Escherichia coli* enterotoxigênica em suínos ao longo de seu desenvolvimento..... 17

**Tabela 2** – Fatores de virulência encontrados em *Escherichia coli* enterotoxigênica que acometem suínos..... 19

### MATERIAIS E MÉTODOS

**Tabela 3** – Lista de *primers* utilizados nas reações de PCR para a detecção de marcadores de virulência de *Escherichia coli* enterotoxigênica em amostras de fezes de suínos..... 36

**Tabela 4** – Lista de *primers* utilizados em RT-qPCR para análise da expressão gênica relativa de marcadores do sistema imune de suínos..... 39

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 16S-rDNA*: gene codificador da subunidade ribossômica 30S de procariotos
- AIDA: adesina não-fimbrial envolvida na aderência difusa (do inglês *adhesin involved in diffuse adherence*)
- ASV: variantes de sequência amplificada (do inglês *amplicon sequence variant*)
- Ca<sup>2+</sup>: íons de cálcio
- cAMP: monofosfato de adenosina cíclico (do inglês *cyclic adenosine monophosphate*)
- cDNA: DNA complementar
- CFTR: regulador de condutância transmembrana de fibrose cística (do inglês *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*)
- cGMP: monofosfato de guanosina cíclico (do inglês *cyclic guanosine monophosphate*)
- Cl<sup>-</sup>: íons de cloreto
- DEC: *Escherichia coli* diarreio gênicas
- DOI: identificador de objeto digital (do inglês *digital object identifier*)
- DNA: ácido desoxirribonucleico (do inglês *deoxyribonucleic acid*)
- EAST1: toxina termoestável enteroagregativa 1 (do inglês *enteroaggregative heat-stable toxin 1*)
- ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigênica (do inglês *enterotoxigenic Escherichia coli*)
- F4: adesina fimbrial K88
- F5: adesina fimbrial K99
- F6: adesina fimbrial 987P
- F18: adesina fimbrial F18
- F41: adesina fimbrial F41
- HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>: íons de bicarbonato
- IgA: imunoglobulina A
- IL: interleucina
- LPS: lipopolissacalídeo
- LT: enterotoxina termolábil (do inglês *heat-labile enterotoxin*)
- MMLV: vírus da leucemia murina (do inglês *Moloney murine leukemia virus*)
- mRNA: RNA mensageiro
- Na<sup>+</sup>: íons de sódio
- NGS: sequenciamento de nova geração (do inglês *Next generation sequencing*)
- pb: pares de base

DEF1B: defensina 1 beta

PBS: tampão salina fosfato (do inglês *phosphate-buffered saline*)

PCR: reação em cadeia da polimerase (do inglês *polymerase chain reaction*)

pH: potencial hidrogeniônico

PIB: produto interno bruto

PMAP36: peptídeo antimicrobiano mieloide suíno-36 (do inglês *porcine myeloid antimicrobial peptide-36*)

PRRSV: vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (do inglês *porcine reproductive and respiratory syndrome virus*)

qPCR: PCR quantitativa

RNA: Ácido ribonucleico (do inglês *ribonucleic acid*)

SI: sistema imunológico

STa: enterotoxina termoestável A (do inglês *heat-stable enterotoxin A*)

STb: enterotoxina termoestável B (do inglês *heat-stable enterotoxin B*)

STEC: *Escherichia coli* produtoras de shiga toxina (do inglês *shiga toxin-producing Escherichia coli*)

TFF: fator trefoil (do inglês *trefoil factor*)

TGE: Gastroenterite Transmissível

TGI: trato gastrointestinal

TNF: fator de necrose tumoral (do inglês *tumoral necrosis factor*)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>16</b>
2.1 Suinocultura no Brasil e infecções gastrointestinais por <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica na produção de suínos .....	16
2.2 Patogenicidade de <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênicas que acometem suínos .....	18
2.3 Patogenia das infecções por <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica em suínos e seus fatores predisponentes .....	21
2.4 Dinâmica patógeno-hospedeiro: interação entre <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica, a microbiota intestinal e o sistema imunológico dos suínos .....	24
2.5 Eixo intestino-pulmão: papel de patógenos intestinais na homeostase respiratória de suínos .....	28
<b>3 PERGUNTAS CIENTÍFICAS</b> .....	<b>31</b>
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	<b>32</b>
4.1 Objetivo geral.....	32
4.2 Objetivos específicos .....	32
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
5.1 Desenho experimental.....	33
5.2 Coleta de amostras .....	34
5.3 Extração de ácidos nucleicos .....	35
5.4 Identificação molecular de fatores de virulência de <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica em amostras de fezes.....	36
5.5 Amplificação da região V4 do gene <i>16S-rDNA</i> e sequenciamento de nova geração (NGS) .....	36
5.6 Análises <i>in silico</i> da microbiota bacteriana intestinal e pulmonar de suínos carreadores e não-carreadores de <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênicas.....	37
5.7 Perfil de expressão gênica sistêmica e local de marcadores do sistema imune de suínos carreadores e não-carreadores de <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica .....	38
<b>6 RESULTADOS</b> .....	<b>40</b>

<b>7</b>	<b>CAPÍTULO 1 – Efeito de <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica na modulação da microbiota intestinal e na expressão gênica de marcadores do sistema imune de suínos em diferentes fases de desenvolvimento .....</b>	<b>41</b>
<b>8</b>	<b>CAPÍTULO 2 – Dinâmica do eixo intestino-pulmão em leitões portadores de <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica.....</b>	<b>42</b>
<b>9</b>	<b>CAPÍTULO 3 – Desenvolvimento e validação de método alternativo para o sequenciamento por <i>amplicon</i> de amostras com baixa densidade microbiana.....</b>	<b>43</b>
<b>10</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>44</b>
<b>11</b>	<b>IMPACTO SOCIAL E CIENTÍFICO DOS RESULTADOS DESTA TESE .....</b>	<b>45</b>
<b>12</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>46</b>

## 1 INTRODUÇÃO

*Escherichia coli* são bactérias Gram-negativas comensais da microbiota intestinal de diversos animais que, paradoxalmente, podem tanto estar em simbiose quanto causar infecções em seus hospedeiros. Com isso, estas bactérias são ótimos modelos para investigar fatores genéticos que podem levar ao comensalismo ou a patogenicidade de determinadas cepas, ou mesmo a transitar entre estes dois estados (TENAILLON *et al.*, 2010).

*E. coli* intestinais estão envolvidas em casos de diarreia que acometem diferentes hospedeiros, e sua patogenicidade está associada a conjuntos de fatores genéticos de virulência, adquiridos evolutivamente por transferência horizontal (KAPER *et al.*, 2004; CROXEN *et al.*, 2013). Até hoje, diversos patotipos de *E. coli* intestinais já foram descritos e amplamente estudados, sendo classificados de acordo com a combinação dos conjuntos de fatores de virulência. Dentre eles, o patotipo *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) é o agente etiológico da diarreia branda, a qual acomete humanos e animais de produção (KAPER *et al.*, 2004; DUBREUIL *et al.*, 2016).

Infecções por ETEC em suínos são muito comuns nas fases iniciais de seu desenvolvimento, e causam doenças como a colibacilose neonatal em leitões recém-nascidos, e a diarreia pós-desmame em animais desmamados. Trata-se de um patógeno com transmissão oro-fecal pelo contato com animais carreadores – diarreicos ou assintomáticos –, ou ambiente contaminado (GYLES; FAIRBROTHER, 2010; EFSA/AHAW *et al.*, 2022). Entretanto, além da presença do patógeno, outros fatores predisponentes contribuem para o desenvolvimento clínico destas doenças nos leitões, incluindo características genéticas dos animais, imaturidade do trato gastrointestinal (TGI) e sistema imunológico (SI) nestas fases, administração de colostro ao nascer, idade ao desmame, condições ambientais e manejo sanitário (RHOUMA *et al.*, 2017). O impacto destas doenças se reflete em altas taxas de morbidade e mortalidade, redução na taxa de crescimento dos animais e, conseqüentemente, prejuízos econômicos para o setor suinícola (DUBREUIL *et al.*, 2016).

Além disso, a interação patógeno-hospedeiro se estende por outros aspectos, como a modulação da sua microbiota intestinal e barreira imunológica (CERF-BENSUSSAN; GABORIAU-ROUTHIAU, 2010). Nos últimos anos, a microbiota intestinal de suínos vem sendo amplamente estudada através de sequenciamento de nova geração (NGS), principalmente para a caracterização das comunidades bacterianas (KIM; ISAACSON,

2015). A microbiota intestinal de suínos varia principalmente com a idade do animal, sendo a colonização bacteriana iniciada logo após seu nascimento e moldada ao longo de seu desenvolvimento até atingir sua maturação durante o período de crescimento e terminação (LUO *et al.*, 2022). Esta dinamicidade da microbiota intestinal nas fases iniciais de vida afeta a nutrição e a saúde dos animais; enquanto, animais adultos com a microbiota intestinal estável têm menor risco de doenças intestinais e maior potencial de crescimento (LUO *et al.*, 2022).

Ademais, o *crosstalk* da microbiota intestinal não se limita à resposta local no TGI, mas também atua na modulação da imunidade no trato respiratório. Tal interação intestino-pulmão é principalmente explorada na área humana (ANAND; MANDE, 2018), porém, mais recentemente, estudos em suínos também começaram a ser conduzidos (JIANG *et al.*, 2019; NAIR *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2022). A investigação da interação intestino-pulmão em suínos é uma ferramenta importante para melhor compreender a susceptibilidade dos animais a doenças infecciosas, tanto intestinais quanto respiratórias, bem como elucidar os mecanismos relacionados à patogênica e resposta imunológica da interação patógeno-hospedeiro.

Com isso, o presente trabalho visa desvendar a interação patógeno-hospedeiro de ETEC e suínos – carreadores e não-carreadores do patógeno – em diferentes fases de desenvolvimento através de uma abordagem molecular, incluindo caracterização da microbiota intestinal e pulmonar, e avaliação da expressão de genes marcadores de resposta imunológica no intestino e no pulmão dos animais.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Suinocultura no Brasil e infecções gastrointestinais por *Escherichia coli* enterotoxigênica na produção de suínos

O Brasil é atualmente o quarto maior produtor de rebanhos suínos no mundo, com 46,250 mil cabeças em 2023, e o quarto maior exportador, com aproximadamente 31% da produção destinados a este fim (FAS/USDA, 2023). Ademais, internamente, os suínos representam o terceiro maior rebanho produzido no país, atrás apenas de aves e bovinos (IBGE, 2021). Sendo assim, a suinocultura representa um importante segmento do agronegócio nacional, responsável por 24,8% do produto interno bruto (PIB) do Brasil (CEPEA; CNA, 2022).

Infecções gastrointestinais são uma grande preocupação para a produção de suínos. Dentre as infecções mais frequentes, se destacam as causadas por *Escherichia coli* patogênicas, em especial por *E. coli* enterotoxigênica (ETEC). Este patotipo acomete animais em suas fases iniciais de desenvolvimento, principalmente logo após seu nascimento até o período pós-desmame, devido à imaturidade do trato gastrintestinal (TGI) dos leitões nestas fases (GYLES; FAIRBROTHER, 2010), podendo causar quadros de colibacilose neonatal, colibacilose entérica complicada por choque, diarreia pré-desmame e diarreia pós-desmame (FAIRBROTHER; NADEAU, 2019). À exceção da colibacilose entérica complicada por choque, em que a morte ocorre geralmente antes da apresentação de sinais clínicos, as outras doenças se manifestam por diarreia moderada a severa (GYLES; FAIRBROTHER, 2010). A Tabela 1 resume as principais doenças gastrintestinais causadas por ETEC em suínos.

