**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

# Diferença de patogenicidade entre *Escherichia coli* enteroinvasora e *Shigella flexneri* em modelo experimental de infecção intestinal

Ana Carolina Ramos Moreno

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Profa. Tit. Marina Baquerizo Martinez
Co-orientador:
Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida

São Paulo
2008

J9.282

DEDALUS - Acervo - CQ

30100013892

**Ficha Catalográfica**
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Moreno, Ana Carolina Ramos
M843d Diferença de patogenicidade entre *Escherichia coli* enteroinvasora e *Shigella flexneri* em modelo experimental de infecção intestinal / Ana Carolina Ramos Moreno . -- São Paulo, 2008.
110p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Martinez, Marina Baquerizo
Co-orientador: Almeida, Sandro Rogério de

1. Microbiologia médica 2. Microorganismo patogênico : Medicina 3. Inflamação : Medicina I. T. II. Martinez, Marina Baquerizo, orientador. III. Almeida, Sandro Rogério de, co-orientador

616.01 CDD

Ana Carolina Ramos Moreno

Diferença de patogenicidade entre *Escherichia coli* enteroinvasora e *Shigella flexneri* em modelo experimental de infecção intestinal

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Tit. Marina Baquerizo Martinez
orientador/presidente

Prof. Dr. Osvaldo Augusto Brazil Esteves Sant'Anna
1°. examinador

Profa. Dra. Rita de Cássia Ruiz
2°. examinador

Profa. Dra. Roxane Maria Fontes Piazza
3°. examinador

Profa. Dra. Beatriz Ernestina Cabilio Guth
4°. examinador

São Paulo, 22 de 08 de 2008.

*É preciso ter força, é preciso ter raça, é preciso ter gana sempre... Quem trás no corpo essa marca mistura a dor e a alegria.*

*É preciso ter manha, é preciso ter graça é preciso ter sonhos sempre... Quem trás na pele essa marca possui a estranha mania de ter fé na vida*

***Agradeço a Deus, por me orientar, pela proteção e por todos os momentos em que me acolheu em minhas orações... Muito obrigada.***

*Dedico, com muito amor, este trabalho...*

*À minha mãe (in memorian)*

*Sinônimo de amor é você! Ser único que se doa, sem muitas vezes, nada ter em troca. Sinônimo de mãe é você! Nasci e no mesmo instante com você aprendi a sentir...*

*Quando triste, com você aprendi a sorrir. Quando só, com você aprendi a rezar. Quando na dúvida, com você aprendi a buscar a certeza. Quando na dor, com você aprendi a ser forte e prosseguir. Quando magoada, com você aprendi a perdoar... E quando alegre, com você aprendi o compartilhar.*

*Em meio às trevas, você sempre foi a luz que me fez enxergar o outro caminho. Em meio ao desgaste dos momentos difíceis, você sempre foi o colo que me amparou. Em meio ao desalento, você sempre foi o bálsamo que banhou meu coração, fortificando-o na esperança.*

*Você é a bondade que salva qualquer mal. Você é o firme alicerce que nunca se queda. Você é o ilimitado dicionário do amor. Você foi o MAIOR encontro da minha vida! E encontrei Deus no momento em que Ele me escolheu para ser a SUA filha.*

*Amo você...*

*Ao meu pai*

*Quando pequena te via como um herói... O mais forte, o maior. O tempo passou, eu cresci e muito dos meus pensamentos mudaram, mas ainda assim você não deixou de ser o meu grande papai herói.*

*Este homem que eu admiro tanto, com todas as suas virtudes e também com seus limites. Este homem com olhar de menino, sempre pronto e atento, mostrando-me o caminho da vida, que está pela frente.*

*Este mestre contador de histórias traz em seu coração tantas memórias, espalha no meu caminhar muitas esperanças, certezas e confiança.*

*Este homem alegre e brincalhão, mas também, às vezes, silencioso e pensativo, homem de fé e grande luta, sensível e generoso.*

*Pai, paizinho... Infinito é teu coração.*

*Obrigada, pai, por orientar o meu caminho, feito de lutas e incertezas, mas também de muitas esperanças e sonhos! Obrigada por se esforçar sempre para que eu realize os meus sonhos.*

*Peço a DEUS que me ajude a alegrar seu coração, e quanto a mim, prometo me esforçar ao máximo para também poder te fazer um pai feliz e que se orgulhe de mim.*

*Te amo muito, meu pai...*

*Aos meus irmãos*

*Nós somos o maior bem que existe. Entre nós vigora o lema dos mosqueteiros desde sempre: um por todos e todos por um.*

*Nós somos uma irmandade em sangue e em solidariedade.*

*Só tenho a agradecer o bem que possuo... Seu afeto, suas palavras de coragem, de conforto, de carinho, de esperança...*

*Se há amor do qual não duvido é do vosso.*

*Vocês realizaram um dos meus mais preciosos desejos... Ter uma irmã... Na falta de uma, ganhei três... Três maravilhosas irmãs... Amigas, sinceras, carinhosas, guerreiras... Tenho muito orgulho de compartilhar com vocês os meus três preciosos amores, meus irmãos!*

*Nos momentos mais difíceis, nos momentos mais delicados, nos momentos mais confusos... Lá estavam todos vocês! No aconchego de seus abraços e de suas palavras, busquei a esperança e encontrei a felicidade.*

*Simplesmente amo vocês...*

## *Ao meu Flávio*

*He*
*May be the face I can't forget,*
*A trace of pleasure or regret*
*May be my treasure or the price I have to pay*
*He may be the song that summer sings*
*May be the chill that autumn brings*
*May be a hundred tearful things*
*Within the measure of the day.*

*He*
*May be the beauty or the beast*
*May be the famine or the feast*
*May turn each day into heaven or a hell*
*He may be the mirror of my dreams*
*A smile reflected in a stream*
*He may not be what he may seem*
*Inside a shell*

*He who always seems so happy in a crowd*
*Whose eyes can be so private and so proud*
*No one's allowed to see them when they cry*
*He may be the love that can and hope to last*
*May come to me from shadows of the past*
*That I remember till the day I die*

*He*
*May be the reason I survive*
*The why and where for I'm alive*
*The one I'll care for through the rough and rainy years*
*Me I'll take his laughter and his tears*
*And make them all my souvenirs*
*For where he goes I got to be*
*The meaning of my life is*

*He*

*Amo você...*

*À minha orientadora e amiga Marina*

*To Sir With Love*

*Those school girl days, of telling tales and biting nails are gone,*
*But in my mind,*
*I know they will still live on and on,*
*But how do you thank someone, who has taken you from crayons toper fume?*
*It isn't easy, but I'll try,*

*If you wanted the sky I would write across the sky in letters,*
*That would sour a thousand feet high,*
*To Sir, with Love*

*The time has come,*
*For closing books and long last looks must end,*
*And as I leave,*
*I know that I am leaving my best friend,*
*A friend who taught me right from wrong,*
*And weak from strong,*
*That's a lot to learn,*
*What, what can I give you in return?*

*If you wanted the moon I would try to make a start,*
*But I, would rather you let me give my heart,*
*To Sir, with Love*

*Marina, muito obrigada pela inestimável confiança, pelas oportunidades, pela amizade e carinho. Com você eu sorri, chorei, aprendi e amadureci... Em seus abraços, pude suprir um pouco da minha carência materna... Não há palavras suficientes que possam expressar a minha gratidão.*

## *Às minhas amigas Beth, Karen, Karin, Carla, Ana Paula e Renata*

*Amigos para siempre*

*I don't have to say*
*A word to you*
*You seem to know*
*Whatever mood*
*I'm going through*
*Feels as though*
*I've known you forever*
*You*
*Can look into my eyes and see*
*The way I feel*
*And how*
*The world is treating me*
*Maybe I have known you forever*
*Amigos para siempre*
*Means you'll always be my friend*
*Amis pour sempre*
*Means a love that will never end*
*Friends for life*
*Not just a summer or a spring*
*Amigos para siempre*
*I feel you near me*
*Even when we are apart*
*Just knowing you are in this world*
*Can warm my heart*
*Friends for life*
*Not just a summer or a spring*
*Amigos para siempre*
*We share memories*

*I won't forget*
*And we'll share more,*
*My friend,*
*We haven't started yet*
*Something happens*
*When we're together*
*When*
*I look at you*
*I wonder why*
*There has to come*
*A time when we must say goodbye*
*I'm alive when we are together*
*Amigos para siempre*
*Means you'll always be my friend*
*Amis pour sempre*
*Means a love that will never end*
*Friends for life*
*Not just a summer or a spring*
*Amigos para siempre*
*I feel you near me*
*Even when we are apart*
*Just knowing you are in this world*
*Can warm my heart*
*Friends for life*
*Not just a summer or a spring*
*Amigos para siempre*

*Vocês são um presente na minha vida... Muito obrigada!!!*

## *Agradecimentos*

*À minha amada avó Maria (in memorian), pelo infinito amor, carinho, confiança e amizade. Meu exemplo de coragem, no qual me espelho para dar continuidade aos meus ideais.*

*Ao meu amado avô Vicente, pelo carinho, colo, respeito e confiança. Vô, muito obrigada por toda a sua ajuda... Por me proporcionar a realização de sonhos importante e necessários para a minha carreira profissional.*

*Aos meus queridos avós Mário (in memorian) e Cybeles, pelo carinho, amor e confiança; por se orgulharem de mim e como pessoa, neta e profissional.*

*Ao Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida, por ter aberto as portas de seu laboratório, pelas orientações e pela dedicação dispensada.*

*Ao meu amigo e colaborador Lucas Gonçalves Ferreira, pela paciência, amizade, finais de semana trabalhados, cervejas e histórias... Sua participação neste trabalho foi singular!!!*

*Ao Fernado Zanoni, Tico, por toda a sua inestimável amizade, momentos de alegrias e descontrações... Muito obrigada, Tiquinho!!!*

À minha estagiária Marina Rangel, Nina, eu agradeço por todo o carinho, dedicação e amizade... Você apenas começou o seu caminho na vida científica e estou muito honrada de ter te iniciado nesse ramo tão difícil, mas extremamente apaixonante. Eu te adoro!!!

À Silvia Bando, que teve um papel fundamental no início deste trabalho. Agradeço pela sua amizade, carinho e compreensão!!!

À Ana Dantas, por toda a sua dedicação, seu carinho e principalmente a sua paciência... Agradeço de coração por tudo!!!

À Dorley, Carmen, Claudinha e Rose por sua amizade, carinho, dedicação, conversas, festinhas... Adoro vocês!!!

Aos meus amigos ou colegas do Laboratório de Microbiologia Clínica Isabel, Fernanda, Haydee, Milton, Lara, Mônica, Mariama e Charline. Agradeço por todo o carinho, ajuda, amizade e companheirismo.

À Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka pelo apoio e carinho.

Aos funcionários, docentes e estudantes do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela cooperação técnica e carinho.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

*À FAPESP, pelo apoio financeiro concedido para a realização desta pesquisa.*

*À Universidade de São Paulo, fonte inesgotável da sabedoria, da qual tive a honra de ter sido aluna.*

*Aos camundongos sacrificados no decorrer deste trabalho.*

*A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização do presente trabalho.*

***Muito obrigada!!!!***

# SUMÁRIO

**LISTA DE TABELAS** ..... **1**

**LISTA DE FIGURAS** ..... **2**

**LISTA DE ESQUEMA** ..... **7**

**LISTA DE ABREVIAÇÕES** ..... **8**

**RESUMO** ..... **10**

**ABSTRACT** ..... **11**

**1. INTRODUÇÃO** ..... **12**

**2. OBJETIVOS** ..... **26**

2.1 OBJETIVO GERAL ..... 26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS ..... 26

**3. MATERIAIS E MÉTODOS** ..... **27**

3.1 AMOSTRAS BACTERIANAS ..... 27
*3.1.1 Inóculo bacteriano* ..... 27
3.2 MODELO CELULAR DE EPITÉLIO INTESTINAL POLARIZADO ..... 28
3.3 INFECÇÃO BACTERIANA EM CÉLULAS CACO-2 POLARIZADAS ..... 28
*3.3.1 Ensaio de invasão bacteriana* ..... 28
*3.3.2 Cinética de disseminação bacteriana* ..... 29
3.4 VIABILIDADE DAS CÉLULAS CACO-2 APÓS INFECÇÃO BACTERIANA ..... 29
3.5 ENSAIO DE PLACAS DE LISE PARA VISUALIZAÇÃO DA DISSEMINAÇÃO BACTERIANA ..... 29
3.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA DE EIEC FBC124/13 E *Shigella flexneri* M90T APÓS INFECÇÃO EM CÉLULAS CACO-2 POLARIZADAS ..... 30
*3.6.1 Processo de invasão bacteriana em células Caco-2: bacterias presentes no sobrenadante da cultura celular* ..... 30
*3.6.2 Processo de disseminação bacteriana em células Caco-2: bactérias intracelulares* ..... 31
*3.6.3 Extração de RNA* ..... 31
*3.6.4 Quantificação do RNA total* ..... 31
*3.6.5 Síntese da fita de DNA complementar (cDNA)* ..... 31
*3.6.6 RT-PCR semiquantitativo* ..... 32
*3.6.7 PCR em tempo real* ..... 33
3.7 MODELO ANIMAL ..... 35
*3.7.1 Purificação de células dendríticas intestinais de camundongos* ..... 35
3.8 IMUNOFENOTIPAGEM DE CÉLULAS DENDRÍTICAS INTESTINAIS ..... 35
3.9 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS T ..... 36
*3.9.1 Purificação de linfócitos T* ..... 36
*3.9.2 Proliferação de linfócitos T mediada por células dendríticas intestinais após infecção por FBC124/13 e M90T* ..... 36
3.10 CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MONÓCITOS HUMANOS ..... 37
3.11 SECREÇÃO DE PROTEINAS EFETORAS BACTERIANAS ..... 38
3.12 MIGRAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS ATRAVÉS DE UMA MONOCAMADA DE CÉLULAS CACO-2 DIFERENCIADAS ..... 39
3.13 DOSAGEM DE CITOCINAS ..... 40
3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA ..... 40

**4- RESULTADOS** ..... **41**

4.1 CINÉTICA DE INVASÃO BACTERIANA EM CÉLULAS CACO-2 ..... 41
4.2 CINÉTICA DE DISSEMINAÇÃO BACTERIANA EM CÉLULAS CACO-2 ..... 42
4.3 VIABILIDADE DAS CÉLULAS CACO-2 APÓS INFECÇÃO BACTERIANA ..... 43
4.4 ENSAIO DE PLACAS DE LISE ..... 45
4.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA DE EIEC FBC124/13 E *Shigella*

*flexneri* M90T APÓS INFECÇÃO EM CÉLULAS CACO-2 PELO MÉTODO DE RT-PCR SEMIQUANTITATIVO ..... 47
*4.5.1 Cinética de expressão de genes envolvidos na invasão bacteriana após contato com células Caco-2* ..... 47
*4.5.2 Cinética de expressão dos genes no curso da disseminação bacteriana em células Caco-2* ..... 51
4.6 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE EXPRESSÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA DE FBC124/13 E M90T APÓS INFECÇÃO EM CÉLULAS CACO-2 POR RT-PCR QUANTITATIVO ..... 53
*4.6.1 Expressão relativa dos genes virF, virB, ipaA, ipaB, ipaC e ipaD durante invasão bacteriana em células Caco-2* ..... 53
*4.6.2 Expressão relativa dos genes virF, virB, ipaA-C, icsA e icsB durante disseminação bacteriana em células Caco-2 em diferentes intervalos de tempo* ..... 55
4.7 IMUNOFENOTIPAGEM DE CÉLULAS DENDRÍTICAS INTESTINAIS PURIFICADAS ..... 57
4.8 IMUNOFENOTIPAGEM DE CÉLULAS DENDRÍTICAS INTESTINAIS APÓS ESTÍMULO BACTERIANO ..... 57
4.9 PROCESSAMENTO E APRESENTAÇÃO DE ANTÍGENOS PELAS CÉLULAS DENDRÍTICAS ÀS CÉLULAS T ..... 59
4.10 QUANTIFICAÇÕES DE CITOCINAS PRODUZIDAS POR CÉLULAS DENDRÍTICAS INTESTINAIS ..... 61
4.11 CÉLULAS DENDRÍTICAS DIFERENCIADAS DE MONÓCITOS HUMANOS ..... 63
4.12 SECREÇÃO DE PROTEÍNAS EFETORAS BACTERIANAS ..... 64
4.13 MIGRAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS ATRAVÉS DE UMA MONOCAMADA DE CÉLULAS CACO-2 DIFERENCIADAS ..... 65
4.14 PERFIL DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS SECRETADAS NA CO-CULTURA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS E CÉLULAS CACO-2 APÓS ESTÍMULO BACTERIANO ..... 66

**5- DISCUSSÃO ..... 71**

**6- CONCLUSÕES ..... 90**

**7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 92**

**8- ANEXOS ..... 102**

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1 -** Amostras bacterianas..... **27**

**Tabela 2**- Iniciadores sintetizados a partir da cepa de *Shigella flexneri* depositada no GenBank (N° nc_002698)..... **33**

**Tabela 3** - Iniciadores e sondas da reação RT-PCR Quantitativo..... **34**

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Integração das células dendríticas intestinais com a resposta imune inata e adaptativa. As células dendríticas são responsáveis pelo reconhecimento de antígenos no intestino e estão presentes na lâmina própria, assim como nas regiões ao redor das placas de Peyer. Essas células são responsáveis pela contínua aquisição de antígenos no lúmen intestinal e os transportam para os linfonodos mesentéricos para apresentação aos linfócitos T. As células dendríticas $CCR6^+$ são recrutadas da região interfolicular para a região infectada após o reconhecimento dos patógenos pelas células epiteliais. Há a necessidade de se determinar como as células dendríticas da lâmina própria estão integradas com a resposta imune inata após a injúria da barreira epitelial intestinal. DC – células dendrítica, FAE – folículo associado ao epitélio, IEC – célula epitelial intestinal (NIESS & REINECKER, 2006).... **15**

**Figura 2**. Modelo de patogenicidade induzida por *Shigella* sp. translocação bacteriana através das células M (1). Fagocitose pelos macrófagos residentes (2), escape por indução à necrose celular (3), invasão do enterócito através da região basolateral (4), disseminação (5) e indução a formação de protrusões e lise da dupla membrana com liberação da bactéria na célula vizinha (modificado de PARSOT, 2005)..... **19**

**Figura 3**: Mapa esquemático da ilha de patogenicidade de 30 kb do plasmídio de *S. flexneri* e os genes *virF* e *icsA*. A orientação da transcrição está indicada com as flechas pretas, os localização dos promotores (P) e as flechas verticais indicam a ponto de regulação das proteínas VirF e VirB (modificado de PORTER AND DORMAN, 1997)..... **20**

**Figura 4 - Desenho esquemático dos ensaios de invasão de *Shigella flexneri* M90T e EIEC FBC124/13 em células Caco-2 polarizadas.** A – poços com FBC124/13, B – poços com M90T, D – poços sem bactérias. Colunas 1, 2 e 3 – monocamada de Caco-2; colunas 4, 5 e 6 – ausência de monocamada celular..... **30**

**Figura 5 – Esquema representativo da separação de células sanguíneas por gradiente de densidade com Ficoll-Paque PLUS.** Células mononucleares do sangue periférico venoso de voluntários saudáveis foram purificadas após centrifugação em gradiente de densidade de Ficoll-Paque. Após centrifugação, a fase superior, correspondente ao plasma, foi removida, expondo a camada de células mononucleares. Estas foram cuidadosamente removidas para posterior purificação dos monócitos..... **38**

**Figura 6 – Esquema do sistema de co-cultura celular.** No compartimento apical, foram adicionados os estímulos bacterianos (bactérias ou proteínas secretadas). No compartimento baso-lateral, foram adicionadas as células dendríticas diferenciadas de monócitos humanos..... **40**

**Figura 7 - Invasão bacteriana em células Caco-2 polarizadas**. Células Caco-2 com 10 dias de diferenciação foram infectadas com $10^7$ bactérias por diferentes intervalos de tempo (eixo X). As unidades formadoras de colônias (U.F.C.) (eixo Y) foram obtidas através da semeadura do lisado celular (pós-infecção) em ágar MC e contagem do número de colônias crescidas após 18 horas de incubação em estufa bacteriológica a 37°C. Observa-se que não há diferenças de concentração de M90T e EIEC FBC124/13 nos dois intervalos de tempo estudados. Gráfico representativo de uma média de três experimentos independentes..... **41**

**Figura 8- Disseminação bacteriana em células Caco-2 polarizadas.** Células Caco-2 com 10 dias de diferenciação foram infectadas com $10^7$ bactérias por 2 horas, lavadas com SST e incubadas com meio de cultura contendo gentamicina por diferentes intervalos de tempo (eixo X). As unidades formadoras de colônias (U.F.C.) (eixo Y) foram obtidas através da semeadura do lisado celular (pós-infecção) em ágar MC e contagem do número de colônias crescidas após 18 horas de incubação em estufa bacteriológica a 37°C. Observa-se que a

concentração de M90T é maior que FBC124/13 á partir de 4 horas de infecção. A – microscopia ótica da monocamada de células Caco-2 (controle negativo); B – microscopia ótica de uma placa de lise referente a 5 horas de disseminação de FBC124/13; C – microscopia ótica de uma placa de lise referente a 5 horas de disseminação de M90T. Gráfico representativo de uma média de três experimentos. * ($p < 0,05$); *** ($p < 0,001$). * - diferença estatística entre FBC124/13 x M90T para um mesmo tempo analisado. Análise estatística realizada pelo teste *Two Way ANOVA*..... **43**

**Figura 9 - Cinética de viabilidade de células Caco-2 induzida por *Shigella flexneri* M90T e EIEC FBC124/13 durante disseminação bacteriana.** Uma monocamada de células Caco-2 polarizadas foi infectada por 2 horas com FBC124/13 ou M90T, seguida de tempos sucessivos de disseminação bacteriana (1, 2, 3, 4 e 5 horas), na presença de meio de cultura contendo gentamicina. A viabilidade celular foi avaliada pela integridade do DNA após a incorporação de iodeto de propídeo. FBC124/13 e M90T danificaram as células Caco-2 de forma distinta, onde M90T mostrou-se mais citotóxica que FBC124/13 até 3 horas de infecção. Para os tempos de 4 e 5 horas, não foram observadas diferenças de citotoxicidade entre as bactérias. Os resultados são representativos de uma triplicata de experimento. * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$). * - diferença estatística entre FBC124/13 x M90T para um mesmo tempo analisado. Análise estatística realizada pelo teste *Two Way ANOVA*..... **44**

**Figura 10 – Ensaio de placas de lise após infecção bacteriana das células Caco-2.** As células Caco-2 foram cultivadas em placas com 6 orifícios ($1 \times 10^6$ células/poço) até formação de uma monocamada diferenciada e, posteriormente, foram infectadas com duas concentrações diferentes de inóculo bacteriano: $1 \times 10^4$ e $1 \times 10^5$ bactérias (FBC124/13 ou M90T) por poço. Após o tempo de 2 horas de invasão, as células foram incubadas na presença de antibióticos por 36, 48 e 84 horas, para a análise da disseminação bacterina. Para melhor visualização fotográfica, foi escolhida a maior diluição para os tempos de 36 horas (A e D) e 48 horas (B e E). Contudo, após 84 horas de disseminação bacteriana, escolheu-se a menor diluição para visualização fotográfica (C e F). É possível observar que a quantidade de halos formados por FBC124/13 é aproximadamente 5 vezes maior do que os formados por M90T. Observa-se também que, o diâmetro dos halos formados por FBC124/13 são significativamente menores do que os formados por M90T. A, B e C – células infectadas por FBC124/13; D, E e F – células infectadas por M90T. Os resultados são representativos de um experimento. *** ($p < 0,001$). * - diferença estatística entre FBC124/13 x M90T para um mesmo tempo analisado. Análise estatística realizada pelo teste *Two Way ANOVA*..... **46**

**Figura 11 – RT-PCR semiquantitativo dos genes de regulação da ilha de patogenicidade de 31 Kb de M90T e FBC124/13**. A figura mostra a cinética de expressão dos genes *virF* e *virB* de EIEC FBC124/13 (O) e *Shigella flexneri* M90T (S) em gel de garose a 1 %. As amostras de RNA foram provenientes do sobrenadante da cultura de Caco-2 polarizadas após diferentes tempos de infecção (30, 60, 90 e 120 min) com as bactérias. O gene *16S rRNA* foi utilizado como controle interno da reação. A expressão gênica foi avaliada através da intensidade das bandas obtidas da reação de RT-PCR. *virF* apresentou uma expressão mais acentuada em M90T, principalmente a partir de 60 min de infecção. A expressão de *virB* não foi muito diferente entre as bactérias nos tempos estudados. Nota-se que com o decorrer do tempo, a expressão dos genes parece aumentar gradativamente, dado observado após comparação dos tempos de 30 e 120 min. Foto representativa de três experimentos independentes..... **48**

**Figura 12 – RT-PCR semiquantitativo de genes de montagem do SSTT e uma chaperonina da ilha de patogenicidade de 31 Kb de M90T e FBC124/13.** A figura mostra a cinética de expressão dos genes *spa32, mxiH* e *ipgC* de EIEC FBC124/13 (O) e *Shigella flexneri* M90T (S). As amostras de RNA foram provenientes do sobrenadante da cultura de Caco-2 polarizadas após diferentes tempos de infecção (30, 60, 90 e 120 min) com as bactérias. O gene *16S rRNA* foi utilizado como controle interno da reação. A expressão de *spa32* não apresentou diferenças visíveis entre as duas bactérias nos intervalos de tempo estudados. Com o passar do tempo, verifica-se um leve aumento de intensidade de banda, o que sugere o aumento de expressão do gene. No início da infecção, a expressão de *mxiH* é

aparentemente muito superior em M90T. Essa diferença de intensidade de bandas continua até o tempo de 90 min. Em 120 min, ainda há diferenças na intensidade de banda, porém, visivelmente, não muito acentuada. A expressão de *ipgC*, desde o início da infecção, é superior em M90T. Contudo, no tempo de 120 min, parece não haver diferenças na intensidade de bandas das duas espécies bacterianas. Foto representativa de três experimentos independentes..... **49**

**Figura 13 – RT-PCR semiquantitativo dos genes de invasão da ilha de patogenicidade de 31 Kb de M90T e FBC124/13.** A figura mostra a cinética de expressão dos genes *ipaA, ipaB, ipaC* e *ipaD* de EIEC FBC124/13 (O) e *Shigella flexneri* M90T (S). As amostras de RNA foram provenientes do sobrenadante da cultura de Caco-2 polarizadas após diferentes tempos de infecção (30, 60, 90 e 120 min) com as bactérias. O gene *16S rRNA* foi utilizado como controle interno da reação. A expressão de todos os genes foi mais branda em FBC124/13. Em todos os tempos, nota-se o aumento gradativo da intensidade das bandas conforme o tempo de infecção. Aparentemente, no tempo de 120 min, não há diferenças perceptíveis na transcrição dos genes *ipaA* e *ipaC* entre as duas bactérias. *ipaB*, por sua vez, apresentou-se mais expresso em *Shigella* em todos os intervalos de tempo. Os resultados encontrados na expressão da *ipaD* foram muito interessantes. Aparentemente, FBC124/13 expressa pouca *ipaD*, principalmente no início da infecção (30 e 60 min) e seu nível de transcrição continua baixo até 120 min. Em contrapartida, M90T expressa *ipaD* desde o início da infecção e, em 120 min, o nível de transcrição é muito elevado. Foto representativa de três experimentos independentes..... **50**

**Figura 14 – RT-PCR semiquantitativo dos genes *virB* e *icsA* da ilha de patogenicidade de 31 Kb de M90T e FBC124/13.** A figura mostra a cinética de expressão dos genes *virB* e *icsA* de EIEC FBC124/13 (O) e *Shigella flexneri* M90T (S). Células Caco-2 com 10 dias de diferenciação foram infectadas com $10^7$ bactérias por 2 horas, lavadas com SST e incubadas com meio de cultura contendo gentamicina por diferentes intervalos de tempo (1, 2, 3, 4 e 5 h). Em seguida, a monocamada foi coletada para extração do RNA total. O gene *16S rRNA* foi utilizado como controle interno da reação. A expressão gênica foi avaliada através da intensidade das bandas obtidas da reação de RT-PCR. Aparentemente, a expressão dos genes de M90T foi um pouco mais elevada. Até 3 h de disseminação, a diferença da intensidade de banda entre as bactérias parece ser pequena. Contudo, principalmente para *icsA*, essa diferença acentua-se a partir de 4 h de disseminação, onde a expressão dos genes parece ser razoavelmente maior em M90T. Nota-se que com o decorrer do tempo, a expressão dos genes parece aumentar gradativamente. Foto representativa de três experimentos independentes..... **51**

**Figura 15 – RT-PCR semiquantitativo dos genes de invasão da ilha de patogenicidade de 31 Kb de M90T e FBC124/13.** A figura mostra a cinética de expressão dos genes *ipaA-D* de EIEC FBC124/13 (O) e *Shigella flexneri* M90T (S). Células Caco-2 com 10 dias de diferenciação foram infectadas com $10^7$ bactérias por 2 horas, lavadas com SST e incubadas com meio de cultura contendo gentamicina por diferentes intervalos de tempo (1, 2, 3, 4 e 5 h). Em seguida, a monocamada foi coletada para extração do RNA total. O gene *16S rRNA* foi utilizado como controle interno da reação. Em todos os tempos estudados, o nível de expressão de todos os genes foi mais brando em EIEC FBC124/13. A intensidade das bandas aumentou gradativamente para cada espécie bacteriana no decorrer da cinética. O gene *ipaD*, contudo, apresentou-se pouco expresso e, aparentemente, sua expressão não foi observada em EIEC FBC124/13. A partir de e 3 h de disseminação, M90T apresentou baixos níveis de expressão para *ipaD*. Em 4 h, a banda é muito fraca, quase imperceptível. Foto representativa de três experimentos independentes..... **52**

**Figura 16 – PCR em tempo real dos genes *virF, virB, ipaA-D* de M90T e FBC124/13 durante invasão em células Caco-2 polarizadas.** A figura mostra a cinética de expressão dos genes de virulência de EIEC FBC124/13 e *S. flexneri* M90T. Células Caco-2 com 10 dias de diferenciação foram infectadas com $10^7$ bactérias por 30, 60 e 90 minutos. O sobrenadante da cultura celular foi coletado para extração de RNA. O gene *16S rRNA* foi utilizado como normalizador da reação. Em todos os tempos estudados, o nível de expressão de todos os

genes foi mais brando em FBC124/13. A- gráfico referente ao gene *ipaA*; B- gráfico referente ao gene *ipaB*; C- gráfico referente ao gene *ipaC*; D- gráfico referente ao gene *ipaD;* E- gráfico referente ao gene *virF*; F- gráfico referente ao gene *virB*. Foto representativa de três experimentos independentes. * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$). * - diferença estatística entre EIEC x *Shigella* para um mesmo tempo analisado. Análise estatística realizada pelo teste *Two Way ANOVA*..... **54**

**Figura 17 – PCR em tempo real dos genes *virF, virB, ipaA-C, icsA* e *icsB* de M90T e FBC124/13 durante disseminação em células Caco-2 polarizadas.** A figura mostra a cinética de expressão dos genes de virulência de EIEC e *Shigella flexneri*. Células Caco-2 com 10 dias de diferenciação foram infectadas com $10^7$ bactérias por 2 horas, lavadas com SST e incubadas com meio de cultura contendo gentamicina por diferentes intervalos de tempo (1, 2, 3, 4 e 5 h). Em seguida, a monocamada foi coletada para extração do RNA total. O gene *16S rRNA* foi utilizado como normalizador da reação. Com exceção do gene *virF*, em todos os tempos estudados, o nível de expressão dos genes de FBC124/13 foi menor. A- gráfico referente ao gene *ipaA*; B- gráfico referente ao gene *ipaB*; C- gráfico referente ao gene *ipaC*; D- gráfico referente ao gene *icsA*; E- gráfico referente ao gene *icsB;* F- gráfico referente ao gene *virF*; G- gráfico referente ao gene *virB*. Foto representativa de três experimentos independentes. * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$). * - diferença estatística entre EIEC x *Shigella* para um mesmo tempo analisado. Análise estatística realizada pelo teste *Two Way ANOVA*..... **56**

**Figura 18 – Análise do fenótipo de células dendríticas intestinais purificadas por coluna magnetizada.** Células dendríticas foram extraídas do intestino delgado de camundongos C57/BL6 e purificadas em colunas magnetizadas após marcação do extrato celular com anticorpos anti-CD11c marcados com micropartículas magnéticas. O fenótipo das células dendríticas intestinais foi confirmado por citometria de fluxo (20.000 eventos), após dupla-marcação com anticorpos anti-CD11c (marcado com PE – ficoeritrina) e anti-MHC II (marcado com FITC - isotiocianato de fluoresceína). Mais de 70% das células apresentaram-se duplo-marcadas e mais de 90% das células expressavam MHC classe II..... **57**

**Figura 19 - Expressão de moléculas de superfície em células dendríticas intestinais.** Através de citometria de fluxo, analisou-se a expressão das moléculas MHC II, CD40, CD80, CD86 e TLR-4 em células dendríticas intestinais de camundongos C57/BL6. As células foram cultivadas na presença de FBC124/13 ou M90T por 3 horas. DC- células dendríticas; DC + FBC124/13 – células dendríticas cultivadas com FCB124/13; DC + M90T – células dendríticas cultivadas com M90T. A- histogramas referentes à citometria de fluxo dos marcadores MHC classe II, CD40, CD80, CD86 e TLR-4; B- Gráficos referentes às médias de intensidade de fluorescência relativas à citometria de fluxo dos marcadores MHC classe II, CD40, CD80, CD86 e TLR-4..... **58**

**Figura 20 - Ativação de linfócitos T $CD4^+$ naïve por células dendríticas intestinais.** Linfócitos T $CD4^+$ *naïve* foram purificados de linfonodos mesentéricos de camundongos C57/BL6 e cultivados com células dendríticas intestinais previamente ativadas com diferentes antígenos. A apresentação dos antígenos foi avaliada pela indução da proliferação dos linfócitos. A proliferação celular foi analisada pela incorporação de timidina triciada, que foi mensurada em contador de emissões de radiação beta. No gráfico, observa-se que a apresentação de antígeno foi eficiente apenas quando as células dendríticas foram ativadas com 1:1 de M90T. FBC124/13 – *Escherichia coli* enteroinvasora O124:$H^-$; M90T – *Shigella flexneri* M90T; controle negativo – células dendríticas inativas cultivadas com linfócitos T; controle positivo – células dendríticas inativas cultivadas com linfócitos T na presença do mitógeno fitohemaglutinina. Resultado representativo de três experimentos independentes. *** ($p < 0,001$); §§§ ($p < 0,001$). * - diferença estatística de M90T (1:1) em relação a todos os outros grupos analisados. § - *diferença estatística do controle* positivo em relação a todos os outros grupos analisados. Análise estatística realizada pelo teste *Two Way ANOVA*..... **60**

**Figura 21 - Secreção de IL-12 por células dendríticas intestinais infectadas com FBC124/13 e M90T.** Células dendríticas intestinais foram infectadas por 12 e 24 horas com

FBC124/13 ou M90T na proporção 1:10. IL-12 foi mensurado por ELISA de captura no sobrenadante da cultura. No gráfico, observa-se uma diferença na expressão basal das citocinas para o tempo de 24 horas de infecção, bem como uma diferença de concentração dessas proteínas quando se compara as duas espécies bacterianas. FBC124/13: *Escherichia coli* enteroinvasora; M90T: *Shigella flexneri* M90T. Os dados apresentados são representativos de 4 experimentos independentes. * ($p < 0,05$); # ($p < 0,05$); §§§ ($p < 0,001$). * - diferença estatística entre FBC124/13e M90T. § - diferença estatística entre M90T 12h e M90T 24h. # - diferença estatística entre controle 12h e controle 24h. Análise estatística realizada pelo teste *Two Way ANOVA*..... **62**

**Figura 22 - Secreção de IL-10 por células dendríticas intestinais infectadas com FBC124/13 e M90T**. Células dendríticas intestinais foram infectadas por 12 e 24 horas com FBC124/13 ou M90T na proporção 1:10. IL-10 foi mensurado por ELISA de captura no sobrenadante da cultura. No gráfico, observa-se uma diferença na expressão basal das citocinas para o tempo de 24 horas de infecção, bem como uma diferença de concentração dessas proteínas quando se compara as duas espécies bacterianas. FBC124/13: *Escherichia coli* enteroinvasora; M90T: *Shigella flexneri* M90T. Os dados apresentados são representativos de 4 experimentos independentes. € ($p < 0,05$); ## ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$); §§§ ($p < 0,001$). * - diferença estatística entre FBC124/13 e M90T. § - diferença estatística entre FBC124/13 e controle. # - diferença estatística entre FBC124/13 12h e FBC124/1324h. € - diferença estatística entre controle 12h e controle 24h. Análise estatística realizada pelo teste *Two Way ANOVA*..... **62**

