

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Farmácia

Área de Análises Clínicas

Processo autofágico no reconhecimento de *Escherichia coli*
enteroinvasora: um possível mecanismo da degradação
bacteriana por células epiteliais

Hadassa Cristhina de Azevedo Soares dos Santos

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientador: Profa. Dra. Marina Baquerizo Martinez

São Paulo

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Farmácia

Área de Análises Clínicas

Processo autofágico no reconhecimento de *Escherichia coli*
enteroinvasora: um possível mecanismo da degradação
bacteriana por células epiteliais

Hadassa Cristhina de Azevedo Soares dos Santos

Versão Original

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientador: Profa. Dra. Marina Baquerizo Martinez

São Paulo

2016

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

S237p Santos, Hadassa Cristhina de Azevedo Soares dos
Processo autofágico no reconhecimento de *Escherichia coli*
enteroinvasora: um possível mecanismo da degradação bacteriana
por células epiteliais / Hadassa Cristhina de Azevedo Soares dos
Santos. -- São Paulo, 2016.
130p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Martinez, Marina Baquerizo

1. Microbiologia médica 2. *Escherichia coli* 3. Controle de
infecções I. T. II. Martinez, Marina Baquerizo, orientador.

616.01 CDD

Hadassa Cristhina de Azevedo Soares dos Santos

Processo autofágico no reconhecimento de *Escherichia coli*
enteroinvasora: um possível mecanismo da degradação bacteriana
por células epiteliais

Comissão Julgadora

da

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Prof. Dr. Marina Baquerizo Martinez

orientador/presidente

1o. examinador

2o. examinador

3o. examinador

4o. Examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2016.

Am I Wrong

Níco & Vínz

*Am I wrong for thinking out of the box
From where I stay?
Am I wrong for saying that I choose another way?
I ain't trying to do what everybody else's doing
Just 'cause everybody's doing what they all do
If one thing I know, I'll fall but I'll grow
I'm walking down this road of mine
This road that I call home*

*So am I wrong?
For thinking that we could be something for real?
Now am I wrong?
For trying to reach the things that I can't see?
But that's just how I feel
That's just how I feel
That's just how I feel
Trying to reach the things that I can't see*

*Am I tripping for having a vision?
My prediction: I'm a be on the top of the world
Walk your walk and don't look back
Always do what you decide
Don't let them control your life, that's just how I feel
Fight for yours and don't let go
Don't let them compare you, no
Don't worry, you're not alone, that's just how we feel*

*Am I wrong? (Am I wrong?)
For thinking that we could be something for real?
Now am I wrong?
For trying to reach the things that I can't see?
But that's just how I feel
That's just how I feel
That's just how I feel
Trying to reach the things that I can't see*

...

*Eu dedico este trabalho aos meus pais
Lucrécia e Ivanildo
e a Profa. Marina
por serem os realizadores dos meus
sonhos, pelo apoio e amor incondicional.*

Agradecimentos

Ao meu Deus

*Que tem cuidado de mim, sempre me dando forças e ouvindo minhas orações.
Toda honra a Ti!!*

Aos meus pais

*Honra teu pai e tua mãe - este é o primeiro mandamento com promessa - para
que tudo te corra bem e tenhas longa vida sobre a Terra. Efésios 6:1-14*

*De todos os amores que podemos receber durante a vida, o amor dos pais é, sem
dúvida, o mais especial. Não existe outro que consiga ser incondicional e
demonstrar ao mesmo tempo um interesse tão grande e genuíno na nossa
felicidade. A vocês meu muito obrigado!!! **Amo vocês!!!***

Aos meus irmãos

*Eu poderia dizer muitas coisas, mas acho que palavras não são suficientes
para expressar o tamanho da minha admiração por vocês! H.C.*

*Acredito bastante no sucesso de cada um, sei que vocês vão longe... E eu estarei
aqui de pé para aplaudí-los!*

*Cada um já formou sua família e desejo o melhor para todos vocês, Filípi e
cunha Cíntia, juntamente com o meu sobrinho lindo Vinícius e Estevão e
cunha Jennifer, obrigada por tudo! **Simplesmente amo vocês!!!***

A minha linda orientadora

Run the world (Girls)

Beyoncé

Who run the world?

Girls!

Who run the world?

Girls!

Some of them men think they freak this

Like we do

But no they don't

Make your check come at they neck

Disrespect us?

No they won't

...

I'm reppin' for the girls

Who taken' over the world

Let me raise a glass

For the college grads

...

This goes out to all the women

Getting it in

Get on your grind

To all the men that respect

What I do

Please accept my shine

How we're smart enough to make these millions

Strong enough to bear the children

Then get back to business

...

My persuasion

Can build a nation

...

Who run the world?

Girls!

Who run the world?

Girls!