**Tabela 1 – Doenças gastrintestinais causadas por *Escherichia coli* enterotoxigênica em suínos ao longo de seu desenvolvimento.**

Doença	Sinais clínicos	Etiologia	Fase*				
			Neonatal	Amamentação	Pós-desmame	Crescimento/ Terminação	Adultos
Colibacilose neonatal	Diarreia aquosa severa; desidratação; mortalidade de até 70%	ETEC					
Diarreia pré-desmame	Diarreia moderada; Baixa mortalidade; redução do ganho de peso	ETEC, Coccidia, rotavírus, vírus TGE					
Colibacilose entérica complicada por choque	Diarreia; cianose periférica, morte rápida	ETEC					
Diarreia pós-desmame	Diarreia moderada a severa; redução do ganho de peso; mortalidade de 25% dos animais não tratados	ETEC e outros patotipos de <i>E. coli</i>					

\* região hachurada indica fase de desenvolvimento em que a doença é reportada de acordo com a literatura. TGE: Gastroenterite Transmissível

Para a produção animal, a colibacilose neonatal e a diarreia pós-desmame têm maior importância veterinária, gerando significativas perdas econômicas no setor devido às altas taxas de morbidade e mortalidade, e à redução da taxa de crescimento nos rebanhos infectados (DUBREUIL *et al.*, 2016). Em lotes afetados por colibacilose neonatal, a taxa de morbidade varia de 30 a 40%, podendo atingir até 80% em alguns rebanhos; enquanto a taxa de mortalidade nestes casos pode ser de 70% (GYLES; FAIRBROTHER, 2010). Já lotes com diarreia pós-desmame, a mortalidade é de aproximadamente 1,5 a 2%, mas pode chegar a 25% em lotes não tratados (GYLES; FAIRBROTHER, 2010). O impacto financeiro anual na produção de suínos pode chegar a € 133 (equivalente a aproximadamente R\$ 430,00 na época) por matriz em rebanhos afetados por colibacilose neonatal, e € 40 (equivalente a aproximadamente R\$ 130,00 na época) por matriz em lotes com diarreia pós-desmame, considerando estimativa de 2014 (SJÖLUND, M. *et al.*, 2014).

Ainda, é necessário considerar as infecções subclínicas por ETEC, em que não há uma manifestação clínica de infecção, porém o patógeno está presente na microbiota do animal sendo carregado no ambiente e podendo contaminar outros animais do rebanho. Não há um consenso sobre a prevalência de ETEC em animais assintomáticos, que varia consideravelmente de acordo com o estudo. Em análise transversal realizada em granjas suinícolas comerciais de ciclo completo na Argentina, foi observado 15,2% de prevalência de ETEC em suínos assintomáticos, bem como a presença de múltiplos

genótipos de ETEC circulantes nos rebanhos e coabitando os animais investigados (MOREDO *et al.*, 2015). Já em estudo realizado em granjas comerciais identificadas pelos autores como de pequeno a grande porte na África do Sul, a prevalência de ETEC chegou a 69,2% em suínos assintomáticos (OGUNDARE *et al.*, 2018). Em ambos os casos, a prevalência variou de acordo com a fase de desenvolvimento dos animais investigados, com um aumento significativo em animais recém desmamados na fase de creche, chegando de 66% a 90% (MOREDO *et al.*, 2015; OGUNDARE *et al.*, 2018). Tais observações indicam a importância do monitoramento de animais carreadores de ETEC subclínica para a prevenção de manifestação clínica e da disseminação do patógeno nos rebanhos.

## **2.2 Patogenicidade de *Escherichia coli* enterotoxigênicas que acometem suínos**

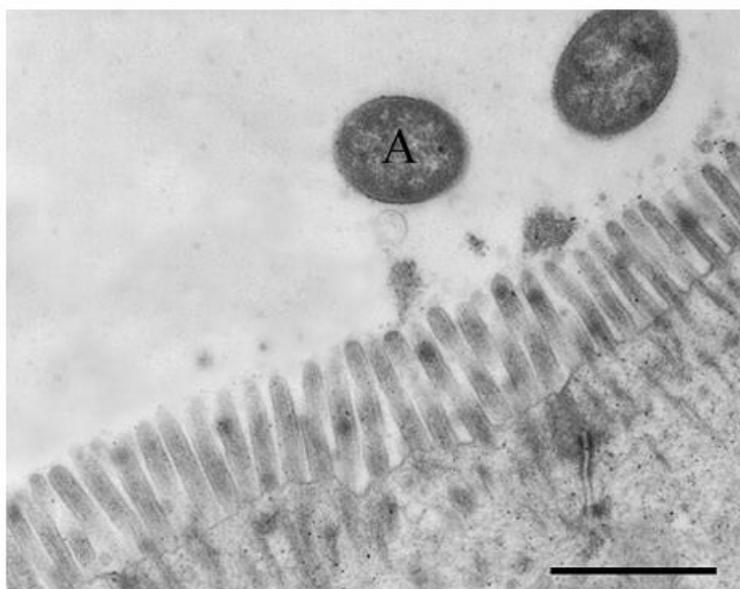
A patogenicidade de ETEC está diretamente relacionada à produção de dois principais grupos de fatores de virulência: as adesinas e as enterotoxinas. Em ETEC que acometem suínos, já foram descritos 10 marcadores deste patotipo na literatura (Tabela 2).

As adesinas, que podem ser fimbriais ou não-fimbriais, são essenciais para o estabelecimento da infecção por ETEC por possibilitarem a aderência bacteriana a receptores específicos localizados no tecido epitelial intestinal do hospedeiro, para então ocorrer a colonização intestinal (DUBREUIL *et al.*, 2016). A interação patógeno-hospedeiro promovida pelas adesinas de ETEC aos receptores tipicamente é sutil, sem um contato íntimo ou efeito notório na célula do hospedeiro, diferentemente da interação observada em outros patotipos de *E. coli* (GYLES; FAIRBROTHER, 2010) (Figura 1). Em suínos, as adesinas de ETEC mais comuns são as fimbriais F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P), F18 e F41, e já foi reportada a ocorrência da adesina não-fimbrial AIDA (do inglês *adhesion involved in diffuse adherence*) (MAINIL *et al.*, 2002) (Tabela 2). Em detalhe, F4 é encontrada em ETEC presentes ao longo de todo o ciclo de produção de suínos, podendo estar associada à colibacilose neonatal, diarreia pré-desmame e diarreia pós-desmame; enquanto que as adesinas F5, F6 e F41 são apenas encontradas em ETEC de leitões neonatos, estando exclusivamente associadas a casos de colibacilose neonatal; já F18 e AIDA são encontradas em animais na fase de pós-desmame, estando relacionada a ETEC causadora de diarreia pós-desmame (GYLES; FAIRBROTHER, 2010).

**Tabela 2 – Fatores de virulência encontrados em *Escherichia coli* enterotoxigênica que acometem suínos**

Fator	Descrição	Gene	Localização	Função	Fase animal	Doenças	Observações
F4	Adesina fimbrial K88	<i>fae</i>	plasmídeo	Adesão ao epitélio do intestino delgado	Todas	Colibacilose neonatal, colibacilose entérica complicada por choque, diarreia pré-desmame e diarreia pós-desmame	Até 50% dos suínos não possuem receptores para F4 (alelo do receptor é dominante, resistência herdada pela progênie); A prole com receptores para F4 oriunda de matrizes resistentes não recebe anticorpos anti-F4 no colostro, sendo altamente suscetíveis.
F5	Adesina fimbrial K99	<i>fan</i>	plasmídeo	Adesão ao epitélio do intestino delgado posterior	Neonatal	Colibacilose neonatal	Receptores para F5 são mais expressos em leitões neonatos, tendo sua expressão reduzida com a idade do animal.
F6	Adesina fimbrial 987P	<i>fas</i>	cromossomo e plasmídeo	Adesão ao epitélio do intestino delgado posterior	Neonatal	Colibacilose neonatal	Receptores para F6 são mais expressos em leitões neonatos, tendo sua expressão reduzida com a idade do animal.
F18	Adesina fimbrial F18	<i>fed</i>	plasmídeo	Adesão	Pós-desmame a adulta	Diarreia pós-desmame	Receptores para F18 estão ausentes em leitões neonatos, mas sua produção aumenta até o desmame.
F41	Adesina fimbrial F41	<i>fim41a</i>	cromossomo	Adesão ao epitélio do intestino delgado posterior	Neonatal	Colibacilose neonatal	Comumente expresso juntamente com F5.
AIDA	Adesina não-fimbrial envolvida em aderência difusa	<i>aidA</i>	plasmídeo	Adesão ao epitélio do intestino	Pós-desmame	Diarreia pós-desmame	Descrita inicialmente em humanos, com ainda poucos relatos em suínos.
LT	Enterotoxina termolábil	<i>eltAB</i>	plasmídeo	Ativação da produção de cAMP, secreção e menor absorção de Cl <sup>-</sup> , Na <sup>+</sup> e água.	Todas	Colibacilose neonatal, diarreia pré-desmame e diarreia pós-desmame	Comumente associado a F4 e a STb; Pode estimular a secreção por outros mecanismos de ação (prostaglandinas, citocinas, etc.); Efeito irreversível na célula hospedeira.
STa	Enterotoxina termoestável A	<i>estA</i>	plasmídeo (associada a transposons)	Ativação da produção de cGMP, inibição do sistema de cotransporte Na <sup>+</sup> /Cl <sup>-</sup> , secreção de água e Cl <sup>-</sup> pelas células.	Todas	Colibacilose neonatal, diarreia pré-desmame e diarreia pós-desmame	Efeito na célula hospedeira é reversível; Número de receptores para STa decresce com o envelhecimento do animal.
STb	Enterotoxina termoestável B	<i>estB</i>	plasmídeo	Elevação a absorção de Ca <sup>2+</sup> pela célula e da produção de prostaglandina E2 e 5-hidroxitriptamina, secreção de água e eletrólitos.	Todas	Colibacilose neonatal, diarreia pré-desmame e diarreia pós-desmame	Diarreia pode ser causada por ETEC que expressam apenas STb.
EAST1	Toxina termoestável enteroagregativa 1	<i>astA</i>	cromossomo e plasmídeo	Provável função semelhante a STa.	Neonatal a pós-desmame	Colibacilose neonatal, diarreia pré-desmame e diarreia pós-desmame	Comumente associado a F4; Possui 50% de homologia com o domínio de STa, interagindo com seu receptor; Sozinha não parece ser capaz de provocar doença, mas com LT causa quadro de diarreia.

cAMP: adenosina monofosfato cíclica; cGMP: guanosina monofosfato cíclica



**Figura 1 – Interação patógeno-hospedeiro de *Escherichia coli* enterotoxigênica e células do epitélio intestinal de suínos.** Microfotografia da ligação de ETEC às células epiteliais do íleo de um leitão no pós-desmame, mostrando uma aderência pouco íntima (A) e sem alterar a estrutura dos enterócitos do hospedeiro. Barra = 1  $\mu$ m. Fonte: Imagem retirada de GYLES; FAIRBROTHER, 2010.

Uma vez estabelecida no epitélio intestinal do hospedeiro, ETEC produz uma ou mais enterotoxinas que se ligam a receptores específicos, desencadeando a alteração da homeostase celular devido à desidratação e à secreção de eletrólitos, que levam à manifestação clínica de diarreia (DUBREUIL *et al.*, 2016). Até o momento, quatro enterotoxinas de ETEC que acometem suínos já foram descritas, sendo elas a termolábil LT e as termoestáveis STa, STb e EAST1 (GYLES; FAIRBROTHER, 2010) (Tabela 2).

Estes marcadores de ETEC por si não são determinantes da ocorrência de infecção nos animais contaminados, que também dependerá de fatores genéticos do hospedeiro que podem predispor para o estabelecimento da doença propriamente dita (RHOUMA *et al.*, 2017). Os fatores genéticos predisponentes incluem a expressão de receptores específicos aos fatores de virulência de ETEC pelas células epiteliais intestinais do hospedeiro. Suínos resistentes à ETEC não expressam receptores intestinais para as adesinas fimbriais F4 e F18, visto que o alelo responsável pela expressão destes receptores é dominante, onde animais com o genótipo homocigoto recessivo são resistentes a ETEC-F4/F18, enquanto animais com genótipos homocigoto dominante ou heterocigoto são suscetíveis à colonização ETEC-F4/F18 (GYLES; FAIRBROTHER,

2010). Além disso, sabe-se que matrizes resistentes à ETEC-F4 – por não possuírem receptor para F4 –, não produzem anticorpos anti-F4 naturalmente no colostro, fazendo com que sua prole seja altamente sensível a esta adesina (GYLES; FAIRBROTHER, 2010).

Ademais, sabe-se que a expressão de receptores para adesinas e enterotoxinas de ETEC também pode variar ao longo da vida do animal. No caso de ETEC-F5/F6, animais recém-nascidos apresentam maior susceptibilidade à colonização por estas cepas do que animais mais velhos, em que a expressão dos receptores de F5 e F6 é reduzida (FAIRBROTHER; NADEAU, 2019). De modo similar, a concentração e afinidade de receptores para a enterotoxina STa também varia com a idade do animal, sendo menos ativa com seu envelhecimento (FAIRBROTHER; NADEAU, 2019).