Figura 23 – **Análise do fenótipo de células dendríticas diferenciadas de monócitos humanos.** Monócitos humanos foram obtidos do sangue periférico de voluntários humanos saudáveis através de centrifugação em gradiente de Ficoll-Paque PLUS, seguido de purificação em colunas magnetizadas após marcação celular com anticorpos anti-CD14 marcados com micropartículas magnéticas. Em seguida, os monócitos foram diferenciados em células dendríticas através de estímulo do GM-CFF e IL-4. O fenótipo das células dendríticas foi confirmado por citometria de fluxo (15.000 eventos), após marcação com anticorpos anti-CD1a (marcado com FITC - isotiocianato de fluoresceína), anti-CD14 (marcado com FITC - isotiocianato de fluoresceína) e anti-HLA (marcado com FITC - isotiocianato de fluoresceína). A pureza das células obtidas foi de aproximadamente 80%..... **63**

**Figura 24 – Características físicas das células dendríticas diferenciadas de monócitos humanos.** As células dendríticas diferenciadas de monócitos humanos foram avaliadas quanto às características físicas e peculiares a esse tipo celular. Através de microscopia ótica, foi possível observar a presença de prolongamentos citoplasmáticos característicos de células dendríticas..... **64**

**Figura 25 – Gel de SDS-PAGE 10% - Perfil eletroforético das proteínas totais de FBC123/13 e M90T**. FBC123/13 e M90T foram cultivadas em meio MEM por 16-18h a 37ºC sob agitação. O sobrenadante celular foi concentrado e as proteínas efetoras secretadas foram separadas em gel de poliacrilamida. Foram realizados 3 experimentos independentes (1º, 2º e 3º) para cada espécie bacteriana. FBC124/13 – *Escherichia coli* enteroinvasora O124:H$^-$, M90T – *Shigella flexneri* M90T, PM – padrão de massa molecular..... **65**

**Figura 26 –Migração de células dendríticas humanas através de uma monocamada de células Caco-2 polarizadas.** Células Caco-2 foram infectadas com FBC123/13 e M90T, bem como suas proteínas totais, por duas horas antes da adição de células dendríticas derivadas de monócitos humanos à cavidade BL. A incubação foi entendida por 5 horas antes da coleta das amostras de sobrenadante para se determinar a porcentagem de DC migradas através de células Caco-2 polarizadas. Observa-se que apenas a cepa FBC124/13 e suas proteínas totais foram capazes de induzir a migração celular. DC: célula dendrítica; FBC124/13: *Escherichia coli* enteroinvasora; M90T: *Shigella flexneri* M90T. Os resultados são representativos de três experimentos independentes. * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$). Análise estatística realizada pelo teste T não pareado..... **66**

**Figura 27 – Secreção de citocinas em co-cultura de células dendríticas células Caco-2 após estímulo bacteriano.** Células Caco-2 foram infectadas com FBC123/13 e M90T, bem como suas proteínas totais, por duas horas antes da adição de células dendríticas derivadas de monócitos humanos à cavidade BL. A incubação foi entendida por 5 horas antes da coleta das amostras de sobrenadante para se determinar a concentração de citocinas inflamatórias. Os gráficos mostram que há alterações nas concentrações e localizações de citocinas inflamatórias no microambiente da co-cultura de células dendríticas e células Caco-2 após estímulo bacteriano. Os sobrenadantes de AP e BL foram analisados quanto à secreção das citocinas IL-8, MCP-1, CCL4, CCL19, CCL20 e TNF-α por ELISA de captura. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes, realizados em triplicata. * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$). Análise estatística realizada pelo teste T não pareado..... **70**

## LISTA DE ESQUEMA

**Esquema 1** – Método matemático para cálculo da expressão relativa de genes por PCR em tempo real..... **34**

## LISTA DE ABREVIATURAS

MHC – complexo de histocomplexidade

TLR – receptor do tipo Toll

FAE – epitélio associado ao intestino

GALT – tecido linfóide associado ao intestino

CDi – células dendrítica intestinal

CD – células dendrítica

MΦ – macrófagos

APC – célula apresentadora de antígeno

IL – interleucina

TCR – receptor de célula T

Th1 – célula T auxiliar do tipo 1

Th2 – célula T auxiliar do tipo 2

Tr – célula T regulatória

CEI – célula epitelial intestinal

LRR – seqüências ricas em leucinas

GPI – glicofosfatidil inositol

EIEC – Escherichia coli enteroinvasora

ºC – graus Celsius

µm – micrometro

AP – apical

BL – basolateral

DI – diluição de infecção

µCi – microcurie

PBMC – células mononucleares do sangue periférico

g – gravidade

g– gramas

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Médium

RPMI – meio RPMI 1640

R10 – meio RPMI 1640 com 10% de soro fetal bovino

MEM – Minimum Essential Medium

LPS – lipopolissacarídeo

ELISA – Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

IP – iodeto de propídeo

mm – milímetro

PE – ficoeritrina

FITC – isotiocianato de fluoresceína

SSTT – sistema de secreção do tipo três

PMN – polimorfonuclear

VC – ágar vermelho congo

TSB – caldo tríptico de soja

MC – ágar MacConkey

λ – comprimento de onda

nm – nanômetro

U – unidade

mL – mililitro

cm – centímetros

µg – microgramas

µL – microlitros

SST – solução salina tamponada

h – horas

min – minutos

$CO_2$ – gás carbônico

RNA – ácido ribonucleotídio

PCR – reação em cadeia da polimerase

RT-PCR – Transcriptase reversa-PCR

qPCR – PCR quantitativo

ng – nanogramas

cDNA – DNA complementar

dNTP –nucleotídios tri-fosfatos

M – molar

s – segundos

TSA – ágar tríptico de soja

CT – Threshold Cycle

SFB –soro fetal bovino

## RESUMO

Neste trabalho, esclarecemos tópicos da patogenicidade de EIEC que sustentam a sua menor virulência quando comparada à *S. flexneri*, e mostramos a importância das células dendríticas (CD) nesse processo. Estudou-se o comportamento de EIEC e *S. flexneri* quando em contato com células Caco-2, avaliando-se uma cinética de expressão dos genes envolvidos na invasão e disseminação bacteriana. Em geral, todos os genes foram menos expressos em EIEC, fato corroborado pelo fenótipo de disseminação bacteriana, onde EIEC foi menos eficiente do que *Shigella*. Também foi avaliada a modulação da resposta inflamatória de células dendríticas intestinais murinas pela produção de citocinas, expressão de moléculas co-estimulatórias e apresentação de antígenos, após desafio das células com as bactérias. Os resultados sugerem que EIEC induz a uma resposta protetora ao hospedeiro, enquanto que *Shigella* estaria "driblando" o sistema imune, além de provavelmente super-estimular o sistema imune adaptativo, fato que poderia levar a um agravamento da doença. As ações integradas das células Caco-2, células dendríticas e estímulos bacterianos foram estudadas em co-cultura celular. Observou-se que EIEC e suas proteínas secretadas induzem a migração das CDs ao compartimento apical da co-cultura; nada foi observado quando o desafio se deu com *Shigella*. Também foram avaliadas as concentrações de citocinas inflamatórias no microambiente infeccioso formado. A citocina TNF-α, bem como CCL20 e MCP-1 foram mais proeminentes após estímulo com EIEC, fato que poderia explicar parcialmente a migração das CDs ao lado apical da co-cultura após estímulo com EIEC e suas proteínas secretadas. Nossas evidências experimentais indicam que a doença desencadeada por EIEC é mais restrita a um determinado local da infecção, ou seja, não é capaz de se disseminar a ponto de estender a lesão tecidual de forma mais drástica, como *Shigella*. Esse fenômeno pode estar associado à menor expressão de seus dos fatores de virulência e à resposta imune inata induzida no sítio de infecção, o que levaria, fatalmente, à resolução da doença.

Palavras chave: *Escherichia coli* enteroinvasora. *Shigella flexneri*. Célula dendrítica. Caco-2. Inflamação.

## ABSTRACT

In this study, we clarify topics of pathogenicity from EIEC that support its lower level of virulence when it is compared to *S. flexneri,* and we have shown the importance of dendritic cells (DC) in this process. We studied the conduct of EIEC and *S. flexneri* when they were in contact with Caco-2 cells and we analyzed the kinetics of the genes expression that was involved in the spread and invasion of the bacteria. In general, all genes were expressed less in EIEC, as demonstrated by the phenotype of the bacterial spread, where EIEC was less efficient than *Shigella.* We also analyzed the modulation of the inflammatory response by the murine intestinal dendritic cells by the production of cytokine, expression of co-stimulators molecules and antigens presentation, after the interaction of the cells with the bacteria. The results showed that EIEC induces a response that protects the host while *Shigella* manipulate the host intestinal innate and adaptive immune system and it probably over-stimulates the adaptive immune system which could let the disease worse. The integrated actions of Caco-2 cells, dendritic cells and bacterial stimulus, were studied in a co-culture cell. We observed that EIEC and its secreted proteins induce the migration of the DCs to the apical compartment of the co-culture; nothing was observed related to *Shigella.* We also evaluated the concentrations of the inflammatory cytokines at the infective micro environment that was formed. The cytokine TNF-α, as CCL20 and MCP-1 were more prominent after been stimulated with EIEC, a fact that could partially explain the migration of DCs to the apical side of the co-culture after the stimulus with EIEC and its secreted proteins. Our experimental evidence shows that the disease triggered by the EIEC is more restricted at a definite infection place, which means that it is not capable of disseminating beyond a certain point to extend the tissue's injury and let it worsen, as *Shigella* do. This phenomenon can be associated with the lower level of expression of its virulence factors and to the immune response induced in the infection site, what could finally lead to the eradication of the disease.

Key words: *Escherichia coli* enteroinvasora. *Shigella flexneri.* Dentritic cells. Caco-2. Inflammation.

# *Introdução*

## 1- INTRODUÇÃO

Em vários aspectos, a interação do organismo humano com as bactérias é muito conflitante. Diversos trabalhos científicos ilustram como os patógenos afetam a célula alvo do hospedeiro e como a resposta do hospedeiro erradica os patógenos (KAPER et al., 2004). Em contraste, o colón humano alberga um imenso e complexo ecossistema de microrganismos, onde as bactérias comensais são muito importantes e necessárias para a educação das células do sistema imune da mucosa, além da fisiologia normal do intestino (RAKOFF-NAHOUM et al., 2004).

A barreira gastrointestinal possui uma área superficial enorme, da ordem de 400 $m^2$, e compreende uma variedade de células e elementos não celulares. Estruturalmente, essa barreira é formada por uma monocamada de células epiteliais, um complexo número de agentes na superfície luminar e por tecidos linfóides organizados, designados a assistir uma função protetora contra antígenos estranhos e perigosos (ACHESON et al., 2004).

As células intestinais típicas possuem microvilosidades em sua superfície apical. Enquanto sua anatomia ajuda a prevenir a penetração de antígenos estranhos, essas células simultaneamente expressam receptores do tipo MHC classe II para a apresentação de antígenos ao sistema imune quando necessário. As células intestinais também podem reconhecer estruturas microbianas conservadas, através de receptores de superfície do tipo TOLL (TLR), e iniciar uma resposta de sinalização intracelular. Mais ainda, os enterócitos produzem uma variedade de moléculas funcionais, como enzimas proteolíticas e mucinas, presentes no muco. Essas características, somadas a várias outras, são essenciais na proteção contra diversos enteropatógenos (JUNG et al., 1995; PÉDRON et al., 2003, ACHESON et al., 2004).

A localização anatômica na qual os antígenos intestinais são capturados e o fenótipo das células que os capturam possuem implicações importantes na natureza de qualquer desenvolvimento de uma resposta imune. Para manter a função intestinal ótima, é crucial que a resposta imune inflamatória, vital no combate aos enteropatógenos, seja intimamente controlada. Essas respostas não podem danificar os microrganismos comensais. O mecanismo de tolerância oral tem por função prevenir a ativação imune inapropriada enquanto detém a capacidade de destruir organismos patogênicos (NIESS & REINECKER, 2005)

As características particulares dos antígenos solúveis, partículas e microrganismos irão influenciar profundamente o seu destino, mas isso será fortemente influenciado pela maneira que eles inicialmente interagem com o sistema imune. Existem pelo menos três rotas por onde os antígenos luminais podem acessar o intestino (MILLING et al., 2005). Ao longo da parede intestinal são encontradas as placas de Peyer (órgãos linfáticos secundários), muito importantes na geração da resposta imune da mucosa intestinal. As células M são células epiteliais especializadas localizadas no epitélio associado ao folículo (FAE) que recobre os nódulos linfáticos das placas de Peyer (SANSONETTI et al., 1996). Essas células são capazes de condicionar a transcitose de antígenos luminais até o espaço subepitelial, onde os antígenos serão processados por células fagocíticas e apresentados ao tecido linfóide associado ao intestino (GALT). Os antígenos da mucosa luminal são continuamente observados, uma vez que o intestino é monitorado por um sistema imune altamente adaptativo, no qual sentinelas como células dendríticas (CD), macrófagos (MΦ) e células epiteliais monitoram juntas o microambiente e coordenam as respostas imunes aos sinais perigosos (NIESS & REINECKER, 2006). De fato, quando um antígeno é internalizado através das células M, eles impreterivelmente são interceptados por MΦ, CD, linfócitos B e T.

Os antígenos intestinais podem ser processados por diferentes vias. Em condições estáveis, o acesso mediado por células M, com subseqüente apresentação de antígenos pelas CD pode gerar uma resposta T $CD4^+$ antígeno-específica. Devido à sua capacidade de capturar e processar antígenos, CD estão intimamente envolvidas na iniciação das respostas imunes intestinais imunogênica e relacionadas à tolerância. Foi demonstrado que CDs expressam proteínas das *tight junctions* e são capazes de inserir dendritos entre os enterócitos (sem danificar a estrutura íntima da monocamada intestinal) tanto em cultura de tecidos quanto em alça ligada de intestino delgado. Desta forma, essas células sentem e diferenciam as bactérias próprias das patogênicas (RESCIGNO et al., 2001).

As células dendríticas são células apresentadoras de antígenos capazes de fazer um "link" entre a resposta imune inata e adaptativa, sendo as únicas, dentre as células apresentadoras de antígenos (APCs), a migrarem para os órgãos linfóides secundários e apresentar os antígenos aos linfócitos T *naïve* (BANCHEREAU, 2000; WICK, 2003). Estes, por sua vez, desencadeiam a indução da resposta imune

adaptativa no controle da inflamação do tecido e na manutenção da tolerância imune (STEINMAN et al., 2003).

As células dendríticas são encontradas em dois estágios de diferenciação que correspondem a funções imunes distintas. No estágio imaturo, essas células são capazes de internalizar partículas por fagocitose e degradá-las até apresentação de antígenos em sua superfície celular. Após ativação, elas perdem sua capacidade fagocítica e passam por um processo de maturação, adquirindo capacidade migratória para sair dos tecidos periféricos e entrar nos linfonodos adjacentes, onde elas apresentam antígenos aos linfócitos T *naïve*. Em contraste com as células dendríticas, os MΦ da mucosa, como os MΦ alveolares ou os MΦ recrutados na lâmina própria após sinais pró-inflamatórios, não são capazes de estimular linfócitos T *naïve*, mas participam efetivamente no estabelecimento da resposta imune e são importantes no *clearence* dos microrganismos e células danificadas (NIESS & REINECKER, 2005).

A maturação das células dendríticas também está associada com a regulação positiva de moléculas co-estimulatórias CD80, CD86, CD54 e CD40, moléculas MHC de classe II e a secreção de citocinas, como, IL-6, IL-12 e IL-10 (NIESS & REINECKER, 2005). É através da molécula de MHC II que as APC apresentam os antígenos aos linfócitos T, via receptor de células T (TCR). Entretanto, apenas a ligação do MHC II ao TCR não é suficiente para estimular o linfócito T. Faz-se necessário um segundo sinal, promovido pelas interações de CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2) com CD28, presentes nos linfócitos T, que é essencial para iniciar uma resposta inflamatória, com secreção de citocinas e expansão/diferenciação de clones específicos de células T (ALBA SOTO et al., 2003). As moléculas co-estimulatórias e as citocinas secretadas no microambiente da infecção definem a imunidade mediada por células T em respostas dos tipos Th1, Th2 ou Tr. Contudo, a expressão de CD40 é essencial na condução da ativação destes linfócitos. A falta da expressão de CD40, juntamente com a expressão de CTLA-4 pelos linfócitos, pode desencadear um processo de supressão da resposta imune adaptativa. (PRENDERGAST, G.C., 2008).

Alguns estímulos podem induzir o desenvolvimento de células dendríticas regulatórias, que criam tolerância aos antígenos que estão sendo apresentados através de células T regulatórias (Tregs) (LEWIS & POLLARD, 2006). Nas DCs regulatórias, que interagem com células T $CD4^+$ e prontamente induzem tolerância

antigênica, o mecanismo de sinalização via receptor B7 é extremamente importante para a tolerância e supressão imune. O contato das células T feito através deste sistema co-regulatório é concomitante àqueles realizados pelo receptor de célula T (TCR), que interage com o MHC. A co-regulação pelos receptores B7 sinalizam às células T se respondem ou não aos antígenos que estão sendo apresentados: enquanto a estimulação dos sinais B7 ativa as células T frente aos antígenos, a inibição dos sinais B7 instrui as células T a se tornarem tolerantes aos antígenos apresentados (PRENDERGAST, G.C., 2008).

Diversos mecanismos estão envolvidos na translocação de antígenos através da barreira intestinal e as células dendríticas da mucosa possuem um papel fundamental no transporte e processamento de antígenos intestinais para apresentação nas placas de Peyer e linfonodos mesentéricos **(Figura 1)** (NIESS & REINECKER, 2006). A ativação da resposta imunológica é conseqüência de uma série de interações envolvendo diferentes tipos celulares. Para que ocorra uma resposta mediada por linfócitos T, é necessário que estes interajam com APCs, proliferem e se diferenciem em células efetoras.

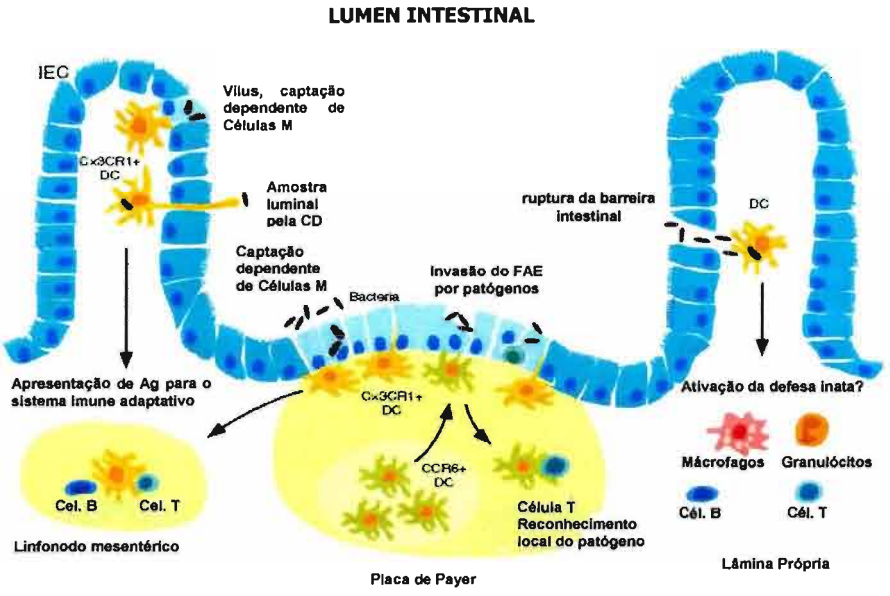



**Figura 1:** Integração das células dendríticas intestinais com a resposta imune inata e adaptativa. As células dendríticas são responsáveis pelo reconhecimento de antígenos no intestino e estão presentes na lâmina própria, assim como nas regiões ao redor das placas de Peyer. Essas células são responsáveis pela contínua aquisição de antígenos no lúmen intestinal e os transportam para os linfonodos mesentéricos para apresentação aos linfócitos T. As células dendríticas $CCR6^+$ são recrutadas da região interfolicular para a região infectada após o reconhecimento dos patógenos pelas células epiteliais. Há a necessidade de se determinar como as células dendríticas da lâmina própria estão integradas com a resposta imune inata após a injúria da barreira epitelial intestinal. DC – células dendrítica, FAE – folículo associado ao epitélio, IEC – célula epitelial intestinal (modificado de NIESS & REINECKER, 2006).

O desenvolvimento predominante de uma subpopulação de células T durante uma infecção é extremamente importante, pois certos patógenos são mais efetivamente controlados por uma resposta do tipo celular (Th1) e outros por uma resposta do tipo humoral (Th2) (SHER & COFFMAN, 1992). Em algumas doenças crônicas, a resposta celular de células T $CD4^+$ inapropriada pode exacerbar a doença, levando a uma inabilidade do hospedeiro para erradicar o microrganismo.

As células dendríticas estão diretamente envolvidas na relação entre o patógeno e o sistema imune do hospedeiro, o que, na maioria das vezes, desencadeia uma eficiente resposta inflamatória. No entanto, alguns patógenos possuem a capacidade de afetar as funções biológicas dessas células através da inibição de suas moléculas de superfície, bem como da inibição da síntese de citocinas importantes na ativação de linfócitos do tipo Th1, como IL-12 (GUERMONPREZ et al., 2002). Sua maturação e ativação são desencadeadas por sinais de perigo provenientes de microrganismos ou células danificadas.

As células dendríticas reconhecem os microrganismos e suas partículas por meio de receptores de superfície, como os receptores do tipo Toll (*toll-like receptor* – TLR). Os TLR são moléculas transmembranas que contêm um domínio externo à membrana com seqüências ricas em leucina (LRR), particular para cada TLR, e uma cauda intracelular que mostra grande homologia com o domínio intracelular do receptor para a IL-1 (IL-1R), chamado domínio Toll/IL-1R (TIR) (GAY et al, 1991). A família dos receptores do tipo Toll compreende, até o momento, onze proteínas identificadas em mamíferos (11 receptores identificados em camundongos e 10 receptores em humanos) (NETEA et al, 2004). Entre seus diversos ligantes, os melhores caracterizados são peptidoglicanos e lipoproteínas bacterianas, âncoras de glicofosfatidil inositol (GPI) presentes em protozoários e zimosan em fungos (ligantes de TLR2); RNA dupla-fita, comuns em vírus (ligante de TLR3); lipopolissacarídeo (LPS) presentes na parede de bactérias gram-negativas (ligante de TLR4); flagelina, subunidade do filamento flagelar microbiano (ligante de TLR5) e seqüências de DNA não metilados, ricas em CpG, presentes em bactérias e vírus (ligante de TLR9), entre outros (NIEDERGANG et al, 2004). A ativação do TLR por seus ligantes induz o recrutamento de proteínas adaptadoras específicas que transduzem o sinal, ativando quinases e fatores de transcrição como NF-kB e STAT-1 (TAKEDA et al, 2004). Dá-se, dessa maneira, a produção de diferentes moléculas efetoras, citocinas pró-inflamatórias, entre outros mediadores, responsáveis pelas

diferentes respostas. Sinais pró e anti-inflamatórios (TNF, IL-6, IL-1, IL-10, TGF-β e prostaglandinas) ou sinais derivados de células T (via CD40L) (BANCHEREAU et al., 2000) são capazes de ativar o processo de maturação das células dendríticas (PALUCKA & BANCHEREAU, 2002).

A inflamação intestinal aumenta a permeabilidade epitelial, tanto paracelular (entre as células adjacentes) quanto transcelular (passagem de materiais pela porção apical e/ou basolateral). Assim, a diminuição da função da barreira é a causa ou o efeito da inflamação. As células epiteliais intestinais secretam água e eletrólitos em quantidades ideais sob condições fisiológicas. Quando o epitélio é invadido por microrganismos, a secreção de água e eletrólitos, bem como a produção de citocinas é aumentada e leva ao quadro clínico da diarréia secretora. Enterobactérias, como *Salmonella*, *Escherichia* e *Shigella*, são os agentes etiológicos mais importantes a diarréia infecciosa ao redor do mundo (W.H.O., 2004; GOMES et al.,1991; LAW, 1994; ALBERT et al., 1995; ALMEIDA et al., 1998; SOUZA et al., 2002; SCALETSKY et al., 2002; FERNANDES-FILHO et al., 2004).

A espécie *E. coli* compreende amostras comensais, que predominam entre a microbiota anaeróbia facultativa do cólon de mamíferos, e amostras patogênicas, que se distinguem por suas características biológicas, sorológicas, fatores de virulência e síndromes clínicas. Cada grupo é classificado de acordo com seu modo de ação (LEVINE, 1987).

Em 1947, EWING e GRAVATTI isolaram amostras de *E. coli* a partir de fezes de soldados americanos com diarréia, durante a segunda guerra mundial. Estudos posteriores demonstraram que essas cepas eram capazes de causar ceratoconjuntivite experimental em cobaias, ensaio conhecido como teste de Serény (SERÈNY, 1963). No Brasil, a primeira amostra capaz de causar ceratoconjuntivite em cobaia foi isolada de fezes de um paciente com enterite aguda (TRABULSI, 1965). Essas cepas, que se assemelhavam à bactéria do gênero *Shigella* em muitos aspectos, foram denominadas de *E. coli* enteroinvasora (EIEC).

EIEC e *Shigella* sp. possuem características bioquímicas, genéticas e fisiopatológicas muito semelhantes. Embora a disenteria bacilar devido à EIEC seja clinicamente indistinguível daquela causada por *Shigella*, estudos com voluntários humanos mostraram que a dose infectante de EIEC é maior (da ordem de $10^6$) do que de *Shigella* (10 a $10^2$ microrganismos) (DuPONT, 1971). Como nas shigeloses, a infecção causada por EIEC consiste em inflamação e morte das células da

mucosa e submucosa intestinal. O quadro clínico é caracterizado por diarréia líquida ou sanguinolenta, com a presença de leucócitos e muco, freqüentemente acompanhada de dor abdominal severa, vômitos, tenesmo, cefaléia, febre, calafrios e mal-estar generalizado (DuPONT et al., 1971).

Na literatura são encontrados diversos trabalhos científicos que abordam os mecanismos de virulência de *S. flexneri*, bem como a resposta do hospedeiro em relação a essa espécie bacteriana. Devido à proximidade entre as bactérias, os resultados obtidos com *S. flexneri* foram aplicados, de uma maneira geral, à EIEC e às outras espécies de *Shigella*.

Bactérias enteropatogênicas são dotadas de sistemas especializados que lhes conferem a capacidade de utilizar as funções das células epiteliais para favorecer a sua penetração no epitélio do hospedeiro e causar doença. O ciclo de infecção tradicional - entrada do patógeno, estabelecimento e multiplicação, danos à célula hospedeira e saída - deve-se à presença de sistemas macromoleculares conservados presentes nessas bactérias (DONNENBERG, 2000).

Muitos patógenos possuem um conjunto específico de fatores de virulência que afetam a célula hospedeira (FINLAY, 1999). Por meio de sistemas de secreção, os enteropatógenos são capazes de secretar proteínas efetoras para o meio externo ou para o interior das células hospedeiras. (DONNENBERG, 2000). Um dos sistemas mais importantes para esse grupo de patógenos é o sistema de secreção do tipo III (SSTT).

A invasão de EIEC e *Shigella* sp. em células intestinais é essencial na condução da disenteria bacilar. A secreção de um conjunto de efetores através do SSTT para o interior da célula hospedeira é um pré-requisito para desencadear o processo de internalização.

*S. flexneri* se ligam especificamente à mucosa do intestino e invadem as células por endocitose. Observou-se que essa espécie bacteriana possui pouca aderência às células epiteliais e a internalização consiste em seu engolfamento pela formação do bolso macropinocítico. Inicialmente, a bactéria se adere à superfície da célula epitelial. Esse contato induz a reorganização dos filamentos de actina e elementos do citoesqueleto, o que leva à formação de invaginações localizadas na membrana da célula, através das quais as bactérias são internalizadas. Uma vez dentro da célula, o microrganismo lisa a membrana do endossomo e ganha acesso ao citoplasma, onde se multiplica. O movimento bacteriano é dado pela formação de

protrusões, que proporcionam a penetração das bactérias nas células adjacentes. O ciclo da infecção é então completado pela lise da dupla membrana formada pela protrusão, a fim de liberar a bactéria no citoplasma da célula vizinha **(Figura 2)** (COSSART & SANSONETTI, 2004; PARSOT, 2005).

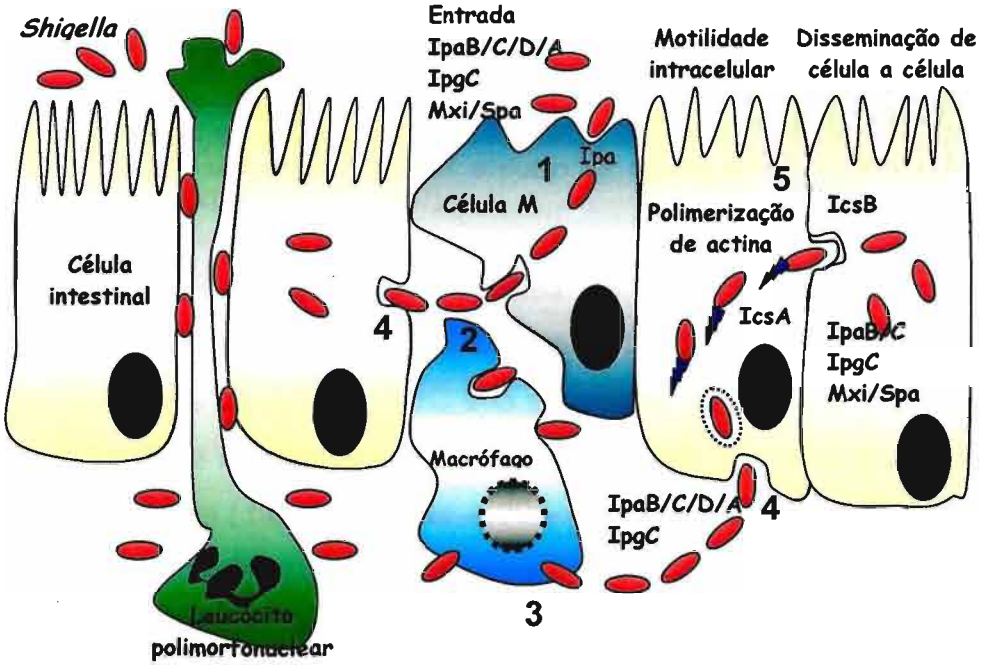



**Figura 2**. Modelo de patogenicidade induzida por *Shigella* sp. translocação bacteriana através das células M (1). Fagocitose pelos macrófagos residentes (2), escape por indução à necrose celular (3), invasão do enterócito através da região basolateral (4), disseminação (5) e indução a formação de protrusões e lise da dupla membrana com liberação da bactéria na célula vizinha (modificado de PARSOT, 2005)

Todos esses mecanismos de patogenicidade de *Shigella* sp. e EIEC na célula epitelial (invasão, multiplicação intracelular e disseminação de célula para célula) depende da presença de um plasmídio de virulência de 213 Kb, denominado *pINV* (SANSONETTI et al., 1982a; BUCHRIESER et al., 2000). A maioria dessas funções está relacionada a proteínas codificadas por um fragmento de 31Kb do plasmídio de virulência. Este fragmento contém 32 genes essenciais para a invasão. Entre estes genes, estão *ipaA*, *ipaB*, *ipaC*, *ipaD* (antígenos plasmidiais de invasão); *ipgB*, *ipgC* e *ipgD* (chaperoninas citoplasmáticas) e genes do locus *mxi-spa* (antígenos de transporte e apresentação das Ipas na superfície da membrana celular) (**Figura 3**) (BUCHRIESER et al., 2000). Células sem o plasmídio de invasão são avirulentas, não penetram em células epiteliais e não causam ceratoconjuntivite em cobaias (SANSONETTI et al., 1982b).

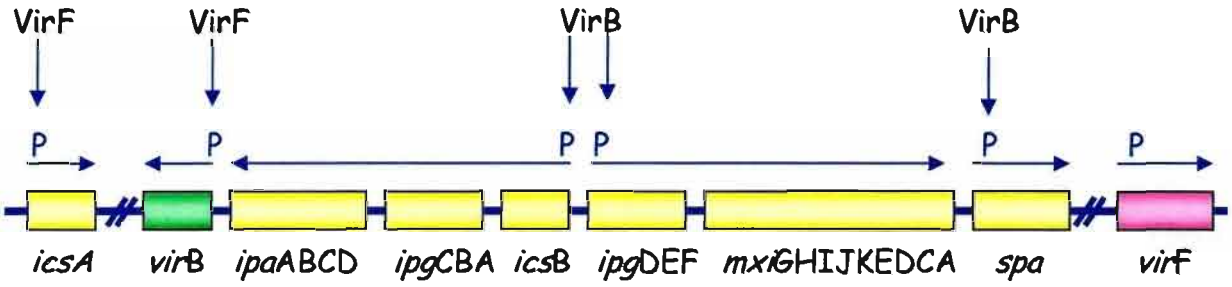



**Figura 3**: Mapa esquemático da ilha de patogenicidade de 30 kb do plasmídio de *S. flexneri* e os genes *virF* e *icsA*. A orientação da transcrição está indicada com as flechas pretas, os localização dos promotores (P) e as flechas verticais indicam a ponto de regulação das proteínas VirF e VirB (modificado de PORTER AND DORMAN, 1997)

A regulação da expressão dos genes do operon de virulência tem sido extensivamente estudada (PHALIPON & SASONETTI, 2007). A transcrição dos genes da região de entrada é regulada a 37°C sob o controle da proteína VirF, um membro da família das AraC de ativadores transcricionais, e VirB, um membro da família das ParB de divisão protéica ( LE GALL *et al.*, 2005; PARSOT, 2005).

As proteínas codificadas pelos genes contidos no locus *mxi-spa* são necessárias para a formação do SSTT. O contato da bactéria com a célula hospedeira induz a atividade do SSTT (MÉNARD et al., 1993; MÉNARD ET AL., 1996), que leva à inserção das IpaB e IpaC na membrana da célula, com formação de um poro de 25 Å (BLOCKER et al., 1999). Por esse poro, efetores são translocados para dentro da célula, como IpaA e IpgD que modulam a reorganização dos filamentos de actina da célula alvo (BLOCKER et al., 2003). A atividade do Mxi-Spa SSTT também pode ser induzida após a exposição da bactéria ao corante vermelho congo ou a determinados meios de cultura (BAHRANI et al., 1997).

A inativação dos genes *ipa*B, *ipa*C, *ipa*D inibe a entrada da bactéria dentro de células HeLa (BLOCKER *et al.*, 1999) e a inativação do gene *ipa*A altera, mas não impede a entrada da bactéria nestas células (TRAN VAN NHIEU *et al.*, 1997; BLOCKER *et al.*, 1999). Foi demonstrado também que a IpaB sozinha é suficiente para ativar a apoptose em macrófagos (CHEN *et al.*,1996). A função da IpaA até há pouco tempo era desconhecida. Foi proposto que esta Ipa seria translocada para dentro do citoplasma onde modularia a invasão de *Shigella* pela sua interação com a vinculina (proteína da célula hospedeira associada com a actina intracitoplasmática) durante a invasão em células HeLa. (TRAN VAN NHIEU *et al.*, 1997). O papel da IpaD na invasão ainda não está claro. Acreditava-se que esta proteína estaria envolvida na fase inicial de aderência bacteriana. Contudo, foi demonstrado que

mutantes no gene *ipaD* preservaram a capacidade de aderir nas células do hospedeiro. Sabe-se que estes mutantes não são invasivos, não são hemolíticos e, presumivelmente, incapazes de escapar do fagossomo (MÉNARD *et al.*, 1993). Recentemente, foi sugerido que a IpaD, acompanhada da IpaB, interagem com o aparato de secreção para modular a secreção de IpaC, IpaB e de várias outras proteínas bacterianas. A IpaD está presente no citoplasma e também associada à membrana externa (COSSART & SANSONETTI, 2004; TURBYFILL *et al.*, 1998).

O gene plasmidial *ics*A ("intra- and intercellular *s*pread") codifica uma proteína de membrana externa de 120 kDa que atua no pólo apical da bactéria. IcsA é responsável pela indução da polimerização da actina nesse local, o que leva à formação de protrusões intercelulares que propulsionam a bactéria para frente (BERNARDINI *et al.*, 1989; RATHMAN *et al.*, 2000).

Outro gene plasmidial envolvido na disseminação intercelular é o *ics*B. Inicialmente, foi atribuído à proteína IcsB a função de lise das duas membranas celulares que envolvem a bactéria na passagem de uma célula infectada para outra adjacente (ALLAOUI et al., 1992). Ogawa e colaboradores (2003), através de experimentos de placas de lise em células MDCK e testes de Serény em cobaias, observaram que o gene de virulência *icsB* é essencial para a patogenicidade de *Shigella*. Recentemente, Ogawa e colaboradores (2005) observaram que IcsB interage com IcsA e com Atg5 (proteína autofágica) na formação do autofagossomo.

Em ensaios envolvendo monocamadas celulares foi demonstrado que *S. flexneri* invade células epiteliais apenas por seu pólo basolateral, sendo incapaz de fazê-lo pelo pólo apical. Para promover a infecção, portanto, a bactéria necessitaria de outra rota de invasão. Utilizando-se alça ligada de coelho, foi observado que cepas de *Shigella* translocam através células M, sendo esta então sua via de entrada no epitélio intestinal (PERDOMO et al., 1994; COSSART & SANSONETTI, 2004).