Alguém pode estar pensando: Por que ela colocou a música da Beyoncé em homenagem a sua orientadora? Calma, eu posso explicar! Das partes selecionadas para colocar neste papel, resume (um pouco) o que de FATO representa a Marina, ela manda, rs. Ela sabe cuidar das “crianças” e dos negócios ao mesmo tempo, mulher de garra! Explicado? Então, vamos lá:

Marina Baquerizo Martínez, além de ter depositado sua confiança em mim, me ensinou a como ser uma mulher realizada e feliz. Professora, através da sua vida, tanto profissional como pessoal, pode me incentivar a seguir em frente, não importando os obstáculos que possamos a vir enfrentar. E cá entre nós, a senhora não poderia ter finalizado sua vida profissional, com uma aluna tão maravilhosa como eu, rsrs, e modesta, rs. Obrigada pelas várias chances dadas. Obrigada pelo consolo nos momentos difíceis e muitíssimo obrigada pelos puxões de orelha. Só assim, me tornei uma pessoa melhor! Serei eternamente grata por sua vida! VIVA o melhor que esse mundo pode te proporcionar!! T’E AMO!!!

A **Profa. Dra. Agda Andrade**, por me ensinar o amor pela microbiologia e ainda mais pela EIEC. Obrigada por me incentivar a possuir a melhor cultura do mundo... A cultura bacteriana, rs.

A **Profa. Dra. Carla Taddei de Castro Neves**, pelos anos de incentivo e amizade, com você aprendi que o importante não é cuidar só do coração, e sim, cuidar do intestino. Afinal se ele for bem, tudo nosso irá bem. Viva a nossa microbiota intestinal!!! Rs. É só olhar nos seus olhos e ver o amor que tens pelo que faz! Amor que transborda e incentiva todos a sua volta. Obrigada por tudo! Ainda vou ouvir falar muito do seu nome. Seu nome não é para ficar apenas em 4 paredes e sim nos 4 cantos da Terra.

A **Prof. Dra. Ana Carolina Ramos Moreno**, não sei o que dizer, pois não há palavras o suficiente para expressar minha eterna gratidão! Só peço a Deus, que todo o esforço, tempo prestado, conselhos e broncas a mim dados, sejam triplicados em bênçãos e grandes realizações em sua vida! Em qualquer lugar que eu esteja, eu sempre estarei torcendo por você!! Obrigada por me auxiliar e me mostrar o amor pela ciência!! Para ti, minha eterna gratidão.

Ao Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida, que sempre disponibilizou seu laboratório. Na verdade eu me sentia meia aluna dele, uma 'microbiologista', rs, porque o que eu não tinha no meu laboratório, eu encontrava no dele (principalmente, anticorpo, rs). Obrigada por sua paciência e incentivo! Quero também agradecer aos seus alunos, que de uma forma ou de outra puderam me ajudar. Em especial a Suelen Santos, José Roberto, Lavinia Romera, Fábio Seiti, Luana Rossato, obrigada pelo tempo de prosa (boa e ruim, rs), pelas festinhas, e principalmente pelo Western blot e LDH!! Quero agradecer a Soninha pela paciência e conversas de grande valia!! =P

Ao Prof. Dr. Waldir Pereira Elias Júnior, minha eterna gratidão! Como é bom poder dizer que pude conhecê-lo e mesmo que por pouco tempo, trabalhar contigo. Lembro-me da primeira disciplina cursada na USP, onde o senhor era um dos responsáveis pela disciplina, e no qual pude ver que aquela mancha escura, significava uma banda, rs. Alguns não entenderão ao ler isso, mas foi através deste simples aprendizado que comecei a admirar este mestre. Saiba que te admiro e sou grata pelo carinho e disponibilidade a mim oferecido. Quero agradecer também aos seus ex-alunos Francielli Vasconcellos e Afonso de Abreu, pela ajuda dada no processo da mutação e pelas dúvidas esclarecidas. MUITÍSSIMO obrigada!

A Profa. Dra. Karen Spadari Ferreira, uma mulher admirável, amiga, excelente caráter e batalhadora, que além dessas e outras qualidades pôde me ajudar em todas as áreas da minha vida, dentro e fora da vida acadêmica. Obrigada por tudo! Minha vida em SP só foi mais fácil, pois eu sabia que podia contar com você. E quero agradecer também a sua aluna Grasi Jannuzzi que me proporcionou momentos incríveis e animados. Loras amo vocês!!

A Prof. Dra. Cecília Mari Abe, aos 46 minutos do segundo tempo, rs. Chegou no final do trabalho, mas com a importância necessária para o término deste. Culpa sua que me apaixonei ainda mais pela microscopia eletrônica e pela morfologia celular. Aquelas 3 horas em cada dia de análise, me mostrou a mulher maravilhosa que és. Obrigada pelas lindas fotos e por me ensinar muito em tão pouco tempo. Sucessos é o que te desejo!