### **2.3 Patogenia das infecções por *Escherichia coli* enterotoxigênica em suínos e seus fatores predisponentes**

A transmissão de ETEC ocorre por via oro-fecal, através do contato com animais carreadores – sejam eles diarreicos ou assintomáticos – ou com o patógeno presente no ambiente (GYLES; FAIRBROTHER, 2010; EFSA/AHAW *et al.*, 2022). No entanto, o contato com o patógeno não é suficiente para o desenvolvimento de infecções por ETEC, que têm caráter multifatorial, e cujo risco aumentado está correlacionado a diversos fatores predisponentes já descritos na literatura até então (RHOUMA *et al.*, 2017). Como visto no item 2.2, fatores genéticos do hospedeiro contribuem para a evolução da infecção devido à expressão de receptores específicos para as adesinas de ETEC. Além disso, a saúde da matriz também está correlacionada à susceptibilidade dos leitões a infecções bacterianas, devido às condições durante a gestação e o parto, bem como devido à imunidade passiva sistêmica que é transmitida via colostro nos primeiros momentos de vida do leitão (PORTER *et al.*, 1970; LALLÈS *et al.*, 2007; MELKEBEEK *et al.*, 2013; RHOUMA *et al.*, 2017). O período de lactação e a idade ao desmame também podem favorecer a ocorrência de infecções por ETEC, uma vez que o leite da matriz confere imunidade passiva lactogênica aos leitões através da transmissão de imunoglobulinas A (IgA) (PORTER *et al.*, 1970; MELKEBEEK *et al.*, 2013; RHOUMA *et al.*, 2017). Sendo assim, o desmame representa um momento de grande estresse aos animais em virtude da mudança brusca de alimentação que modifica a fisiologia de seu TGI (LALLÈS *et al.*, 2007).

Outros fatores contribuintes para infecções por ETEC incluem as condições ambientais da granja e manejo dos animais, tais como densidade de animais, controle térmico, regime alimentar e histórico de infecções virais (LAINE *et al.*, 2008; RHOUMA *et al.*, 2017). Portanto, na presença destes fatores predisponentes, o patógeno pode estabelecer um quadro infeccioso de ETEC no hospedeiro – como colibacilose neonatal, colibacilose entérica complicada por choque, diarreia pré-desmame ou diarreia pós-desmame (FAIRBROTHER; NADEAU, 2019) –, a depender da fase de desenvolvimento do animal acometido e dos fatores de virulência expressos pelo patógeno (Tabela 1; Tabela 2).

A colibacilose neonatal ocorre em animais logo após seu nascimento até o quarto dia de vida, quando são expostos pela primeira vez a um ambiente contaminado com a microbiota intestinal da matriz (FAIRBROTHER; NADEAU, 2019). Além disso, o TGI dos leitões ainda é imunologicamente imaturo e apresenta pH alcalino com baixa capacidade proteolítica, favorecendo a ocorrência de infecções gastrintestinais (LAWLEY; WALKER, 2012; LUPPI, 2017). As cepas de ETEC que causam esta doença podem apresentar as adesinas fimbriais F4, F5, F6 e F41 (Tabela 2), colonizando principalmente a porção posterior do jejuno e íleo (FAIRBROTHER; NADEAU, 2019). Uma vez aderidas ao TGI do leitão, a maioria das ETEC envolvidas na colibacilose neonatal produzem a enterotoxina STa, que se liga a glicoproteína receptora guanilato ciclase C e ativa uma cascata de sinalização intracelular, com o acúmulo de monofosfato de guanósina cíclico (cGMP), ativação da quinase II cGMP-dependente, fosforilação do canal de cloreto regulador de condutância transmembrana de fibrose cística (CFTR), que culmina na secreção de íons  $\text{Cl}^-$  e  $\text{HCO}_3^-$  e inibição da absorção de  $\text{Na}^+$ , resultando no quadro de diarreia e desidratação (DUBREUIL *et al.*, 2016).

No caso da colibacilose entérica complicada por choque, a doença ocorre em leitões antes e após o desmame e as cepas de ETEC envolvidas geralmente possuem a adesina F4 (FAIRBROTHER; NADEAU, 2019). Como mencionado anteriormente, em casos de choque, a morte do animal normalmente ocorre antes de qualquer manifestação clínica da infecção, sendo causada muito provavelmente pela rápida liberação de lipopolissacarídeos (LPS) que estimulam a superprodução de mediadores de inflamação, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e as interleucinas (IL) IL-1 e IL-6, que

recrutam neutrófilos causando danos no endotélio vascular, perda de líquidos e choque hipovolêmico (DUBREUIL *et al.*, 2016).

Os casos de diarreia em leitões antes do desmame ainda na fase de amamentação são menos relatados na literatura, mas sabe-se que compartilham os mecanismos de patogenia da diarreia pós-desmame, porém com sinais clínicos mais moderados e baixos índices de mortalidade (FAIRBROTHER; NADEAU, 2019). Nestes casos, as cepas de ETEC envolvidas possuem a adesina fimbrial F4 e uma ou mais enterotoxinas – STa, STb, LT e/ou EAST-1 (Tabela 2) –, e a gravidade da doença depende principalmente da titulação de anticorpos presentes no leite das matrizes, que geralmente decresce com a idade dos animais lactentes (DEPREZ *et al.*, 1986).

A diarreia pós-desmame ocorre nos primeiros 14 dias após os desmame (ERIKSEN *et al.*, 2021), devido às mudanças alimentares, alterações fisiológicas do TGI dos animais neste período, e ao estresse associado à retirada do contato com a matriz e adaptação ao ambiente de creche com o contato com outros leitões (LALLÈS *et al.*, 2004; RHOUMA *et al.*, 2017). As ETEC envolvidas nesta doença usualmente possuem as adesinas fimbriais F4 e/ou F18, porém há relatos de casos de diarreia por ETEC negativas para estes fatores; alguns isolados de ETEC ainda possuem a adesina não-fimbrial AIDA. A toxicidade das cepas se dá pela presença de uma ou mais enterotoxinas – STa, STb, LT e/ou EAST-1 –, tendo relatos de infecção híbrida com *E. coli* produtoras de shiga toxina (STEC) devido à presença da toxina Stx2e, comum na doença do edema (FAIRBROTHER; NADEAU, 2019). O mecanismo de STa é equivalente ao observado na colibacilose neonatal, resultando no estímulo da produção de cGMP e secreção de fluidos. Já a enterotoxina STb se liga a receptores glicosfingolípídeos sulfatide, amplamente distribuídos no epitélio intestinal, tendo uma ação rápida, porém de moderada potência, que é iniciada pelo aumento da absorção de  $Ca^{2+}$ , ativação da proteína quinase C, fosforilação de CFTR, e culmina na inibição da absorção de  $Na^{+}$  e liberação dos secretagogos prostaglandina-E2 e 5-hidroxitriptamina, induzindo a secreção de água e eletrólitos pela célula (DUBREUIL *et al.*, 2016). A toxina EAST-1 compartilha similaridades biológicas e físicas com STa, mas seu papel em quadros de diarreia em suínos ainda não é completamente caracterizado, não sendo capaz de causar doença quando expressa sozinha (NGELEKA *et al.*, 2003); portanto, EAST-1 não é considerada um marcador de virulência de ETEC. Por fim, a enterotoxina LT, além de sua toxicidade,

também atua promovendo a adesão e colonização no hospedeiro (BERBEROV *et al.*, 2004). A toxina LT se liga a receptores ganglosídeos e é internalizada por endocitose, sendo levada até o complexo de Golgi e retículo endoplasmático, onde é translocada para o citoplasma, ativando permanentemente a adenilato ciclase na camada basolateral da célula. O aumento nos níveis de adenosina monofosfato cíclico (cAMP,) leva à ativação de CFTR, causando o aumento da secreção de Cl<sup>-</sup> e HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, redução na absorção de Na<sup>+</sup> e perda de água pela célula devido ao equilíbrio osmótico (DUBREIUL *et al.*, 2016).

Com isso, em virtude da ampla diversidade de subtipos de *E. coli* com diferentes conjuntos de marcadores de virulência de ETEC envolvidos em infecções gastrintestinais (GYLES; FAIRBROTHER, 2010), o monitoramento epidemiológico de granjas suínolas se faz necessário no intuito de reduzir os riscos de contaminação, conter os prejuízos associados e garantir a saúde do rebanho. Para isso, ferramentas moleculares para identificação de marcadores de ETEC se fazem essenciais para o monitoramento microbiológico e determinação da prevalência deste patógeno nas granjas, sendo amplamente empregadas em estudos da área (MOREDO *et al.*, 2015. LUPPI *et al.*, 2016).

#### **2.4 Dinâmica patógeno-hospedeiro: interação entre *Escherichia coli* enterotoxigênica, a microbiota intestinal e o sistema imunológico dos suínos**

A microbiota intestinal de mamíferos exerce um papel determinante na dinâmica patógeno-hospedeiro através da modulação do SI do hospedeiro, que precisa se adaptar para tolerar a colonização por bactérias simbiotes e, concomitantemente, manter a capacidade de reconhecer e combater patógenos (CERF-BENSUSSAN; GABORIAU-ROUTHIAU, 2010). No caso dos patobiontes – bactérias potencialmente patogênicas –, a colonização por si não se traduz necessariamente em uma infecção (hospedeiros assintomáticos), causando doença apenas frente a algum desbalanço imunológico do hospedeiro (CERF-BENSUSSAN; GABORIAU-ROUTHIAU, 2010), mas podendo impactar na diversidade bacteriana local. Visto isso, é possível inferir quais os componentes da comunidade bacteriana são indicativos de uma microbiota saudável – sinalizando um hospedeiro menos suscetível à infecção – e quais componentes estão associados a um determinado patógeno. O desequilíbrio da interação entre a microbiota e o SI, dependendo do contexto genético do hospedeiro e das condições ambientais, pode aumentar sua susceptibilidade a patógenos e desencadear a resposta imune (ZHENG *et*

*al.*, 2020). Esta dinâmica é amplamente estudada em humanos e cada vez mais explorada no âmbito veterinário.

Em suínos, estudos de caracterização da comunidade bacteriana intestinal através do sequenciamento do gene *16S-rDNA* por plataformas de sequenciamento de nova geração (NGS) vêm se tornando mais frequentes (KIM; ISAACSON, 2015; LUO *et al.*, 2022). Com isso, foi possível estabelecer a dinamicidade da microbiota intestinal ao longo da vida do suíno (WANG *et al.*, 2019b). A colonização bacteriana inicia imediatamente após o nascimento, quando a microbiota intestinal ainda é imatura, tornando o animal mais propenso a infecções gastrintestinais e a problemas de digestão e ganho de peso; e é moldada com o avanço de seu desenvolvimento até atingir a maturidade completa na fase de crescimento e terminação, contribuindo para a performance dos animais e diminuindo sua susceptibilidade a infecções gastrintestinais (LUO *et al.*, 2022). Inicialmente, a microbiota intestinal de leitões neonatos se assemelha à composição encontrada no solo das granjas, na pele e no leite da matriz, e se modifica de acordo com a microbiota ambiental (CHEN *et al.*, 2017). Durante a amamentação, os principais gêneros encontrados na microbiota intestinal dos leitões são *Bacteroides*, *Escherichia* e *Lactobacillus* (LUO *et al.*, 2022); e, apesar de *E. coli* ser uma das primeiras bactérias a colonizar o TGI de leitões neonatos, sua abundância decai logo após o desmame (WANG *et al.*, 2019b). No desmame, período do maior estresse para os leitões, a mudança de dieta base – de leite para alimentação sólida – modifica abruptamente a composição da microbiota intestinal, onde *Prevotella*, *Lactobacillus* e *Oscillispira* são mais abundantes (LUO *et al.*, 2022); e afeta o funcionamento do TGI, prejudicando o ganho de peso dos animais (BIAN *et al.*, 2016). Após esta fase, a microbiota intestinal tende a se estabilizar até atingir a maturidade em animais adultos, onde é composta principalmente por *Prevotella*, *Lactobacillus* e *Streptococcus*. Além das mudanças ao longo das fases de desenvolvimento, outros fatores podem atuar modulando a composição bacteriana intestinal, como fatores genéticos, condições de manejo e ambiente da granja, exposição a patógenos, uso de antibióticos, dieta e suplementação com probióticos (KIM; ISAACSON, 2015). Apesar desta dinamicidade de composição, foi possível estabelecer a microbiota central do TGI de suínos saudáveis, independentemente de sua fase de desenvolvimento, contendo majoritariamente bactérias dos gêneros *Bacteroides*, *Prevotella* e *Lactobacillus* (LUO *et al.*, 2022). O estabelecimento de uma microbiota

intestinal “saudável” nas fases iniciais de vida dos suínos é determinante para a maturação imunológica, o desenvolvimento das funções fisiológicas do TGI, e para garantir uma composição microbiana adequada e estável em sua vida adulta (XU *et al.*, 2016).