Penetrando pelas células M, a bactéria encontra células apresentadoras de antígenos, como macrófagos residentes e células dendríticas, e a fagocitose por estas células é o primeiro passo na geração da resposta inflamatória. A ligação da IpaB, produzida por *Shigella*, com a Caspase 1, uma protease intracelular presente nos macrófagos, desempenha um duplo papel: a morte dos macrófagos por apoptose, demonstrada *in vitro* e *in vivo* (ZYCHLINSKI *et al.*, 1992 e 1996); e a clivagem das

citocinas pró- IL-1 e pró-IL-18 em suas formas ativas (GUICHON *et al.*, 2001; HILBI *et al.,* 1998).

Após o escape dos macrófagos, a bactéria penetra então na célula intestinal, pelo lado basolateral, e se dissemina para as células adjacentes. Em resposta à invasão bacteriana, as células epiteliais intestinais expressam uma série de moléculas pró-inflamatórias, principalmente quimiocinas, como IL-8 (JUNG *et al.,* 1995). De fato, as células do epitélio intestinal não funcionam apenas como barreira mecânica, protegendo o indivíduo do meio externo; elas também participam ativamente da imunidade da mucosa. Foi demonstrado, *in vitro* e *in vivo*, que células epiteliais intestinais apresentam a capacidade de expressar moléculas de adesão, apresentar antígenos para células T e produzir citocinas (JUNG *et al.,* 1995; PÉDRON *et al.,* 2003).

A síntese de quimiocinas (IL-8, principalmente) tem papel fundamental na disseminação bacteriana e forte resposta inflamatória característica da infecção por *Shigella* sp. Estas quimiocinas são responsáveis pelo recrutamento de células do sistema imune inato, como monócitos, células dendríticas e principalmente neutrófilos polimorfonucleares (PMN). A migração destas células para o local da infecção causa desestabilização do epitélio intestinal, permitindo, assim, a passagem de um maior número de microrganismos que irão invadir os enterócitos, pela superfície basolateral, o que leva à destruição tecidual. (DONNENBERG, 2000; PARSOT & SANSONETTI, 1995, SANSONETTI, 2001). O grupo consiste nas moléculas IL-8, MCP-1, CCL4, CCL20, CCL19, PF4 e RANTES, produzidos basicamente por macrófagos e células endoteliais ativadas, sob influência de citocinas pró-inflamatórias.

Na shigelose, a resposta inflamatória da mucosa intestinal está bem caracterizada quanto à função dos MΦ (ZYCHLINSKY et al, 1994a, ZYCHLINSKY et al, 1994b, HILBI et al, 1997) e células epiteliais intestinais (JUNG *et al.,* 1995; PÉDRON *et al.,* 2003; PHILPOTT *et al.*, 2000; SANSONETTI, 2001). Edgeworth e colaboradores (2002) estudaram o comportamento das células dendríticas durante infecção por *S. flexneri.* Assim como os MΦ, as células dendríticas derivadas de monócitos humanos também sofrem rápida morte celular dependente de IpaB, em um mecanismo que envolve caspase-1 e outras cisteína-proteases ainda não identificadas. Esses autores também observaram que células dendríticas infectadas

com *S. flexneri* contribuem para a indução do início da resposta inflamatória através da secreção de IL-1β, seguida de ativação celular em resposta à invasão bacteriana.

PÉDRON e colaboradores (2003) demonstraram que *Shigella flexneri* altera o padrão transcricional de mediadores inflamatórios em células intestinais Caco-2. Pela técnica de *microarray*, foi possível observar que após a invasão bacteriana ocorre aumento na expressão de uma série de moléculas, como quimiocinas (IL-8, CXCL1, 2 e 3), TNF, moléculas de adesão (ICAM-1) entre outras. Foi observado também, que células epiteliais, após invasão por *Shigella*, ativam a translocação do fator transcricional NF-κB, que promove a transcrição dos genes responsáveis pela síntese de citocinas inflamatórias, como IL-8 (PHILPOTT *et al.*, 2000).

Apesar das semelhanças fisiopatológicas entre EIEC e *Shigella*, a dose infectante de EIEC é muito maior do que a de *Shigella* (DuPONT *et al.,* 1971). Além disso, a doença causada por EIEC parece apresentar-se numa forma mais branda e autolimitante. Em testes de Serény realizados em nosso laboratório, foi possível observar claramente a diferença de patogenicidade entre EIEC e *Shigella*. O desenvolvimento da ceratoconjuntivite em cobaias inoculadas com EIEC ocorre após quatro a cinco dias de infecção enquanto que *Shigella* desencadeia essa patologia após 48 horas, além de proporcionar um quadro clínico mais grave, com a presença de ulcerações na córnea do animal. Contudo, já foi demonstrado que não há diferenças significantivas entre os plasmídios de invasão das duas espécies (FORMAL *et al.,* 1983).

Mesmo com sua importância reconhecida, pouco se sabe sobre o mecanismo de patogenicidade de EIEC e as alterações que essa bactéria gera nas células hospedeiras. Com a finalidade de contribuir para o conhecimento da biologia de EIEC, vários trabalhos foram desenvolvidos em nosso laboratório.

Os sistemas de captação de ferro por EIEC foram abordados por Andrade (1996) e Dall'agnol e Martinez (1999). Sistemas de alta afinidade de transporte de ferro foram expressos pelas amostras de EIEC durante o crescimento em meio de cultura com baixas concentrações de ferro. Foram produzidos sideróforos do tipo fenolato (enterobactina) e hidroxamato (aerobactina). Os autores sugeriram que EIEC possui alta capacidade de adaptação ao microambiente, talvez pelo uso de sistemas de captação de ferro, que consomem menos energia. A capacidade de utilizar diferentes fontes de ferro pode facilitar o desenvolvimento de processos infecciosos por esta bactéria.

AZEVEDO (1998) estudou a influência do pH ácido no metabolismo de EIEC, onde a tolerância ao pH ácido estomacal poderia ser uma diferença entre EIEC e *Shigella* [as espécies de *Shigella* sobrevivem ao pH ácido (GORDEN & SMALL, 1993)]. O pH estomacal provocou alterações no perfil eletroforético do AgO, fenômeno que foi reversível após três a cinco horas em pH neutro. Esses dados foram confirmados por uma amostra de EIEC Serény positiva que, após duas horas em pH 2,5, perdeu sua capacidade de causar ceratoconjuntivite em cobaio; contudo, após seis horas em pH neutro, essa amostra retomou seu potencial invasor.

A produção de flagelos por sorotipos imóveis de EIEC foi conduzida por Andrade e colaboradores (2002). Os estudos realizados mostraram que os sorotipos imóveis de EIEC são capazes de expressar flagelos, que nem sempre são traduzidos em motilidade. A motilidade dessas amostras só foi observada em meios de cultura cuja concentração máxima de ágar era de 0,2%.

Após diversos ensaios fenotípicos que não elucidaram possíveis diferenças entre EIEC e *Shigella*, Gibotti e colaboradores (2004) estudaram as seqüências de nucleotídeos dos genes invasores de EIEC. Os autores observaram que os genes *ipa*A, *ipa*B, *ipa*C e *ipa*D de EIEC não possuem diferenças em suas seqüências de nucleotídeos que possam explicar a distinta patogenicidade entre EIEC e *Shigella*.

A partir de 2005, foram iniciados estudos sobre a interação parasita-hospedeiro, onde se abordou a interação de EIEC com macrófagos J774 e/ou macrófagos peritoniais murinos. Os dados desses estudos, obtidos recentemente em nosso laboratório, sugeriram que a doença mais branda causada por EIEC se deve provavelmente aos menores níveis transcricionais dos genes de virulência desse microrganismo, que podem resultar em uma menor tradução protéica quando comparado à *S. flexneri* (ALBUQUERQUE, 2006). Além disso, foi observado que (i) o escape de EIEC do macrófago se dá mais lentamente que o escape de *Shigella*; (ii) na infecção por *Shigella*, parece haver um maior estímulo dos mecanismos imunes inatos, como a produção de NO; (iii) a maior produção de TNF-α e IL-10 após desafio dos macrófagos com EIEC pode estar relacionada com uma eliminação mais eficiente da bactéria; (iv) em ensaios *in vivo*, foi observada uma maior produção de citocinas pró-inflamatórias na infecção por *Shigella*, enquanto EIEC estimulou um maior produção de IL-10; (v) *Shigella* mostrou ser mais eficiente na

geração da resposta imune adaptativa, (vi) a cinética de migração das células mononucleares e polimorfonucleares para o peritônio de camundongos infectados com *Shigella* e EIEC apresentou diferenças significativas (AMHAZ, 2007).

As células Caco-2 são derivadas de um adenocarcinoma intestinal. Em culturas longas, essa linhagem celular espontaneamente se diferencia, expressando diversas características morfológicas e bioquímicas do enterócito do intestino delgado (PINTO et al., 1983). Essas células crescem em monocamada, com morfologia polarizada cilíndrica, microvilosidades no lado apical, *tight junctions* entre as células adjacentes e expressão de hidrolases enzimáticas de intestino delgado. Por apresentar todas essas características, as células Caco-2 tem sido extensivamente utilizada nos últimos 20 anos como um modelo de barreira intestinal (SAMBUY et al., 2005).

Sendo o intestino o sítio anatômico alvo da infecção por EIEC, estudos com células intestinais são necessários para o conhecimento da biologia celular da infecção por esse microrganismo.

No presente trabalho foi estudado o comportamento de EIEC e *S. flexneri* quando em contato com células Caco-2, avaliando-se uma cinética de expressão dos genes envolvidos na invasão, escape e disseminação bacteriana. Também foi avaliada a modulação da resposta inflamatória de células dendríticas intestinais murinas pela da produção de citocinas, expressão de moléculas co-estimulatórias e apresentação de antígenos, após desafio das células com EIEC e *S. flexneri*. Um sistema de co-cultura foi utilizado como modelo experimental para mimetizar de forma mais fidedigna um microambiente intestinal. Neste, foram integradas as ações das células Caco-2, células dendríticas e estímulos bacterianos.

Com nossos resultados, esperamos contribuir para o conhecimento do processo invasor de EIEC, bem como para o conhecimento da biologia celular da infecção por esse microrganismo, visto que a mucosa intestinal é a primeira linha de defesa do organismo contra enteropatógenos.

# *Objetivos*

# 2- OBJETIVOS

## 2.1- Objetivo geral

O objetivo principal deste trabalho é esclarecer tópicos da patogenicidade de EIEC que sustentem a sua menor virulência quando comparada à *Shigella flexneri.* Para tanto, o projeto em desenvolvimento tem como objetivos (i) quantificar e comparar a expressão dos genes plasmidiais de EIEC e *Shigella* durante infecção em células intestinais humanas Caco-2, (ii) estudar o papel das células dendríticas intestinais de camundongos no processo inflamatório gerado por esses microrganismos e (iii) avaliar a interação entre as células intestinais humanas e as células dendríticas humanas durante a infecção.

## 2.2- Objetivos específicos

- Comparar a transcrição de genes plasmidiais de virulência de EIEC e *Shigella* através das técnicas de RT-PCR semi-quantitativo e PCR em tempo real, após invasão e disseminação em células Caco-2 polarizadas;

- Estudar a ativação das células dendríticas por EIEC e *Shigella* através da expressão de moléculas co-estimularórias e receptores de superfície, bem como o perfil de secreção de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias TNF-$\alpha$, IL-10 e IL-12;

- Avaliar a capacidade de apresentação de antígenos das células dendríticas intestinais infectadas com EIEC e *Shigella* através de ensaios de proliferação de células T $CD4^+$ *naïve*;

- Avaliar a transmigração de células dendríticas humanas através de uma monocamada de células Caco-2 após estímulo bacteriano, bem como o perfil de secreção de citocinas inflamatórias neste microambiente.

# *Materiais e Métodos*

# 3- MATERIAIS E MÉTODOS

## 3.1- Amostras bacterianas,

Os ensaios de infecção bacteriana foram realizados com as cepas *Shigella flexneri* M90T e *Escherichia coli* enteroinvasora do sorotipo O124:H$^-$ **(Tabela 1)**, previamente submetidas ao Teste de Serény (SERÉNY, 1963) para confirmação de sua capacidade invasora. O cultivo das bactérias foi realizado em caldo tríptico de soja (TSB), ágar vermelho-congo (VC) [ágar tríptico de soja, acrescido de 0,02% de corante vermelho congo (Sigma-Aldrich)] ou ágar MacConkey (MC), sempre incubados a 37ºC em estufa bacteriológica.

**Tabela 1** - Amostras bacterianas

| Cepa | Característica | Fonte |
|---|---|---|
| FBC124/13 | Amostra selvagem de EIEC O124:H$^-$, isolada de fezes diarréicas, possui o plasmídio pInv, teste de Sèreny positivo | Gibotti, A. et al., 2004 |
| M90T | *Shigella flexneri*, possui o plasmídio pInv, teste de Sèreny positivo | Dr Phillip Sansonetti, Institut Pasteur, Paris, France |

### 3.1.1- Inoculo bacteriano

O corante vermelho-congo foi utilizado como um marcador de virulência das amostras bacterianas M90T e FBC124/13. São consideradas colônias vermelho-congo positivas aquelas que apresentam coloração vermelho-tijolo em ágar VC, resultado da precipitação do corante quando em contato com proteínas virulentas secretadas pelas bactérias (BAHRANI et al., 1997). Desta forma, as bactérias M90T e FBC124/13 foram semeadas em ágar VC e incubadas por 48 horas a 37°C em estufa bacteriológica. As colônias vermelho-congo positivas foram selecionadas, inoculadas em caldo TSB e incubadas por 4 horas (para a obtenção da fase logarítmica de crescimento) sob agitação contínua (30 g), a 37°C. A cultura bacteriana foi centrifugada a 900 g por 5 minutos e o sedimento foi ressuspenso em meio de cultura celular (DMEM ou RPMI). A concentração bacteriana foi ajustada em espectrofotômetro (Spectronic 20, Bausch & Lomb) até obtenção de $10^8$ bactérias por mililitro ($\lambda$ = 625 nm, absorbância 0,01). A densidade bacteriana foi confirmada através da semeadura desta diluição em ágar MC, com posterior contagem de colônias.

### 3.2- Modelo celular de epitélio intestinal polarizado

Células Caco-2, uma linhagem celular de adenocarcinoma intestinal humano, foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (D-MEM) suplementado [10% de soro fetal bovino, 25 mM de glicose, 1% de aminoácidos não essenciais 100X concentrado (Sigma-Aldrich), 2 mM L-glutamina (Sigma-Aldrich)], acrescido de 100 U/mL penicilina (Sigma-Aldrich) e 100 μg/mL estreptomicina (Sigma-Aldrich). As células foram mantidas em atmosfera de 5% de $CO_2$, a 37ºC, em garrafa para cultura celular (75 $cm^2$). Antes de sua confluência, as células foram tripsinizadas e cultivadas em placas de 24 orifícios (2 X $10^5$ células/poço) (TPP®, Suíça) ou em membrana de 3 μm de poro (2 X $10^5$ células/poço), presente em um dispositivo de cultura celular (*Transwell*) inserido em placas de 12 orifícios (Corning, Inc., Corning, NY), até sua diferenciação e polarização (10 dias pós-confluência total).

### 3.3- Infecção bacteriana em células Caco-2 polarizadas

#### 3.3.1- Ensaio de invasão bacteriana

Após a diferenciação da monocamada de células Caco-2 em placas de 24 orifícios (item 3.2), as células foram lavadas duas vezes com solução salina tamponada (SST – 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM $Na_2HPO_4$; 2 mM $KH_2PO_4$) para remoção do antibiótico remanescente do meio de cultura. Para a infecção, adicionou-se um mililitro de DMEM suplementado (sem antibiótico) contendo $10^7$ bactérias, seguido de centrifugação a 1 g por 5 minutos para sincronizar a infecção. O ensaio foi realizado em triplicata para cada espécie bacteriana.

As células infectadas foram incubadas em atmosfera de 5% de $CO_2$ a 37°C por diferentes intervalos de tempos (1,5 e 2 horas). Logo após, as células foram lavadas três vezes com SST e incubadas por 50 minutos com DMEM suplementado e acrescido de 50μg/mL de gentamicina. Uma nova lavagem com SST foi realizada para posterior lise celular com solução de triton X-100 a 0,1%. As bactérias foram diluídas e semeadas em ágar MC. Após incubação por 18h a 37°C, realizou-se a contagem das unidades formadoras de colônias que estavam presentes no interior das células eucarióticas.

### 3.3.2- Cinética de disseminação bacteriana

Procedeu-se a infecção em células Caco-2 polarizadas de acordo com o item 3.3.1. As células infectadas foram incubadas em atmosfera de 5% de $CO_2$ a 37°C por 2 horas (tempo determinado após análise dos resultados do item 3.3.1). Logo após, as células foram lavadas com SST e incubadas com DMEM (adicionado de 50 μg/mL de gentamicina) por diferentes intervalos de tempo (1, 2, 3, 4, e 5 horas). Em seguida, as células foram novamente lavadas com SST e lisadas com solução de triton X-100 a 0,1%. As bactérias foram diluídas e semeadas em ágar MC. Após incubação por 18h a 37°C, realizou-se a contagem das unidades formadoras de colônias.

## 3.4- Viabilidade das células Caco-2 após infecção bacteriana

As células Caco-2 foram infectadas com FBC124/13 e M90T conforme descrito no item 3.3.2. Após a cinética de disseminação bacteriana, o sobrenadante celular foi descartado e as células foram lavadas uma vez com SST. Em seguida, as células foram ressuspensas em 300 μL de tampão citrato (0,1% de Citrato de sódio, 0,1% de Triton X-100 e 50 μg/ml de Iodeto de Propídio) e analisadas em Citômetro de Fluxo (FACScalibur, Becton-Dikinson).

## 3.5- Ensaio de placas de lise para visualização da disseminação bacteriana

As células Caco-2 foram cultivadas em placas com 6 orifícios (TPP®, Suíça) (1 x $10^6$ células/poço) até formação de uma monocamada diferenciada. Para o ensaio de placas de lise, as células foram lavadas com SST, acrescidas de 2 mL de DMEM e infectadas com duas concentrações diferentes de inóculo bacteriano: 1 x $10^4$ e 1 x $10^5$ bactérias (FBC124/13 ou M90T) por poço. As células foram, então, incubadas em atmosfera de 5% de $CO_2$, a 37°C por 2 horas, tempo escolhido para promover a invasão bacteriana. Em seguida, as células foram lavadas 2 vezes com SST e incubadas em DMEM contendo 50 μg de gentamicina/ mL, sob atmosfera de 5% de $CO_2$, a 37°C por 30 minutos. Logo após, o meio de cultura foi removido e um novo DMEM, agora acrescido de 50 μg de gentamicina/ mL e 1% ágar bacteriológico, foi adicionado à monocamada delicadamente. As células foram novamente

incubadas em atmosfera de 5% de $CO_2$, a 37°C, por diferentes intervalos de tempo: 36, 48 e 84 horas. Após incubação, adicionou-se ao meio semi-sólido 1,5 mL de uma solução de vermelho-neutro a 0,033% em SST. As células foram novamente incubadas, agora por 2 horas, sob atmosfera de 5% de $CO_2$, a 37°C. Em seguida, a solução de vermelho-neutro foi removida e as células foram re-incubadas na estufa, até a visualização das placas de lise (aproximadamente 2 horas). As placas de lise foram foto-documentadas para posterior análise do diâmetro dos halos formados.

### 3.6- Avaliação da expressão dos genes de virulência de EIEC FBC124/13 e *Shigella flexneri* M90T após infecção em células Caco-2 polarizadas

#### 3.6.1- Processo de invasão bacteriana em células Caco-2: bactérias presentes no sobrenadante da cultura celular

A infecção das células polarizadas foi realizada segundo o item 3.3.1. Para o estudo da cinética da expressão de genes de virulência, as células infectadas foram incubadas durante 30, 60, 90 e 120 minutos. Em seguida, o sobrenadante da cultura foi coletado para extração do RNA total (item 3.5.3). Os RNAs foram analisados quanto à expressão qualitativa dos genes *virF, virB, ipaA-D, spa32, mxiH* e *ipgC* por RT-PCR semiquantitativo e quanto à expressão quantitativa dos genes *virF, virB, ipaA-D* por PCR em tempo real (PCR quantitativo – qPCR). A fração 16S do gene RNA ribossômico (*16S* rRNA) foi utilizada como controle interno e todos os cálculos de expressão gênica foram baseados na sua expressão. A fim de se estudar o papel da célula do hospedeiro na regulação da transcrição dos genes de virulência, o RNA bacteriano foi obtido também de bactérias que não entraram em contato com as células Caco-2. Vide esquema **Figura 4.**

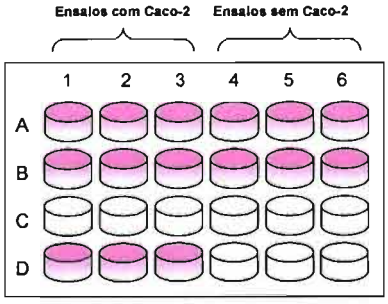



**Figura 4 - Desenho esquemático dos ensaios de invasão de *Shigella flexneri* M90T e EIEC FBC124/13 em células Caco-2 polarizadas.** A – poços com FBC124/13, B – poços com M90T, D – poços sem bactérias. Colunas 1, 2 e 3 – monocamada de Caco-2; colunas 4, 5 e 6 – ausência de monocamada celular.

### 3.6.2- Processo de disseminação bacteriana em células Caco-2: bactérias intracelulares

A infecção celular foi realizada segundo o protocolo descrito no item 3.3.2. Após os tempos de incubação de 1, 2, 3, 4, e 5 horas, as células foram novamente lavadas com SST e coletadas para extração do RNA total (monocamada de Caco-2 e bactérias intracelulares) (item 3.6.3). Os RNAs foram analisados quanto à expressão qualitativa dos genes *virB, ipaA-D* e *icsA* por RT-PCR semiquantitativo e quanto à expressão quantitativa dos genes *virF, virB, ipaA-C, icsA* e *icsB* por qPCR. O gene 16S rRNA foi utilizado como controle interno, como descrito anteriormente (item 3.6.1).

### 3.6.3- Extração de RNA

As amostras adquiridas nos itens 3.6.1 e 3.6.2 foram submetidas à extração de RNA total pelo Kit Rneasy (Qiagen Laboratories, Uniscience do Brasil, São Paulo), de acordo com protocolo recomendado pelo fornecedor. A preparação foi tratada com DNase (*RNase-Free DNase set*, Qiagen Laboratories) e uma eletroforese em gel de agarose a 0.8% foi realizada no final do ensaio para observar a qualidade da extração. Além disso, foi realizada uma reação de PCR com *Taq* DNA polimerase para observar se havia contaminação com DNA.

As preparações de RNA total foram estocadas a -80ºC até o momento da utilização.

### 3.6.4- Quantificação do RNA total

Um microlitro de cada amostra de RNA extraído foi quantificado através do NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) a 260 nm e sua pureza foi avaliada em comprimento de onda de 260/280 nm. Todas as amostras foram diluídas para 10 ng/µL para posterior síntese da primeira fita de DNA complementar.

### 3.6.5- Síntese da fita de DNA complementar (cDNA)

A primeira fita de cDNA foi sintetizada com Superscript II e hexâmeros randômicos do kit *SuperScript*™ *First-Strand synthesis System for RT-PCR*, segundo recomendações do fabricante (Invitrogen, Carlsbad, Calif.). Em um microtubo, acrescentou-se 100 ng de hexâmeros, 10 mM de dNTP mix e 170 ng de RNA, para um volume final de 20 µL. A preparação foi incubada a 65° C por 5 min e em seguida

imediatamente colocada no gelo. Ao microtubo, adicionou-se 18 µL de uma solução contendo 1x RT *buffer*, 25 mM de $MgCl_2$, 0,1 M de DTT e 24 unidades de *RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor*. A reação foi incubada por 2 min a 25°C. Logo após, adicionou-se 30 U de *Superscript II* seguido uma incubação sucessiva de 25°C por 10 min, 42°C por 50 min e 70°C por 15 min. Ao final da reação, foi adicionada 1,2 U de RNaseH, seguida de incubação a 37°C por 20 min para remover as fitas de RNA remanescentes. A amostra foi estocada a - 20°C até o uso.

**3.6.6- RT-PCR semiquantitativo**

A primeira fita de cDNA sintetizada por RT foi submetida à técnica de PCR semiquantitativo. A expressão do gene *16S* rRNA foi usada como controle interno da reação. O cDNA foi amplificado por PCR, utilizando-se *Taq* DNA polimerase, tampão da enzima, dNTPs e iniciadores específicos. Os iniciadores foram sintetizados a partir da seqüência de *Shigella flexneri* depositada no GenBank, número nc_002698 (**Tabela 2**). Para um volume final de 20 µL, utilizou-se 1x Solução tampão 10X, 1,5 mM de $MgCl_2$, 150 µM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 0,4 µM de iniciador, 1,0 unidade de *Taq* DNA polimerase (Fermentas Life Sciences, Lituânia), 20 ng de cDNA e água milliQ estéril para completar o volume final da reação. As amplificações foram realizadas no termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf) sob as seguintes condições: um ciclo a 94°C por 2 min; variável número de ciclos (padronizado para cada amostra) a 94°C por 40 s, 50-60°C (dependendo da temperatura de associação de cada iniciador) por 30 s e 72°C por 50 s. A reação foi concluída com um ciclo a 72°C por 5 min. O número de ciclos foi padronizado a partir do nível de expressão de cada gene a fim de evitarmos trabalhar com amplificações na região do platô. Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose a 1 % em tampão TBE 0,5x (Trisma-base 0,1M, ácido bórico 0,09M e EDTA 1mM). As amostras foram coradas com brometo de etídio (10 µg/mL) e visualizadas sob luz UV. A imagem fotográfica foi digitalizada pelo sistema *Photodocumantation System* Modelo: DP-001.FDC Versão 10 (*Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée Cedex* 1 - França) e impressa pelo sistema de *Vídeo Graphic UP-895CE* (SONY).

Após a obtenção da imagem digital, os tamanhos dos fragmentos de DNA foram analisados para construção dos histogramas de intensidade de banda através do programa *PhotoCaptMw* versão10.01 *for Windows*.

Os iniciadores foram sintetizados de forma a se evitar a formação de *hairpin* e dímeros, sendo testados e padronizados em DNA de lisados das bactérias para observar o seu funcionamento nas mesmas condições do RT-PCR. Os lisados bacterianos foram obtidos por fervura após cultivo das bactérias em meio ágar TSA a 37ºC por 18 horas.

**Tabela 2**- Iniciadores sintetizados a partir da cepa de *Shigella flexneri* depositada no GenBank (N° nc_002698).

| Gene | Seqüências (5'-3') | Tamanho do fragmento (bp) | Temperatura de hibridização |
|---|---|---|---|
| *ipaA* | ipaA-F AAGATTCGCATCCTATCCAAG<br>ipaA-R TGTGGTAGAACGGAAGTTAC | 307 | 50ºC |
| *ipaB* | ipaB-F CCGGCAATTCCTTCATGGAAC<br>ipaB-R AGTTGAGAAGAAAAATTCTTG | 310 | 50ºC |
| *ipaC* | ipaC-F GTCACACAAGTAGGTATAACG<br>ipaC-R TCTGGGTGTCAATTTTATCCT | 301 | 50ºC |
| *ipaD* | ipaD-F ATATGAACATGCCGTTAGTTC<br>ipaD-R TGGGGTCATGTTTATACTGAC | 326 | 50ºC |
| *ipgC* | ipgC-F AAGGAAGAATAGAGGAAGCTG<br>ipgC-R TCATTGCTGTGTTGAATTACG | 262 | 50ºC |
| *spa32* | spa-F TCTGCTAGAATCTGATAATAG<br>spa-R TAGAACAAAAGAACCAGACTC | 301 | 50ºC |
| *mxiH* | mxiH-F GATGGAACTCAAACATTAC<br>mxiH-R CATCCTTAATCACTTTCAC | 150 | 50ºC |
| *icsA* | icsA-F GAGTCAATCTACCCATAATC<br>icsA-R GTGTTCCATCATCTTGTTTAC | 342 | 50ºC |
| *virF* | virF-F CATTTCAACACTCCTATTC<br>virF-R AACTAAGAGAAGAAGCTATCG | 208 | 53ºC |
| *virB* | virB-F CAGCAAAAGAGCATAGCATC<br>virB-R AGAGATTCATTAGCCTTTTC | 251 | 53ºC |
| *16S rRNA* | 16S-F CAGCAGCCGCGGTAATAC<br>16S-R ACCAGGGTATCTAATCCTGT | 283 | 60ºC |

### 3.6.7- PCR em tempo real

A expressão dos genes de virulência de FBC124/13 e M90T foi quantificada por PCR em tempo real (Sistema TaqMan®). O cDNA proveniente dos ensaios de invasão (item 3.6.1) e disseminação (item 3.6.2) foram submetidos às condições universais de termociclagem no equipamento ABI Prism® 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, New Jersey, EUA). Para cada reação da PCR, utilizou-se 3 ng de cDNA (ensaio de invasão) ou 15 ng de cDNA (ensaio de diseminação); 12,5 µL 2x *TaqMan PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, Calif.); 1,25 µL 20x *gene expression* (iniciadores e sonda fluorescente) (Applied Biosystems, Foster City, Calif.) (**Tabela 3**) e 8 µL de água milliQ estéril (volume final de reação – 25 µL).

A expressão relativa dos genes de virulência foi calculada pelo método matemático de $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde o gene 16S rRNA foi utilizado como normalizador e os genes $ipaB_{EIEC/30\ minutos}$ e $icsA_{EIEC/1\ hora}$ foram usados como calibradores dos ensaios

de invasão e disseminação respectivamente. No **Esquema 1**, pode-se visualizar de forma mais clara o método utilizado para o cálculo da expressão relativa dos genes de virulência.

**Esquema 1** – Método matemático para cálculo da expressão relativa de genes por PCR em tempo real

Dados obtidos após análise da PCR em tempo real:

- CT 16S rRNA (normalizador)
- CT gene alvo
- CT gene calibrador

CT gene alvo – CT normalizador = ΔCT gene alvo

ΔCT gene alvo – ΔCT gene calibrador = ΔΔCT gene alvo

Expressão relativa = $2^{-\Delta\Delta CT}$

**Tabela 3** - Iniciadores e sondas da reação RT-PCR Quantitativo

| Gene | Primer 5' (5'-3') | Sonda (5'FAM) | Primer 3' (5'-3') |
|---|---|---|---|
| *virF* | TCTGAGGAGGAGGTTTCTATCGATT | CCGAAAGGCATCTCTTTT | GAAACAGCTGATAAAAGGCAAGCT |
| *virB* | TCTCGCGCGAAAGTCACT | CCTTTCAGGCAGCAAGC | GTTCTGACGCGATTGGAAATAGAGA |
| *ipaA* | TGCACAGTCTCCTACTTCTCAGA | CCGTAACGGAAACTCA | CTTTTTGAACTAGTGCTCTTTGTGGATT |
| *ipaB* | TTGGGCGTCGACTCGAAAA | ATTGCCCCCAGAATAGA | ACTGCTGCAACTAGGACAAGAG |
| *ipaC* | CCTCACCACAAACTAACTCTAGCA | CTGGCGCCAGTTTAT | GAGAAGTTTTATGTTCAGTTGACAGGGATA |
| *ipaD* | CAAGATTTTAGCGCTGTTCTTTCCA | TTGCCGGCTGGATCT | CGGAGTTTCCGTCGTTACCT |
| *icsA* | CTCTCTGTAATCAATAAGGGCACGTT | CCGTAAGCAGCACCTCC | CCACCGTAGCCATCATAACCATAA |
| *icsB* | CATTCCGCCGGGATACCA | CTACAGGAACCAACTCATACCT | GGCATAACCCATTTAGGGCATACTA |
| *16S* | GCGGTTTGTTAAGTCAGATGTGAAA | TCAACCTGGGAACTGC | GACTCAAGCTTGCCAGTATCAGAT |

### 3.7- Modelo animal

Camundongos C57BL/6 machos (8 a 12 semanas de idade) foram utilizados para a obtenção das células dendríticas intestinais. Os animais foram adquiridos no Biotério de Criação e Experimentação vinculado à Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP. Foram utilizados aproximadamente 100 animais.

#### 3.7.1- Purificação de células dendríticas intestinais de camundongos

As células dendríticas do intestino delgado de camundongos C57BL/6 foram purificadas, segundo técnica modificada descrita por Jang e colaboradores (2006). Brevemente, segmentos do intestino delgado foram tratados com SST contendo 10% SFB, 20 mM HEPES, 100 U/mL penicilina, 100 μg/mL estreptomicina, 1 mM piruvato de sódio e 10 mM EDTA. Após incubação por 30 minutos a 37°C, os segmentos intestinais foram lavados várias vezes com SST suplementada (2% SFB, 100 U/mL penicilina, 100 μg/mL estreptomicina) e submetidos à digestão celular com colagenase tipo 1 (0,7 μg/mL em R10). Filtrou-se a mistura em gaze estéril e o sobrenadante foi centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos. O sedimento celular foi ressuspenso em 0,5 mL SST 2% SFB, marcado com anticorpo anti-CD11c *microbeads* (Miltenyi Biotec, Bergisch, Alemanha) e incubado em gelo por 15 minutos. As células dendríticas foram, então, separadas de outras linhagens celulares por coluna magnética, utilizando-se o kit MACS LS Columns (Miltenyi Biotec), segundo instruções do fabricante.

### 3.8- Imunofenotipagem de células dendríticas intestinais

As células dendríticas, ativadas ou não com FBC124/13 ou M90T foram caracterizadas por citometria de fluxo quanto às moléculas co-estimulatórias e específicas expressas em sua superfície. Analisou-se a expressão dos seguintes marcadores: MHC-II, CD80, CD86, CD40 e TLR4 marcados com PE ou FITC. As células dendríticas purificadas foram contadas em câmera de Neubauer, aliquotadas ($3 \times 10^5$) em R10 (RPMI suplementado com 10% de SFB) e desafiadas por 3 horas com bactérias em uma diluição de infecção (DI) de 1:10 (uma célula para cada 10 bactérias). Cada alíquota de células dendríticas, desafiadas ou não com antígenos, foi marcada com anticorpos específicos e incubadas em gelo por 30 minutos. Após

incubação e centrifugação, as células foram ressuspensas em solução fixadora (SST com 2% glicose e 1 % formaldeído) e mantidas a 4°C até análise. As células foram lavadas, ressuspensas em SST 2% SFB e analisadas quanto à média de intensidade de fluorescência (MIF) através de citometria de fluxo (FacScalibur – Becton & Dickison, CA).

### 3.9- Ensaio de proliferação de células T

#### 3.9.1– Purificação de linfócitos T

Os linfonodos mesentéricos de camundongos C57BL/6 não infectados foram retirados e macerados. A mistura de células foi marcada com anticorpo monoclonal anti-$CD4^+$ *microbeads* (Miltenyi Biotec), de acordo com o item 3.7.1. Os linfócitos T $CD4^+$ *naïve* foram separados das outras linhagens celulares utilizando-se o kit MACS LS Columns (Miltenyi Biotec), segundo instruções do fabricante.

#### 3.9.2– Proliferação de linfócitos T mediada por células dendríticas intestinais após infecção por FBC124/13 e M90T

Os linfócitos T $CD4^+$ purificados foram ressuspensos em meio RPMI suplementado com 2% SFB (R2) e 50 µg gentamicina/mL. As células foram contadas em câmara de Neubauer e alíquotadas ($5x10^4$) em placas de 96 orifícios. As células dendríticas ($15x10^4$) foram ativadas por uma hora com concentrações variadas de bactérias (1:1 e 1:10). Em seguida, as células foram centrifugadas, ressuspenas em meio R2 suplementado com 50 µg gentamicina/mL e co-cultivadas com os linfócitos T, em uma proporção de 3 células dendríticas para um linfócito (3:1). A placa foi incubada em atmosfera de 5% de $CO_2$, por 72 horas, a 37 °C. A fitohemaglutinina (PHA) (20 µg/mL) foi utilizada como controle positivo da proliferação celular.

Nas 16 horas precedentes à análise da linfoproliferação, adicionou-se 1 µCi de metil-$^3$H-timidina em cada poço da cultura celular. Para a análise, as células foram coletadas por um coletor automático de células e mensuradas quanto à incorporação da timidina através da emissão de radiações beta (Liquid Scintillation Counter, 1205 betaplate, Wallac).

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo



### 3.10- Células dendríticas derivadas de monócitos humanos

Células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram obtidas a partir do sangue venoso de voluntários saudáveis, recrutados no Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. O sangue periférico foi coletado diretamente em tubos contendo heparina sódica. O gradiente de Ficoll-Paque PLUS (densidade de 1.077 ± 0.001 g/mL) (GE Healthcare Bio-Sciences) foi utilizado para separar os componentes celulares do sangue periférico (eritrócitos, leucócitos, monócitos, linfócitos, etc), segundo as instruções do fabricante. Resumidamente, em um tubo estéril com capacidade para 50 mL, adicionou-se 15 mL de Ficoll-Paque PLUS. Em seguida, 20 mL de sangue periférico diluído 1:1 em SST foi cuidadosamente depositado acima do Ficoll-Paque, com o auxílio de uma pipeta pasteur estéril. A mistura foi centrifugada a 400 g por 45 minutos a 20°C. Logo após, a camada superior (plasma) gerada pela centrifugação foi descartada e, com uma pipeta parteur, a "nuvem" de PBMC foi cuidadosamente removida para um novo tubo, que continha 10 mL de SST, com o intuito de diluir o Ficoll remanescente, tóxico para as células (**Figura 5**). As PBMC foram lavadas com SST (adição de SST às células, seguido de centrifugação a 400 g, onde o sedimento celular foi ressuspenso em 90 µL SST 2% SFB, marcadas com anticorpo anti-CD14 *microbeads* (Miltenyi Biotec, Bergisch, Alemanha) e incubado em gelo por 15 minutos. Os monócitos foram, então, separados dos linfócitos por coluna magnética, utilizando-se o kit MACS LS Columns (Miltenyi Biotec), segundo instruções do fabricante.

Os monócitos purificados foram ressuspensos em 2 mL de meio R10, suplementado com as citocinas humanas GM-CFS (100 ng/mL) e IL-4 (50 ng/mL), e incubados por 3 dias em atmosfera de 5% de $CO_2$, a 37°C. No terceiro dia de cultura, o meio de cultura foi coletado em tubo estéril, centrifugado a 200 g por 5 minutos e o sedimento celular foi ressuspenso e um novo meio R10, suplementado com as citocinas. Essa suspensão celular foi adicionada ao mesmo poço de onde o meio de cultura foi removido. As células foram incubadas por mais 4 dias, em atmosfera de 5% de $CO_2$, a 37°C.

Após sete dias de cultura, as células dendríticas que se diferenciaram de monócitos foram coletadas do sobrenadante da cultura celular (as células que se

apresentavam aderidas não foram utilizadas). A pureza da cultura celular foi verificada por microscopia ótica, onde foram observadas as características peculiares das células dendríticas (dendritos), e por citometria de fluxo, onde parte da cultura celular foi marcada com os anticorpos anti-CD1a (marcador de células dendríticas), anti-DC14 (marcador de monócitos) e anti-HLA (molécula presente em altas concentrações nas células dendríticas). As células foram analisadas quanto à média de intensidade de fluorescência (MIF) através de citometria de fluxo (FacScalibur – Becton & Dickison, CA).

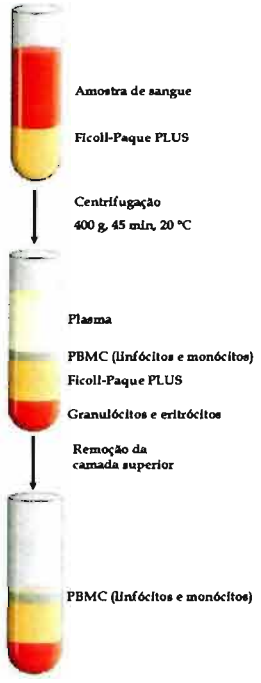



**Figura 5 – Esquema representativo da separação de células sanguíneas por gradiente de densidade com Ficoll-Paque PLUS.** Células mononucleares do sangue periférico venoso de voluntários saudáveis foram purificadas após centrifugação em gradiente de densidade de Ficoll-Paque. Após centrifugação, a fase superior, correspondente ao plasma, foi removida, expondo a camada de células mononucleares. Estas foram cuidadosamente removidas para posterior purificação dos monócitos.

## 3.11 - Secreção de proteínas efetoras bacterianas

A secreção de proteínas foi realizada de acordo com metodologia padronizada em nosso laboratório. A amostra bacteriana foi cultivada em Meio Essencial Mínimo Dulbeco (MEM; Sigma-Aldrich Química Brasil Ltda.) por 16-18 h a 37°C com agitação (35 g). Após a centrifugação (centrífuga Sorvall RC2-B, Wilmngton, Delaware, USA) a 10.410 *g* por 30 min a 4°C, o sobrenandante foi filtrado em membrana com poro de 0,22 μm de diâmetro (Millipore do Brasil, São Paulo, Brasil) e suplementado com Fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF; Sigma-Aldrich Química Brasil Ltda) a 50 μg/mL e EDTA (Gibco BRL - Life Technologies do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil) a 0,5 μM. Em seguida, o sobrenadante foi concentrado

1.000 vezes pelo sistema de ultrafiltração AMICON (Millipore do Brasil, São Paulo, Brasil) com membrana PM-10 (Millipore do Brasil, São Paulo, Brasil). O concentrado foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) a 10%.

### 3.12 – Migração de células dendríticas humanas através de uma monocamada de células Caco-2 diferenciadas

As células Caco-2 foram cultivadas em membrana de 3 µm de poro (2 X $10^5$ células/poço), presente em um dispositivo de cultura celular (*Transwell*) inserido em placas de 12 orifícios (Corning, Inc., Corning, NY), até sua diferenciação e polarização (10 dias pós-confluência total). Este dispositivo permite que seja montado um sistema de três componentes: superfície apical (AP) (que mimetiza o lúmen intestinal), monocamada de células epiteliais intestinais e o lado baso-lateral (BL) (que mimetiza a mucosa intestinal) (**Figura 6**). À superfície apical (AP) foram adicionadas 1 x $10^6$ bactérias (M90T ou FBC124/13) ou 100 µg de proteínas totais, em um volume final de 700 µL, seguido de incubação por 2 horas, sob atmosfera de 5% $CO_2$, a 37°C. Após esse tempo de pré-estimulação das células epiteliais, células dendríticas humanas (2 x $10^5$) derivadas de monócitos foram adicionadas à câmara basolateral (BL), também em um volume final de 700 µL. Como controle negativo, adicionou-se apenas meio de cultura (R10) à superfície AP das células Caco-2, previamente à adição das células dendríticas na câmara BL. O sistema foi incubado a 37°C, em atmosfera de 5% $CO_2$ por 5 horas. Os sobrenadantes de AP e BL foram coletados e a determinação da migração imuno-celular foi realizada em hemocitômetro. Adicionalmente, esses sobrenadantes foram analisados quanto à secreção das citocinas IL-8, MCP-1, CCL4, CCL19, CCL20 e TNF-$\alpha$ por ELISA de captura.

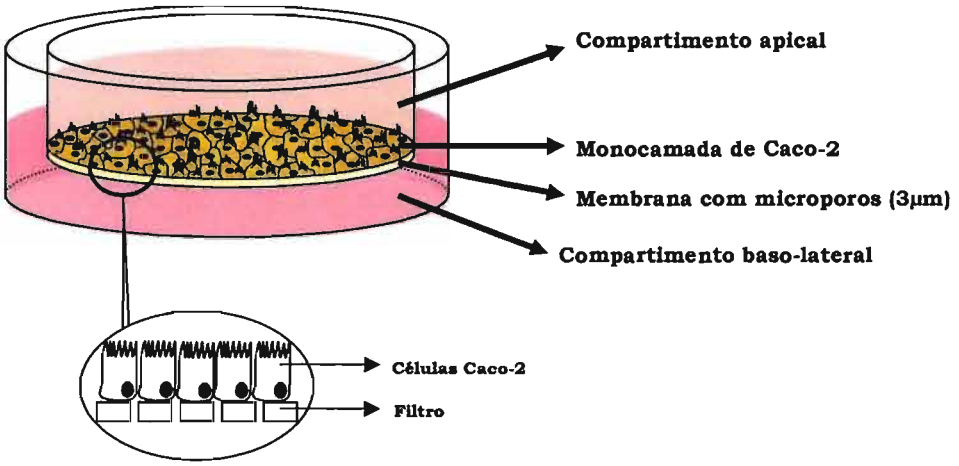



**Figura 6 – Esquema do sistema de co-cultura celular.** No compartimento apical, foram adicionados os estímulos bacterianos (bactérias ou proteínas secretadas). No compartimento baso-lateral, foram adicionadas as células dendríticas diferenciadas de monócitos humanos.

## 3.13- Dosagem de citocinas

As citocinas foram mensuradas por ELISA, utilizando-se anticorpos monoclonais de captura e detecção contra as citocinas, nas concentrações recomendadas pelo fabricante (R&D Systems ou PEPROTECH). As citocinas IL-10 e IL-12 foram dosadas a partir do sobrenadante de cultura de células dendríticas intestinais purificadas após 12 e 24 horas de contato com EIEC FBC124/13 e *Shigella flexneri* M90T. Utilizou-se uma DI de 1:10. Também foram dosadas as citocinas inflamatórias secretadas pelas células Caco-2/DC humana nas câmaras AP e BL, conforme item 3.12.

## 3.14– Análise estatística

A análise foi realizada através do teste T não pareado ou *Two Way ANOVA* e os resultados foram confirmados através de múltiplas comparações pelo teste de Tukey. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

# *Resultados*

# 4- RESULTADOS

## 4.1- Cinética de invasão bacteriana em células Caco-2

Com o intuito de se conhecer a capacidade invasora das cepas *Shigella flexneri* M90T e EIEC FBC124/13, foi realizada uma cinética de invasão bacteriana em células Caco-2 polarizadas (**Figura 7**). Não observamos diferenças de bactérias intracelulares nos dois tempos estudados (1,5 e 2 horas), o que mostrou que a capacidade invasora das duas bactérias aparentemente é a mesma para um tempo de exposição relativamente curto.

Este ensaio foi realizado com o propósito de escolher um tempo de infecção adequado para os estudos posteriores (expressão dos genes de virulência bacterianos). No tempo de 2 horas, a média das bactérias internalizadas (triplicata) foi de 21.900 e 19.300 para M90T e FBC124/13 respectivamente, o que mostra uma quantidade de bactérias suficiente para posteriores extrações de RNA de bactérias intracelulares. Uma vez que o tempo de exposição das células Caco-2 às bactérias é diretamente proporcional aos danos que elas sofrem, o tempo de 2 horas de infecção também foi escolhido por apresentar dois pontos favoráveis: quantidade de bactérias intracelulares adequada para extração de RNA e poucos danos à célula do hospedeiro (não houve descolamento da monocamada de Caco-2 após 2 horas de infecção).

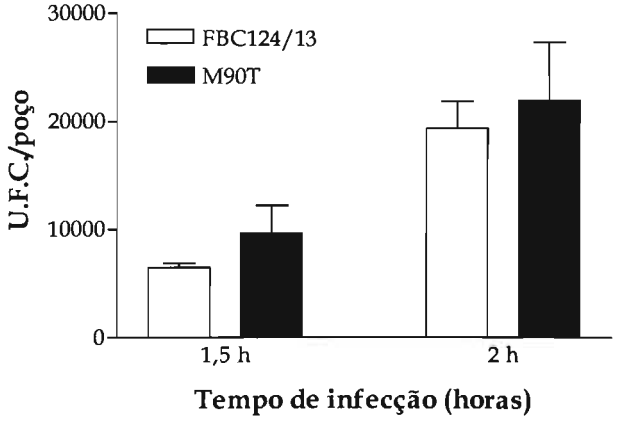


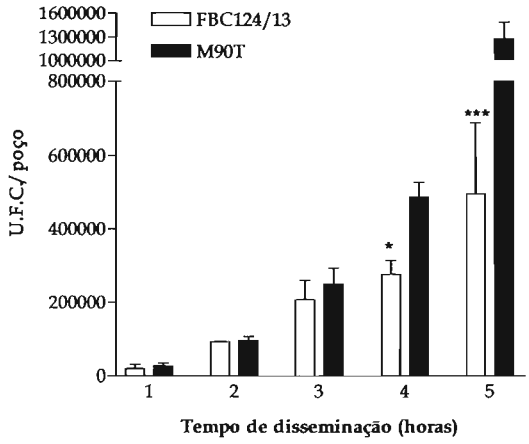

**Figura 7 - Invasão bacteriana em células Caco-2 polarizadas**. Células Caco-2 com 10 dias de diferenciação foram infectadas com $10^7$ bactérias por diferentes intervalos de tempo (eixo X). As unidades formadoras de colônias (U.F.C.) (eixo Y) foram obtidas pela semeadura do lisado celular (pós-infecção) em ágar MaConkey e contagem do número de colônias crescidas após 18 horas de incubação em estufa bacteriológica a 37°C. Observa-se que não há diferenças significativas de concentração de M90T e EIEC FBC124/13 nos dois intervalos de tempo estudados. Gráfico representativo de uma média de três experimentos independentes.

## 4.2- Cinética de disseminação bacteriana em células Caco-2

Após infecção das células Caco-2 por 2 horas, a cinética de disseminação das bactérias internalizadas foi avaliada pela contagem das unidades formadoras de colônias. Para os tempos de quatro e cinco horas ($p = 0,023$ e $p < 0,001$, respectivamente), M90T foi recuperada em maior número que EIEC FBC124/13 **(Figura 8)**; nos demais tempos estudados, não foram observadas diferenças estatísticas. A proposta deste ensaio foi avaliar a capacidade de disseminação de cada espécie bacteriana e sua concentração intracelular. Mais ainda, a integridade da monocamada de células Caco-2 pode ser avaliada no decorrer do experimento. A princípio, os tempos de seis e oito horas de disseminação bacteriana estavam inclusos no protocolo. Entretanto, verificou-se que havia uma grande porcentagem de descolamento celular após tanto tempo de exposição das células às bactérias. Assim, devido aos danos causados a essas e a infidelidade da quantidade de bactérias recuperadas após lise celular (a perda de células diminuía muito a recuperação das bactérias), esses tempos foram descartados do experimento principal.

A integridade das células Caco-2 (avaliada quanto à capacidade celular de manter-se em monocamada – sem descolamento – após os diferentes tempos de exposição às bactérias), juntamente com a concentração microbiana intracelular, possibilitou a escolha dos tempos de disseminação bacteriana para análise da transcrição de seus genes de virulência. Para os RT-PCR semiquantitativo e quantitativo, todos os tempos foram escolhidos (1, 2, 3, 4 e 5 horas). Não foram observadas diferenças das concentrações de M90T e FBC124/13 nos tempos de 1, 2 e 3 h e, a partir de 4 horas, a diferença é muito evidente; desta forma, o estudo da cinética de expressão dos genes de virulência em todos esses tempos tornava-se interessante. Será que em até 3 horas de disseminação bacteriana não há diferença de expressão gênica dos fatores de virulência? Será que a diferença de expressão dos genes de invasão e disseminação bacterianos é mais proeminente a partir de 3 horas de exposição das células às bactérias?

I




II

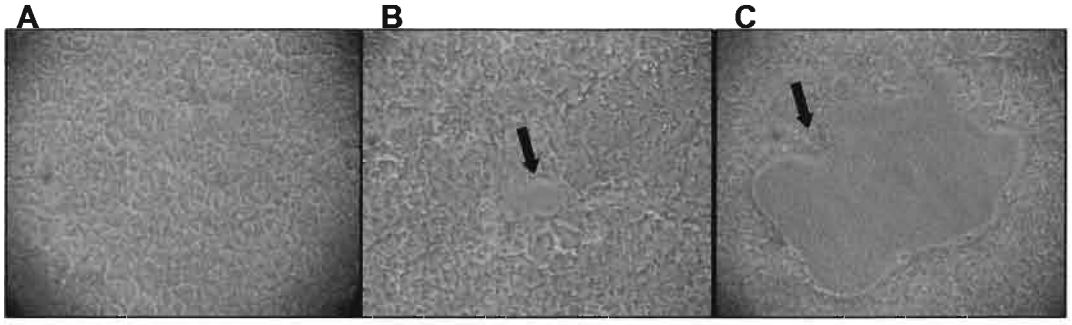



**Figura 8- Disseminação bacteriana em células Caco-2 polarizadas.** I- Células Caco-2 com 10 dias de diferenciação foram infectadas com $10^7$ bactérias por 2 horas, lavadas com SST e incubadas com meio de cultura contendo gentamicina por diferentes intervalos de tempo (eixo X). As unidades formadoras de colônias (U.F.C.) (eixo Y) foram obtidas pela semeadura do lisado celular (pós-infecção) em ágar MacConkey e contagem do número de colônias crescidas após 18 horas de incubação em estufa bacteriológica a 37°C. Observa-se que a concentração de M90T é maior que FBC124/13 a partir de 4 horas de infecção. II- microscopia ótica da monocamada de células Caco-2. A – controle negativo; B – microscopia ótica de uma placa de lise referente a 5 horas de disseminação de FBC124/13; C – microscopia ótica de uma placa de lise referente a 5 horas de disseminação de M90T. Gráfico representativo de uma média de três experimentos. * ($p < 0,05$); *** ($p < 0,001$). * - diferença estatística entre FBC124/13 x M90T para um mesmo tempo analisado. Análise estatística realizada pelo teste *Two Way ANOVA*.

## 4.3- Viabilidade das células Caco-2 após Disseminação bacteriana

O dano celular foi avaliado pelo ensaio de incorporação de iodeto de propídeo (IP) às células infectadas e não infectadas com FBC124/13 ou M90T. O IP é um composto fluorescente que se liga à molécula de DNA. Entretanto, esse composto não atravessa a membrana íntegra das células, sendo permeável apenas às células que sofreram alguma injúria, seguida de perda da integridade da membrana (morte celular). O ensaio de viabilidade celular foi realizado com o tampão citrado, que contém Triton X100. Este, por ser um detergente, permeabiliza a membrana celular

de células íntegras, favorecendo a entrada do IP. Esse método permite a análise da integridade do DNA de células mortas e células vivas.

As células da monocamada de Caco-2 foram avaliadas quanto à viabilidade celular após duas horas de infecção, seguida de sucessivas horas de disseminação (1, 2, 3, 4 e 5 horas) bacteriana (**Figura 9**). Todos os dados foram normalizados com o dano celular das células não infectadas de cada período estudado. M90T mostrou-se mais citotóxica do que FBC124/13 até 3 horas de disseminação. Após esse período, não foi observada nenhuma diferença estatística entre a citotoxicidade das duas bactérias. As médias de morte celular induzidas por FBC124/13 e M90T foram de 9,23% e 15,57% (1 hora); 22,8% e 37,13% (2 horas); 18,96% e 37,32% (3 horas); 40,75% e 35,97% (4 horas); 46,03% e 50,05% (5 horas) respectivamente.

Na **Figura 9**, ao se analisar separadamente a cinética de morte celular desencadeada pelas duas bactérias, observa-se que com o passar das horas, FBC124/13 apresentou um aumento significativo de citotoxicidade até 4 horas de disseminação. Já para M90T, esse aumento foi até 2 horas de disseminação, onde logo após, a citotoxicidade se estabiliza para os tempos estudados.

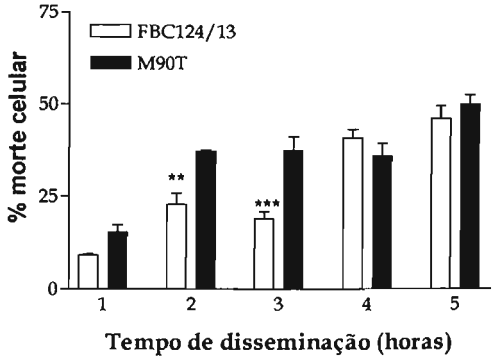



**Figura 9 - Cinética de viabilidade de células Caco-2 induzida por *Shigella flexneri* M90T e EIEC FBC124/13 durante disseminação bacteriana.** Uma monocamada de células Caco-2 polarizadas foi infectada por 2 horas com FBC124/13 ou M90T, seguida de tempos sucessivos de disseminação bacteriana (1, 2, 3, 4 e 5 horas), na presença de meio de cultura contendo gentamicina. A viabilidade celular foi avaliada pela integridade do DNA após a incorporação de iodeto de propídeo. FBC124/13 e M90T danificaram as células Caco-2 de forma distinta, onde M90T mostrou-se mais citotóxica que FBC124/13 até 3 horas de infecção. Para os tempos de 4 e 5 horas, não foram observadas diferenças de citotoxicidade entre as bactérias. Os resultados são representativos de uma triplicata de experimento. * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$). * - diferença estatística entre FBC124/13 x M90T para um mesmo tempo analisado. Análise estatística realizada pelo teste *Two Way ANOVA*.

## 4.4- Ensaio de placas de lise

Para se comparar mais efetivamente o fenótipo de disseminação bacteriana, foi realizado um ensaio de placas de lise, onde as bactérias foram incubadas por diferentes intervalos de tempo (36, 48 e 84 horas), para posterior análise dos halos formados pela destruição celular. Foram utilizadas duas diluições bacterianas: $10^4$ e $10^5$. Para melhor visualização fotográfica, foi escolhida a maior diluição para os tempos de 36 e 48 horas. Contudo, após 84 horas de disseminação bacteriana, os danos celulares foram tão intensos que a coloração da monocamada não foi eficiente. Portanto, para esse tempo, a foto apresentada refere-se à menor diluição.

Na **Figura 10** é possível observar que FBC124/13 não é tão eficaz quanto M90T no processo de disseminação bacteriana. Os halos formados por FBC124/13 foram muito pequenos, principalmente para o tempo de 36 horas (1,095 mm ± 0,098), o que tornou sua visualização fotográfica insatisfatória. M90T, por sua vez, a partir do primeiro tempo analisado (36 h) conduziu a formação de placas de lise com diâmetro de 6,283 mm ± 0,882. Para o tempo de 48 horas, os halos formados por FBC124/13 foram praticamente iguais aos observados no tempo anteriormente analisado (1,120 mm ± 0, 198); para a cepa M90T, pode-se observar que houve um aumento de aproximadamente 0,5 mm no diâmetro do halo (6,850 mm ± 0,664), o que mostrou uma tendência de maior velocidade de disseminação bacteriana. O último tempo avaliado foi de 84 horas, onde foi observado com mais clareza as placas de lise formadas pela cepa FBC124/13 (3,025 mm ± 0,659), duas vezes maior do que as observadas em 48 horas. O tamanho do halo observado após a disseminação de M90T também foi duas vezes maior do que o observado em 48 horas (14,990 mm ± 0,920).

Neste experimento, fica muito explícita a diferença de capacidade de disseminação das duas bactérias, o que corroborou com os resultados obtidos no ensaio de disseminação bacteriana do item 4.2.

Uma vez estudada a cinética de invasão bacteriana (item 4.1) e o fenótipo de disseminação bacteriana (itens 4.2, 4,3 e 4,4), a pergunta seguinte foi: como se dá a expressão dos genes de virulência que estão envolvidos no processo de invasão e disseminação bacteriana? Desta forma, tornou-se necessário e interessante estudar

a cinética e expressão dos genes de virulência de EIEC FBC124/13 e *Shigella flexneri* M90T no curso da invasão e disseminação.

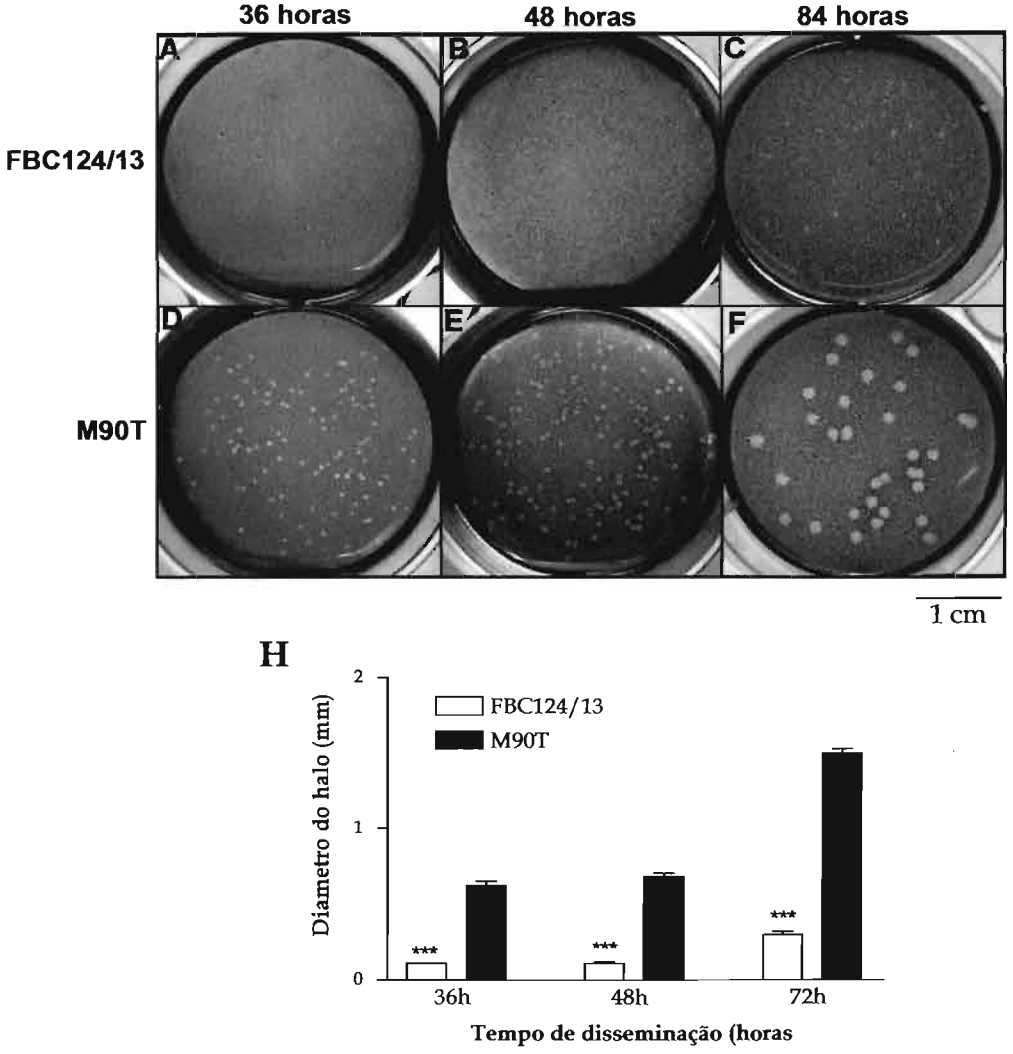



**Figura 10 – Ensaio de placas de lise após infecção bacteriana das células Caco-2.** As células Caco-2 foram cultivadas em placas com 6 orifícios (1 x $10^6$ células/poço) até formação de uma monocamada diferenciada e, posteriormente, foram infectadas com duas concentrações diferentes de inóculo bacteriano: 1 x $10^4$ e 1 x $10^5$ bactérias (FBC124/13 ou M90T) por poço. Após o tempo de 2 horas de invasão, as células foram incubadas na presença de antibióticos por 36, 48 e 84 horas, para a análise da disseminação bacteriana. Para melhor visualização fotográfica, foi escolhida a maior diluição para os tempos de 36 horas (A e D) e 48 horas (B e E). Contudo, após 84 horas de disseminação bacteriana, escolheu-se a menor diluição para visualização fotográfica (C e F). É possível observar que a quantidade de halos formados por FBC124/13 é aproximadamente 5 vezes maior do que os formados por M90T. Observa-se também que, o diâmetro dos halos formados por FBC124/13 são significativamente menores do que os formados por M90T. A, B e C – células infectadas por FBC124/13; D, E e F – células infectadas por M90T. Os resultados são representativos de um experimento. *** ($p < 0,001$). * - diferença estatística entre FBC124/13 x M90T para um mesmo tempo analisado. Análise estatística realizada pelo teste *Two Way ANOVA*.

## 4.5- Avaliação da cinética de expressão dos genes de virulência de EIEC FBC124/13 e *Shigella flexneri* M90T após infecção em células Caco-2 pelo método de RT-PCR semiquantitativo

### *4.5.1- Cinética de expressão de genes envolvidos na invasão bacteriana após contato com células Caco-2*

A expressão dos genes de regulação (*virF* e *virB*) (**Figura 11**), de montagem do sistema do SSTT (*spa32, mxiH*) (**Figura 12**), chaperonina (*ipgC*) (**Figura 12**) e de invasão (*ipaA-D*) (**Figura 13**) foi avaliada de forma qualitativa por RT-PCR. A expressão do gene *16S rRNA* foi utilizada com controle interno das reações. Os tempos escolhidos para essa análise (30, 60, 90 e 120 min) representam a cinética do início até um estágio mais avançado da invasão bacteriana. Uma vez que o gênero *Shigella sp* é mais virulento que a espécie EIEC, fez-se necessário abranger intervalos de tempo razoavelmente grandes para se avaliar a expressão dos genes de virulência entre essas duas bactérias. Nestes intervalos, coletou-se apenas o sobrenadante da cultura celular para a extração do RNA. A expressão dos genes de virulência também foi estudada em bactérias sem contato com Caco-2 (dados não demonstrados). A primeira fita de cDNA foi utilizada como molde para amplificação dos fragmentos. Foram realizados três ensaios de infecção independentes para verificar a expressão dos genes de virulência.

Uma vez que a análise visual das bandas possui muitas falhas, a intensidade das bandas de todas as fotos a seguir foi analisada digitalmente pelo programa *PhotoCaptMw* versão10.01 *for Windows*.

A cinética de expressão dos genes de virulência de EIEC FBC124/13 e *Shigella flexneri* M90T sem contato com Caco-2 foi aparentemente a mesma, onde observou-se que todos os genes estavam igualmente expressos, sem a necessidade de um estímulo prévio do hospedeiro para a ativação da transcrição do *operon* de virulência.

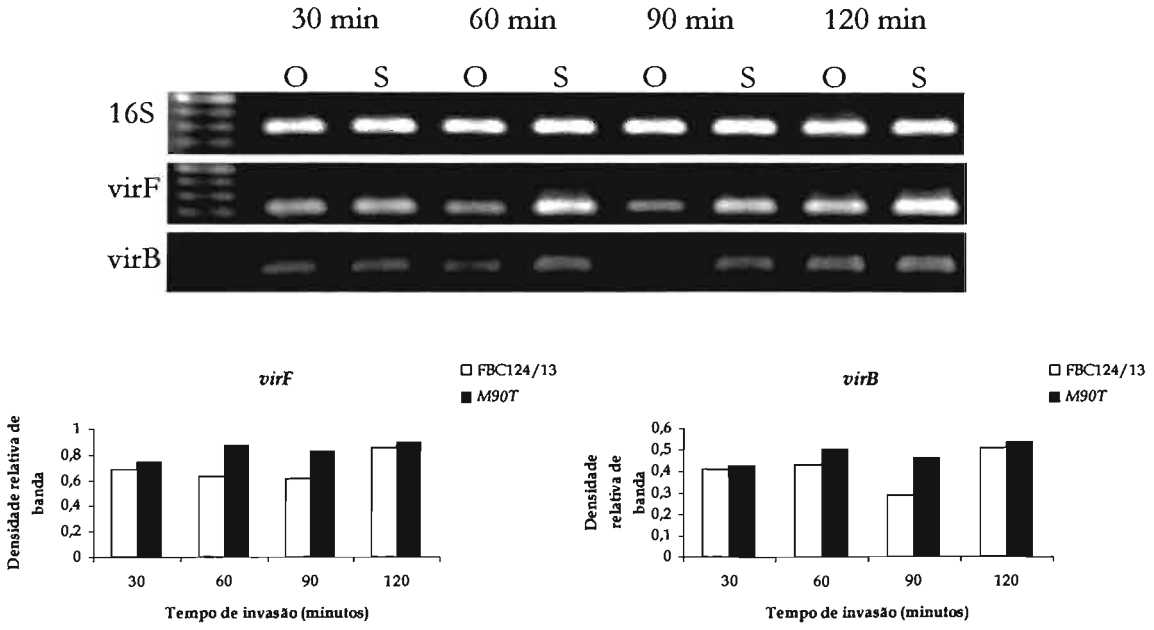



**Figura 11 – RT-PCR semiquantitativo dos genes de regulação da ilha de patogenicidade de 31 Kb de M90T e FBC124/13**. A figura mostra a cinética de expressão dos genes *virF* e *virB* de EIEC FBC124/13 (O) e *Shigella flexneri* M90T (S) em gel de agarose a 1 %. As amostras de RNA foram provenientes do sobrenadante da cultura de Caco-2 polarizadas após diferentes tempos de infecção (30, 60, 90 e 120 min) com as bactérias. O gene *16S rRNA* foi utilizado como controle interno da reação. A expressão gênica foi avaliada através da intensidade das bandas obtidas da reação de RT-PCR. *virF* apresentou uma expressão mais acentuada em M90T, principalmente a partir de 60 min de infecção. A expressão de *virB* não foi muito diferente entre as bactérias nos tempos estudados. Nota-se que com o decorrer do tempo, a expressão dos genes parece aumentar gradativamente, dado observado após comparação dos tempos de 30 e 120 min. Figura representativa de três experimentos independentes.

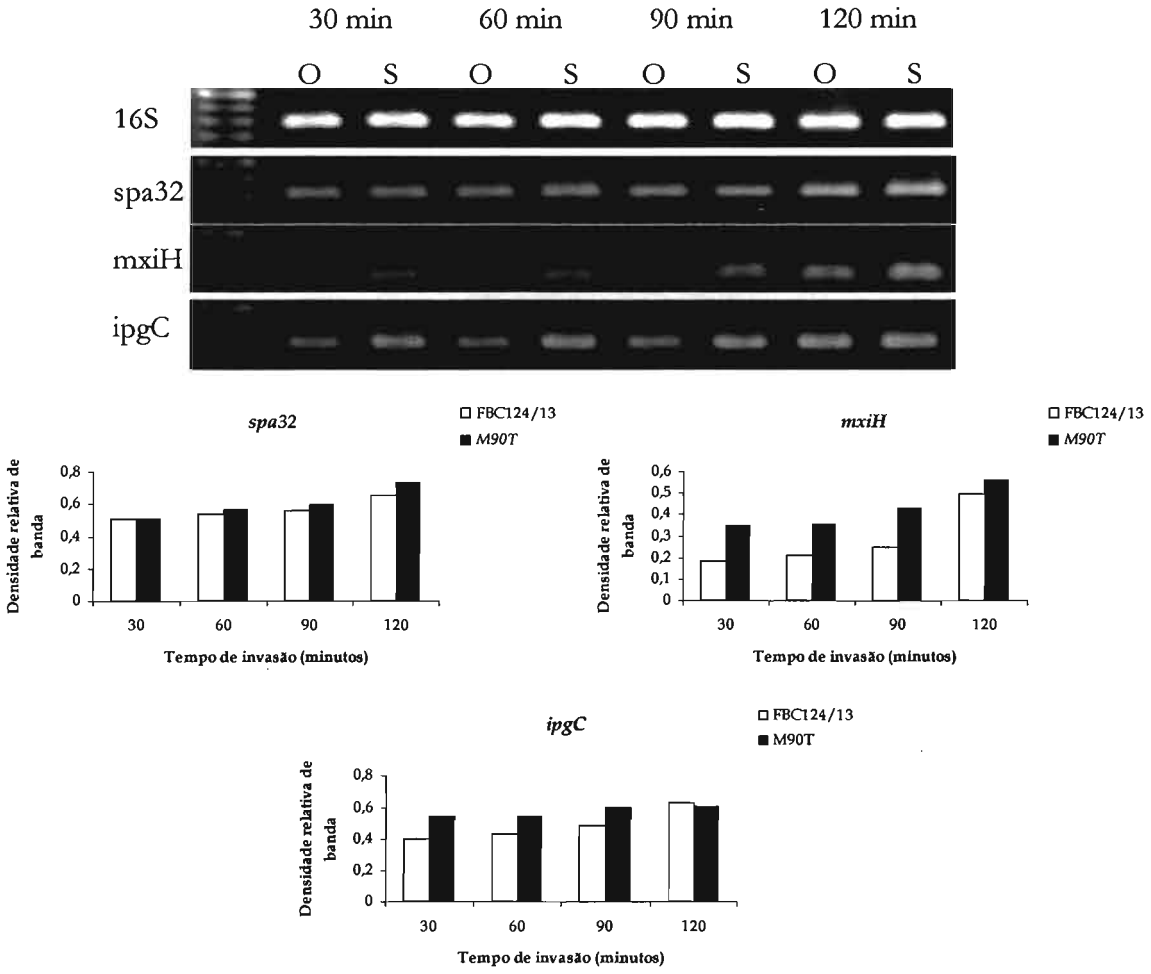



**Figura 12 – RT-PCR semiquantitativo de genes de montagem do SSTT e uma chaperonina da ilha de patogenicidade de 31 Kb de M90T e FBC124/13.** A figura mostra a cinética de expressão dos genes *spa32, mxiH* e *ipgC* de EIEC FBC124/13 (O) e *Shigella flexneri* M90T (S). As amostras de RNA foram provenientes do sobrenadante da cultura de Caco-2 polarizadas após diferentes tempos de infecção (30, 60, 90 e 120 min) com as bactérias. O gene *16S rRNA* foi utilizado como controle interno da reação. A expressão de *spa32* não apresentou diferenças visíveis entre as duas bactérias nos intervalos de tempo estudados. Com o passar do tempo, verifica-se um leve aumento de intensidade de banda, o que sugere o aumento de expressão do gene. No início da infecção, a expressão de *mxiH* é aparentemente muito superior em M90T. Essa diferença de intensidade de bandas continua até o tempo de 90 min. Em 120 min, ainda há diferenças na intensidade de banda, porém, visivelmente, não muito acentuada. A expressão de *ipgC*, desde o início da infecção, é superior em M90T. Contudo, no tempo de 120 min, parece não haver diferenças na intensidade de bandas das duas espécies bacterianas. Figura representativa de três experimentos independentes.