Sabe-se que a homeostase da microbiota intestinal se reflete na saúde intestinal dos suínos, através da modulação de funções metabólicas e imunológicas do organismo. Como visto anteriormente, a presença de receptores nas células do epitélio intestinal do hospedeiro serve como uma barreira inicial para a colonização bacteriana; ademais, bactérias comensais podem prevenir a colonização de eventuais patógenos através da exclusão competitiva (DUARTE; KIM, 2018). A imunidade passiva transmitida da matriz para o leitão através do colostro e durante a amamentação é essencial para a prevenção de infecções gastrintestinais. Sabe-se que, em indivíduos saudáveis, a microbiota comensal estimula a produção de peptídeos microbicidas e secreção de IgA, que protegem o hospedeiro da translocação de bactérias e seus metabólitos e da ativação de cascatas pró-inflamatórias (MACPHERSON; UHR, 2004; VAISHNAVA *et al.*, 2008). Porém, é importante ressaltar que, quando se estuda a modulação da reposta imune de suínos frente a um determinado patógeno, é preciso considerar o contexto fisiológico do animal. Por exemplo, sabe-se que o processo de desmame é um período de grande estresse para os leitões que pode modular seu sistema imune ainda pouco desenvolvido (SALLADRIAS-GARCÍA, *et al.*, 2021).

Os efeitos imunológicos associados à presença de determinado patógeno no organismo podem ser inferidos através do monitoramento de marcadores de reposta imune. Por exemplo, TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória cujo mecanismo de ação tem grande relevância em doenças infecciosas gastrintestinais por aumentar a permeabilidade do epitélio intestinal (YE *et al.*, 2006), sendo um mediador essencial para o estabelecimento de inflamação no TGI (AL-SADI *et al.*, 2013). A produção de TNF- $\alpha$  geralmente está associada à liberação simultânea de interleucinas (IL-1 $\beta$  e IL-8) para potencializar a resposta pró-inflamatória a infecções bacterianas (PIÉ *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2019). As mucinas, presentes no muco intestinal, também são importantes componentes da resposta imune, tendo papel na interação entre a microbiota e o epitélio intestinal e estando correlacionadas com a imunidade inata e respostas inflamatórias no TGI (LINDEN *et al.*, 2008; CHAIRATANA; NOLAN, 2017). Diversos genes codificadores de mucinas já foram descritos em mamíferos, com regulação diferencial a

depender da região do TGI, sendo regulados positivamente na presença de citocinas inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-9, IL-13, interferons e TNF- $\alpha$ ) ou de produtos microbianos (LINDEN *et al.*, 2008). Outro marcador intestinal do SI são os fatores trefoil (TFF), peptídeos reguladores que atuam no reparo da mucosa e proteção do TGI (WANG *et al.*, 2019a), tendo papel importante em doenças inflamatórias locais (EMIDIO *et al.*, 2019).

No caso de infecções por ETEC, se sabe que há uma redução na diversidade microbiana intestinal em suínos acometidos, bem como uma diminuição da razão *Bacteroidota:Firmicutes*, que são os dois filos mais abundantes no TGI destes animais (BIN *et al.*, 2018). A redução da razão *Bacteroidota:Firmicutes* é inclusive utilizada como biomarcador de disbiose intestinal em suínos, também sendo observada em outras infecções diarreicas não causadas por ETEC (KIM *et al.*, 2022). Outras mudanças na composição da microbiota intestinal frente à infecção por ETEC incluem um aumento da abundância de *Proteobacteria* e redução de *Lactobacillus* (KIM *et al.*, 2022). Quanto ao SI, considerando que infecções por ETEC têm caráter não-invasivo, a imunidade da mucosa intestinal dos leitões obtida através do leite (imunidade lactogênica) é mais importante para a resposta contra este patógeno do que a obtida no recebimento do colostro (imunidade sistêmica) (MELKEBEEK *et al.*, 2013). Visto isso, a vacinação das matrizes contra patótipos de *E. coli* ou mesmo sua exposição prévia ao patógeno presente no ambiente fazem com que maiores quantidades de IgA estejam presentes no leite, sendo passadas para os leitões e conferindo uma maior barreira contra a colonização de ETEC no seu TGI (LUPPI, 2017); portanto, a presença de anticorpos específicos no leite das matrizes, em quantidades adequadas, é fundamental para a imunidade de mucosa dos leitões.

A presença de LPS – componente imunogênico da parede celular de bactérias Gram-negativas, incluindo ETEC – elevam os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ , sugerindo a indução da inflamação local (SCHILLING *et al.*, 2001; XIAO *et al.*, 2021). Além disso, a infecção por ETEC pode alterar a expressão de *MUC2*, que codifica para a mucina 2 – proteína mais abundante no muco intestinal de suínos –, que pode ser regulado tanto positiva quanto negativamente a depender do momento de infecção (KIM *et al.*, 2022). Estudos anteriores demonstraram que *MUC2* tem sua expressão aumentada em leitões durante o pico de infecção por ETEC (de dois a sete dias

após a contaminação) (KIM *et al.*, 2019; XUE *et al.*, 2014) e reduzida após o pico de infecção (após 14 dias da contaminação) (KIM *et al.*, 2019). Não obstante, leitões saudáveis durante o desmame também apresentam redução da expressão de mucinas (*MUC2* e *MUC13*) (SALLADRIAS-GARCÍA, *et al.*, 2021) e, similarmente, aumento da expressão do peptídeo regulador *TFF2* (TAO *et al.*, 2015); portanto a interpretação de tais variações nos marcadores de resposta imune deve considerar a fase de vida do animal. Por fim, em nível sistêmico, a infecção por ETEC pode levar a uma inflamação sistêmica e sepse, sendo indicada pelo aumento gradual da contagem de neutrófilos e linfócitos e pela elevação dos níveis da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  (KIM *et al.*, 2022).

Apesar da riqueza de dados disponíveis sobre o assunto, a maioria dos estudos utilizam modelos de infecção induzida por ETEC, desconsiderando o contexto de produção dos animais em suas análises. Mais do que isso, o efeito de ETEC na saúde intestinal de suínos portadores assintomáticos, seja no âmbito da microbiota intestinal ou na modulação imunológica de marcadores, ainda é desconhecido e se soma à falta de dados claros sobre a prevalência de ETEC nas granjas.

## **2.5 Eixo intestino-pulmão: papel de patógenos intestinais na homeostase respiratória de suínos**

A homeostase da microbiota intestinal está associada às funções metabólicas e imunológicas do hospedeiro, não se limitando à resposta local da mucosa intestinal, mas também impactando na manutenção de outros sítios no hospedeiro (SHREINER *et al.*, 2015; ANAND; MANDE, 2018). O eixo intestino-pulmão é bastante explorado na área humana, indicando a associação da disbiose intestinal com quadros respiratórios infecciosos e não-infecciosos (SHUKLA *et al.*, 2017); e, de modo similar, alterações na microbiota do trato respiratório devido a infecções também podem modular a microbiota e imunidade intestinal do hospedeiro (ANAND; MANDE, 2018). Portanto, o eixo intestino-pulmão é bidirecional e interconectado, sendo modulado mutuamente em ambos os sítios. No entanto, estudos de caracterização da microbiota pulmonar (trato respiratório superior) são dificultados pelos métodos de coleta disponíveis, que incidem em um risco aumentado de contaminação pela microbiota do trato respiratório superior e, conseqüentemente, falham em representar com acurácia a complexidade das comunidades bacterianas pulmonares e distingui-las das comunidades de outros locais do trato respiratório (HAUPTMANN; SHCAIBLE, 2016). Quanto a modulação do SI,

evidências sugerem a existência de um mecanismo de resposta comum de mucosa (SI de mucosas), em que as alterações sofridas pela mucosa intestinal podem influenciar a resposta imune de sítios de mucosa distal, incluindo o pulmão (MESTECKY, 1987; HAUPTMANN; SHCAIBLE, 2016). Neste sentido, a interleucina IL-22 age no SI de mucosas promovendo a produção de peptídeos antimicrobianos, a regeneração do epitélio, a produção de muco e a regulação de sistemas de reparo (ZENEWICZ; FLAVELL, 2011; BELKAID; HAND, 2014). Além disso, mediadores de proteção imunológica existentes no epitélio do trato respiratório, como  $\beta$ -defensinas e cateciclina, atuam modulando a microbiota pulmonar e SI através de suas atividades antimicrobianas e imunomodulatórias (TECLE *et al.*, 2010).

Em suínos, estudos sobre o eixo intestino-pulmão ainda são escassos, porém recentemente, alguns grupos vêm explorando como a microbiota intestinal influencia na susceptibilidade dos animais a infecções respiratórias, e como estas infecções podem resultar na disbiose intestinal nos animais acometidos. Em detalhe, em estudo investigando o papel da microbiota intestinal de suínos em quadros de pneumonia enzoótica causada por *Mycoplasma hyopneumoniae*, se observou que a composição da microbiota nas fases iniciais de vida está correlacionada com a gravidade de infecção, onde a abundância de determinados táxons bacterianos – incluindo *Ruminococcus*, *Prevotella*, *Ruminiclostridium* e *Oscillospira* – estava associada a menores níveis de lesão pulmonar, indicando quadros de baixa gravidade da doença (NAIR *et al.*, 2019). Outro estudo demonstrou que suínos com infecção induzida por *Mycoplasma hyorhinis* apresentaram resposta inflamatória sistêmica e local nos pulmões com alteração nos níveis de citocinas pró-inflamatórias circulantes (ZHANG *et al.*, 2022). Quanto aos efeitos intestinais, foi observada uma redução da expressão de *MUC2*, indicando possível disfunção da barreira intestinal, e alteração da microbiota intestinal com a redução da razão *Bacteroidota:Firmicutes* e aumento da abundância de patógenos oportunistas – como *Alistipes*, *Blautia*, *Ruminococcus*, *Desulfovibrio*, *Escherichia/Shigella*, e *Bacteroides* –, causando uma disfunção da barreira intestinal (ZHANG *et al.*, 2022). Ademais, casos de coinfeções intestinais associadas a patógenos respiratórios também já foram relatados. Animais desafiados com vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (PRRSV), além de apresentarem uma maior abundância de patógenos respiratórios na microbiota de fluido bronco alveolar, como *Haemophilus* e *Mycoplasma*,

também apresentaram abundância de *Campylobacter* e *Clostridium* na microbiota intestinal, sugerindo uma possível coinfeção intestinal ao quadro de PRRSV, corroborando com a ocorrência de diarreia em suínos infectados (JIANG *et al.*, 2019).

Os efeitos de *E. coli* intestinais em infecções respiratórias se refletem na imunidade, na barreira intestinal e no metabolismo do hospedeiro, fazendo destas bactérias potenciais alvos terapêuticos (WEI *et al.*, 2023). Diversos trabalhos em humanos já relacionaram a abundância aumentada de *E. coli* intestinal com a ocorrência de infecções pulmonares virais e bacterianas (GU *et al.*, 2020; QIN *et al.*, 2015; WU *et al.*, 2020). Como mencionado anteriormente, o aumento de *E. coli* na microbiota intestinal eleva os níveis de citocinas pró-inflamatórias e LPS, induzindo não apenas resposta imune local no TGI, mas também no trato respiratório; com isso, pode agravar o quadro respiratório inicial e causar sinais clínicos similares aos de gastroenterites (WEI *et al.*, 2023). Ademais, *E. coli* é capaz de fazer translocação para outros sítios (ZHANG *et al.*, 2020).

No caso de infecções por ETEC, não há relatos avaliando o papel deste patógeno na saúde respiratória de suínos e estudos em humanos ou utilizando modelos animais são raros. Em modelo murino de infecção induzida por ETEC via intranasal, por exemplo, se observou a infiltração de neutrófilos e macrófagos nos pulmões através de exames histopatológicos (BYRD *et al.*, 2003). No entanto, o modelo proposto pelos autores é bastante questionável e a interpretação dos dados é limitada, visto que o pulmão não é o sítio alvo de ETEC, não possuindo receptores para suas adesinas ou enterotoxinas. Ademais, o contexto fisiológico do trato respiratório restringe ainda mais o estudo da dinâmica infecciosa de ETEC neste sítio, devido à ausência das condições encontradas no TGI (pH ácido e enzimas digestivas), bem como divergências na composição da microbiota pulmonar.

De modo geral, o estudo do eixo intestino-pulmão é uma importante ferramenta para elucidar os mecanismos relacionados à patogenicidade, à susceptibilidade e à resposta imunológica da interação patógeno-hospedeiro. Tendo em vista a ausência de estudos que investigam o papel de ETEC na dinâmica do eixo intestino-pulmão em suínos, este trabalho visa desvendar a interação patógeno-hospedeiro de ETEC e suínos – carreadores e não-carreadores do patógeno – em diferentes fases de desenvolvimento através de uma abordagem molecular.

### 3 PERGUNTAS CIENTÍFICAS

- A presença de ETEC no TGI de suínos, sejam diarreicos ou assintomáticos, é capaz de causar a disbiose da microbiota intestinal ou alterar a resposta imune destes animais?
- Qual o impacto de ETEC na dinâmica do eixo intestino-pulmão, considerando os reflexos na microbiota e no SI de mucosa e sistêmico, de leitões portadores de ETEC assintomáticos e diarreicos?
- É possível otimizar o método de sequenciamento por *amplicon* para amostras biológicas com baixa densidade microbiana maximizando os dados gerados sem criar viés durante a análise metataxonômica?

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo geral**

Relacionar a presença ETEC no TGI de suínos portadores – diarreicos ou assintomáticos – com a modulação da microbiota bacteriana intestinal e pulmonar, e com a expressão gênica de marcadores de resposta imune.

### **4.2 Objetivos específicos**

- a) Buscar por genes marcadores de ETEC (enterotoxinas e adesinas) para determinar a ocorrência deste patógeno em suínos em diferentes fases de desenvolvimento (maternidade, creche, crescimento e adulta), caracterizando seu estado de carreador de ETEC;
- b) Caracterizar a microbiota intestinal e respiratória dos suínos analisados, e correlacionar estes dados com a presença ou ausência de ETEC;
- d) Analisar os níveis de expressão gênica de marcadores do SI, considerando sua expressão sistêmica (sangue) e local (ceco e pulmão), e correlacionar estes dados com a presença ou ausência de ETEC;
- e) Elucidar como ETEC influencia a dinâmica do eixo intestino-pulmão em leitões, considerando os dados da caracterização das microbiotas e da expressão gênica de marcadores de SI nestes sítios;
- f) Padronizar um método alternativo para o sequenciamento por *amplicon* de amostras biológicas com baixa densidade microbiana para a investigação da microbiota nestes sítios.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

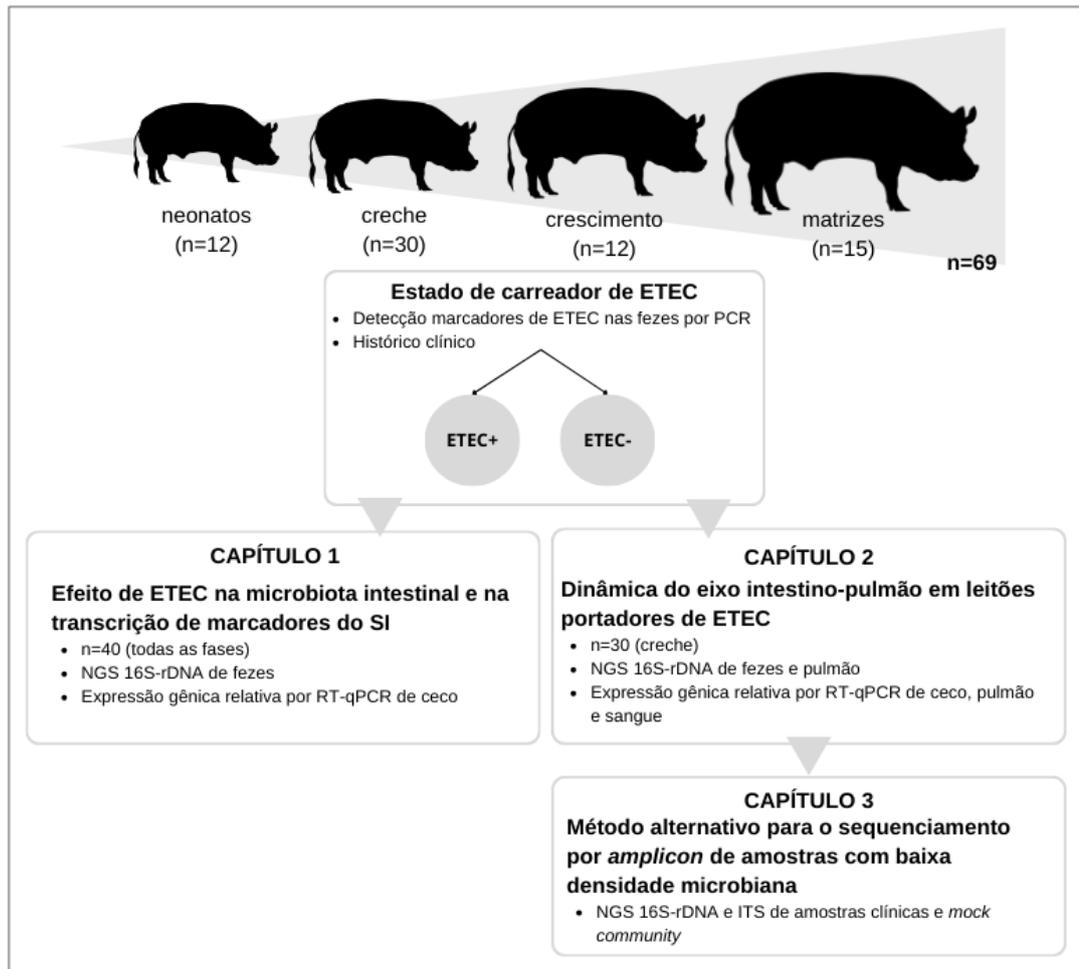
### 5.1 Desenho experimental

Um total de 69 suínos em quatro fases de desenvolvimento foram analisados: maternidade (n=12), creche (n=30), crescimento (n=12), e reprodução (representada pelas matrizes, n=15). Os animais foram amostrados por conveniência de duas granjas distintas. Os dados clínicos dos lotes coletados foram registrados e apenas animais sem histórico de uso de antibioticoterapia nos 30 dias anteriores foram coletados. Todos os animais foram avaliados quanto à presença de genes marcadores de virulência de ETEC nas fezes. A partir destes dados, os três Capítulos desta Tese foram desenvolvidos (Figura 2).

Para a realização do Capítulo 1, 40 animais incluindo suínos carreadores de ETEC (ETEC+, n=20) e não-carreadores (ETEC-, n=20) tiveram sua microbiota bacteriana intestinal caracterizada a partir do DNA isolado das fezes. Para a determinação do perfil de expressão gênica de marcadores do SI no ceco, 18 animais foram selecionados, sendo ETEC+ (n=9) e ETEC- (n=9) e representando as fases de maternidade, creche e crescimento (n=3 ETEC+ e n=3 ETEC- de cada fase amostrada).

No Capítulo 2, 30 leitões em fase de creche foram analisados. Os dados clínicos dos animais foram considerados juntamente com a busca molecular por marcadores de ETEC para selecionar 20 leitões nos grupos: i) ETEC- sem sinais clínicos (n=3); ii) ETEC+ assintomáticos (n=10); e iii) ETEC+ diarreicos (n=6). Os animais selecionados tiveram a microbiota intestinal e pulmonar, e o perfil de expressão gênica de marcadores do SI no ceco, pulmão e sistêmico analisados.

O Capítulo 3, pensado e desenvolvido diante da dificuldade de se obter dados viáveis para a determinação da microbiota do trato respiratório inferior devido à baixa densidade microbiana no pulmão, utilizou os dados de microbiota intestinal de três suínos para a validação de um método alternativo de amplificação para sequenciamento de *16S-rDNA* e ITS. Em conjunto, também foram incluídos dados de uma *mock community* e de outros sítios de baixa e alta densidade microbiana de amostras clínicas provenientes projetos desenvolvidos anteriormente no laboratório.



**Figura 2 – Desenho experimental empregado nesta Tese.** Desenvolvimento da Tese em três Capítulos a partir da coleta de amostras de fezes de suínos em granjas e detecção molecular de marcadores de ETEC. O Capítulo 1 investiga o efeito de ETEC na microbiota intestinal e na transcrição de marcadores do SI em suínos em diferentes fases de desenvolvimento. O Capítulo 2 aborda como ETEC impacta na dinâmica do eixo intestino-pulmão em leitões na fase de creche, incluindo seus efeitos na microbiota e expressão gênica de marcadores locais e sistêmicos do SI nestes sítios. Por fim, o Capítulo 3 traz a validação de um método alternativo para o sequenciamento de amostras de baixa densidade microbiana, inspirado na dificuldade de se obter dados metataxonômicos de qualidade para a caracterização da microbiota do trato respiratório inferior de leitões no Capítulo 2.

## 5.2 Coleta de amostras

Todas as coletas foram realizadas de acordo com o Protocolo de Uso de Animais para Experimentação aprovado pela CEUA/UFRGS, nº 33558. A coleta de fezes foi realizada diretamente da ampola retal dos animais e as amostras foram mantidas refrigeradas até o isolamento de DNA. As amostras de tecido de ceco e pulmão foram coletadas de animais imediatamente após o abate. Fragmentos de 40 mg de pulmão foram seccionados e mantidos refrigerados até o isolamento de DNA. Concomitantemente, fragmentos de 20 mg de ceco e pulmão foram seccionados e lavados com PBS 1X e

armazenados respectivamente em 500 µL de TRIzol (Invitrogen, Massachusetts, EUA) a -80 °C até isolamento de RNA. Amostras de sangue foram coletadas da veia jugular em tubos contendo 3,2% de citrato e centrifugadas a 3,000 x g por 30 min a 4 °C, para a separação das células brancas, que foram então lavadas com PBS 1 X até completa remoção das hemácias e armazenadas em 250 µL de TRIzol (Invitrogen, Massachusetts, EUA) a -80 °C até o isolamento de RNA.

### **5.3 Extração de ácidos nucleicos**

O DNA metagenômico total das amostras de fezes foi isolado através de *DNeasy PowerSoil kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. Para o isolamento do DNA metagenômico total das amostras de pulmão, foi realizado um pré-tratamento para otimizar a extração através da maceração com micropistilo em 200 µL de PBS 1X, e digestão enzimática com 1 mg de lisozima (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) a 37 °C por 90 min, e com 0,2 mg de proteinase K (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) a 65 °C por 90 min. Em paralelo, foi realizada a extração de uma *blank community* para a posterior descontaminação das bibliotecas amostrais de possíveis contaminantes provenientes dos reagentes e do processo de extração. Os DNA extraídos tiveram sua qualidade aferida através de espectrofotômetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, EUA), e foram quantificados através do fluorômetro Qubit 2.0 (Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, EUA) utilizando os kits Qubit™ dsDNA BR e Qubit™ dsDNA HS (Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, EUA).

Para o isolamento de RNA total, foi adicionado um volume de TRIzol (Invitrogen, Massachusetts, EUA) às amostras de células brancas, ceco e pulmão, e seguiu-se o protocolo de extração orgânica. Uma etapa de maceração com o auxílio de micropistilo e nitrogênio líquido foi realizada previamente à extração para as amostras de ceco e pulmão. A integridade dos RNA extraídos foi verificada em eletroforese em gel de agarose 1%, e a qualidade e quantificação foram aferidas através de espectrofotômetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, EUA). Apenas RNA íntegros e com razão entre absorbâncias 260 nm e 280 nm adequadas ( $A_{260/280} = 1.8-2.0$ ) seguiram para as análises subsequentes.