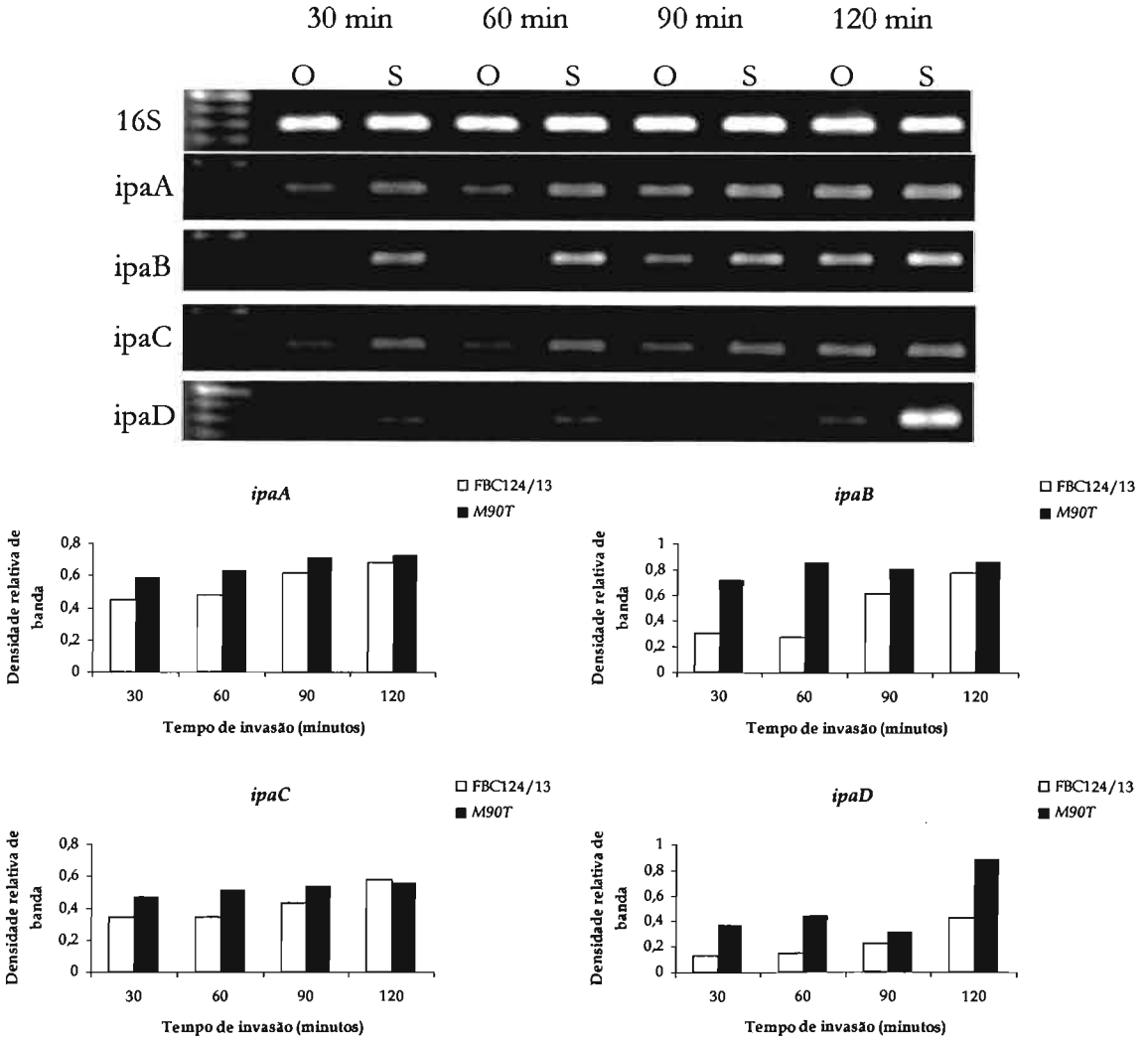



**Figura 13 – RT-PCR semiquantitativo dos genes de invasão da ilha de patogenicidade de 31 Kb de M90T e FBC124/13.** A figura mostra a cinética de expressão dos genes *ipaA, ipaB, ipaC* e *ipaD* de EIEC FBC124/13 (O) e *Shigella flexneri* M90T (S). As amostras de RNA foram provenientes do sobrenadante da cultura de Caco-2 polarizadas após diferentes tempos de infecção (30, 60, 90 e 120 min) com as bactérias. O gene *16S rRNA* foi utilizado como controle interno da reação. A expressão de todos os genes foi mais branda em FBC124/13. Em todos os tempos, nota-se o aumento gradativo da intensidade das bandas conforme o tempo de infecção. Aparentemente, no tempo de 120 min, não há diferenças perceptíveis na transcrição dos genes *ipaA* e *ipaC* entre as duas bactérias. *ipaB*, por sua vez, apresentou-se mais expresso em *Shigella* em todos os intervalos de tempo. Os resultados encontrados na expressão da *ipaD* foram muito interessantes. Aparentemente, FBC124/13 expressa pouca *ipaD*, principalmente no início da infecção (30 e 60 min) e seu nível de transcrição continua baixo até 120 min. Em contrapartida, M90T expressa *ipaD* desde o início da infecção e, em 120 min, o nível de transcrição é muito elevado. Figura representativa de três experimentos independentes.

### *4.5.2- Cinética de expressão dos genes no curso da disseminação bacteriana em células Caco-2*

A cinética de expressão dos genes no curso da disseminação de EIEC FBC124/13 e *Shigella flexneri* M90T em uma monocamada de células Caco-2 diferenciadas foi avaliada pela técnica de RT-PCR semiquantitativo. Após um tempo de infecção de 2 horas (item 3.6.2), as monocamadas foram incubadas por diferentes intervalos de tempo (1, 2, 3, 4 e 5 h) para avaliação da expressão dos genes da disseminação intercelular das bactérias. Após incubação, as células foram coletadas para extração do RNA total (Caco-2 + bactérias). Estudou-se a cinética de expressão dos genes *virB* (regulador de transcrição) **(Figura 14)**, *icsA* (formação da cauda de actina e indução das protrusões) **(Figura 14)**, *ipaA-D* (invasão) **(Figura 15)**. A expressão do gene *16S rRNA* foi utilizada com controle interno das reações. Foram realizados três ensaios de infecção independentes para verificar a expressão dos genes de virulência. A intensidade das bandas de todas as fotos à seguir foi analisada digitalmente pelo programa *PhotoCaptMw* versão10.01 *for Windows*.

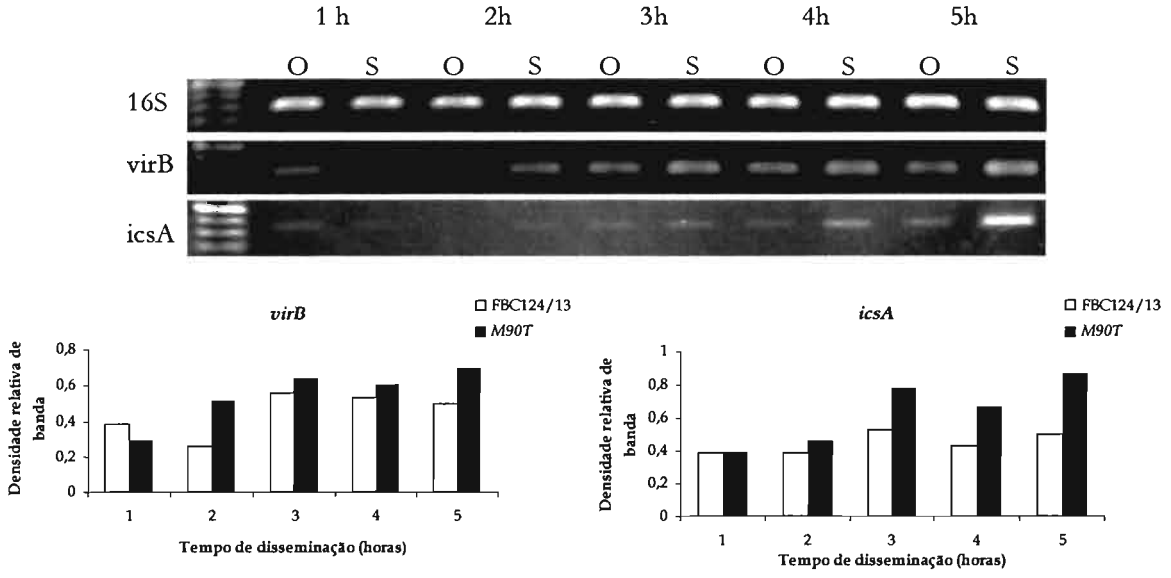



**Figura 14 – RT-PCR semiquantitativo dos genes *virB* e *icsA* da ilha de patogenicidade de 31 Kb de M90T e FBC124/13.** A figura mostra a cinética de expressão dos genes *virB* e *icsA* de EIEC FBC124/13 (O) e *Shigella flexneri* M90T (S). Células Caco-2 com 10 dias de diferenciação foram infectadas com $10^7$ bactérias por 2 horas, lavadas com SST e incubadas com meio de cultura contendo gentamicina por diferentes intervalos de tempo (1, 2, 3, 4 e 5 h). Em seguida, a monocamada foi coletada para extração do RNA total. O gene *16S rRNA* foi utilizado como controle interno da reação. A expressão gênica foi avaliada pela intensidade das bandas obtidas da reação de RT-PCR. Aparentemente, a expressão dos genes de M90T foi um pouco mais elevada. Até 3 h de disseminação, a diferença da intensidade de banda entre as bactérias parece ser pequena. Contudo, principalmente para *icsA*, essa diferença acentua-se a partir de 4 h de disseminação, onde a expressão dos genes parece ser razoavelmente maior em M90T. Nota-se que com o decorrer do tempo, a expressão dos genes parece aumentar gradativamente. Figura representativa de três experimentos independentes.

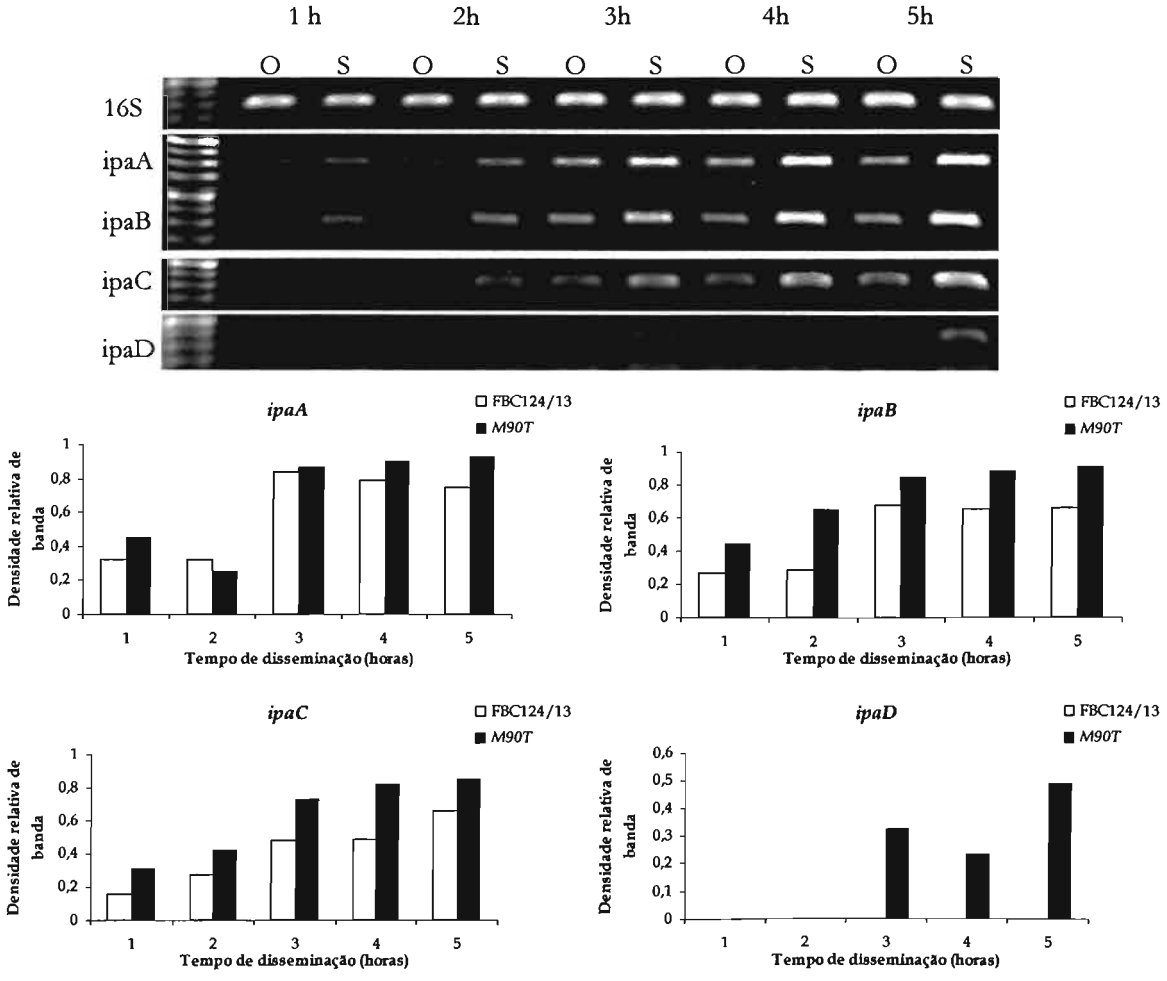



**Figura 15 – RT-PCR semiquantitativo dos genes de invasão da ilha de patogenicidade de 31 Kb de M90T e FBC124/13.** A figura mostra a cinética de expressão dos genes *ipaA-D* de EIEC FBC124/13 (O) e *Shigella flexneri* M90T (S). Células Caco-2 com 10 dias de diferenciação foram infectadas com $10^7$ bactérias por 2 horas, lavadas com SST e incubadas com meio de cultura contendo gentamicina por diferentes intervalos de tempo (1, 2, 3, 4 e 5 h). Em seguida, a monocamada foi coletada para extração do RNA total. O gene *16S rRNA* foi utilizado como controle interno da reação. Em todos os tempos estudados, o nível de expressão de todos os genes foi mais brando em EIEC FBC124/13. A intensidade das bandas aumentou gradativamente para cada espécie bacteriana no decorrer da cinética. O gene *ipaD*, contudo, apresentou-se pouco expresso e, aparentemente, sua expressão não foi observada em EIEC FBC124/13. A partir de e 3 h de disseminação, M90T apresentou baixos níveis de expressão para *ipaD*. Em 4 h, a banda é muito fraca, quase imperceptível. Figura representativa de três experimentos independentes.

## 4.6- Avaliação da cinética de expressão dos genes de virulência de FBC124/13 e M90T após infecção em células Caco-2 por RT-PCR quantitativo

### *4.6.1- Expressão relativa dos genes virF, virB, ipaA, ipaB, ipaC e ipaD durante invasão bacteriana em células Caco-2*

A técnica de PCR em tempo real foi utilizada para quantificar a expressão dos genes *virF*, *virB*, *ipaA-D* de FBC124/13 e M90T após uma cinética de invasão em células Caco-2 polarizadas. As diferenças de quantidades de U.F.C. das duas bactérias e dos diferentes tempos experimentais foram normalizadas pela expressão do gene *16S rRNA* de cada bactéria em cada tempo estudado. Desta forma, todos os resultados foram analisados como expressão relativa ao gene *16S rRNA* (**Figura 16**).

Os genes de EIEC FBC124/13 apresentaram-se significativamente menos expressos do que os de *Shigella flexneri* M90T e essa relação foi observada em todos os tempos de invasão avaliados (**Figura 16**).

A expressão dos genes *ipaA-D* acompanhou a expressão dos genes reguladores *virF* e *virB*, responsáveis pela transcrição do *operon* que codifica os genes de virulência. Essa cinética pode ser observada tanto para EIEC FBC124/13 quanto para M90T. No decorrer do tempo, não houve diferenças de expressão gênica de cada bactéria (individualmente) referente aos genes *virF*, *virB* e *ipaC*, ou seja, tanto FBC124/13 quanto M90T não aumentaram e nem diminuíram a expressão destes. No curso da infecção, a expressão dos genes *ipaB* (90 min x 30 min $\rightarrow$ p = 0,015; 90 min x 60 min $\rightarrow$ p = 0,003) e *ipaD* (90 min x 30 min $\rightarrow$ p = 0,021; 90 min x 60 min $\rightarrow$ p = 0,01) aumentaram significativamente para M90T enquanto que para FBC124/13, a expressão permaneceu a mesma.

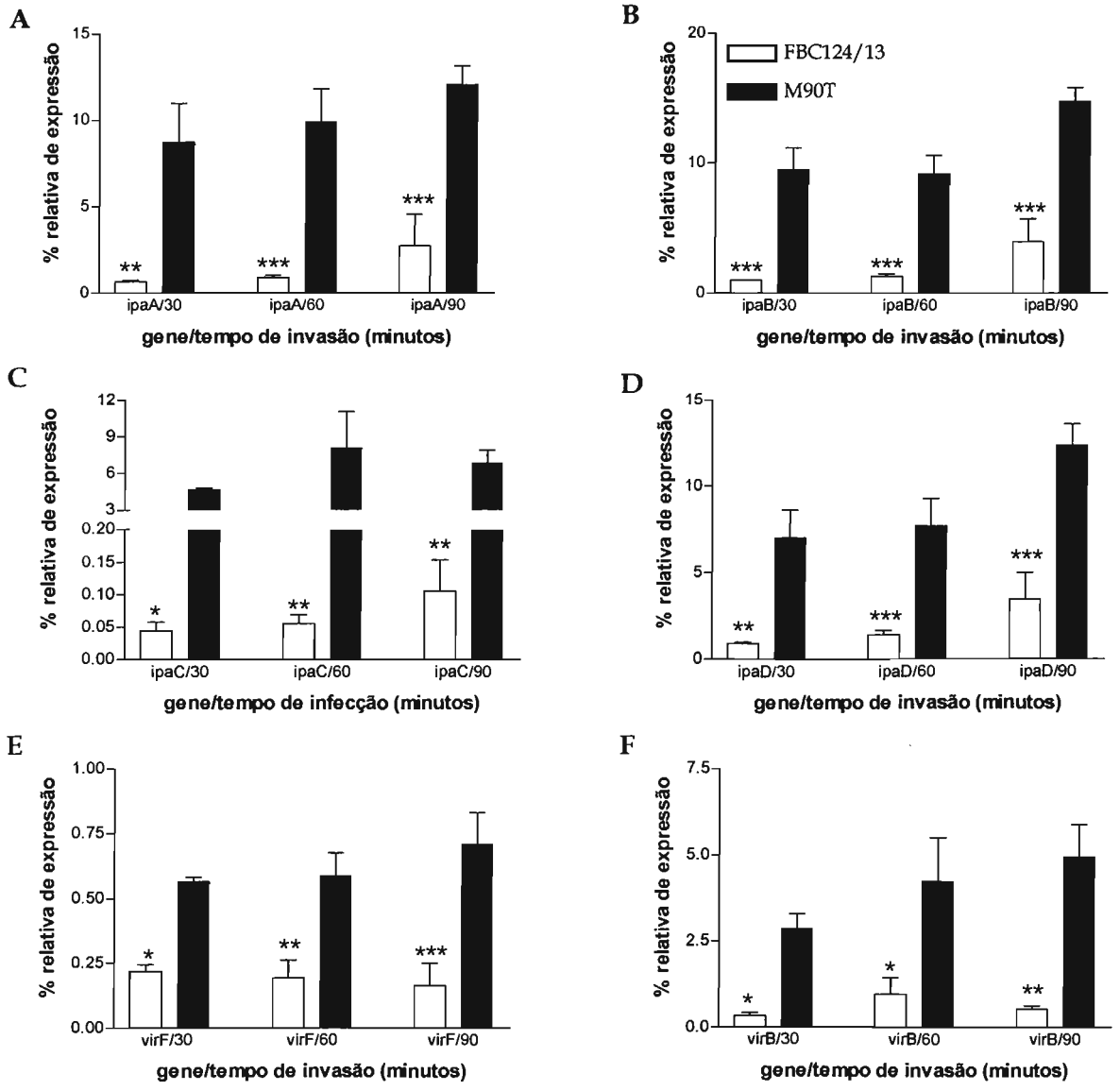



**Figura 16 – PCR em tempo real dos genes *virF*, *virB*, *ipaA-D* de M90T e FBC124/13 durante invasão em células Caco-2 polarizadas.** A figura mostra a cinética de expressão dos genes de virulência de EIEC FBC124/13 e *S. flexneri* M90T. Células Caco-2 com 10 dias de diferenciação foram infectadas com $10^7$ bactérias por 30, 60 e 90 minutos. O sobrenadante da cultura celular foi coletado para extração de RNA. O gene *16S rRNA* foi utilizado como normalizador da reação. Em todos os tempos estudados, o nível de expressão de todos os genes foi mais brando em FBC124/13. A- gráfico referente ao gene *ipaA*; B- gráfico referente ao gene *ipaB*; C- gráfico referente ao gene *ipaC*; D- gráfico referente ao gene *ipaD;* E- gráfico referente ao gene *virF*; F- gráfico referente ao gene *virB*. Foto representativa de três experimentos independentes. * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$). * - diferença estatística entre EIEC x *Shigella* para um mesmo tempo analisado. Análise estatística realizada pelo teste *Two Way ANOVA*.

### *4.6.2- Expressão relativa dos genes virF, virB, ipaA-C, icsA e icsB durante disseminação bacteriana em células Caco-2 em diferentes intervalos de tempo*

Para estudar o comportamento das bactérias durante a disseminação bacteriana, a expressão dos genes *virF, virB, ipaA-C, icsA* e *icsB,* relacionados a esse fenótipo, foi quantificada por PCR em tempo real. Todos os resultados foram normalizados pela expressão do gene *16S rRNA*. Curiosamente, FBC124/13 apresentou uma maior tendência de expressão de *virF* em relação à M90T e, à partir de 3 horas de infecção, essa diferença se anulou. Desta forma, parece que FBC124/13 necessita do contato intracelular do enterócito para uma expressão mais acentuada de *virF*, que é o principal regulador do *operon* de virulência. Todos os outros genes de FBC124/13 mostraram-se significativamente menos expressos do que os de M90T.

A análise da expressão dos genes bacterianos mostra que tanto FBC124/13 quanto M90T não alteram significativamente o perfil de expressão gênica no curso da disseminação, ou seja, o nível transcricional dos genes de FBC124/13 são os mesmos durante toda a cinética de disseminação, o que também é observado para M90T (**Figura 17**).

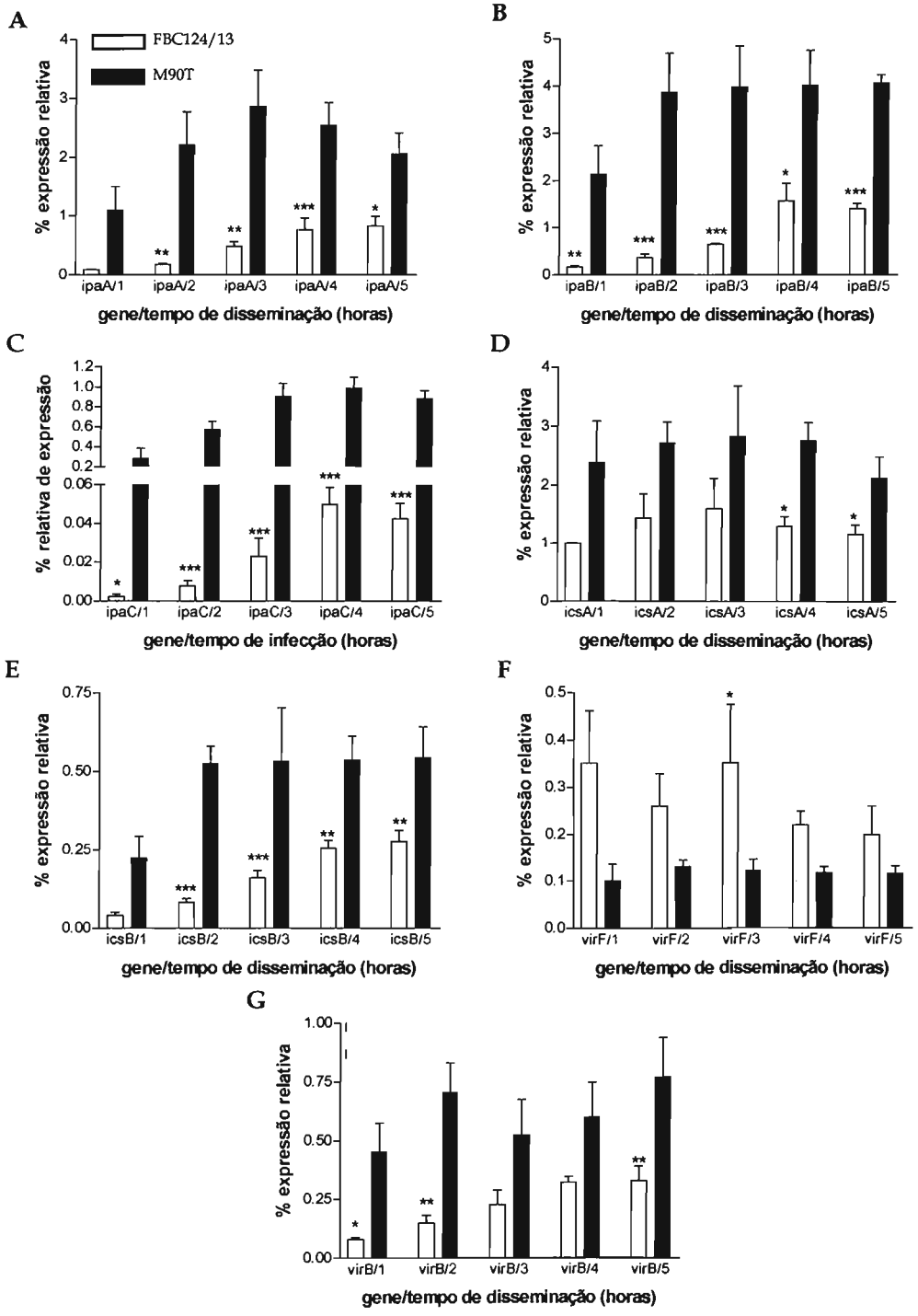



**Figura 17 – PCR em tempo real dos genes *virF, virB, ipaA-C, icsA* e *icsB* de M90T e FBC124/13 durante disseminação em células Caco-2 polarizadas.** A figura mostra a cinética de expressão dos genes de virulência de EIEC e *Shigella flexneri*. Células Caco-2 com 10 dias de diferenciação foram infectadas com $10^7$ bactérias por 2 horas, lavadas com SST e incubadas com meio de cultura contendo gentamicina por diferentes intervalos de tempo (1, 2, 3, 4 e 5 h). Em seguida, a monocamada foi coletada para extração do RNA total. O gene *16S rRNA* foi utilizado como normalizador da reação. Com exceção do gene *virF*, em todos os tempos estudados, o nível de expressão dos genes de FBC124/13 foi menor. A- gráfico referente ao gene *ipaA*; B- gráfico referente ao gene *ipaB*; C- gráfico referente ao gene *ipaC*; D- gráfico referente ao gene *icsA*; E- gráfico referente ao gene *icsB;* F- gráfico referente ao gene *virF*; G- gráfico referente ao gene *virB*. Figura representativa de três experimentos independentes. * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$). * - diferença estatística entre EIEC x *Shigella* para um mesmo tempo analisado. Análise estatística realizada pelo teste *Two Way ANOVA*.

## 4.7- Imunofenotipagem de células dendríticas intestinais purificadas

O fenótipo das células dendríticas purificadas do intestino de camundongos foi avaliada por citometria de fluxo através da análise da expressão do seu marcador específico CD11c e da molécula MHC classe II, altamente expressa nessas células. Esse procedimento foi realizado para verificar o grau de pureza das células e, assim, validar os procedimentos subseqüentes. Após dupla marcação das células com os anticorpos anti-CD11c (PE) e anti-MHC II (FITC), observou-se que mais de 70% das células estavam duplo-marcadas e mais de 90% expressavam a molécula de histocompatibilidade MHC classe II (**Figura 18**). Desta forma, todos os experimentos posteriores à purificação foram considerados confiáveis quanto à presença de células dendríticas intestinais.

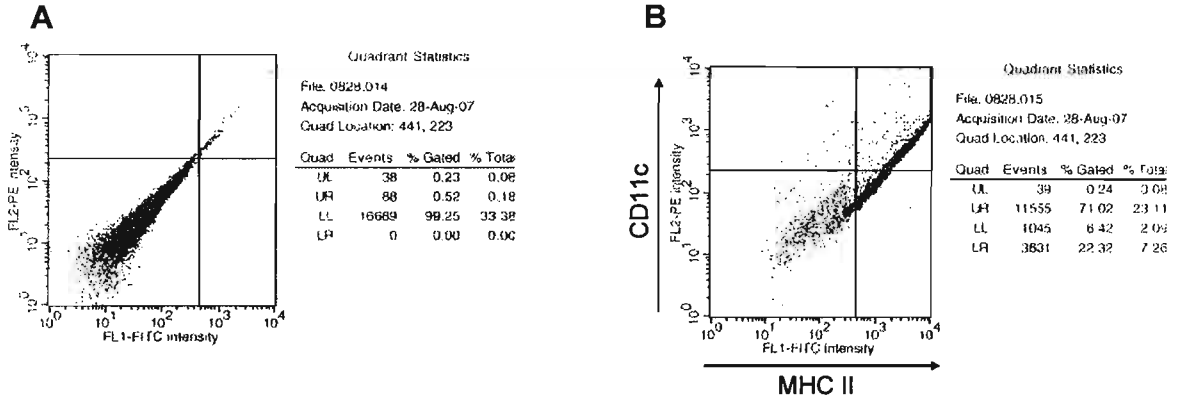



**Figura 18 – Análise do fenótipo de células dendríticas intestinais purificadas por coluna magnetizada.** Células dendríticas foram extraídas do intestino delgado de camundongos C57/BL6 e purificadas em colunas magnetizadas após marcação do extrato celular com anticorpos anti-CD11c marcados com micropartículas magnéticas. O fenótipo das células dendríticas intestinais foi confirmado por citometria de fluxo (20.000 eventos), após dupla-marcação com anticorpos anti-CD11c (marcado com PE – ficoeritrina) e anti-MHC II (marcado com FITC - isotiocianato de fluoresceína). Mais de 70% das células apresentaram-se duplo-marcadas e mais de 90% das células expressavam MHC classe II.

## 4.8- Imunofenotipagem de células dendríticas intestinais após estímulo bacteriano

As células dendríticas intestinais, ativadas ou não com bactérias, foram avaliadas quanto à expressão de moléculas de superfície por citometria de fluxo (**Figura 19**). Pesquisou-se a expressão das moléculas MHC II, CD40, CD80, CD86 e TLR-4.

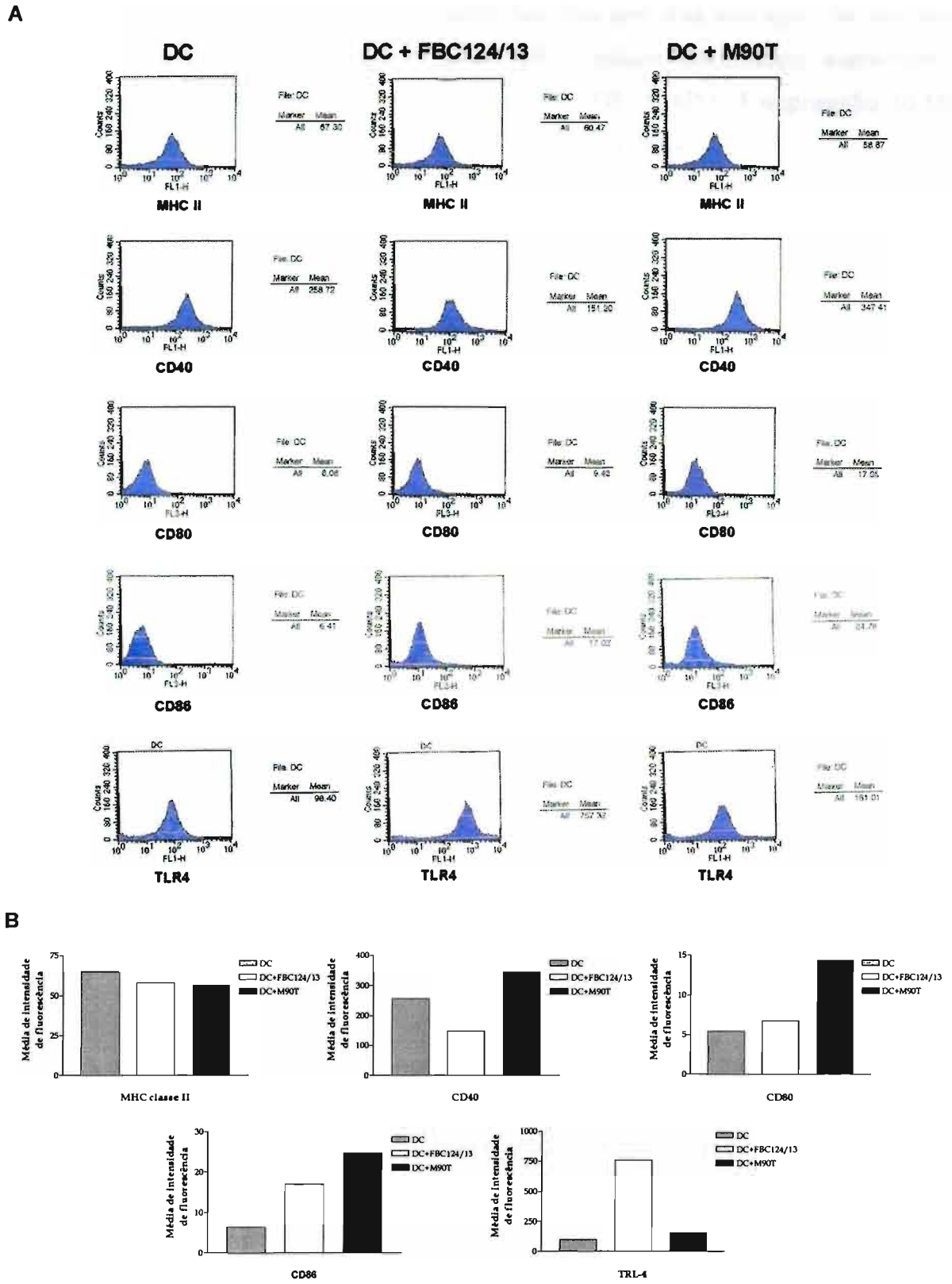



**Figura 19 - Expressão de moléculas de superfície em células dendríticas intestinais.** Pela citometria de fluxo, analisou-se a expressão das moléculas MHC II, CD40, CD80, CD86 e TLR-4 em células dendríticas intestinais de camundongos C57/BL6. As células foram cultivadas na presença de EIEC FBC124/13 ou S. flexneri M90T por 3 horas. DC- células dendríticas; DC + FBC124/13 – células dendríticas cultivadas com FCB124/13; DC + M90T – células dendríticas cultivadas com M90T. A- histogramas referentes à citometria de fluxo dos marcadores MHC classe II, CD40, CD80, CD86 e TLR-4; B- Gráficos referentes às médias de intensidade de fluorescência relativas à citometria de fluxo dos marcadores MHC classe II, CD40, CD80, CD86 e TLR-4.

O desafio das CDi com as bactérias resultou em uma alteração na expressão basal das moléculas de superfície, onde M90T induziu uma maior expressão de CD80, CD86 e CD40 nas CDi em relação à EIEC FBC124/13. A expressão de MHC II praticamente não sofreu alteração após estímulo bacteriano.

As moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86, bem como a molécula CD40 foram positivamente reguladas na presença de M90T. A expressão dessas moléculas é essencial para uma eficiente apresentação de antígenos. Para FBC124/13, contudo, apenas a molécula co-estimulatória CD86 foi positivamente regulada, mas em baixa intensidade; CD40, por sua vez, foi negativamente regulada por FBC124/13, sendo menos expressa do que o controle negativo (CDis que não foram estimuladas com bactérias). Este resultado sinaliza que a apresentação de antígenos por células dendríticas que entram com contato com FBC124/13 estaria prejudicada. Esses resultados conduziram ao estudo da capacidade de apresentação de antígenos das células dendríticas depois de desafiadas com as bactérias.

A expressão de TLR-4, o receptor transmembrânico responsável pelo reconhecimento de lipopolissacarídeo (LPS), apresentou-se mais expresso nas células dendríticas infectadas por FBC124/13. Esse resultado sugere que o sistema imune inato provavelmente é mais ativado na presença de FBC124/13 do que M90T, para o tempo de estimulação estudado.

### 4.9- Processamento e apresentação de antígenos pelas células dendríticas às células T

A apresentação dos antígenos de FBC124/13 e M90T pelas CDi foi avaliada pelo ensaio de linfoproliferação de linfócitos T $CD4^+$ *naïve*. O meio de cultura utilizado na co-cultura continha gentamicina para eliminar as bactérias extracelulares da cultura de células dendríticas e, desta forma, estudar apenas as bactérias que foram fagocitadas e processadas pela mesma. Como pode ser observado na **Figura 20**, as CDi ativadas com M90T na proporção 1:1 induziram a proliferação de linfócitos T $CD4^+$ enquanto que nada foi observado em relação à ativação de CDi com FBC124/13. Não foi observado proliferação celular nas amostras de CDi ativadas com bactérias na proporção 1:10 (uma célula dendrítica para cada 10 bactérias).