#### 5.4 Identificação molecular de fatores de virulência de *Escherichia coli* enterotoxigênica em amostras de fezes

Cinco fatores de virulência marcadores de ETEC que acometem suínos foram investigados, utilizando *primers* previamente descritos para as enterotoxinas STa, STb e LT, e as adesinas fimbriais F4 e F5 (Tabela 3) (BOERLIN *et al.*, 2005). As reações em cadeia da polimerase (PCR) *singleplex* foram realizadas em 25 µL contendo 1 X de tampão, 0,2 mM dNTP, 2,0 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,2 µM de cada *primer*, e 1 U de Taq DNA Polymerase recombinant (Invitrogen, Massachusetts, EUA); e as condições de ciclagem incluíram uma desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, 30 ciclos de 94 °C por 45 s, 50 °C por 30 s e 72 °C por 30 s, e uma extensão final a 72 °C por 5 min. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2%. Os animais foram considerados ETEC<sup>+</sup> quando detectado pelo menos um dos genes investigados, e ETEC<sup>-</sup> quando negativos para todos os genes investigados.

**Tabela 3 – Lista de *primers* utilizados nas reações de PCR para a detecção de marcadores de virulência de *Escherichia coli* enterotoxigênica em amostras de fezes de suínos.**

Fator	Descrição	Gene	ID	Sequência (5'-3')	Fragmento (pb)
F4	Adesina fimbrial K88	<i>fae</i>	F4-L	GTTGGTACAGGTCTTAATGG	499
			F4-R	GAATCTGTCCGAGAATATCA	
F5	Adesina fimbrial K99	<i>fan</i>	F5-L	AATACTTGTTTCAGGGAGAAA	230
			F5-R	AACTTTGTGGTTAACTTCCT	
LT	Enterotoxina termolábil	<i>eltAB</i>	LT-L	GGCGTTACTATCCTCTCTAT	272
			LT-R	TGGTCTCGGTCAGATATGT	
STa	Enterotoxina termoestável A	<i>estA</i>	STa-L	CAACTGAATCACTTGACTCTT	158
			STa-R	TTAATAACATCCAGCACAGG	
STb	Enterotoxina termoestável B	<i>estB</i>	STb-L	TGCCTATGCATCTACACAAT	113
			STb-R	CTCCAGCAGTACCATCTCTA	

pb: pares de base amplificados com o conjunto de *primers*

#### 5.5 Amplificação da região V4 do gene *16S-rDNA* e sequenciamento de nova geração (NGS)

Para a caracterização de microbiota bacteriana intestinal e pulmonar dos animais investigados, a região V4 do gene *16S-rDNA* foi amplificada empregando os *primers* 515F 5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3' e 806R 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3' (KOZICH *et al.*, 2013) já acoplados às sequências de adaptadores da plataforma Illumina na região 5' de cada *primer*. As reações de PCR

foram realizadas em 50 µL contendo 1 X de tampão, 0.2 mM dNTP, 2.0 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.5 µM de cada *primer*, 1 U de Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Massachusetts, EUA), e 12,5 ng de DNA metagenômico; e as condições de ciclagem incluíram uma desnaturação inicial a 94 °C por 3 min, 25 ciclos de 94 °C por 30 s, 55 °C por 30 s e 72 °C por 30 s, e uma extensão final a 72 °C por 3 min. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% e enviados para o sequenciamento *pair-end* 2 x 250 bp pela plataforma Illumina MiSeq (MS-102-2003 MiSeq® Reagent Kit v2, 500 ciclos).

### **5.6 Análises *in silico* da microbiota bacteriana intestinal e pulmonar de suínos carregadores e não-carregadores de *Escherichia coli* enterotoxigênicas**

A microbiota bacteriana intestinal e pulmonar dos suínos investigados foi analisada através de um *script* desenvolvido por nosso grupo (DE CARLI *et al.*, 2021). Brevemente, a qualidade das *reads* brutas foi analisada com o *software* FastQC v.0.11.9 (ANDREWS, 2010) e sequências curtas (<80 nt) ou de baixa qualidade (Phred<30) foram removidas através do *software* Trimmomatic (BOLGER *et al.*, 2014). As *reads* filtradas seguiram para análise no *software* QIIME2 v.2020.2 (ESTAKI *et al.*, 2020) com o pacote DADA2 (CALLAHAN *et al.*, 2016) para o pareamento de *reads*, remoção de quimeras e agrupamento de variantes de sequência amplificada (ASV). A afiliação taxonômica foi realizada com base no banco de dados SILVA 138.1 v.2022 (classificador silva-138-99-515-806-nb-classifier.qza) (QUAST *et al.*, 2012).

As análises subsequentes foram realizadas no RStudio v.2021.09.0 (RSTUDIO TEAM, 2015), incluindo a remoção de sequências provenientes de eucariontes, arqueas, cloroplastos e mitocôndrias através do pacote phyloseq (MCMURDIE; HOLMES, 2013), e, quando necessário, a descontaminação das bibliotecas amostrais com base na biblioteca da *blank community* através do pacote microDecon (MCKNIGHT *et al.*, 2019). Posteriormente, foram utilizados os pacotes ANCOM-BC (LIN; PEDDADA, 2020), dysbiosisR (SHETTY, 2022), eulerr (LARSSON, 2022), ggplicrust2 (YANG *et al.*, 2023), ggplot2 (WICKHAM, 2016), microbiome and microbiomeutilities (LAHTI *et al.*, 2017), microbiomeMarker (CAO *et al.*, 2022), ranacapa (KANDLIKAR *et al.*, 2018) e vegan (OKSANEN *et al.*, 2017) para a realização de análises de qualidade do sequenciamento, diversidade e composição das comunidades, e elaboração de gráficos para a visualização dos dados.

## 5.7 Perfil de expressão gênica sistêmica e local de marcadores do sistema imune de suínos carreadores e não-carreadores de *Escherichia coli* enterotoxigênica

Um total de 11 marcadores do SI de suínos foram selecionados para avaliar os impactos da presença de ETEC na expressão gênica de alvos locais (no ceco e pulmão) e sistêmicos (células brancas): *IL1B*, *IL4*, *IL6*, *IL10*, *IL22*, *TNF*, *MUC2*, *TFF2*, *CD36*, *DEGB1* e *PMAP-36*. O gene codificador de  $\beta$ -actina (*ACTB*) foi utilizado como referência para a análise. Para estes alvos, foram construídos *primers* específicos (Tabela 4).

A partir de RNA das amostras de células brancas, ceco e pulmão, foi realizada a síntese de DNA complementar (cDNA) através de reações de transcrição reversa (RT) usando o kit Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (MMLV; Invitrogen, Massachusetts, EUA), empregando 500 ng de mRNA e *primers* Oligo(dT)12–18 (Invitrogen, Massachusetts, EUA). As reações de PCR quantitativa (qPCR) foram realizadas pelo equipamento Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, EUA) empregando PowerUp SYBR Green Master mix (Applied Biosystem, Massachusetts, EUA), de acordo com as instruções do fabricante para 10  $\mu$ L de reação contendo 10 ng de cDNA. Após a ciclagem, foi realizada análise da curva de dissociação para a verificação da especificidade e pureza dos produtos amplificados (Tabela 4). Cada amostra biológica foi testada em triplicata técnica.

O nível de expressão gênica dos alvos analisados foi determinado em cada sítio e normalizado de acordo com a expressão do gene de referência *ACTB*. A expressão relativa de cada alvo foi calculada pelo método PFFAFL (PFFAFL, 2001), considerando o valor de eficiência dos *primers* determinado pelo *software* RDML-LinRegPCR (Untergasser *et al.*, 2021). Para comparar os níveis de expressão relativa dos alvos nos grupos ETEC- e ETEC+, foram realizadas análises estatísticas no *software* GraphPad Prism v.7 através de ANOVA com teste Tukey ou Kruskal-Wallis com teste Dunn para comparações múltiplas ( $p < 0.05$ ) para dados paramétricos e não-paramétricos, respectivamente.

**Tabela 4 – Lista de *primers* utilizados em RT-qPCR para análise da expressão gênica relativa de marcadores do sistema imune de suínos.**

Alvo	Gene	Gene ID	Função	Sítios alvo	Sequência (5'-3')	Fragmento (pb)	Eficiência dos <i>primers</i> *
$\beta$ -actina	<i>ACTB</i>	414396	Gene normalizador	Intestino, pulmão, sistêmico	f: GCAGAAGGAGATCACG r: TGCTGGAAGGTGGACAG	123	1,638
Interleucina 1 beta	<i>IL1B</i>	397122	Citocina pró-inflamatória, proliferação e diferenciação celular; mediador da resposta inflamatória; ativação de macrófagos	Intestino, sistêmico	f: CACACTAGGGTCACTGGC r: ATCTTTCACAGACTGCT	142	1,843
Interleucina 4	<i>IL4</i>	397225	Citocina anti-inflamatória, indução do recrutamento de eosinófilos, estímulo às células produtoras de muco; estímulo à produção de anticorpos pelos linfócitos B; perpetuação e ativação de mastócitos	Pulmão, sangue	f: GCACATCTACAGACACCACA r: CCTTCATAATCGTCTTTAGCCT	152	1,888
Interleucina 6	<i>IL6</i>	399500	Citocina pró-inflamatória, estímulo da resposta imunológica; proliferação e diferenciação celular	Intestino	f: TGGGTTCATCAGGAGAC r: TGGTGGCTTTGTCTGGAT	185	1,712
Interleucina 10	<i>IL10</i>	397106	Citocina anti-inflamatória, inibição da produção de citocinas; manutenção da homeostase celular	Intestino, pulmão, sistêmico	f: TGAGGTATCAGAGGTAATAAATATC r: CCAGGATGACGACTCTACTAAAC	143	1,847
Interleucina 22	<i>IL22</i>	595104	Citocina, estímulo à produção de defensinas; reparo de tecidos	Pulmão	f: CAAGCGTGAAGGTGCGGTT r: GCGGACATCTGGGAGC	167	1,576
Fator de necrose tumoral	<i>TNF</i>	397086	Citocina pró-inflamatória, indução de apoptose	Intestino, pulmão, sistêmico	f: CACCACGCTCTTCTGC r: GCTGTCCCTCGGCTTTGAC	170	1,844
Mucina 2	<i>MUC2</i>	100127145	Proteína secretora de mucina, proteção contra danos físicos e químicos	Intestino	f: ACAGACAGGTGGTGGCG r: GGACAGAGAAGGAGAGGC	129	1,828
Fator trefoil 2	<i>TFF2</i>	397420	Peptídeos reparadores, inibição da motilidade intestinal; inibição da secreção gástrica	Intestino	f: GGGTCAACTGCGGATTC r: CACTCCTCAGACTCTTGC	127	1,835
CD36	<i>CD36</i>	733702	Glicoproteína de membrana, presente em fagócitos; internalização de células apoptóticas	Intestino	f: GAGCGAGCCAGAGATTG r: GTTCATTTACGGTTGAGAGA	139	1,828
Defensina beta 1	<i>DEFB1</i>	396819	Peptídeo citotóxico, ação constitutiva no sistema de defesa do hospedeiro; ação antimicrobiana	Pulmão	f: CACCAGCCACCAGCAT r: ACACACGCCTTTATTCCTTA	128	1,818
Peptídeo antibacteriano	<i>PMAP-36</i>	100170124	Peptídeo antimicrobiano, ação antimicrobiana	Pulmão	f: CAGAGTGTGGACGATTTAG r: CAGAGCAGGCATATTTAGG	160	1,852

pb: pares de base amplificados com o conjunto de *primers*

\*calculada pelo *software* RDML-LinRegPCR (Untergasser *et al.*, 2021)

## **6 RESULTADOS**

Tendo em vista os objetivos desta Tese, os resultados obtidos estão apresentados e são discutidos no formato de artigos científicos. Esta Tese conta com três Capítulos, cada um representado um artigo científico: o Capítulo 1 avalia o efeito de ETEC na microbiota intestinal e na transcrição de marcadores locais do SI de suínos em diferentes fases de desenvolvimento; o Capítulo 2 investiga o impacto de ETEC na dinâmica do eixo intestino-pulmão em leitões na fase de creche, considerando seu potencial de modulação da microbiota e da transcrição de marcadores locais e sistêmicos do SI nestes sítios; e o Capítulo 3 apresenta um método alternativo para o preparo e sequenciamento de amostras de baixa densidade microbiana.

## **7 CAPÍTULO 1 – Efeito de *Escherichia coli* enterotoxigênica na modulação da microbiota intestinal e na expressão gênica de marcadores do sistema imune de suínos em diferentes fases de desenvolvimento**

### ***Carrier state of enterotoxigenic Escherichia coli virulence markers in pigs: effects on gut microbiota modulation and immune markers transcription***

Visando elucidar o papel de ETEC na modulação da microbiota intestinal e na expressão gênica de marcadores do SI em suínos portadores de ETEC assintomáticos, foi elaborado o presente Capítulo, sendo apresentado na forma de artigo científico. A formatação utilizada a seguir segue os critérios da revista científica em que o trabalho foi submetido e se encontra atualmente em revisão. O material suplementar deste manuscrito está disponível no APÊNDICE A desta Tese.

A participação de Gabriela Merker Breyer inclui:

- Participação no desenho experimental;
- Seleção e desenho dos alvos do SI de suínos empregados nas reações de RT-qPCR;
- Execução da etapa experimental, incluindo extração de ácidos nucleicos, aferição da qualidade e quantificação dos DNA e RNA, PCR para amplificação de *16S-rDNA* (V4), síntese de cDNA e reações de RT-qPCR;
- Execução da etapa *in silico* de análise dos dados metataxonômicos;
- Análises estatísticas dos dados gerados;
- Elaboração das figuras;
- Interpretação e discussão dos resultados obtidos;
- Escrita do artigo científico.

## **8 CAPÍTULO 2 – Dinâmica do eixo intestino-pulmão em leitões portadores de *Escherichia coli* enterotoxigênica**

### ***Enterotoxigenic Escherichia coli as a modulator of gut-lung microbiota and immune response in piglets***

Com o objetivo de elucidar a dinâmica do eixo intestino-pulmão em leitões portadores de ETEC – assintomáticos ou diarreicos –, foi elaborado o presente Capítulo, apresentado em forma de artigo científico. A formatação utilizada segue os critérios da revista científica a qual o trabalho foi submetido e se encontra atualmente em revisão. O material suplementar deste manuscrito está disponível no APÊNDICE B desta Tese.

A participação de Gabriela Merker Breyer inclui:

- Participação no desenho experimental;
- Seleção e desenho dos alvos do SI de leitões empregados nas reações de RT-qPCR;
- Execução da etapa experimental, incluindo extração de ácidos nucleicos, aferição da qualidade e quantificação dos DNA e RNA, PCR para amplificação de *16S-rDNA* (V4), síntese de cDNA e reações de RT-qPCR;
- Execução da etapa *in silico* dos dados metataxonômicos;
- Análises estatísticas dos dados gerados;
- Elaboração das figuras;
- Interpretação e discussão dos resultados obtidos;
- Escrita do artigo científico.

## 9 CAPÍTULO 3 – Desenvolvimento e validação de método alternativo para o sequenciamento por *amplicon* de amostras com baixa densidade microbiana

### *Alternative amplicon-PCR protocol for maximizing bacterial and fungal sequencing in low-biomass samples*

Em virtude das dificuldades enfrentadas no Capítulo 2 para o sequenciamento do gene *16S-rDNA* de amostras de pulmão, bem como nas enfrentadas em outras amostras de sítios com baixa densidade microbiana em outros projetos do grupo de pesquisa, surgiu a ideia de desenvolver um método alternativo que permitisse a análise destes sítios. Portanto, foi elaborado o presente Capítulo, que está apresentado na forma de artigo científico. O trabalho foi publicado em 23 de dezembro de 2023 na revista científica *Analytical Biochemistry* (Fator de Impacto: 2.219; Qualis A2) sob *digital object identifier* (DOI): 10.1016/j.ab.2023.115449.

A participação da aluna Gabriela Merker Breyer inclui:

- Idealização da metodologia proposta;
- Participação no desenho experimental;
- Execução da etapa experimental, incluindo extração de ácidos nucleicos, aferição da qualidade e quantificação dos DNA e PCR para amplificação de *16S-rDNA* (V4) e ITS.
- Execução da etapa *in silico* dos dados metataxonômicos;
- Análises estatísticas dos dados gerados;
- Elaboração das figuras;
- Interpretação e discussão dos resultados obtidos;
- Escrita do artigo científico.

## 10 CONCLUSÃO

Com o avanço de ferramentas de sequenciamento de alto desempenho, os estudos metataxonômicos se tornaram parte ativa dos avanços na saúde humana e animal, auxiliando no melhor entendimento da interação patógeno-hospedeiro e contribuindo para a Medicina Veterinária Preventiva. Partindo desta premissa, o presente trabalho empregou técnicas de biologia molecular, incluindo NGS e RT-qPCR, para elucidar como o patógeno gastrointestinal ETEC interage com suínos portadores, considerando seu potencial de modulação da microbiota e da resposta imune do hospedeiro.

Os dados obtidos através desta abordagem demonstraram que a presença de ETEC reduz a diversidade das comunidades bacterianas que habitam o TGI e direcionam para uma condição de disbiose em animais diarreicos e assintomáticos. Os efeitos da modulação da microbiota intestinal por ETEC também afetam a imunidade de mucosa, tendo sido observada a expressão diferencial de genes marcadores de resposta imune em suínos portadores. Tais observações não se limitam ao TGI, sendo também observadas no trato respiratório dos animais analisados e, com isso, comprovando a existência de redes de interação no eixo intestino-pulmão em suínos.

Por fim, este trabalho também propõe um método alternativo para o sequenciamento por *amplicon* de amostras com baixa densidade microbiana, idealizado frente às dificuldades enfrentadas durante a análise metataxonômica de amostras de pulmão suíno. Através do método aqui proposto, foi possível obter dados de qualidade e sem viés para a caracterização do trato respiratório de suínos, bem como auxiliou diversos outros estudos realizados pelo grupo de pesquisa.

## 11 IMPACTO SOCIAL E CIENTÍFICO DOS RESULTADOS DESTA TESE

Os efeitos de ETEC na microbiota e sistema imune de suínos portadores, mesmo que sem manifestação de sinais clínicos, primordialmente salientam a importância do monitoramento de ETEC nas granjas suinícolas considerando seu impacto na imunidade de mucosa dos animais e eventual favorecimento de infecções oportunistas no TGI e trato respiratório. Como a atividade suinícola pode sofrer grandes impactos econômicos em casos de infecções oportunistas, os resultados obtidos auxiliarão na redução destas infecções e consequentemente de perdas econômicas.

Ademais, esta Tese contribui para a comunidade científica por elucidar a dinâmica do eixo intestino-pulmão em leitões, que ainda é pouco explorado na área veterinária. A abordagem de análise metataxonômica realizada para o entendimento deste eixo pode ser empregada não apenas para patógenos intestinais, mas em diversos outros cenários vivenciados na suinocultura.

Não obstante, esta Tese propõe um método alternativo para o sequenciamento por *amplicon* de amostras com baixa densidade microbiana, que pode ser aplicada em diferentes áreas para mitigar as dificuldades relacionadas a sítios de difícil recuperação de material genético fúngico ou bacteriano, possibilitando assim a caracterização da microbiota de sítios antes desconhecidos ou até mesmo considerados estéreis.

Sobretudo, esta Tese destaca como as metodologias metataxonômicas podem ser empregadas em pesquisa na área veterinária, com o intuito enriquecer o conhecimento atual sobre a patogenia de doenças e a dinâmica patógeno-hospedeiro e contribuir para a Medicina Veterinária Preventiva.

## 12 REFERÊNCIAS

- AL-SADI, R. *et al.* TNF- $\alpha$  modulation of intestinal epithelial tight junction barrier is regulated by ERK1/2 activation of Elk-1. **The American Journal of Pathology**, v. 183, n. 6, p. 1871–1884, dez. 2013.
- ANAND, S.; MANDE, S.S. Diet, microbiota and gut-lung connection. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2147, set. 2018.
- ANDREWS, S. FASTQC: A quality control tool for high throughput sequence data. (Version 0.11.9). **Babraham Institute**, 2010. Disponível em: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. Acesso em: 2 de maio de 2022.
- BELKAID, Y.; HAND, T. Role of the Microbiota in Immunity and inflammation. **Cell**, v. 157, n. 1, p. 121–141, mar. 2014.
- BERBEROV, E.M. *et al.* Relative importance of heat-labile enterotoxin in the causation of severe diarrheal disease in the gnotobiotic piglet model by a strain of enterotoxigenic *Escherichia coli* that produces multiple enterotoxins. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 7, p. 3914–3924, jul. 2004.
- BIAN, G. *et al.* Age, introduction of solid feed and weaning are more important determinants of gut bacterial succession in piglets than breed and nursing mother as revealed by a reciprocal cross-fostering model. **Environmental Microbiology**, v. 18, n 5 p. 1566–1577, mar. 2021.
- BIN, P. *et al.* Intestinal microbiota mediates enterotoxigenic *Escherichia coli*-induced diarrhea in piglets. **BMC Veterinary Research**, v. 14, n. 385, dez. 2018.
- BOERLIN, P. *et al.* Antimicrobial resistance and virulence genes of *Escherichia coli* isolates from swine in Ontario. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 6753–6761, nov. 2005.
- BOLGER, A.M. *et al.* Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, ago. 2014.
- BYRD, W. *et al.* Pathogenicity and immune response measured in mice following intranasal challenge with enterotoxigenic *Escherichia coli* strains H10407 and B7A. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 1, p. 13–21, jan. 2003.
- CALLAHAN, B.J. *et al.* DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods**, v. 13, n. 7, p. 581–583, jul. 2016.
- CAO, Y. *et al.* microbiomeMarker: an R/Bioconductor package for microbiome marker identification and visualization. **Bioinformatics**, v. 38, n. 16, p. 4027–4029, ago. 2022.
- CEPEA; CNA – Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada; Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil. PIB do agronegócio brasileiro. **Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ)**, 2022. Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/pib-do-agronegocio-brasileiro.aspx>. Acesso em: 14 jun. 2023.

CERF-BENSUSSAN, N.; GABORIAU-ROUTHIAU, V. The immune system and the gut microbiota: friends or foes? **Nature Reviews Immunology**, v. 10, p. 735–744, set. 2010.

CHAIRATANA, P.; NOLAN, E.M. Defensins, lectins, mucins, and secretory immunoglobulin A: microbe-binding biomolecules that contribute to mucosal immunity in the human gut. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 52, n. 1, p. 45–56, fev. 2017.

CHEN, X. *et al.* Co-occurrence of early gut colonization in neonatal piglets with microbiota in the maternal and surrounding delivery environments. **Anaerobe**, v. 49, p. 30-40, fev. 2017.

CROXEN, M.A. *et al.* Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 822–880, out. 2013.

DE CARLI, S. *et al.* Cows' reproductive performances and parity order influences the cervicovaginal fungal community. **Microbial Pathogenesis**, v. 162, p. 105351, jan. 2021.

DEPREZ, P. *et al.* The influence of the administration of sow's milk on the postweaning excretion of hemolytic *E. coli* in the pig. *Veterinary Research Communications*, v. 10, p. 469–478, dez. 1986.

DUARTE, M.E.; KIM, S.W. Intestinal microbiota and its interaction to intestinal health in nursery pigs. **Animal Nutrition**, v. 8, n. 1, p. 169–184, mar. 2018.

DUBREUIL, J.D. *et al.* Animal enterotoxigenic *Escherichia coli*. **EcoSal Plus**, v. 7, n. 1, 10112, out. 2016.

EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW) *et al.* Assessment of listing and categorisation of animal diseases within the framework of the Animal Health Law (Regulation (EU) No 2016/429): antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in dogs and cats, horses, swine, poultry, cattle, sheep and goats. **EFSA Journal**, v. 20, n. 5, e07311, mai. 2022.

EMIDIO, N.B. *et al.* Trefoil factor family: unresolved questions and clinical perspectives. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 44, n. 5, p. 387–390, abr. 2019.

ERIKSEN, E.Ø. *et al.* Post-weaning diarrhea in pigs weaned without medicinal zinc: risk factors, pathogen dynamics, and association to growth rate. **Porcine Health Management**, v. 7, n. 54, out. 2021.

ESTAKI, M. *et al.* QIIME 2 Enables comprehensive end-to-end analysis of diverse microbiome data and comparative studies with publicly available data. **Current protocols in bioinformatics**, v. 70, n. 1, p. e100, jun. 2020.