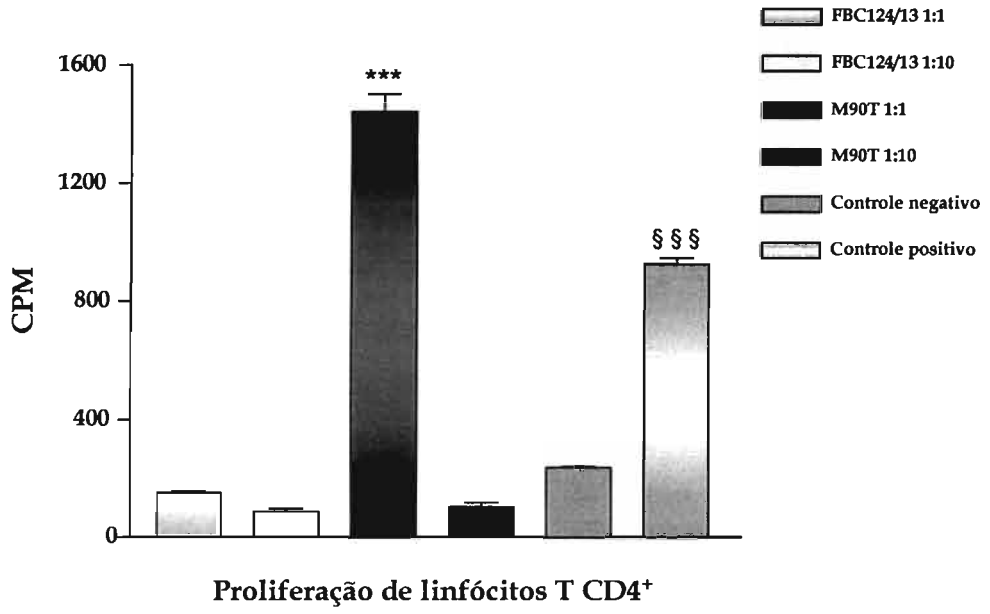



**Figura 20 - Ativação de linfócitos T CD4$^+$ naïve por células dendríticas intestinais.** Linfócitos T CD4$^+$ *naïve* foram purificados de linfonodos mesentéricos de camundongos C57/BL6 e cultivados com células dendríticas intestinais previamente ativadas com diferentes antígenos. A apresentação dos antígenos foi avaliada pela indução da proliferação dos linfócitos. A proliferação celular foi analisada pela incorporação de timidina triciada, que foi mensurada em contador de emissões de radiação beta. No gráfico, observa-se que a apresentação de antígeno foi eficiente apenas quando as células dendríticas foram ativadas com 1:1 de M90T. FBC124/13 – *Escherichia coli* enteroinvasora O124:H$^-$; M90T – *Shigella flexneri* M90T; controle negativo – células dendríticas inativas cultivadas com linfócitos T; controle positivo – células dendríticas inativas cultivadas com linfócitos T na presença do mitógeno fitohemaglutinina. Resultado representativo de três experimentos independentes. *** ($p < 0,001$); §§§ ($p < 0,001$). * - diferença estatística de M90T (1:1) em relação a todos os outros grupos analisados. § - *diferença estatística do controle* positivo em relação a todos os outros grupos analisados. Análise estatística realizada pelo teste *Two Way ANOVA*.

O estudo do processamento e apresentação de antígenos pelas células dendríticas às células T mostrou ineficiência das células dendríticas em apresentar os antígenos referentes à bactéria FBC124/13. Este resultado corroborou com os dados encontrados em relação à expressão de moléculas de superfície (item 4.10). Os antígenos de M90T foram eficientemente apresentados aos linfócitos T CD4$^+$, caracterizado pela proliferação celular dos clones de linfócitos. Contudo, não foi observada linfoproliferação quando as CDis foram desafiadas com uma concentração maior de M90T (1:10). A alta intensidade de estimulação dos linfócitos T CD4$^+$ neste caso pode ter desencadeado um processo de anergia.

Para uma melhor compreensão dos dados, estudou-se a produção de citocinas secretadas pelas CDis no microambiente da infecção.

## 4.10- Quantificações de citocinas produzidas por células dendríticas intestinais

Os níveis das citocinas IL-12 (**Figura 21**) e IL-10 (**Figura 22**) foram mensurados nos sobrenadantes da cultura de células dendríticas após 12 e 24 horas de infecção por FBC124/13 ou M90T. A análise das figuras nos mostra que o padrão de secreção de citocinas inflamatória e antiinflamatória foi diferente após o estímulo das células com FBC124/13 ou M90T. Mais ainda, esse padrão foi dependente do tempo de exposição das células às bactérias.

A secreção de IL-12 foi equivalente para os três grupos no tempo de 12 horas de infecção. Contudo, a análise dos gráficos mostra uma diminuição dos níveis absolutos de IL-12 entre os tempos de 12 horas e 24 horas, tanto no sobrenadante das culturas das células não ativadas ($p = 0,044$) quanto no das desafiadas com M90T ($p < 0,001$). Os níveis desta citocina permaneceram os mesmos em relação ao estímulo com FBC124/13. Mais ainda, em 24 horas, observa-se uma diferença significativa entre as duas bactérias ($p = 0,013$).

Para o tempo de 12 horas de infecção, não foram observadas diferenças na secreção de IL-10 entre os grupos (FBC124/13, M90T e controle). Porém, após 24 horas, os níveis de IL-10 observados para as células infectadas com FBC124/13 foram significativamente maiores do que os níveis observados para as células controle ($p < 0,001$) e para as desafiadas com M90T ($p < 0,001$). Em relação à cinética de secreção, foi observado que os níveis absolutos de IL-10 entre os tempos de 12 horas e 24 horas aumentaram após ativação das CDis com FBC124/13 ($p = 0,008$) e diminuíram em relação ao nível basal ($p = 0,045$).

A pesquisa das citocinas liberadas no microambiente da infecção foi condizente com os resultados esperados, uma vez que realçaram os resultados previamente obtidos em relação à expressão de moléculas de superfície e apresentação de antígenos aos linfócitos T *naïve*.

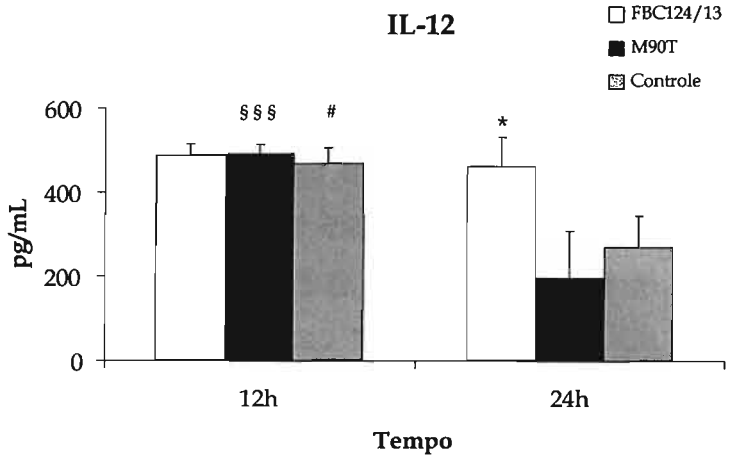



**Figura 21 - Secreção de IL-12 por células dendríticas intestinais murinas infectadas com FBC124/13 e M90T.** Células dendríticas intestinais foram infectadas por 12 e 24 horas com FBC124/13 ou M90T na proporção 1:10. IL-12 foi mensurado por ELISA de captura no sobrenadante da cultura. No gráfico, observa-se uma diferença na expressão basal das citocinas para o tempo de 24 horas de infecção, bem como uma diferença de concentração dessas proteínas quando se compara as duas espécies bacterianas. FBC124/13: *Escherichia coli* enteroinvasora; M90T: *Shigella flexneri* M90T. Os dados apresentados são representativos de quatro experimentos independentes. * ($p < 0,05$); # ($p < 0,05$); §§§ ($p < 0,001$). * - diferença estatística entre FBC124/13e M90T. § - diferença estatística entre M90T 12h e M90T 24h. # - diferença estatística entre controle 12h e controle 24h. Análise estatística realizada pelo teste *Two Way ANOVA*.

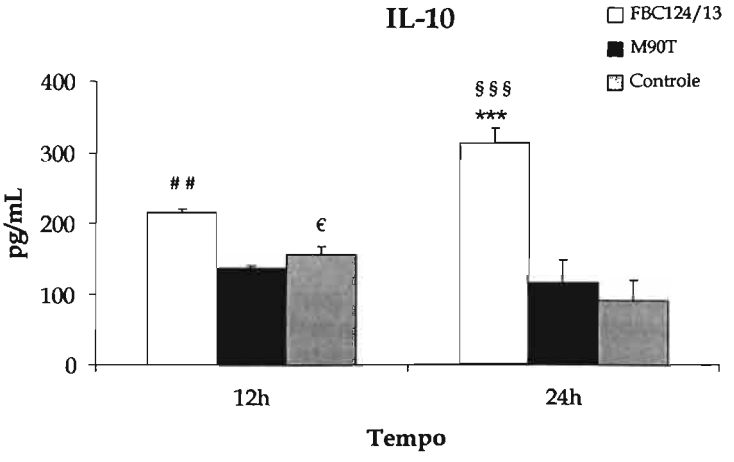



**Figura 22 - Secreção de IL-10 por células dendríticas intestinais infectadas com FBC124/13 e M90T**. Células dendríticas intestinais foram infectadas por 12 e 24 horas com FBC124/13 ou M90T na proporção 1:10. IL-10 foi mensurado por ELISA de captura no sobrenadante da cultura. No gráfico, observa-se uma diferença na expressão basal das citocinas para o tempo de 24 horas de infecção, bem como uma diferença de concentração dessas proteínas quando se compara as duas espécies bacterianas. FBC124/13: *Escherichia coli* enteroinvasora; M90T: *Shigella flexneri* M90T. Os dados apresentados são representativos de quatro experimentos independentes. € ($p < 0,05$); ## ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$); §§§ ($p < 0,001$). * - diferença estatística entre FBC124/13 e M90T. § - diferença estatística entre FBC124/13 e controle. # - diferença estatística entre FBC124/13 12h e FBC124/1324h. € - diferença estatística entre controle 12h e controle 24h. Análise estatística realizada pelo teste *Two Way ANOVA*.

## 4.11- Células dendríticas diferenciadas de monócitos humanos

O estudo singular das ações bacterianas nas células epiteliais intestinais, bem como a resposta imune induzida nas CDis forneceu dados muito importantes de suas interações com FBC124/13 e M90T. Contudo, o intestino é um microambiente muito mais complexo e dinâmico. Em busca de um ensaio *in vitro* mais fidedigno à síndrome clínica intestinal, um modelo experimental com três componentes foi utilizado (item 3.12). O objetivo deste ensaio foi estudar a transmigração de células dendríticas humanas através de uma monocamada de células Caco-2 após estímulo bacteriano, e o perfil de secreção de citocinas inflamatórias neste microambiente. Para tanto, monócitos de sangue periférico foram purificados e diferenciados em células dendríticas por estímulo químico (item 3.10). As células dendríticas diferenciadas foram avaliadas quanto à sua pureza (**Figura 23**) e características físicas (**Figura 24**).

Utilizando-se marcadores de superfície, foi possível verificar que a pureza das células obtidas foi de aproximadamente 80% (**Figura 23**). A molécula CD1a é o marcador fenotípico de células dendríticas humanas, enquanto que a molécula CD14 foi utilizada como marcador de monócitos, a fim de se visualizar a presença de monócitos remanescentes que não se diferenciaram em células dendríticas. O HLA é uma molécula muito expressa em células apresentadoras de antígenos e, no presente modelo experimental, assim como o CD1a, também foi utilizada para comprovar a presença de células dendríticas na suspensão celular.

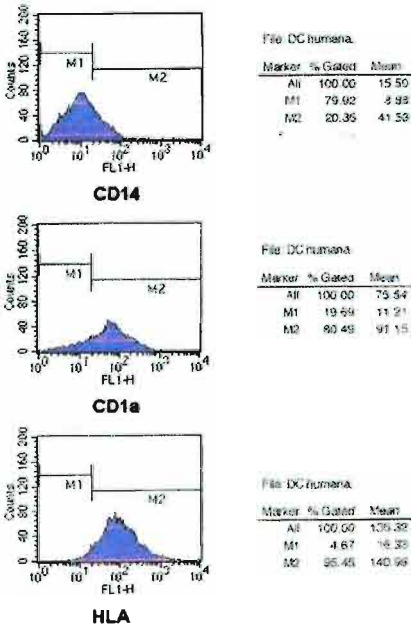



**Figura 23 – Análise do fenótipo de células dendríticas diferenciadas de monócitos humanos.** Monócitos humanos foram obtidos do sangue periférico de voluntários humanos saudáveis através de centrifugação em gradiente de Ficoll-Paque PLUS, seguido de purificação em colunas magnetizadas após marcação celular com anticorpos anti-CD14 marcados com micropartículas magnéticas. Em seguida, os monócitos foram diferenciados em células dendríticas através de estímulo do GM-CFF e IL-4. O fenótipo das células dendríticas foi confirmado por citometria de fluxo (15.000 eventos), após marcação com anticorpos anti-CD1a (marcado com FITC - isotiocianato de fluoresceína), anti-CD14 (marcado com FITC - isotiocianato de fluoresceína) e anti-HLA (marcado com FITC - isotiocianato de fluoresceína). A pureza das células obtidas foi de aproximadamente 80%.

As características físicas das células dendríticas também foram avaliadas por microscopia ótica (**Figura 24**). É possível observar que as células presentes na cultura apresentavam prolongamentos citoplasmáticos, típicos de células dendríticas.

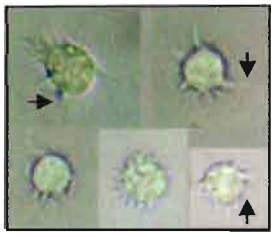


**Figura 24 – Características físicas das células dendríticas diferenciadas de monócitos humanos.** As células dendríticas diferenciadas de monócitos humanos foram avaliadas quanto às características físicas e peculiares a esse tipo celular. Observa-se a presença de prolongamentos citoplasmáticos característicos de células dendríticas (→). (Microscopia óptica x 3000).

## 4.12- Secreção de proteínas efetoras bacterianas

Para o estudo da transmigração celular, além de bactérias viáveis, foram utilizadas como estímulo as proteínas efetoras secretadas pelas bactérias. Dentre essas proteínas, encontram-se as Ipas (antígenos plasmidiais de invasão), muito importantes no processo patogênico de EIEC e *Shigella*. Portanto, com o intuito de se avaliar o potencial de ativação imune-celular apenas das proteínas bacterianas, estas foram obtidas por técnica previamente padronizada em nosso laboratório (GIBOTTI et al., 2004). A **Figura 25** mostra o perfil eletroforético das proteínas totais de FBC124/13 e M90T, após extração e concentração, conforme descrito no item 3.11. A determinação das proteínas totais foi realizada pelo método colorimétrico de Bradford, para posterior utilização em outros ensaios laboratoriais. Foram realizados três experimentos, com a finalidade de verificar a reprodutibilidade da secreção das proteínas no meio MEM, sob as mesmas condições ambientais. Uma mistura das preparações foi utilizada posteriormente para a observação do papel das proteínas secretadas na ativação de células dendríticas e células epiteliais intestinais.

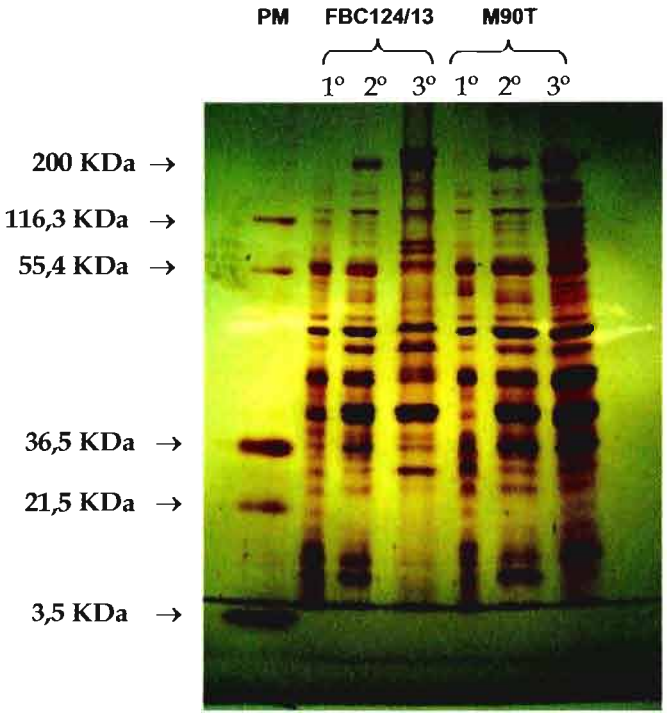



**Figura 25 – Gel de SDS-PAGE 10% - Perfil eletroforético das proteínas totais de FBC123/13 e M90T**. FBC123/13 e M90T foram cultivadas em meio MEM por 16-18h a 37ºC sob agitação. O sobrenadante celular foi concentrado e as proteínas efetoras secretadas foram separadas em gel de poliacrilamida. Foram realizados 3 experimentos independentes (1º, 2º e 3º) para cada espécie bacteriana. FBC124/13 – *Escherichia coli* enteroinvasora O124:H⁻, M90T – *Shigella flexneri* M90T, PM – padrão de massa molecular.

## 4.13- Migração de células dendríticas humanas através de uma monocamada de células Caco-2 diferenciadas

A proposta do ensaio de transmigração imuno-celular foi a integração dos dois sistemas, células intestinais humanas Caco-2 e células dendríticas, durante o curso da infecção bacteriana. No modelo experimental, a transmigração de células dendríticas foi investigada após diferentes estímulos bacterianos, onde foram utilizadas células bacterianas viáveis (FBC124/13 e M90T) e proteínas totais (100 µg), secretadas por essas espécies bacterianas.

A princípio, as células intestinais foram pré-ativadas por duas horas com os estímulos bacterianos, alocados na superfície apical (AP). Logo após, as células dendríticas diferenciadas de monócitos humanos foram adicionadas à câmara baso-lateral (BL). A resposta inflamatória foi avaliada após 5 horas de interação entre estímulo bacteriano/ Caco-2/ células dendríticas. O recrutamento de células dendríticas para a cavidade AP foi avaliada pela contagem das CD desta câmara. Foi observado que FBC124/13 e suas proteínas secretadas induzem a

transmigração de células dendríticas através da monocamada de células Caco-2 (14% ± 2,85 e 5,83% ± 1,65 respectivamente) (**Figura 26**). A interação de M90T ou suas proteínas totais com as células intestinais não induziu a transmigração das células dendríticas.

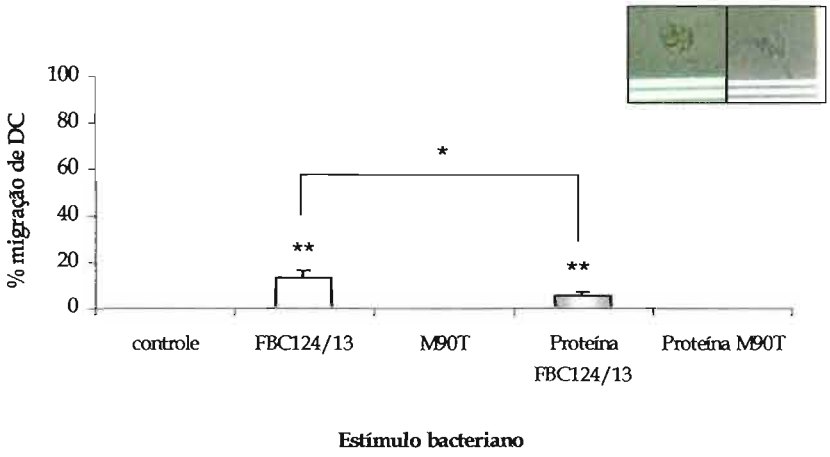



**Figura 26 –Migração de células dendríticas humanas através de uma monocamada de células Caco-2 polarizadas.** Células Caco-2 foram infectadas com FBC123/13 e M90T, bem como suas proteínas totais, por duas horas antes da adição de células dendríticas derivadas de monócitos humanos à cavidade BL. A incubação foi entendida por 5 horas antes da coleta das amostras de sobrenadante para se determinar a porcentagem de DC migradas através de células Caco-2 polarizadas. Observa-se que apenas a cepa FBC124/13 e suas proteínas secretadas foram capazes de induzir a migração celular. Em destaque, encontram-se as células dendríticas presentes no sobrenadante apical, contadas em hemocitômetro. DC: célula dendrítica; FBC124/13: *Escherichia coli* enteroinvasora; M90T: *Shigella flexneri* M90T. Os resultados são representativos de três experimentos independentes. * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$). Análise estatística realizada pelo teste T não pareado.

## 4.14- Perfil de citocinas inflamatórias secretadas na co-cultura de células dendríticas e células Caco-2 após estímulo bacteriano

As alterações nas concentrações e localizações de citocinas inflamatórias foram investigadas no microambiente da co-cultura de células dendríticas e células Caco-2 após estímulo bacteriano. Os sobrenadantes de AP e BL foram analisados quanto à secreção das citocinas IL-8, MCP-1, CCL4, CCL19, CCL20 e TNF-α por ELISA de captura (**Figura 27**).

CCL4, também conhecida por MIP-1β, foi pouco expressa na cavidade AP, onde se apresentou nula a nível basal e após os estímulos FBC124/13 e proteínas totais de M90T. Para a cepa M90T, a expressão foi praticamente nula. Apenas as proteínas totais de FBC124/13 induziram a secreção de CCL4, ainda que em

pequenas concentrações (p = 0,009). A análise da secreção de CCL4 na cavidade BL foi bastante distinta da observada na parte AP. Apesar das altas concentrações encontradas, não foram observadas diferenças estatísticas entre o nível basal e as outras amostras (FBC124/13, proteínas totais de FBC124/13 e M90T), com exceção das células infectadas com proteínas totais de M90T (p = 0,007). Entretanto, a regulação positiva de CCL4 após os estímulos bacterianos é sugestiva.

A citocina CCL19 (MIP-3β) não foi secretada nas duas câmaras, AP e BL; o ensaio de ELISA foi negativo para todas as amostras.

Na porção AP, a secreção basal de CCL20 e a estimulada por FBC124/13 ou M90T foi praticamente a mesma. Contudo, observaram-se altas concentrações da citocina quando as células foram desafiadas com as proteínas totais de FBC124/13 (p = 0,007) ou de M90T (p = 0,004). CCL20 foi positivamente regulada na porção BL. Apenas para as células infectadas com FBC124/13 não foi encontrada diferença estatística em relação ao nível basal, mas o aumento desta citocina é sugestivo. Para M90T e proteínas totais de FBC124/13, a diferença estatística foi de p < 0,001, enquanto que para as proteínas totais de M90T, p = 0,012. Foram observadas diferenças na expressão entre as células infectadas com M90T versus proteínas totais de FBC124/13 (p = 0,018) e as infectadas com proteínas totais de FBC124/13 versus proteínas totais de M90T (p = 0,019).

As citocinas CCL4, CCL10 e CCL20 são quimiocinas muito importantes na resposta inflamatória intestinal, pois conduzem à migração de células dendríticas. CCL4 e CCL20 estão envolvidas na migração de células dendríticas imaturas, ou seja, com alta capacidade fagocítica. CCL19 possui como receptor celular o CCR7, muito expresso em células dendríticas maduras. Os resultados obtidos sobre a secreção dessas quimiocinas sugerem que o microambiente da infecção conduz à migração de CD imaturas, característica de uma infecção aguda.

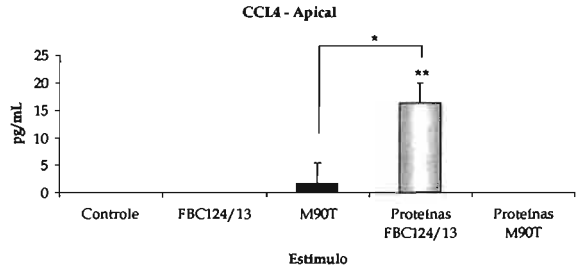
TNF-α, uma importante citocina envolvida em atividades inflamatórias, foi negativamente regulada na superfície AP (FBC124/13: p = 0,02; M90T: p = 0,012; proteínas totais de FBC124/13: p = 0,016). Entretanto, assim como esperado, essa citocina foi altamente expressa na porção BL, onde a expressão basal foi estatisticamente menor do que as encontradas para as células infectadas com FBC124/13, M90T e proteínas totais de FBC124/13 (p < 0,001). Não foram observadas diferenças estatísticas para o estímulo de proteínas totais de M90T em

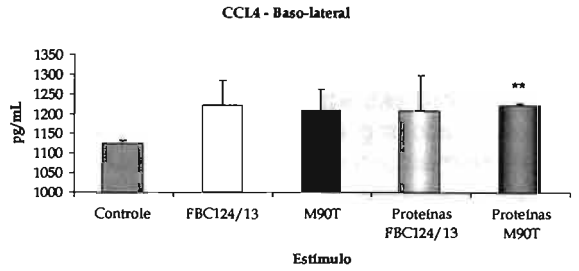
relação ao nível basal. Contudo, a diferenças de expressão de TNF-α entre todas as células desafiadas com algum estímulo foi altamente significativa ($p < 0,001$).

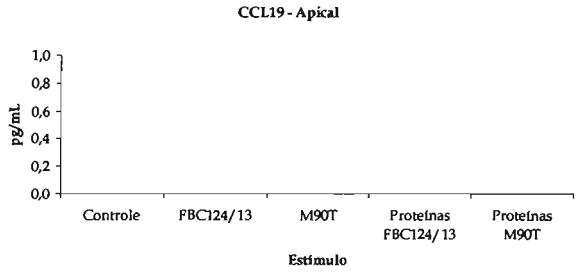
A proteína quimiotática de monócitos 1, MCP-1, apresentou sua expressão diminuída na porção AP após estímulo com FBC124/13 ($p = 0,012$) e M90T ($p = 0,013$). Em relação às proteínas totais, não foram observadas diferenças estatísticas em relação ao nível de expressão basal. MCP-1 foi expressa igualmente por todas as células sob diferentes estímulos, quando o sobrenadante da porção BL foi mensurado; contudo os níveis absolutos de expressão foram altos.

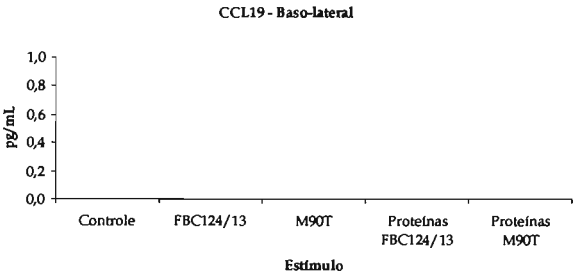
A citocina IL-8 é extremamente importante a nível intestinal, principalmente quando o epitélio intestinal sofre algum tipo de injuria. Contudo, no presente modelo experimental, não foram observadas diferenças estatísticas nos níveis de expressão dessa citocina em nenhum dos dois compartimentos estudados (AP e BL), salvo a exceção das células estimuladas com as proteínas totais de M90T, que apresentou-se estatisticamente diferente do nível basal na porção BL ($p = 0,039$).

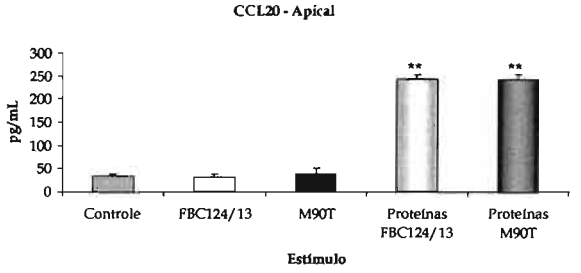
Os resultados obtidos sugerem uma característica aguda da infecção instaurada, o que possivelmente explicaria a falta de diferença da secreção de IL-8 basal em relação às células infectadas e a não expressão de CCL19.

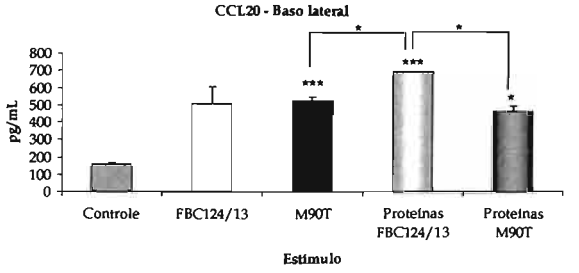

CCL4 - Apical
pg/mL
25
20
15
10
5
0
*
**
Controle
FBC124/13
M90T
Proteínas FBC124/13
Proteínas M90T
Estímulo

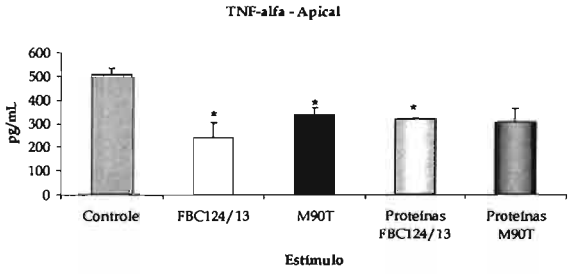

CCL4 - Baso-lateral
pg/mL
1350
1300
1250
1200
1150
1100
1050
1000
**
Controle
FBC124/13
M90T
Proteínas FBC124/13
Proteínas M90T
Estímulo

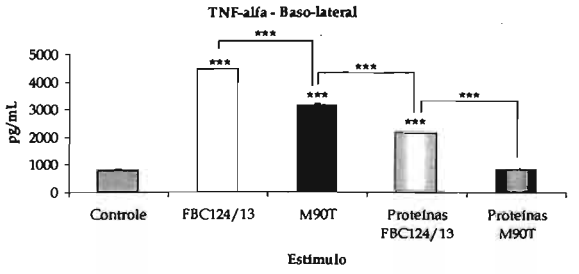

CCL19 - Apical
pg/mL
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
Controle
FBC124/13
M90T
Proteínas FBC124/13
Proteínas M90T
Estímulo

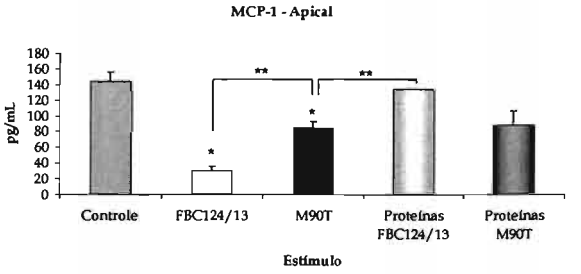

CCL19 - Baso-lateral
pg/mL
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
Controle
FBC124/13
M90T
Proteínas FBC124/13
Proteínas M90T
Estímulo

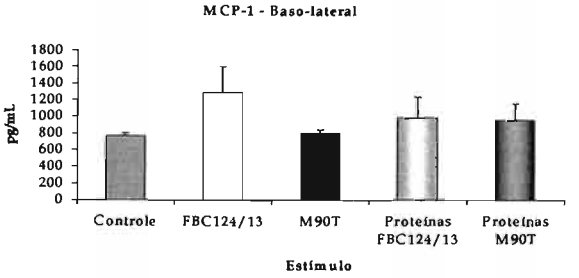

CCL20 - Apical
pg/mL
300
250
200
150
100
50
0
**
**
Controle
FBC124/13
M90T
Proteínas FBC124/13
Proteínas M90T
Estímulo

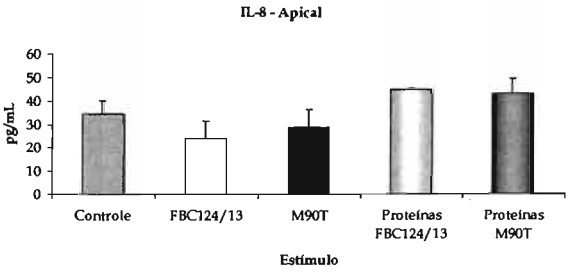

CCL20 - Baso lateral
pg/mL
800
700
600
500
400
300
200
100
0
*
*
***
***
*
Controle
FBC124/13
M90T
Proteínas FBC124/13
Proteínas M90T
Estímulo


TNF-alfa - Apical
pg/mL
600
500
400
300
200
100
0
*
*
*
Controle
FBC124/13
M90T
Proteínas FBC124/13
Proteínas M90T
Estímulo


TNF-alfa - Baso-lateral
pg/mL
5000
4000
3000
2000
1000
0
***
***
***
***
***
***
Controle
FBC124/13
M90T
Proteínas FBC124/13
Proteínas M90T
Estímulo


MCP-1 - Apical
pg/mL
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
**
**
*
*
Controle
FBC124/13
M90T
Proteínas FBC124/13
Proteínas M90T
Estímulo


MCP-1 - Baso-lateral
pg/mL
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
Controle
FBC124/13
M90T
Proteínas FBC124/13
Proteínas M90T
Estímulo


IL-8 - Apical
pg/mL
60
50
40
30
20
10
0
Controle
FBC124/13
M90T
Proteínas FBC124/13
Proteínas M90T
Estímulo

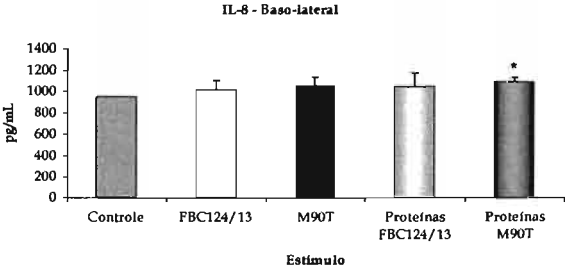

IL-8 - Baso-lateral
pg/mL
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
*
Controle
FBC124/13
M90T
Proteínas FBC124/13
Proteínas M90T
Estímulo

**Figura 27 – Secreção de citocinas em co-cultura de células dendríticas células Caco-2 após estímulo bacteriano.** Células Caco-2 foram infectadas com FBC123/13 e M90T, bem como suas proteínas totais, por duas horas antes da adição de células dendríticas derivadas de monócitos humanos à cavidade BL. A incubação foi entendida por 5 horas antes da coleta das amostras de sobrenadante para se determinar a concentração de citocinas inflamatórias. Os gráficos mostram que há alterações nas concentrações e localizações de citocinas inflamatórias no microambiente da co-cultura de células dendríticas e células Caco-2 após estímulo bacteriano. Os sobrenadantes de AP e BL foram analisados quanto à secreção das citocinas IL-8, MCP-1, CCL4, CCL19, CCL20 e TNF-α por ELISA de captura. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes, realizados em triplicata. * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$). Análise estatística realizada pelo teste T não pareado.

# *Discussão*

## 5- DISCUSSÃO

A proposta do nosso trabalho foi avaliar tópicos da patogenicidade de EIEC para esclarecer a sua menor virulência quando comparada à *Shigella flexneri*. A melhor maneira de se estudar a patogenicidade de um enteropatógeno seria um modelo animal no qual fosse possível reproduzir a doença. Para o estudo da diarréia, os modelos animais são precários e para contornar essa situação, muitos pesquisadores fazem uso do modelo *in vitro* ou *ex-vivo*. Presos a este fato, escolhemos um modelo experimental que se assemelhasse ao microambiente intestinal. Nós estudamos a expressão dos principais genes de virulência de EIEC e *Shigella* durante o curso da invasão e disseminação bacteriana em células intestinais humanas Caco-2. Também foram avaliados alguns parâmetros da resposta imune inata, como expressão de moléculas co-estimulatórias, produção de citocinas e apresentação de antígenos pelas células dendríticas oriundas do intestino delgado de camundongos não infectados, após estímulo bacteriano *ex-vivo*.

Para avaliarmos uma resposta inflamatória mais fidedigna, padronizamos um método de co-cultura que mimetizava um microambiente intestinal. Foram avaliadas as concentrações e localizações de citocinas inflamatórias, bem como a imuno-migração de células dendríticas para o compartimento que mimetizava o lúmen intestinal.

A princípio, avaliamos a capacidade invasora de cada espécie bacteriana durante uma cinética de invasão em células Caco-2. A invasão foi avaliada pela determinação do número de bactérias intracelulares viáveis após infecção. Observamos que EIEC e *Shigella* não diferiram quanto à capacidade invasora para os dois tempos estudados (1,5 e 2 horas) (**Figura 7**). Entretanto, quando avaliamos períodos mais longos de infecção, observamos claramente uma tendência de *Shigella* invadir/reinfectar mais as células epiteliais do que EIEC (dados não mostrados). O processo de reinfecção ocorre mais significativamente após longos períodos de exposição da monocamada celular às bactérias. Sugerimos, portanto, que apesar de não haver diferenças que expressem a menor virulência de EIEC no início da infecção, esta bactéria não é tão rápida quanto *Shigella* no processo de reinfecção

Recentemente, Amhaz (2007) estudou a capacidade de invasão de EIEC em macrófagos murinos, comparada à de *Shigella*. Foi encontrado um número

significativamente maior de U.F.C. de EIEC no interior dos macrófagos em relação à *Shigella*. *Shigella* também apresentou maior capacidade de escape dos macrófagos, onde foi recuperada em maior concentração no sobrenadante da infecção, quando comparada à EIEC. Esses dados corroboram os nossos resultados, pois relata que *Shigella* possui maior probabilidade de reinfecção, devido à sua maior concentração no sobrenadante da cultura após escape da célula hospedeira.

Para se determinar o número de bactérias viáveis no interior das células Caco-2, durante o processo de disseminação bacteriana, escolhemos o tempo de 2 horas de pré-infecção, que antecedeu os demais tempos de incubação para disseminação. Tal cuidado foi tomado a fim de se excluir quaisquer dúvidas sobre a concentração microbiana no interior das células Caco-2 durante o curso da disseminação. Ou seja, no início deste experimento, as duas bactérias estavam presentes na mesma concentração e, desta forma, inferimos que os estudos comparativos estavam sincronizados. A análise da disseminação bacteriana (1, 2, 3, 4 e 5 horas) nos mostrou que em até três horas de incubação, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre a concentração intracelular das duas espécies bacterianas (**Figura 8**). Contudo, nos tempos mais tardios, quatro e cinco horas, a concentração intracelular de EIEC foi significativamente inferior à de *Shigella*. Mais uma vez, os resultados nos sugerem que, após longos períodos de infecção, *Shigella* apresenta a capacidade de potencializar a sua invasão/disseminação, ao passo que EIEC permanece mais localizada no sítio de infecção. Esses resultados foram corroborados pelos dados obtidos no ensaio de placas de lise, onde se pode avaliar o fenótipo de disseminação bacteriana, pela formação de placas de células mortas na monocamada de células Caco-2.

Pelo experimento de placa de lise (**Figura 10)**, a diferença da eficiência de disseminação entre EIEC e *Shigella* foi demonstrada claramente. Avaliamos três tempos de disseminação bacteriana: 36, 48 e 84 horas. Para os dois primeiros tempos estudados, as placas de lise formadas por EIEC foram muito pequenas, onde encontramos dificuldade na visualização a olho nu. Apenas para o tempo de 84 horas, o tamanho das placas de lise foi mais facilmente visualizado, mas mesmo assim, apresentavam-se pequenos. Entretanto, as placas de lise formadas por *Shigella* foram muito mais proeminentes, desde o primeiro tempo analisado (36 horas). É interessante ressaltar que o tamanho médio dos halos formados em 84

horas de disseminação de EIEC foi estatisticamente menor ($p < 0,001$) do que o tamanho médio dos halos observados para 36 horas de disseminação de *Shigella*. Neste ensaio, demonstramos que a capacidade de disseminação de EIEC é menor do que a de *Shigella*, fato que somado aos resultados anteriormente citados, nos sugere que uma das características de EIEC que justifica a sua menor virulência quando comparada à *Shigella* é a sua menor eficiência de disseminação nas células epiteliais.

Os processos de invasão de disseminação bacteriana, que auxiliam na fisiopatologia da disenteria bacilar por *Shigella* e EIEC, levam a danos epiteliais devido à destruição celular. No presente trabalho, nós valíamos a viabilidade das células Caco-2 após uma cinética de disseminação das bactérias EIEC e *Shigella*. O perfil de citotoxicidade de EIEC e *Shigella* foi dependente do tempo, ou seja, quanto maior o tempo de exposição da monocamada celular às bactérias, maior o dano causado. Os resultados entre EIEC e *Shigella* foram significativamente diferentes para os tempos de duas e três horas de disseminação, onde EIEC desencadeou menos danos às células Caco-2 do que *Shigella*. O ápice de morte celular (37,13%) induzida por *Shigella* foi em duas horas, ao passo que para EIEC foi em quatro horas (40,75%). Para os tempos de quatro e cinco horas, não foram observadas diferenças significativas na viabilidade celular para as duas bactérias. Esses resultados parecem inapropriados quando comparados aos dados de disseminação bacteriana do ensaio de placas de lise. Esperava-se que independente do tempo de exposição, *Shigella* provocaria mais danos às células Caco-2. Contudo, o microambiente da cultura celular é complexo, onde vários parâmetros devem ser levados em conta, tal como a resposta das células Caco-2 frente à infecção bacteriana. É provável que a morte das células Caco-2 por EIEC em quatro e cinco horas de disseminação esteja associada a outros fatores, como a produção de óxido nítrico (NO).

Além do efeito rnicrobicida, altas concentrações de NO acaba por causar danos às células hospedeiras. Células epiteliais intestinais, após invadidas, mostraram um aumento na expressão de NO, o que resultou em diminuição de resistência transepitelial, ou seja, perda da função de barreira celular (RESTA-LENERT & BARRET, 2002). O microambiente criado durante a inflamação é importante na contenção da infecção, porém, além de tóxico para microrganismos, é

também para os tecidos do hospedeiro. O processo precisa ser regulado para evitar maiores danos às células.

Em ensaios *ex vivo* conduzidos em nosso laboratório e realizados em camundongos nocauteados no gene iNOS, o NO pareceu ter um papel importante no controle da infecção por EIEC, embora a eliminação de *Shigella* pareça ocorrer independentemente desta via (AMHAZ, 2007). Ferreira (2008) observou uma diferença significativa na produção de NO produzido por células Caco-2 infectadas por EIEC, comparadas com as células infectadas por *Shigella*. O pico na produção de NO na infecção por EIEC ocorreu em 6 horas de infecção e o pico da produção de NO induzida pela *Shigella* foi após 24 horas de infecção. Em seis horas, a concentração de NO secretada pelas células Caco-2 infectadas por EIEC foi o dobro da encontrada para *Shigella*. Corroborando com esses resultados, Witthoft e colaboradores (1998) demonstraram que o pico do nível de RNA mensageiro para proteína iNOS ocorre em 8 horas após infecção por EIEC e além disso, foi observado uma decrescente síntese nos tempos de 12 e 24 horas.

Para esclarecer as diferenças do processo de invasão e disseminação entre EIEC e *Shigella*,, a cinética de expressão dos principais genes de virulência associados a esses fenótipos foi estudada. .

Pela técnica de RT-PCR, nós avaliamos a expressão dos genes *virF, virB, ipaA, ipaB, ipaC, ipaD, ipgC, mxiH, spa32* e *icsA*, qualitativamente. O gene *icsB* não foi avaliado pois, justamente na região onde os iniciadores foram desenhados, o gene de EIEC apresentou polimorfismo, portando, a amplificação do cDNA foi prejudicada (dados que serão discutidos no decorrer dos comentários). Foi verificado, que o problema estava na região escolhida como molde para a síntese do iniciador. Contudo, esse problema foi contornado pelo método de qPCR.

Para os processos de invasão e disseminação bacteriana, todos os genes avaliados por RT-PCR apresentaram-se menos expressos em EIEC (**Figuras 11 a 15**). Os dados mais relevantes foram os obtidos com *mxiH*, *ipaB* e *ipaD*. Após análise da expressão do mRNA por qPCR, um método muito mais sensível e fidedigno, foi possível observar que no curso da invasão e disseminação, todos os genes de virulência estudados apresentaram-se significativamente menos expressos em EIEC, com exceção do gene *virF* durante a disseminação bacteriana (**Figuras 16 e 17**).

Spa32, codificada pelo gene *spa32*, é uma proteína essencial no SSTT, envolvida no controle do comprimento da agulha, assim como na atividade do SSTT (TAMANO et al., 2002). Após a análise da expressão do mRNA de *spa32*, não observamos diferenças entre as duas bactérias no curso da invasão. Contudo, a transcrição de *mxiH* foi mais acentuada em *Shigella* do que EIEC. Sendo MxiH uma subunidade protéica da agulha que forma o SSTT, sua maior expressão em *Shigella* pode indicar uma melhor montagem da agulha do SSTT e, assim, maior eficiência na translocação das proteínas efetoras para as células hospedeiras, Caco-2 no caso.

Os produtos dos genes *virF* e *virB* regulam a transcrição de outros genes envolvidos na virulência de EIEC e *Shigella* (PARSOT et al., 2005). Nós observamos que a transcrição de ambos os genes regulatórios apresentaram diferenças na expressão de mRNA entre EIEC e *Shigella* no momento da invasão ou disseminação bacteriana intracelular. Essa diferença foi dependente do tempo de infecção e foi mais acentuada para *virF*. Desta forma, a regulação dos genes do *operon* de virulência de EIEC estaria "prejudicada" quando comparada com *Shigella*. Contudo, durante a disseminação bacteriana, a expressão do mRNA sugere que *virF* é mais expresso em EIEC do que *Shigella*. Esse dado nos chamou a atenção, pois apesar da maior concentração de *virF*, a expressão de mRNA de todos os outros genes de virulência estudados foram menores para EIEC. Esses resultados sugerem que a regulação da expressão dos genes do *operon* de virulência de EIEC é distinta de *Shigella*, pois haveria necessidade de maior concentração do regulador VirF para induzir, comparativamente à *Shigella*, menores concentrações dos outros genes necessários para invasão e disseminação bacteriana.

Uma possível diferença na regulação dos genes do *operon* da região de entrada de EIEC e *Shigella* já foi anteriormente sugerida (ALBUQUERQUE, 2006). O autor relatou que, após infecção bacteriana em macrófagos J774, a cinética de expressão de mRNA dos genes de virulência observada não foi compatível com a dos genes reguladores. O mesmo autor sugeriu uma regulação pós-transcricional para os genes de virulência, tendo em vista que genes que estão localizados no mesmo *operon* tendem a apresentar uma cinética de transcrição semelhante entre si por serem transcritos no mesmo mRNA (LAING et al, 2006). Albuquerque (2006) também relatou que o gene *ipaD* é regulado de forma distinta entre EIEC e *Shigella*. Esses dados corroboram os nossos, uma vez que, apesar do mRNA policistrônico, observou-se que *ipaD* é pouco expressa em EIEC no momento da invasão e

aparentemente ausente no momento da disseminação e multiplicação intracelular enquanto expressões dos genes *ipaA-C* foram observadas. Para *Shigella*, o nível de expressão do mRNA desse gene foi baixa, principalmente no processo de disseminação.

Em nossos ensaios de qPCR, observamos que todos os genes plasmidiais de invasão (*ipaA-D*) apresentaram-se menos expressos em EIEC. Este dado sugere que a menor virulência por esta espécie bacteriana possa estar associada a menores níveis de expressão de proteínas de virulência. Dois fatos nos levam a essa afirmação: (i) a IpaD possui um papel indireto na regulação da secreção das Ipas e na inserção das Ipas B e C na célula hospedeira (Picking *et al.*, 2005) e (ii) bactérias deletadas em *ipaC* apresentavam menos de 20% de capacidade de invasão frente a macrófagos J774 (Kuwae et al, 2001).

Também foi observado que o mRNA de *ipaB* de EIEC foi significativamente menos expresso do que o de *Shigella* ($p < 0,001$) para os tempos iniciais de invasão (**Figura 16**) e disseminação (**Figura 17**). A função da IpaB está muito bem descrita na literatura. Essa proteína é muito importante no processo de escape do vacúolo fagocítico, bem como na indução de apoptose em macrófagos e células dendríticas derivadas de monócitos humanos (PHALIPON & SANSONETTI, 2007). É possível que esta seja uma importante diferença de patogenicidade entre EIEC e *Shigella*, onde *Shigella* provavelmente estaria manipulando o sistema imune a seu favor, proporcionando a morte de MΦ e CD intestinais, o que provavelmente não ocorre em EIEC com tanta eficiência. De fato, em estudos com MΦ J774, observou-se que em *Shigella* a expressão do mRNA de *ipaB* foi aproximadamente 5 vezes maior do que em EIEC (ALBUQUERQUE, 2006). Outros resultados, oriundos da indução da morte celular de MΦ J774, mostraram que, durante uma cinética de infecção (0,5; 1; 1,5; 2; 4; 6 e 8 horas), *Shigella* mostrou-se mais citotóxica que EIEC nos tempos de 2, 4 e 6 horas de infecção (AMHAZ, 2007). Nossos resultados sugerem que, no microambiente da infecção, EIEC aparentemente possui menor capacidade de evitar a ação das células apresentadoras de antígenos devido à menor expressão de *ipaB*. Desta forma, ela estaria mais sujeita à eliminação pelo sistema imune inato do que *Shigella*.

Pela técnica de qPCR, observamos que a expressão do mRNA de *icsA* também foi significativamente menor em EIEC, quando comparada com *Shigella*. Infere-se que, por produzir mais IcsA, *Shigella* poder ter maior capacidade de

movimentação intra e intercelular. Em experimentos de placa de lise realizados em nosso laboratório com células L929 (fibroblasto murino), observou-se uma maior capacidade de disseminação por *Shigella flexneri* (M90T) em todos os tempos avaliados (Ferreira, 2008). Esses dados vêm de encontro com os encontrados no presente trabalho, onde observamos claramente a maior capacidade de disseminação de *Shigella* em ensaio de placas de lise em células Caco-2 (**Figura 10**).

O gene *icsB* também foi menos expresso em EIEC. A degradação pelo autofagossomo de componentes celulares e organelas indesejáveis, bem como de bactérias invasoras, são cruciais para a sobrevivência celular. IcsB é muito importante no escape de *Shigella* do autofagossomo da célula hospedeira. Bactérias mutantes em *icsB* são capturadas durante a sua multiplicação intracelular e mantidas no autofagossomo até sua degradação (PHALIPON & SANSONETTI, 2007). Devido à importância IcsB na patogênese de *Shigella*, surgiu a pergunta se haveria alguma diferença na estrutura protéica do IcsB de EIEC, visto que polimorfismos haviam sido detectados por experimentos anteriores (RT-PCR). Assim, o gene *icsB* de EIEC foi amplificado e seqüenciado para o conhecimento da cadeia de nucleotídeos. Esta foi traduzida (hipotéticamente) para proteína e sua seqüência foi comparada com a seqüência protéica de IcsB de *Shigella flexneri.* Algumas diferenças foram observadas no que concerne à cadeia nucleotídica e essas diferenças proporcionaram substituição de aminoácidos na cadeia peptídica, que resultou na alteração da estrutura secundária da proteína IcsB de EIEC. Não se pode afirmar que essa mudança conformacional seja significante em relação à atividade protéica. A similaridade da sequência de aa entre as duas proteínas foi de quase 98%. Esses resultados apenas mostram que há polimorfismos na sequência de nucleotídeos, o que pode traduzir uma proteína diferente (dados não mostrados).

A expressão dos genes de virulência de EIEC e *Shigella* já foi previamente estudada em nosso laboratório, porém, o modelo experimental utilizado foi macrófagos murinos da linhagem J774 (ALBUQUERQUE, 2006). Os resultados encontrados foram semelhantes aos observados em células Caco-2. Um dado extremamente importante foi que, assim como observado por Albuquerque (2006), verificamos que a diferença de expressão dos genes de virulência de EIEC e *Shigella* é dependente do estímulo do hospedeiro. Estas bactérias, quando analisadas quanto à expressão gênica de seus fatores de virulência sem um contato

com células do hospedeiro, ou seja, apenas cultivadas em meio de cultura de DMEM, não apresentaram diferenças de expressão (dados não mostrados). Este fato ressalta a importância da regulação da expressão dos genes de virulência, que necessariamente necessitam do estímulo do hospedeiro para serem positivamente ou negativamente regulados.

Nossos resultados sinalizam claramente que na presença do hospedeiro, há menor expressão dos principais genes de virulência de EIEC quando comparados a de *Shigella*. Provavelmente, a menor capacidade de reinfecção e disseminação intercelular de EIEC está relacionada com este fato. Contudo, diversos outros parâmetros não avaliados em nosso estudo devem estar associados à menor patogenicidade de EIEC.

Um número limitado de patógenos e fatores de virulência podem afetar a permeabilidade paracelular das células epiteliais intestinais (CEI). A desestruturação da integridade das *tight junctions* ocorre em resposta a produtos bacterianos tais como a enterotoxina de *Clostridium perfrigens* (Sonoda et al., 1999), o fator de necrose citotóxico 1 de *E. coli* (Oswald et al., 1994), toxinas de *Clostridium difficile* (Nusrat et al., 1995; Gopalakrishnan et al., 1998), entre outros. A invasão de *Salmonella typhii* em CEI causa distúrbios nas *tight junctions* (Chen et al., 1996) e, *E. coli* enteropatogênica desfosforila e associa ocludina das *tight junctions* (Simonovic *et al.*, 2000).

Sakaguchi e colaboradores (2002) demonstraram que S. flexneri diminui rapidamente a resistência trans-epitelial de monocamada de células T-84 após contato apical e basolateral, indicando a deteriorização física das *tight junctions*. Esses autores também demonstraram que cepas selvagens de *S. flexneri* e cepas não invasivas de *S. flexneri*, curadas em pINV, translocaram através das *tight junctions,* até o espaço paracelular entre as CEI. Esses dados levaram os autores a sugerir que *Shigella* pode penetrar diretamente pelo epitélio intestinal em adição à rota de invasão dependente de células M. Também foi demonstrado que *S. flexneri* utiliza mecanismos que regulam a montagem macromolecular das *tight junctions*, como parte de sua estratégia invasão ao hospedeiro e evasão ao sistema imune.

Uma rota independente das células M já havia sido relatada anteriormente por Rescigno e colaboradores (2001). *Salmonella typhimurium*, que é deficiente em genes invasores codificados pela ilha de patogenicidade 1 de *Salmonella*, é capaz de atingir o baço após administração oral. Este fato sugeriu a existência de uma rota

alternativa de invasão bacteriana. Os autores demonstraram a existência de um mecanismo de entrada das bactérias na mucosa dos tecidos mediado por células dendríticas. Estas possuem a capacidade de abrir as *tight junctions* entre as CEI pela inserção de dendritos para fora do epitélio, para sentir diretamente a presença de bactérias. Em adição, como as células dendríticas expressam proteínas das *tight junctions*, a integridade da barreira epitelial é preservada.

A defesa do hospedeiro contra infecções requer uma resposta integrada entre o sistema imune inato e adaptativo. Estudos emergentes indicam que as células dendríticas contribuem como parte essencial para a iniciação e regulação da imunidade adaptativa. Essas células policiam os sítios de entrada de patógenos no hospedeiro, e estão sempre susceptíveis à detecção e captura de microrganismos invasores. Após o reconhecimento das estruturas microbianas e ativação apropriada, um programa de amadurecimento é iniciado e as células dendríticas adquirem a capacidade de migrar para os órgãos linfóides adjacentes para estimular uma resposta imune primária. Essas células possuem um papel crítico na modulação da resposta emergente, controlando o curso da infecção. As células dendríticas são capazes de discriminar vários tipos de microrganismos e capazes de produzir diferentes citocinas em resposta a diferentes estímulos microbianos. Por outro lado, os patógenos desenvolveram numerosas estratégias para evadir e subverter as funções das células dendríticas. A elucidação da interação das células dendríticas com os patógenos microbianos pode levar a uma nova estratégia de combate às doenças infecciosas através de vacinas e imunoterapias baseadas nessa interação (MOLL, 2006).

Na mucosa intestinal, as células dendríticas são as células apresentadoras de antígenos mais abundantes (JOHANSSON & KELSALL, 2007). Em virtude da importância dessas células na homeostase intestinal e no controle da resposta inflamatória inata e adaptativa, nos perguntamos como as células dendríticas intestinais estariam interagindo com EIEC e *Shigella* e como seria a resposta inflamatória desencadeada por esses microrganismos.

A princípio, avaliamos a expressão de moléculas co-estimulatórias DC80, CD86 e CD40, a expressa de MHC II e TLR-4 na superfície das CDis após desafio com as bactérias. Apesar de não se observar uma diferença na expressão da molécula MHC II entre os três grupos (controle, EIEC e *Shigella*), a expressão das moléculas co-estimulatórias foi muito interessante. Verificou-se que *Shigella* regula

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo


positivamente a expressão das moléculas CD80, CD86 e CD40; EIEC, por sua vez, não foi capaz de ativar a expressão de CD80, induziu baixa expressão de CD86 e regulou negativamente a expressão de DC40 (**Figura 19**).

Durante sua maturação, as CDs perdem a sua capacidade de capturar e processar o antígeno e aumentam sua expressão de moléculas de MCH classe II, co-estimulatórias (CD40, CD80, CD86) e de adesão (CD54). Interações célula-célula que requerem moléculas co-estimuladoras são essenciais para que a resposta imune seja efetiva, impedindo que as células envolvidas sejam suprimidas ou tornem-se anérgicas. A ativação de células T $CD4^+$ é dependente de interações com células apresentadoras de antígenos. Para serem ativadas, células T precisam receber vários sinais. O primeiro sinal é antígeno-específico e fornecido pela ligação do receptor de células T (TCR) ao complexo formado por uma molécula de MHC II e o peptídeo antigênico na superfície das APC. Sinais adicionais das APC são fornecidos pela interação das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 (sobre as células dendríticas ou outras APC) e CD28 (sobre células T) (CLARK & LEDBETTER, 1994). Interações entre CD40 e CD40L entre as células dendríticas (ou outras células apresentadoras de antígenos) e células T são essenciais para a ativação das células T $CD4^+$, uma vez que induzem o aumento da expressão de moléculas co-estimuladoras sobre a superfície destas células, necessárias para que estas sejam eficientemente ativadas. Portanto, há uma cooperação entre as células CD e T, via co-receptores CD40- CD40L, permitindo que a resposta imune efetora seja montada (CLARK & LEDBETTER, 1994; GREWAL & FLAVELL, 1996).

Podemos sugerir, a princípio, que EIEC conduz a uma resposta inflamatória menos intensa, uma vez não é capaz de induzir a expressão de moléculas co-estimulatórias na superfície das CDis. Outro dado importante foi a regulação negativa da molécula CD40, essencial na condução da ativação dos linfócitos T.

A expressão de moléculas co-estimulatórias foi abordada anteriormente por Amhaz (2007), onde a autora observou que posteriormente à infecção de macrófagos murinos por EIEC e *Shigella,* houve um aumento da expressão de MHC II e CD80, mais proeminente nas células induzidas por *Shigella*, e uma diminuição da expressão de CD86, principalmente após infecção por EIEC. Esses dados, somados aos resultados obtidos no presente trabalho, nos levaram a outra pergunta: como se dá a apresentação dos antígenos de EIEC e *Shigella* pelas CDis aos linfócitos T $CD4^+$?

Consequentemente, nós avaliamos o processamento e a apresentação de antígenos pelas células dendríticas aos linfócitos T $CD4^+$ *naïve* pela técnica de linfoproliferação. Os resultados obtidos corroboraram com o fenótipo de moléculas co-estimulatórias observado nas células dendríticas (**Figura 19**), pois observamos a proliferação dos linfócitos apenas sob a apresentação dos antígenos de *Shigella*, mais ainda, a proliferação foi dependente da concentração de antígenos. Esses dados são muito interessantes. As CDis foram capazes de apresentar os antígenos de *Shigella* apenas na proporção 1:1 (uma célula dendrítica para uma célula bacteriana) (**Figura 20**), e não apresentaram os antígenos de *Shigella*, quando a proporção foi 1:10 (uma célula dendrítica para cada 10 células bacterianas) ou houve a apresentação, porém com uma intensidade tal que levasse ao estresse dos linfócitos, desencadeando um processo anérgico.

Amhaz (2007) observou que os antígenos de EIEC e *Shigella* estimularam diferentemente a proliferação linfocitária. Houve maior proliferação das células estimuladas com os antígenos de *Shigella*, enquanto que EIEC pouco estimulou a proliferação de linfócitos..

Entre as células linfóides da mucosa intestinal, os linfócitos T desempenham um papel crucial, atuando como verdadeiros maestros da resposta imunológica. O evento central, tanto para a produção da resposta imunológica humoral como para a mediada por células, depende da ativação e da expansão clonal de linfócitos T auxiliares (Th). Por outro lado, dependendo da forma como o antígeno é apresentado ao linfócito Th, e na ausência de moléculas co-estimulatórias, linfócitos T maduros podem tornar-se anérgicos, determinando um estado de tolerância. Na literatura, há trabalhos que abordam a supressão da resposta inflamatória mediada por subpopulações de células T (UHLIG & POWRIE, 2005). Recentemente, algumas evidências têm demonstrado que células T $CD4^+$ estão envolvidas na regulação de doenças inflamatórias, o que inclui a inflamação intestinal, gerando um novo conceito sobre células T supressoras/regulatórias (MALOY & POWRIE, 2001; SAKAGUCHI, 2004). Linfócitos T regulatórios $CD4^+$ $CD25^+$ possuem o potencial de inibir o desenvolvimento de inúmeras respostas inflamatórias in *vivo*, que inclui doenças autoimunes, imunidade a tumores e inflamação intestinal derivada de bactérias (SAKAGUCHI, 2004). Essa subpolulação de linfócitos são hiperresponsivos à estimulação de TCR e podem suprimir a proliferação e a produção de citocinais de linfócitos T *in vitro* e *in vivo* (MALOY & POWRIE, 2001;

SAKAGUCHI, 2004). Talvez, a falta de proliferação dos linfócitos T que sofreram ativação com as CDis infectadas com *Shigella* na proporção 1:10 pode estar relacionada à estimulação excessiva de TCR.

Alguns estímulos podem induzir o desenvolvimento de células dendríticas regulatórias, que criam tolerância aos antígenos que estão sendo apresentados às de células T regulatórias (Tregs) (LEWIS & POLLARD, 2006). A co-regulação pelos receptores B7 sinalizam às células T se respondem ou não aos antígenos que estão sendo apresentados: enquanto a estimulação dos sinais B7 ativa as células T frente aos antígenos, a inibição dos sinais B7 instrui as células T a se tornarem tolerantes aos antígenos apresentados (PRENDERGAST, G.C., 2008). A presença de CD40 é um sinal para a ativação das células T; contudo, sua ausência, somada à presença de CTLA-4 nas células T, influencia o desenvolvimento de uma resposta supressora nos linfócitos T (ALBA SOTO et al, 2003). No que diz respeito aos nossos resultados sobre a falta de linfoproliferação na co-cultura com CDs infectadas por EIEC, sugerimos que devido à baixa expressão de DC40 e CD86, o microambiente da cultura esteja conduzindo a uma resposta adaptativa supressora.

O epitélio intestinal sente a presença de patógenos e bactérias comensais pela interação com o sistema imune inato. Esse reconhecimento é mediado por uma variedade de receptores celulares. Dentre eles, encontram-se aqueles que reconhecem especificamente constituintes moleculares de microrganismos, conhecidos, em geral, pela denominação "padrões moleculares associados a patógenos" (PAMPs). No intestino, duas classes de PAMPs possuem um papel crucial no reconhecimento de patógenos pelo sistema imune da mucosa: os receptores do tipo Toll (TLRs) e os receptores do tipo Nod (NLRs) (MAGALHAES, et al., 2007). O LPS de bactérias Gram-negativa, como EIEC e *Shigella*, é reconhecido pelos TLR-4. Esse reconhecimento desencadeia uma cascata de sinalização intracelular, que culmina na ativação de fatores de regulação transcricionais, como NF-κB, responsável pela ativação da transcrição de citocinas pró-inflamatórias. Devido a sua importância no desenvolvimento da resposta inflamatória, nós avaliamos a expressão de TLR-4 nas CDis após infecção por EIEC e *Shigella* (**Figura 19**) . As duas bactérias, como esperado, regularam positivamente expressão desse receptor nas CDis. Contudo, a expressão desencadeada por EIEC foi muito superior à de *Shigella*. Esse resultado sugere que a resposta inicialmente gerada

pela infecção por EIEC levaria ao desenvolvimento de uma resposta pró-inflamatória mais efetiva.

Recentemente, Ferreira (2008) avaliou a expressão de TLR-4 e NF-κB em células intestinais Caco-2 após quatro horas de estímulo com as bactérias EIEC e *Shigella*. Apesar da regulação positiva da expressão desses genes, não foram observadas diferenças na expressão do mRNA de TLR-4 e NF-κB frente aos dois estímulos bacterianos. Amhaz (2007) estudou a expressão de mRNA de TLR-4 em lavado peritonial de camundongos selvagens após quatro e 48 horas de infecção por EIEC e *Shigella*. Foi observado que *Shigella* induziu maior expressão desse gene do que EIEC, após quatro horas de infecção. Não foram observadas diferenças para o tempo de 48 horas. Frente a esses dados, somados aos obtidos no presente trabalho, parece que o início da resposta pró-inflamatória desencadeada por EIEC estaria mais relacionado com a ação de células dendríticas intestinais. Esses resultados também sinalizam a importância das células dendríticas no processo inflamatório da doença diarréica causada por EIEC.

A resposta imunológica é conseqüência de uma série de interações envolvendo o microambiente da infecção. A regulação de um processo inflamatório envolve um equilíbrio entre as citocinas pró e anti-inflamatórias. Para a melhor compreensão dos parâmetros avaliados sobre a interação de EIEC e *Shigella* com células dendríticas intestinais, nós avaliamos a secreção de IL-10 e IL-12 por CDis após desafio com EIEC e *Shigella*. Após 24 horas de incubação das CDis sob a presença ou ausência de estímulo bacteriano, observamos que EIEC induz maior secreção de IL-10 e IL-12 em relação à *Shigella* e ao controle (secreção basal) (**Figuras 21 e 22**). *Shigella* parece não estimular a secreção dessas citocinas, uma vez que não houve diferenças em relação aos níveis basais. Esses resultados corroboram os resultados da expressão de moléculas co-estimulatórias e linfoproliferação.

A IL-10 inibe a síntese do TNF, IL-1, IL-6 e IL-8 em monócitos e macrófagos. Também já foi observado que o aumento da sua concentração e da do receptor antagonista do IL-1 (IL-1ra) é concomitante à diminuição das concentrações das citocinas pró-inflamatórias. IL-10 também possui um efeito inibitório na apresentação de antígenos por células dendríticas porque regula negativamente a expressão de MHC II e moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 (HUBERT et al, 2007). Desta forma, nós sugerimos uma possível associação da ineficácia da apresentação de

antígenos de EIEC pelas CDis aos linfócitos T também à presença de IL-10 no microambiente da co-cultura celular. A maior expressão de mRNA de IL-10 também foi observada em macrófagos murinos *ex-vivo* infectados com EIEC, comparativamente à *Shigella* (Amhaz, 2007). Esses estudos nos levam a estimar que o microambiente da infecção gerada por EIEC tende a ser menos agressivo do que o observado para *Shigella*. De fato, sabe-se que a resposta inflamatória induzida por *Shigella* é muito exacerbada, o que conduz a uma colite severa (PHALIPON & SANSONETTI, 2007).

Na imunidade inata, a ativação das células dendríticas por uma variedade de produtos microbianos leva a uma maturação destas células, com produção de citocinas e quimiocinas, as quais influenciam na resposta imune adaptativa. Algumas citocinas induzidas por TLRs, como a IL-12, podem levar a ativação de células T do fenótipo Th1, que é uma resposta apropriada para a eliminação de muitos patógenos. IL-12 é o principal mediador da resposta imune inata inicial a microrganismos intracelulares e é um indutor essencial da imunidade mediada por células à resposta imune adaptativa a esses microrganismos. A IL-12 é uma citocina produzida por células apresentadoras de antígenos, que atua basicamente sobre os linfócitos T promovendo uma retroalimentação positiva sobre as respostas do tipo Th1. Uma produção aumentada de IL-12 na mucosa intestinal de pacientes com doenças de Crohn favorece a hipótese de predomínio de resposta imunológica do tipo Th1 nesta infermidade (MONTELEONE et al., 1997).

A avaliação da expressão de IL-12 pelas CDis após estímulo bacteriano revelou que as células infectadas por EIEC induzem maior secreção desta citocina. *Shigella*, por sua vez, não estimulou a secreção de IL-12, visto que a concentração deste mediador químico não apresentou diferenças significativas em relação à expressão basal.

O desenvolvimento predominante de uma subpopulação de células T (Th1 ou Th2) durante uma infecção é extremamente importante, pois certos patógenos são efetivamente mais controlados por uma resposta do tipo celular (Th1) e outros mais controlados por uma resposta do tipo humoral (Th2) (SHER & COFFMAN, 1992). Em algumas doenças, a resposta de células T $CD4^+$ inapropriada pode exacerbar a doença, levando a uma inabilidade do hospedeiro para erradicar o microrganismo. Outro ponto de vista seria uma reação inflamatória muito intensa que, por sua vez,

pode favorecer a colonização e multiplicação bacteriana devido às injúrias que pode causar aos tecidos epiteliais, como o caso do epitélio intestinal.

Na literatura, uma variedade de estudos *in vivo* sugere que a expressão de CD86 promove um sinal inicial para células T *naïve* secretarem IL-4, ou seja, uma resposta polarizada para Th2. Em contrapartida, a expressão de CD80 induz a diferenciação de células T *naïve* ao fenótipo Th1 (KUCHROO et al, 1995; RANGER et al, 1996). Ferreira e Almeida (2006) mostraram que a expressão de CD80 por células dendríticas direciona uma resposta celular do tipo Th1. Sabe-se que a resposta do tipo Th1, ou seja, uma resposta protetora ao hospedeiro, é direcionada pela citocina IL-12; já uma resposta que resulta na inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, como do tipo Th2 é direcionada principalmente pela citocina IL-10.

Os perfis de secreção de citocinas obtidos em nossos experimentos não nos sugerem ao certo a polarização das células T (Th1 ou Th2) em função da ativação das CDis por EIEC e *Shigella*. Aparentemente, EIEC estaria induzindo uma resposta equilibrada Th1/Th2, talvez com o predomínio de uma resposta do tipo Th1 pela produção tanto de IL-10 quanto de IL-12 no microambiente da infecção.

Na literatura, poucos trabalhos foram realizados sobre a interação de células dendríticas com o gênero *Shigella* sp. Edgeworth e colaboradores (2002) estudaram a interação de *Shigella flexneri* com células dendríticas derivadas de monócitos humanos. Os autores demonstraram que a infecção de CD humanas com *S. flexneri* resulta em rápida morte celular dependente de IpaB. A citotoxicidade foi parcialmente bloqueada por inibidores de caspase-1, e completamente bloqueada por um inibidor universal de caspases. As CDs infectadas por *S. flexneri* secretaram IL-1 e IL-18, o que sugeriu sua contribuição na indução de uma resposta inflamatória inicial. Os autores sugeriram que a rápida morte das CDs durante o estágio inicial da shigelose levaria a conseqüências adversas na geração da resposta imune adaptativa. Entretanto, não existem trabalhos que relatem a expressão de moléculas co-estismulatórias em CDs, bem como sua capacidade de apresentação de antígenos de *Shigella*, para que os parâmetros relacionados à imunidade adaptativa sejam avaliados.

A vasta superfície mucosa do tubo digestório constitui a maior porta de entrada do organismo para antígenos estranhos. Os leucócitos e células mononucleares são recrutados para o local da inflamação ou lesão tecidual por um processo finamente regulado. Diversos fatores estão relacionados ao recrutamento e

migração celular, como moléculas de adesão celular e quimiocinas. As quimiocinas são pequenas proteínas solúveis que atuam como moléculas de atração para diferentes subpopulações celulares.

Na intenção de associar a interação das células epiteliais intestinais e a ação das células dendríticas no processo infeccioso desencadeado por EIEC e *Shigella*, nós fizemos uso de um sistema de três componentes (**Figura 6**) para mimetizar um microambiente intestinal mais fidedigno. Avaliamos a imuno-migração das células dendríticas ao compartimento apical da co-cultura, que mimetizava o lúmen intestinal. Nossas evidências experimentais indicam que apenas EIEC possui a capacidade de induzir a transmigração das células dendríticas ao foco inicial da infecção. As proteínas secretadas por EIEC apresentaram a mesma capacidade da célula bacteriana em induzir a migração celular, porém em menor proporção. Nada foi observado em relação à *Shigella* ou suas proteínas secretadas. Posteriormente, avaliamos a localização e concentração de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas após o estímulo bacteriano.

Assim como esperado, não detectamos a presença de CCL19, uma quimiocina importante no recrutamento de células dendríticas maduras para o sítio de infecção. Esta quimiocina também possui um importante papel no tráfego de células T no timo e na migração de células T e B aos órgãos linfóides secundários. Seu receptor na membrana das células dendríticas é o CCR7, positivamente regulado após maturação dessas células (MOLL, 2003; JOHANSSON & KELSALL, 2005, SABATTÉ et al., 2007).

No lado apical, CCL4 foi praticamente nula, contudo sua concentração na porção basolateral foi alta. Os estímulos bacterianos sugestivamente regularam de forma positiva a expressão desta quimiocina. A produção de CCL4 é estimulada por endotoxinas bacterianas. Além de ser quimioatratora de células dendríticas imaturas, esta quimiocina possui a capacidade de ativar granulócitos humanos, que podem levar a uma resposta inflamatória aguda. Ela também induz a síntese e a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6 e TNF (MOLL, 2003; JOHANSSON & KELSALL, 2005, SABATTÉ et al., 2007).