FAIRBROTHER, J.M.; NADEAU, É. Colibacillosis, p. 807–834. In: ZIMMERMAN, J.J.; KARRIKER, L.A.; RAMIREZ, A.; SCHWARTZ K.J.; STEVENSON, G.W.; ZHANG, J. (eds.). **Diseases of Swine**. Hoboken, NJ: John Wiley & Son, 2019.

FAS/USDA – Foreign Agricultural Service/United States Department of Agriculture. **Livestock and Poultry: World Markets and Trade**. Global Market Analysis, abr. 2023.

GU, S. *et al.* Alterations of the gut microbiota in patients with Coronavirus disease 2019 or H1N1 Influenza. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 10, p. 2669–2678, nov. 2020.

GYLES, C.L.; FAIRBROTHER, J.M. *Escherichia coli*, p. 267–308. In: GYLES, C.L.; PRESCOTT, J.F.; SONGER, J.G.; THOEN, C.O. (eds.). **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. New York, NY: Wiley-Blackwell, 2010.

HAUPTMANN, M.; SCHAIBLE, U.E. Linking microbiota and respiratory disease. **FEBS Letters**, v. 590, n. 21, p. 3721–3738, nov. 2016.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Agropecuária. **IBGE**, 2021. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/br>. Acesso em: 14 de jun. 2023.

JENSEN, S.R. *et al.* Distinct inflammatory and cytopathic characteristics of *Escherichia coli* isolates from inflammatory bowel disease patients. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 305, n. 8, p. 925–936, dez. 2015.

JIANG, N. *et al.* Illumina MiSeq sequencing investigation of microbiota in bronchoalveolar lavage fluid and cecum of the swine infected with PRRSV. **Current Microbiology**, v. 76, n. 2, p. 222–230, fev. 2019.

KANDLIKAR, G.S. *et al.* ranacapa: An R package and Shiny web app to explore environmental DNA data with exploratory statistics and interactive visualizations. **F1000Research**, v. 7, p. 1734, nov. 2018.

KAPER, J.B. *et al.* Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123–140, fev. 2004.

KIM, H.B.; ISAACSON, R.E. The pig gut microbial diversity: understanding the pig gut microbial ecology through the next generation high throughput sequencing. **Veterinary Microbiology**, v. 177, p. 242–251, jun. 2015.

KIM, K. *et al.* Dietary supplementation of *Bacillus subtilis* influenced intestinal health of weaned pigs experimentally infected with a pathogenic *E. coli*. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 10, n. 52, jun. 2019.

KIM, K. *et al.* Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection of weaned pigs: Intestinal challenges and nutritional intervention to enhance disease resistance. **Frontiers in Immunology**, v. 13, n. 885253, ago. 2022.

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, set. 2013.

LAHTI, L. *et al.* Tools for microbiome analysis in R. (Version 2.1.28). **Bioconductor**, 2017. Disponível em: <https://github.com/microbiome/microbiome>. Acesso em 14 de janeiro de 2022.

LAINÉ, T.M. *et al.* Risk factors for post-weaning diarrhoea on piglet producing farms in Finland. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 50, n. 1, 21, jun. 2008.

LALLÈS, J.P. *et al.* Gut function and dysfunction in young pigs: physiology. **Animal Research**, v. 53, p. 301–316, mai. 2004.

LALLÈS, J.P. *et al.* Weaning – A challenge to gut physiologists. **Livestock Science**, v. 108, n. 1–3, p. 82–93, mai. 2007.

LARSSON, J. eulerr: Area-Proportional Euler and Venn Diagrams with Ellipses. (Version 7.0.0). **The Comprehensive R Archive Network**. 2022. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=eulerr>. Acesso em: 18 de janeiro de 2024.

LAWLEY, T.D., WALKER, A.W. Intestinal colonization resistance. **Immunology**, v. 138, n. 1, p. 1–11, jan. 2013.

LIN, H.; PEDDADA, S.D. Analysis of compositions of microbiomes with bias correction. **Nature Communications**, v. 11, 3514, jul. 2020.

LINDEN, S.K. *et al.* Mucins in the mucosal barrier to infection. **Mucosal Immunology**, v. 1, p. 183–197, mar. 2008.

LUO, Y. *et al.* Dynamic distribution of gut microbiota in pigs at different growth stages: composition and contribution. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 3, e0068821, jun. 2022.

LUPPI, A. *et al.* Prevalence of virulence factors in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhoea in Europe. **Porcine Health Management**, v. 2, n. 20, set. 2016.

LUPPI, A. Swine enteric colibacillosis: diagnosis, therapy and antimicrobial resistance. **Porcine Health Management**, v. 3, n. 16, ago. 2017.

MACPHERSON, A.J.; UHR, T. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. **Science**, v. 303, n. 5564, p. 1662–1665, mar. 2004.

MAINIL, J.G. *et al.* DNA sequences coding for the F18 fimbriae and AIDA adhesin are localised on the same plasmid in *Escherichia coli* isolates from piglets. **Veterinary Microbiology**, v. 86, n. 4, p. 303–11, mai. 2002.

MCMURDIE, P.J.; HOLMES, S. Phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e61217, abr. 2013.

MCKNIGHT, Donald T. *et al.* microDecon: A highly accurate read-subtraction tool for the post-sequencing removal. **Environmental DNA**, v. 1, p. 14–25, mai. 2019.

MELKEBEEK, V. *et al.* ETEC vaccination in pigs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 152, n. 1–2, p. 37–42, mar. 2013.

MESTECKY, J. The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions. **Journal of Clinical Immunology**, v. 7, n. 4, p. 265–276, jul. 1987.

MOREDO, F.A. *et al.* Enterotoxigenic *Escherichia coli* subclinical infection in pigs: bacteriological and genotypic characterization and antimicrobial resistance profiles. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 12, n. 8, p.704–711, ago. 2015.

NAIR, M.S. *et al.* Influence of pig gut microbiota on *Mycoplasma hyopneumoniae* susceptibility. **Veterinary Research**, v. 50, n. 1, p. 86, out. 2019.

NGELEKA, M. *et al.* Isolation and association of *Escherichia coli* AIDA-I/STb, rather than EAST1 pathotype, with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 15, n. 3, p. 242–52, mai. 2003.

OGUNDARE, S.T. *et al.* Risk factors for prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in diarrheic and non-diarrheic neonatal and weaner pigs, South Africa. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 31, n. 2, p. 149–154, fev. 2018.

OKSANEN, F.J. *et al.* Vegan: Community Ecology Package. (Version 2.4.3). **The Comprehensive R Archive Network**. 2017. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>. Acesso em: 18 de janeiro de 2024.

PFFAFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acid Research**, v. 29, n. 9, p. e45, mai. 2001.

PIÉ, S. *et al.* Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 3, p. 641–647, mar. 2004.

PORTER, P. *et al.* Secretory IgA and Antibodies to *Escherichia coli* in porcine colostrum and milk and their significance in the alimentary tract of the young pig. **Immunology**, v. 18, p. 245–257, fev. 1970.

QIN, N. *et al.* Influence of H7N9 virus infection and associated treatment on human gut microbiota. **Scientific Reports**, v. 5, n. 14771, out. 2015.

QUAST, C. *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic acids research**, v. 41, p. D590-6, jan. 2013.

RHOUMA M. *et al.* Post weaning diarrhea in pigs: risk factors and non-colistin-based control strategies. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 59, n. 31, mai. 2017.

RSTUDIO TEAM. RStudio: Integrated Development Environment for R (Version 2021.09.0). **RStudio**, 2015. Disponível em: <http://www.rstudio.com/>. Acesso em 14 de janeiro de 2022.

SALADRIGAS-GARCÍA, M. *et al.* Understanding host-microbiota interactions in the commercial piglet around weaning. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 23488, dez. 2021.

SCHILLING, J.D. *et al.* Bacterial invasion augments epithelial cytokine responses to *Escherichia coli* through a lipopolysaccharide-dependent mechanism. **Journal of Immunology**, v. 166, n. 2, p. 1148–1155, jan. 2001.

SHETTY, S.A. *et al.* dysbiosisR: an R package for calculating microbiome dysbiosis measures. **GitHub**. 2022. Disponível em: <https://github.com/microsud/dysbiosisR>. Acesso em: 18 de janeiro de 2024.

SHUKLA, S.D. *et al.* Microbiome effects on immunity, health and disease in the lung. **Clinical & Translational Immunology**, v. 6, n. 3, p. e133, mar. 2017.

SHREINER A.B. *et al.* The gut microbiome in health and in disease. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 31, n. 1, p. 69–75, jan. 2015.

SILVA, L.B. *et al.* The role of TNF- $\alpha$  as a proinflammatory cytokine in pathological process. **Open Dentistry Journal**, v. 13, p. 332–338, set. 2019.

SJÖLUND, M. *et al.* **Financial impact on pig production. Part III. Gastrointestinal disorders.** *In: European Symposium of Porcine Health Management*, n° 6, 2014, Sorrento, Italy, p. 189.

TAO, X. *et al.* Transient changes of enzyme activities and expression of stress proteins in the small intestine of piglets after weaning. **Archives of animal nutrition**, v. 69, n. 3, p. 201–211, abr. 2015.

TECLE, T. *et al.* Review: Defensins and cathelicidins in lung immunity. **Innate Immunity**, v. 16, n. 3, p. 151–159, jun. 2010.

TENAILLON, O. *et al.* The population genetics of commensal *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 207–217, mar. 2010.

UNTERGASSER, A. *et al.* Web-based LinRegPCR: application for the visualization and analysis of (RT)-qPCR amplification and melting data. **BMC Bioinformatics**, v. 22, n. 1, p. 398, ago. 2021.

VAISHNAVA, S. *et al.* Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**. USA, v. 105, n. 52, p. 20858–20863, dez. 2008.

WANG, S. *et al.* Deoxynivalenol inhibits porcine intestinal trefoil factors expression in weanling piglets and IPEC-J2 cells. **Toxins**, v. 11, n. 11, p. 670, nov. 2019a.

WANG, X. *et al.* Longitudinal investigation of the swine gut microbiome from birth to market reveals stage and growth performance associated bacteria. **Microbiome**, v. 7, n 109, jul. 2019b.

WEI, L. *et al.* Intestinal *Escherichia coli* and related dysfunction as potential targets of Traditional Chinese Medicine for respiratory infectious diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 313, n. 116381, set. 2023.

WICKHAM, H. **ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis**. New York, USA: Springer-Verlag, 2016.

WU, T. Alterations in the gut microbiome and cecal metabolome during *Klebsiella pneumoniae*-induced pneumosepsis. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. 1331, jul. 2020.

XIAO, X., *et al.* Gut immunity and microbiota dysbiosis are associated with altered bile acid metabolism in LPS-challenged piglets. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, n. 663 4821, mar. 2021.

XU, J. *et al.* Effects of early intervention with sodium butyrate on gut microbiota and the expression of inflammatory cytokines in neonatal piglets. **PLoS One**, v. 11, n. 9, e0162461, set. 2016.

XUE, Y. *et al.* Host inflammatory response inhibits *Escherichia coli* O157:H7 adhesion to gut epithelium through augmentation of mucin expression. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 5, p. 1921–1930, mai. 2014.

YANG, C. *et al.* ggpicrust2: an R package for PICRUSt2 predicted functional profile analysis and visualization. **Bioinformatics**, v. 39, n. 8, btad470, ago. 2023.

YE, D. *et al.* Molecular mechanism of tumor necrosis factor alpha modulation of intestinal epithelial tight junction barrier. **American Journal of Physiology, Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 290, n.3, p. G496-G504, mar. 2006.

ZENEWICZ, L.A.; FLAVELL, R.A. Recent advances in IL-22 biology. **International Immunology**, v. 23, n. 3, p. 159–163, mar. 2011.

ZHANG, X. *et al.* Nitrate is crucial for the proliferation of gut *Escherichia coli* caused by H9N2 AIV infection and effective regulation by Chinese herbal medicine ageratum-liquid. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 555739, out. 2020.

ZHANG, Y. *et al.* Dysbiosis of gut microbiota and intestinal barrier dysfunction in pigs with pulmonary inflammation induced by *Mycoplasma hyorhinis* infection. **mSystems**, v. 7, n. 4, e0028222, jun. 2022.

ZHENG, D. *et al.* Interaction between microbiota and immunity in health and disease. **Cell Research**, v. 30, p. 492–506, mai. 2020.