A quimiocina CCL20 tem por atividade a formação e ativação da função dos tecidos linfóides da mucosa via quimioatração de linfócitos e células dendríticas imaturas pelas células epiteliais que circundam esses tecidos. Sua expressão é induzida por fatores microbianos, como o LPS, e citocinas inflamatórias, como TNF e

INF-γ; a citocina IL-10 regula negativamente a sua expressão. O receptor de CCL20 na membrana das células dendríticas é o CCR6. Em nossos ensaios, observamos que a secreção de CCL20 foi significativamente mais secretada na porção apical apenas após estímulo com as proteínas secretadas das duas bactérias, quando comparada à secreção basal. Os dados mais interessantes foram observados no lado basolateroal, onde todos os estímulos bacterianos estimularam a secreção desta quimiocina em altas concentrações. A maior concentração foi observada após estímulo da monocamada intestinal com as proteínas secretadas de EIEC (MOLL, 2003; JOHANSSON & KELSALL, 2005, SABATTÉ et al., 2007).

Outra quimiocina muito importante na migração celular é o MCP-1, onde sua atividade está relacionada ao recrutamento de células do sistema imune, como monócitos, para o sítio de infecção ou lesão. O MCP-1 foi negativamente regulado na porção apical da co-cultura celular após infecção com os estímulos bacterianos. Na porção basolateral, apesar da alta concentração deste mediador químico, não foram observadas diferenças de secreção em relação ao nível basal. Contudo, sugere-se uma maior concentração de MCP-1 após estímulo com EIEC (MOLL, 2003; JOHANSSON & KELSALL, 2005, SABATTÉ et al., 2007).

A citocina pró-inflamatória IL-8 foi pouco secretada na porção apical e altamente secretada na porção basolateral. Entretanto, apesar da importância desta citocina no processo inflamatório direcionado por *Shigella* (DONNENBERG, 2000; PARSOT & SANSONETTI, 1995, SANSONETTI, 2001), não encontramos diferenças estatísticas entre a secreção basal e a secreção após os estímulos bacterianos. É possível que a secreção desta citocina esteja relacionada a um processo um pouco mais tardio do que o estudado neste trabalho. Ferreira (2008) verificou que tanto EIEC como *Shigella* regulam positivamente a secreção de IL-8 em células Caco-2, mas não foram encontradas diferenças na quantidade desta citocina entre EIEC e *S. flexneri.*

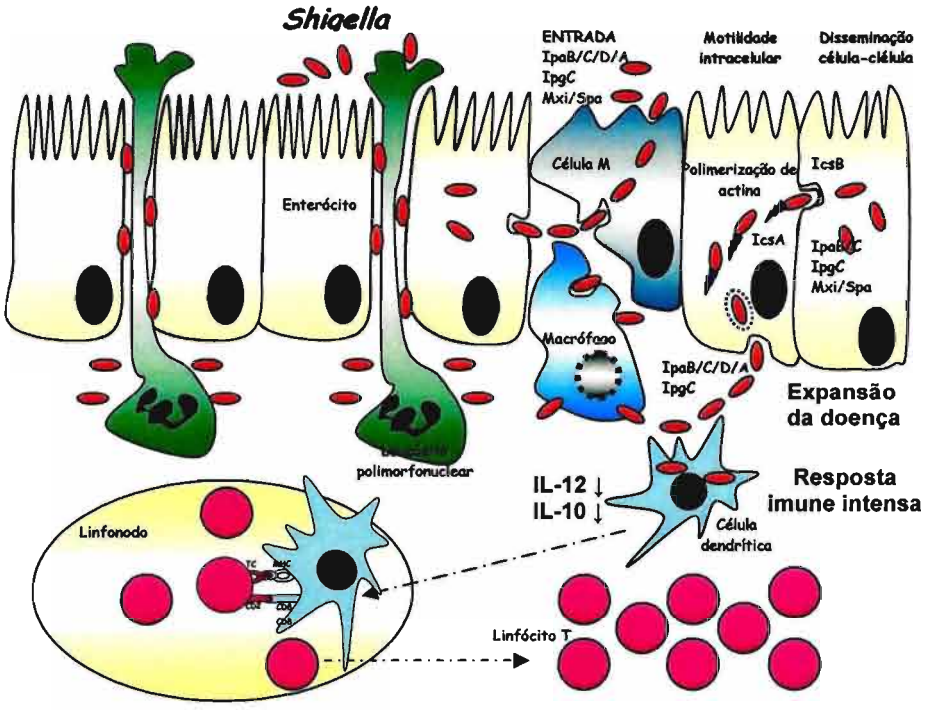
Também avaliamos a secreção de TNF-α na co-cultura de células epiteliais com células dendríticas após infecção com os antígenos. Na porção apical, essa citocina foi negativamente regulada pelos estímulos bacterianos. Contudo, observou-se que sua secreção na porção basolateral foi muito alta, principalmente após infecção com EIEC. Essa citocina possui um papel fundamental na resposta inflamatória, além de exercer a função de quimioatração de células do sistema imune inato (MOLL, 2003; JOHANSSON & KELSALL, 2005, SABATTÉ et al., 2007).

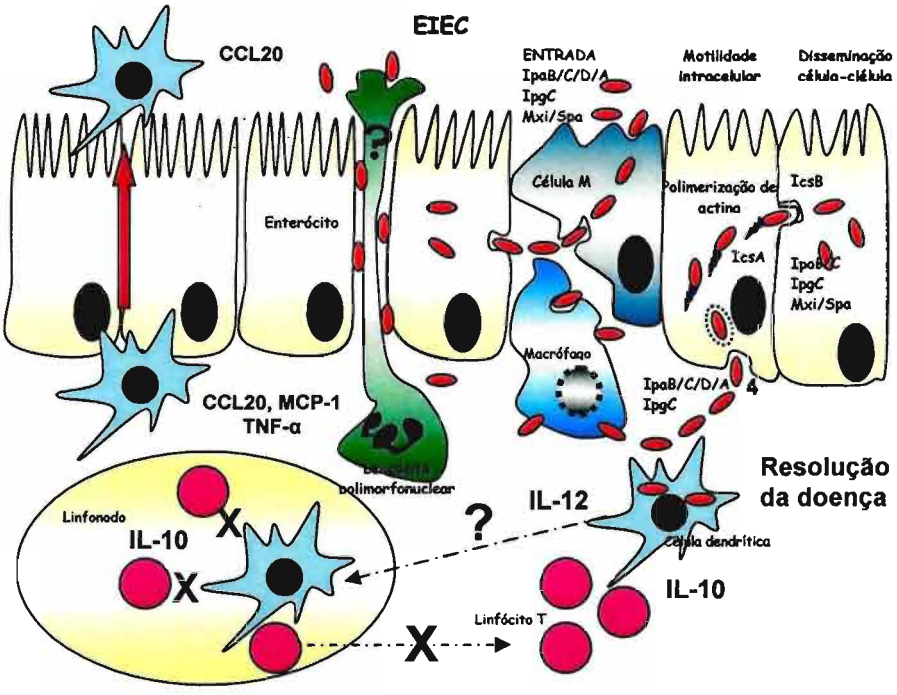
O recrutamento de célula dendríticas ao local inflamatório, direcionado por EIEC, pode ser associado à secreção das quimiocinas aqui estudadas, como CCL4, CCL20, MCP-1 e principalmente TNF-α. Também pudemos avaliar que as proteínas secretadas por EIEC e *Shigella* exercem um sinal diferente em relação à secreção de TNF-α. Esse dado poderia ser somado a vários outros como uma possível explicação da diferença da ativação do sistema imune inato entre as duas bactérias.

Em certas circunstâncias, os mecanismos de controle das respostas imunes das mucosas podem ser alterados e extensas reações imunes e inflamatórias ocorrem. Na mucosa intestinal, o papel das células dendríticas é muito importante na manutenção da homeostase e na defesa imunológica. Neste trabalho, nós comprovamos que a expressão dos genes de virulência de EIEC é menor do que os de *Shigella* no curso da invasão e disseminação bacteriana em células epiteliais intestinais. Também verificamos que EIEC possui menor capacidade de disseminação bacteriana. Nossos dados experimentais sinalizam que a infecção por EIEC esteja mais restrita a um determinado local da infecção, ou seja, não é capaz de se disseminar a ponto de estender a lesão tecidual de forma mais drástica, como *Shigella*. Esses dados compactuam efetivamente com a clínica da doença diarréica causada por EIEC. Entretanto, a mucosa intestinal não se resume a uma monocamada de células epiteliais intestinais. Portanto, o papel do sistema imune é essencial na contenção da doença. Desta forma, verificamos que a resposta imunológica induzida por EIEC em células dendríticas direciona para uma resposta imune celular, onde são secretadas tanto citocinas pró-inflamatórias como anti-inflamatórias. Sugerimos que este equilíbrio da resposta inflamatória estaria favorecendo o hospedeiro, uma vez que seria uma resposta efetiva, porém sem grandes exacerbações imune-celulares, que fatalmente seriam prejudiciais ao hospedeiro, como ocorre em *Shigella*. A resposta imune adaptativa de EIEC estaria a princípio, suprimida na resposta aguda e, em relação à *Shigella*, essa resposta seria tão intensa que levaria a uma super-ativação da resposta inflamatória.

Corroborando esses dados, foi verificado que a produção de TNF-α induzida por EIEC é muito alta, juntamente com a presença de outras quimiocinas, importantes para a transmigração de células dendríticas para o sítio de infecção. Assim, demonstramos que na infecção por EIEC, a imuno-migração de células dendríticas pode ser um fato essencial na eliminação do patógeno.

Com os resultados obtidos no nosso trabalho e, com os dados já publicados na literatura sobre *Shigella*, acreditamos que possivelmente, uma fisiopatologia resumida da infecção por EIEC e *Shigella* seja:



# *Conclusão*

## 6- CONCLUSÕES

- A expressão dos genes de virulência *virF, virF, ipaA, ipaA, ipaC, ipaD, icsA* e *icsB* é menor em EIEC quando comparada à *Shigella*, após infecção em células intestinais Caco-2;

- A disseminação de EIEC em células Caco-2 é menos eficiente que a de *Shigella*;

- EIEC parece induzir um estado de tolerância em células dendríticas intestinais de camundongos; o que levaria, a princípio, a uma supressão da resposta imune adaptativa; os antígenos de *Shigella* são eficientemente apresentados pelas células dendríticas, o que levaria à formação de uma resposta T específica;

- A resposta inflamatória observada nos modelos experimentais estudados indica que EIEC conduz a uma resposta imune inata, com predomínio de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas importantes para a migração imune-celular. Sugerimos a presença de um equilíbrio da resposta inflamatória (sistemas imunes inato e adaptativo), que estaria favorecendo o hospedeiro, uma vez que seria uma resposta efetiva, porém sem grandes exacerbações imune-celulares, que fatalmente seriam prejudiciais ao hospedeiro, como ocorre em *Shigella*;

- A resposta inflamatória observada nos modelos experimentais estudados indica que *Shigella* manipula o sistema imune inato e adaptativo, sendo esta uma importante ferramenta de sua patogenicidade para a sobrevivência e expansão da doença.

- Nossas evidencias experimentais indicam que a doença desencadeada por EIEC é mais restrita a um determinado local da infecção, ou seja, não é capaz de se disseminar a ponto de estender a lesão tecidual de forma mais drástica, como *Shigella*. Esse fenômeno pode estar associado à menor expressão de

seus dos fatores de virulência e à resposta imune inata induzida no sítio de infecção, o que levaria, fatalmente, à resolução da doença.

- Neste trabalho, esclarecemos alguns tópicos da patogenicidade de EIEC que sustentam a sua menor virulência quando comparada à *Shigella flexneri*, e mostramos a importância das células dendríticas nesse processo.

# Referências Bibliográficas

## 6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHESON, D.W.; LUCCIOLI, S. Microbial-gut interactions in health and disease. Mucosal immune responses. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, v.18, p.387-404, 2004.

ALBA SOTO, C. D.; MIRKIN, G. A.; SOLANA, M. E.; GONZÁLEZ CAPPA, S. M. Trypanosoma cruzi infection modulates in vivo expression of major histocompatibility complex class II molecules on antigen-presenting cells and T-cell stimulatory activity of dendritic cells in a strain-dependent manner. *Infect Immun*, v.71, p.1194-1199, 2003.

ALBERT, M.J.; FARUQUE, S.M.; FARUQUE, A.S.; NEOGI, P.K.; ANSARUZZAMAN, M.; BHUIYAN, N.A.; ALAM, K.; AKBAR, M.S.Controlled study of *Escherichia coli* diarrheal infections in Bangladeshi children. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v. 33, p. 937-977, 1995.

ALBUQUERQUE, J.A.T. Análise comparativa da transcrição de genes envolvidos na invasão e escape de *Escherichia coli* enteroinvasora e *Shigella flexneri* em macrófagos J774. São Paulo, 2006. 53p. Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

ALLAOUI, A.; MOUNIER, J.; PRÉVOST, M.C.; SANSONETTI, P.J.; PARSOT, C. *icsB*: a *Shigella flexneri* virulence gene necessary for the lysis of protrusions during intracellular spread. *Mol. Microbiol.*, v.6, p.1605-1616, 1992.

ALMEIDA, M. T. G.; SILVA, R. M.; DONAIRE, L. M. Enteropatógenos associados com diarréia aguda em crianças. *J. Pediatr.*, v.74, p.291-298, 1998.

AMHAZ, J.M.K. Alterações na resposta imune inata e adaptativa induzidas por *Escherichia coli* enteroinvasora em modelo murino. São Paulo, 2007. 116p. Tese de doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

ANDRADE, A.; GIRÓN, J. A.; AMHAZ, J. M. K.; TRABULSI, L. R.; MARTINEZ, M. B. Expression and characterization of flagella in nonmotile enteroinvasive *Escherichia coli* isolated from diarrhea cases. *Infect. Immun.*, v.70, p.5882-5886, 2002.

ANDRADE, A. Influência do ferra na expressão das proteínas de membrana externa de Escherichia coli enteroinvasora (EIEC). São Paulo, 1996. 101p. Dissertação de mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, São Paulo.

AZEVEDO, M. E. F. Influência do pH ácido na expressão do lipopolissacarídeo e das proteínas de membrana externa de *Escherichia coli* invasora. São Paulo, 1998. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, São Paulo.

BANCHEREAU J, BRIERE F, CAUX C, DAVOUST J, LEBECQUE S, LIU YJ, PULENDRAN B, PALUCKA K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, v.18, p.767-811, 2000.

BAHRANI, F.K.; SANSONETTI, P.J.; PARSOT, C. Secretion of Ipa proteins by Shigella flexneri: inducer molecules and kinetics of activation. *Infect Immun.,* v.65, p.4005-10, 1997.

BERNARDINI, M.L.; MOUNIER, J.; d'HAUTEVILLE, H.; COQUIS-RONDON, M., SANSONETTI, P.J. Identification of *icsA*, a plasmid locus of *Shigella flexneri* that governs intra- and intercellular spread through interaction with F-actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v.86, p.3867-71, 1989.

BLOCKER, A.; GOUNON, P.; LARQUET, E.; NIEBUHR, K.; CABIAUX, V.; PARSOT, C.; SANSONETTI, P. The tripartite type III secreton of *Shigella flexneri* inserts IpaB and IpaC into host membranes. *J. Cell Biol.,* v.147, p.683-93, 1999.

BLOCKER, A.; KOMORIYA, K.; AIZAWA, S-I. Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* v.100, p.3027-3030, 2003.

BUCHRIESER, C. The virulence plasmid pWR100 and the repertore of proteins secreted by the type III secretion apparatus of Shigella flexneri. *Mol. Microbiol.,* v.38, p.760-771, 2000.

CHEN, L. M.; HOBBIE, S.; GALAN, J. E. Requirement of CDC42 for Salmonella-induced cytoskeletal and nuclear responses. *Science,* v.274, p.2115–2118, 1996.

CHEN, Y.; SMITH, M.R.; THIRUMALAI, K.; ZYCHLINSKY, A. A bacterial invasin induces macrophage apoptosis by directly binding ICE. *EMBO J.*, v.15, p.3853-60, 1996.

CLARK, E.A.; LEDBETTER, J.A. How B and T cells talk to each other. *Nature*, v.367, p.425-428, 1994.

COSSART, P.; SANSONETTI, P. J. Bacterial invasion: the paradigm of enteroinvasive pathogens. *Science*, v.304, p.242-248, 2004.

DALL'AGNOL, M.; MARTINEZ, M. B. Uptake of iron from different compounds by enteroinvasive *Escherichia coli. Rev. Microbiol.,* v.30, p.149-152, 1999.

DONNENBERG, M. S. Pathogenic strategies of enteric bacteria. Nature, v.406, p.768-774, 2000.

DUPONT, H. L.; FORMAL, S. B.; HORNICK, R. B.; SNYDER, M. J.; LIBONATI, J. P.; SHEHAN, D. G.; LABREC, E. H.; KALAS, J. P. Phatogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. *N. Engl. J. Med.,* v.285, p.1-9, 1971.

EDGEWORTH, J.D.; SPENCER, J.; PHALIPON, A.; GRIFFIN, G.E.; SANSONETTI, P.J. Cytotoxicity and interleukin-1β processing following *Shigella flexneri* infection of human monocyte-derived dendritic cells. *Eur. J. Immunol.,* v.32, p.1464-1471, 2002.

FASANO, A.; KAY, B. A.; RUSSELL, R. G.; MANEVAL, D. R.; JR LEVIN, M. M. Enterotoxin and cytotoxin production by enteroinvasive Escherichia coli. *Infect Immun*, v.58, p.3717-3723, 1990.

EWING, W. H.; GRAVATTI, J. L. Shigella Types Encountered in the Mediterranean Area. *J Bacteriol*, v.53, p.191-195, 1947.

FERREIRA, K.S.; ALMEIDA, S.R. Regulation of T helper cell differentiation in vivo by gp43 from Paracoccidioides brasiliensis provided by different antigen-presenting cells. *Scand. J. Immunol.,* v.58, p.290-297, 2006.

FERNANDEZ-FILHO, A. Doença diarréica aguda em João Pessoa: prevalência de enteropatógenos e importância dos potencias fatores de risco e proteção. São Paulo, 2004. 124p. Tese de doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

FORMAL, S.B.; HALE, T.L.; SANSONETTI, P.J. Invasive enteric pathogens. *Rev. Infect. Dis.,* v.5, p.702-707, 1983.

GIBOTTI, A.; TANAKA, T.L.; OLIVEIRA, V.R.; TADDEI, C.R.; MARTINEZ, M.B. Molecular characterization of enteroinvasive *Escherichia coli ipa* genes by PCR-RFLP analysis. *Braz. J. Microbiol.,* v.35, p.74-80, 2004.

GOMES, T.A.T.; RASSI, V.; McDONALD, K.L.; RAMOS, S.R.T.S.; TRABULSI, L.R.; VIEIRA, M.A.M.; GUTH, B.E.C.; CANDEIAS, J.A.N.; IVEY, C.; TOLEDO, M.R.F.; BLAKE, P.A. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in São Paulo, Brazil. *J. Infect. Dis.,* v.164, p.331-337, 1991.

GOPALAKRISHNAN, S.; RAMAN, N.; ATKINSON, S. J.; MARRS, J.A. Rho GTPase signaling regulates tight junction assembly and protects tight junctions during ATP depletion. *Am J Physiol*, v.75, p.C798–C809, 1998.

GORDEN, J.; SMALL, P. L. Acid resistance in enteric bacteria. *Infect Immun*, v.61, p.364-367, 1993.

GREWAL, I.S.; FLAVELL, R.A. The role of CD40 ligand in costimulation and T-cell activation. *Immun.l Rev.*, v.153, p.85-106, 1996.

GUERMONPREZ, P.; VALLADEAU, J.; ZITVOGEL, L.; THERY, C.; AMIGORENA, S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.*, v.20, p.621-667, 2002.

GUICHON, A.; HERSH, D.; SMITH, M. R.; ZYCHLINSKY, A. Structure-function analysis of the *Shigella* virulence factor Ipa B. *J. bacteriol.,* v.183, p.1269-1276, 2001.

HILBI, H.; CHEN, Y.; THIRUMALAI, K.; ZYCHLINSKY, A. The interleukin-1β-converting enzyme, caspase-1, is activated during *Shigella flexneri*-induced apoptosis in human monocyte-derived-macrophages. *Infect. Immun.,* v.65, p.5165-5170, 1997.

HILBI, H.; MOSS, J.E.; HERSH, D.; CHEN, Y.; ARONDEL, J.; BANERJEE, S.; FLAVELL, R. A.; YUAN, J.; SANSONETTI, P.J.; ZYCHLINSKI, A. *Shigella* - induced apoptosis is dependent on caspase-1 wich binds to IpaB. *J. Biol. Chem.,* v.273, p.32895-32900, 1998.

HUBERT, P.; JACOBS, N.; CABERG, J.H.; BONIVER, J.; DELVENNE, P. The cross-talk between dendrítica and regulatory T cells: good or evil? *J. Leuk. Bio.,* v.82, p.1-14, 2007.

JOHANSSON, C.; KELSALL, B. L. Phenotype and function of intestinal dendritic cells. *Semin Immunol*, v.17, p.284-294, 2005.

JUNG, H. C.; ECKMANN, L.; YANG, S.; PANJA, A.; FIERER, J.; MORZYCKA-WROBLEWSKA, E.; KAGNOFF, M.F. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J. Clin. Invest.,* v.95, p.55-65, 1995.

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L. Pathogenic *Escherichia coli. Nat. Rev.*, v.2, p.123-140, 2004.

KUCHROO, V.K.; DAS, M.P.; BROWN, J.A.; RANGER, A.M.; ZAMVIL, S.S.; SOBEL, R.A.; WEINER, H.L.; NABAVI, N.; GLIMCHER, L.H. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules active differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell,* v.80, p.707-718, 1995.

KUWAE, A.; YOSHIDA, S.; TAMANO, K.; MIMURO, H.; SUZUKI, T.; SASAKAWA, C. *Shigella* invasion of macrophage requires the insertion of *ipaC* into the host plasma membrane. *J Biol Chemistry*, v.276, p.32230-32239, 2001.

LAING, E.; MERSINIAS, V.; SMITH, C.P.; HUBBARD, S.J. Analysis of gene expression in operons of *Streptomyces coelicolor. Genome Biology*, v.7, p.46-50, 2006.

LAW, D. Adhesion and its role in the virulence of enteropathogenic *Escherichia coli* . *Clin. Microbiol. Rev.,* v.7, n.2, p.152-173, 1994.

LE-GALL, T.; MAVRIS, M.; MARTINO, M.C.; BERNARDINI, M.L.; DENAMUR, E.; PARSOT, C. Analysis of virulence plasmid gene expression defines three classes of effectors in the type III secretion system of *Shigella flexneri*. *Microbiol.*, v.151, p.951-962, 2005.

LEVINE, M. M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropatogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroaherent. *J. Infect. Dis.,* v.155, p.377-389, 1987.

LEWIS, C. E.; POLLARD, J. W. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res*, v.66, p.605–612, 2006.

MAGALHAES, J.G.; TATTOLI, I.; GIRARDIN, S. E. The intestinal epithelial barrier: how to distinguish between the microbial flora and pathogens. *Semin Immunol*, v.19, p.106-115, 2007.

MALOY, K.J.; POWRIE, F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat. Immunol.*, v.2, p.816-, 2001

MAVRIS, M.; SANSONETTI, P. Epithelial cell responses. *Best Pratice & Research Clin. Gastroent.*, v.18, n.2, p.373-386, 2004.

MÉNARD, R.; SANSONETTI, P.J.; PARSOT, C. Nonpolar mutagenesis of the *ipa* genes defines IpaB, IpaC, and IpaD as effectors of *Shigella flexneri* entry into epithelial cells. *J. Bacteriol.,* v.175, p.5899-6, 1993.

MÉNARD, R.; DEHIO, C.; SANSONETTI,P.J. Bacterial entry into epithelial cells: the paradigm of *Shigella*. *Trends in Microbiol.,* v.4, p.220-226, 1996.

MILLING, S.W.F.; COUSINS, L.; MaCPHERSON, G. How do DCs interact with intestinal antigens? *TRENDS in Immun.*, v.26, n.7, p.349-352, 2005.

MOLL, H. Dendritic cells and host resistance to infection. *Cell Microbiol*, v.5, p.493-500, 2003.

MONTELEONE, G.; BIANCONE, L.; MARASCO R.; MORRONE, G.; MARASCO, O.; LUZA, F.; PALLONE, F.; Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn's disease but not ulcerative colites. *Gastroenterology*, v.112, p.1169-1178, 1997.

NETEA, M.G.; VAN DER GRAAF, C.; VAN DER MEER, J. W.; KULLBERG, B. J. Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system. *J Leukoc Biol,* v.75, p.749-755, 2004.

NIEDERGANG, F.; DIDIERLAURENT, A.; KRAEHENBUHL, J.P.; SIRARD, J.C.Dendritic cells: the host Achille's heel for mucosal pathogens? *TRENDS in Microbiol.*, v.12, p.79-88, 2004.

NIESS, J.H.; REINECKER, H.C. Lamina propria dendritic cells in the physiology and pathology of the gastrointestinal tract. *Curr Opin Gastroenterol.*, v.21, p.687-91, 2005.

NIESS, J. H.; REINECKER, H. C. Dendritic cells in the recognition of intestinal microbiota. *Cel. Microbiol.*, v.8, p.558-564, 2006.

NUSRAT, A.; GIRY, M.; TURNER, J. R.; COLGAN, S. P.; PARKOS, C.; CARNES, A. Rho protein regulates tight junctions and perijunctional actin organization in polarized epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.92, p.10629–10633, 1995.

OGAWA, M.; SUZUKI, T.; TATSUNO, I.; ABE, H.; SASAKAWA, C. IcsB, secreted via the type III secretion system, is chaperoned by IpgA and required at the post-invasion stage of *Shigella* pathogenicity. *Mol. Microbiol.*, v.48, n.4, p.913-931, 2003.

OGAWA, M.; YOSHIMORI, T.; SUZUKI, T.; SAGARA, H.; MIZUSHIMA, N.; SASAKAWA, C. Escape of intracellular *Shigella* from autophagy. *Science*, v.307, p.727-731, 2005.

OSWALD, E.; SUGAI, M.; LABIGNE, A.; WU, H. C.; FIORENTINI, C.; BOQUET, P.; O'BRIEN, A. D. Cytotoxic necrotizing factor type 2 produced by virulent Escherichia coli modifies the small GTP-binding proteins Rho involved in assembly of actin stress fibers. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.91, p.3814–3818,1994.

PALUCKA, K; BANCHEREAU, J. How dendritic cells and microbes interact to elicit or subvert protective immune responses. *Curr Opin Immunol.*, v.14, p.420-31, 2002.

PARSOT, C. Shigella spp. and enteroinvasive Escherichia coli pathogenicity factors. *FEMS Microbiol.Lett.,* v.252, p.11-8, 2005.

PÉDRON, T; THIBAULT, C.; SANSONETTI, P.J. The invasive phenotype of *Shigella flexneri* directs a distinct gene expression pattern in the human intestinal epithelial cell line Caco-2. *J. Biol. Chem.,* v.278, p.33876-33886, 2003.

PERDOMO, O.J.; CAVAILLON, J.M.; HUERRE, M.; OHAYON, H.; GOUNON, P.; SANSONETTI, P. J. Acute inflammtion causes epithelial invasion and mucosal destruction in experimental shigellosis. *J. Exp. Med.,* v.180, p.1307-1319, 1994.

PHALIPON, A.; SANSONETTI, P. Shigella's ways of manipulating the host intestinal innate and adaptive immune system: a tool box for survivel? *Immunol. and Cell Biol.*, v.85, p.119-129, 2007.

PHILPOTT, D. J.; YAMAOKA, S.; ISRAËL, A.; SANSONETTI, P. J. Invasive Shigella flexneri activates NF-κB through a lipopolyssacharide-dependent innate intracellular response and leads to IL-18 expression in epithelial cells. *J. immunol.,* v.165, p.903-914, 2000.

PICKING, W.L.; NISHIOKA, H.; HEARN, P.D.; BAXTER, M.A.; HARRINGTON, A.T.; BLOCKER, A.; PICKING, W.D. IpaD of *Shigella flexneri* is independently required for regulation of ipa protein secretion and efficient insertion of IpaB and IpaC into host membranes. *Infect. Immun.,* v.3, p.1432-40, 2005.

PINTO, M.; ROBINE-LEON, S.; APPAY, M-D. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol Cell*, v.47, p.323-330, 1983.

PRENDERGAST, G.C. Immune escape as a fundamental trait of cancer: focus on IDO. *Oncogene*, p.1-12, 2008.

RAKOFF-NAHOUM, S.; PAGLINO, J.; ESLAMI-VARZANEH, F.; EDBERG, S.; MEDZHITOV, R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*, v.118, p.229-241, 2004.

RANGER, A.M.; DAS, M.P.; KUCHROO, V.K.; GLIMCHER, L.H. B7-2 (CD86) is essential for the development of il-4 producing T cells. *Int. Immunol.,* v.8, p.1549-1560, 1996.

RAQIB, R.; MIA, S. M.; QADRI, F.; ALAM, T. I.; ALAM, N. H.; CHOWDHURY, A. K.; MATHAN, M. M.; ANDERSSON, J. Innate immune responses in children and adults with Shigellosis. *Infect Immun*, v.68, p. 3620-3629, 2000.

RATHMAN, M.; JOUIRHI, N.; ALLAOUI, A.; SANSONETTI, P.J.; PARSOT, C.; TRAN VAN NHIEU, G. The development of a FACS-based strategy for the isolation of *Shigella flexneri* mutants those are deficient in intercellular spread. *Mol. Microbiol.,* v.35, p.974-90, 2000.

RESCIGNO, M.; URBANO, M.; VALZASINA, B.; FRANCOLINI, M.; ROTTA, G.; BONASIO, R.; GRANUCCI, F.; KRAEHENBUHL, J-P.; CASTAGNOLI, P.R. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bactéria. *Nat. Immun.*, v.2, n.4, p.361-367, 2001.

RESTA-LENERT, S.; BARRETT, K. E. Enteroinvasive bacteria alter barrier and transport properties of human intestinal epithelium: role of iNOS and COX-2. *Gastroenterology*, v.122, p.1070-1087, 2002.

SABATTÉ, J.; MAGGINI ,J.; NAHMOD, K.; AMARAL, M. M.; MARTÍNEZ, D.; SALAMONE, G.; CEBALLOS, A.; GIORDANO, M.; VERMEULEN, M.; GEFFNER, J. Interplay of pathogens, cytokines and other stress signals in the regulation of dendritic cell function. *Cytokine Growth Factor*, v.18, p.5-17, 2007.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.*, v.22, p.531-, 2004

SAKAGUCHI, T.; KÖHLER, H.; GU, X.; MCCORMICK, B. A.; REINECKER, H-C. *Shigella flexneri* regulates tight junction-associated proteins in human intestinal epithelial cells *Cell Microbiol*, v.4, p.367–381, 2002.

SAMBUY, Y.; DE ANGELIS, I.; RANALDI, G.; SCARINO, M. L.; STAMMATI, A.; ZUCCO, F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol*, v.21, p.1-26, 2005.

SANSONETTI, P. J.; KOPECKO, D.; FORMAL, B. Involvement of a plasmid in the invasive ability of *Shigella flexneri. Infect. Immun.,* v.35, p.852-860, 1982a.

SANSONETTI, P.J. Rupture, invasion and inflammatory destruction of the intestinal barrier by Shigella, making sense of prokaryote-eukaryote cross-talks. *FEMS Microbiol. Rev.,* v.25, p.3-14, 2001.

SANSONETTI, P.J.; ARONDEL, J.; CANTEY, J.R.; PREVOST, M.C.; HUERRE, M. Infection of rabbit Peyer's patches by *Shigella flexneri*: effect of adhesive or invasive bacterial on follicle-associated epithelium. *Infect. Immun.,* v.64, p.2752-2764, 1996.

SANSONETTI, P.J.; D'HAUTEVILLE, H.; FORMAL, S.B.; TOUCAS, M. Plasmid – mediated invasiness of "*Shigella*-like" *Escherichia coli. Annu. Microbiol. (Inst. Pasteur),* v.132, p.351-355, 1982b.

SCALETSKY, I. C.; FABBRICOTTI, S.H.; CARVALHO, R.L.; NUNES, C.R.; MARANHAO, H.S.; MORAIS, M.B.; FAGUNDES-NETO, U. Diffuselly Adherent *Escherichia coli* as a Cause of Acute Diarrhea in Young Children in Northeast Brazil: a Case-Control Study. *J. Clin. Microbiol.,* v.40, p.645-648, 2002.

SERENY, B. Biochemical reactions and virulence of *E. coli* O124, K27 (B17). *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.,* v.10, p.11-18, 1963.

SHER, A.; COFFMAN, R. L. Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. *An. Rev. Immunol.*, v.10, p.385-398, 1992.

SIMONOVIC, I.; ROSENBERG, J.; KOUTSOURIS, A.; HECHT, G. Enteropathogenic Escherichia coli dephosphorylates and dissociates occludin from intestinal epithelial tight junctions. *Cell Microbiol*, v.2, p.305–315, 2000.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo


SONODA, N.; FURUSE, M.; SASAKI, H.; YONEMURA, S.; KATAHIRA, J.; HORIGUCHI, Y.; TSUKITA, S. Clostridium perfringensEnterotoxin Fragment Removes Specific Claudins from Tight Junction Strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier. *J Cell Biol,* v.147, p.195–204, 1999.

SOUZA, E.C.; MARTINEZ, M.B.; TADDEI, C.R.; MUKAI, L.; GILIO, A.E.; RACZ, M.L.; SILVA, L.; EJZENBERG, B.; OKAY, Y. Perfi etiológico das diarréias agudas de crianças atendidas em São Paulo. *J. Pediatr.,* v.78, p.31-38, 2002.

STEINMAN, R.M.; HAWIGER, D.; NUSSENZWEIG, M.C. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol.,* v.21, p.685-711, 2003.

TAMANO, K.; AIZAWA, S.; SASAKAWA, C. Purification and detection of Shigella type III secretion needle complex. *Methods Enzymol.*, v.358, p.385-92, 2002.

TRABULSI, L.R.; ZULIANI, M.E.; SERRANO, J.A. On two new enterobacteria pathogenic to the guinea pig eye (cultures 185T-64 and 193T-64). *Rev. Inst. Med. Trop.,* v.7, p.241-246, 1965.

TRAN VAN NHIEU, G.; BEN-ZE'EV, A.; SANSONETTI, P.J. Modulation of bacterial entry into epithelial cells by association between vinculin and the *Shigella* IpaA invasin. *EMBO J.*, v.16, p.2717-29, 1997.

TURBYFILL, K.R.; MERTZ, J.A.; MALLETT, C.P.; OAKS, E.V. Identification of epitope and surface-exposed domains of *Shigella flexneri* invasion plasmid antigen D (IpaD). *Infect. Immun.,*v.66, p.1999-2006, 1998.

TURBYFILL, K.R.; MERTZ, J.A.; MALLETT, C.P.; OAKS, E.V. Identification of epitope and surface-exposed domains of *Shigella flexneri* invasion plasmid antigen D (IpaD). *Infect. Immun.*, v.66, p.1999-2006, 1998.

UHLIG, H.H.; POWRIE, F. The role of mucosal lymphocytes in regulating intestinal inflammation. *Springer Semin. Immun.*, v.27, p.167-180, 2005.

WICK, J. M. The role of dendritic cells in the immune response to Salmonella. *Immunol. Letters.,* v.85, p.99-102, 2003.

WITTHÖFT, T.; ECKMANN, L.; KIM, J. M.; KAGNOFF, M. F. Enteroinvasive bacteria directly activate expression of iNOS and NO production in human colon epithelial cells. *Am J Physiol, v.* 275, p.564-571, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. State of the art of new vaccines: research and development: Initiative for Vaccine. Géneva, 2003. Disponível em: http://www.who.int/vaccine_research/documents/ en/stateofart_excler.pdf. Acesso em: 4 abril 2004.

ZYCHLINSKI, A.; PREVOST, M. C.; SANSONETTI, P. J. *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature*, v.358, p.167-168, 1992.

ZYCHLINSKI, A.; THIRUMALAI, K.; ARONDEL, J.; CANTEY, J. R.; ALIPRANTIS, A. O., M.; SANSONETTI, P. J. *In vivo* apoptosis in *Shigella flexneri* infections. *Infec. Immun.*, v.64, p.5357-5365, 1996.

ZYCHLINSKY, A.; FITTING, C.; CAVAILLON, J.M.; SANSONETTI, P.J. Interleukin 1 is released by murine macrophages during apoptosis induced by Shigella flexneri. *J. Clin. Invest.,* v.94, p.1328-1332, 1994b.

ZYCHLINSKY, A.; KENNY, B.; MENARD, R.; PREVOST. M.C.; HOLLAND, I.B.; SANSONETTI, P.J. IpaB mediates macrophage apoptosis induced by Shigella flexneri. *Mol. Microbiol.,* v.11, p.619-627, 1994a.

# Anexos

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**
Comissão de Ética em Experimentação Animal - CEEA

CEEA nº 76 /2006

# CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto **"Efeitos da ativação das células dendríticas intestinais na resposta inflamatória induzida por "Escherichia coli" enteroinvasora"** (Protocolo CEEA nº120), sob a responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Ana Carolina Ramos Moreno** e do orientador(a) Prof(a).Dr(a). **Marina Baquerizo Martinez**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) desta Faculdade, em 13/11/2006.

São Paulo, 13 de novembro de 2006.

Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes
Presidente da CEEA

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091-3677 / Fax: (11) 3813-5093 - e-mail: rtrigo@usp.br