A técnica mais linda e charmosa **Fabiana Teixeira**. O que seria de mim sem você? **NADA**. Todos os resultados deste trabalho, tiveram sua participação, afinal, eu não saía mais tarde do laboratório, pois as 6 horas da manhã, você colocava minhas lindas bac's para crescerem. Obrigada por eu poder compartilhar minha vida com você, pelas caronas até a Z.L, pelas compras de reagentes, pela organização do laboratório. Ninguém teria o sucesso que têm, se não fosse você em nossas vidas! Te amo minha chata que admiro e quero toda felicidade do MUNDO!!! Casa logo, porque eu quero "bem-casado" rs.

Ao meu amigo, **Prof. Dr. Lucas G. Ferreira**, mais uma vez quero te agradecer por **TUDO** que tens feito por mim. Obrigada pela sua sincera amizade e por poder compartilhar contigo todos os momentos da minha vida. Te amo cabeção! Sucessos a nós!!

Ao laboratório de genômica pediátrica do Prof. Dr. Carlos Antonio Moreira-Filho, juntamente com a Dra. Sílvia Bando, Fernanda Bertonha, Leandro Ferreira e Priscila Tamashita pelo apoio não somente nas análises de microarray, mas também pela ajuda na bancada. Aquela sala escurinha, não teria tanta graça e tanto aprendizado se não fossem por vocês. Obrigada de coração!!

Aos alunos e ex-alunos do laboratório de Microbiologia Clínica do Prof. Dr. Jorge Sampaio, quero agradecer o companheirismo e principalmente nessa fase final de mudanças, que puderam me aturar no laboratório e fora dele. Em especial a Bruna Seco, que me ensinou a ser uma pessoa melhor e me mostrou novos caminhos a percorrer. Sucessos e Felicidade é o mínimo que desejo a você Bru!! Também a Juliana Campos, por anos de convivência e experiências trocadas, te admiro cada dia mais. Sucessos Jú!!! Que nessa nova etapa da sua vida, você seja mais abençoada! A Leticia Carrasco por deixar eu participar do seu lindo trabalho e por mostrar-me que ainda existem pessoas com coração puro e maternal. Sucessos Lê!! Ao Darlan, Flávia e Mayne, meu muito obrigado por dividir comigo o aprendizado de cada dia e até as prosas ruins, rs. =)

Ao laboratório de Patologia Clínica da Profa. Dra. Sílvia Stuchi, em especial ao seu ex-aluno **Dr. Renato Massaro Ramos**, que participou da obtenção das células HeLa LC3-GFP e pelos vários W.B. realizados, até mesmo nos finais de semana. Um parceiro excelente

para ter do lado, tanto fora como dentro de um laboratório. Obrigada pelos jogos de vôlei e risadas garantidas! Sem você, esse trabalho não seria a imensidão que é. Sucessos na sua vida sempre!!!

Ao laboratório de Biologia de Sistemas Computacional do Prof. Dr. Helder Nakaya juntamente com seus alunos, Matheus Burger, Diógenes Lima, Thiago Hirata, Pedro Russo, Gustavo Ferreira, Lucas Cardozo, Léo Gama, Fred Ferreira, Jaqueline Wang, Fernando Marcon, Mindy Muñoz e os novos, rs, gostaria de agradecer a todos pelo carinho e parceria conquistada. Uns são mais antigos, da época que estavam no laboratório de Microbiologia. Tempo bom esse, viu? Era um cheiro de testosterona no ar, que alegrava os meus dias, rrsrrs. Mas a todos, de forma geral, quero agradecer por me acolherem tão bem, pelas festas de final de ano (neste ano quero participar também, rs), pelas batidas de coco no Rei das Batidas, rs... Ahh, por tudo! Sucessos meninos, e qualquer dúvida sobre informática, estou a disposição! ;) Helder, sucessos Japa! Conquistaste o mundo!!! =)

Ao laboratório de Bioquímica Clínica da Profa. Dra. Ana Campa juntamente com seus alunos e ex-alunos, em especial ao ex-alunos Janine Baptista, Renan Clara e as alunas Maysa Braga e Maryana Branquinho, pelas festas, jantares maravilhosos na casa da "Chefa" e risadas garantidas, obrigada por fazerem meus dias mais alegres!

Ao laboratório de toxicologia do Prof. Dr. Ernani Pinto juntamente com seus alunos, que sempre me deixaram a vontade nas festas da "firma". Em especial, a Simone Vieira que além de poder compartilhar comigo um apê e vários problemas e alegrias, me ensinou coisas que jamais pensei em aprender. Si, obrigada por tudo, e que bênçãos sejam multiplicadas na sua vida e da sua linda família!!

Aos amigos do Departamento de Análises Clínicas, em especial a Tarsila Camargo, minha amiga linda, que amo e admiro! Obrigada por tudo, por me ouvir e por ter em mim um ombro amigo. Sucessos e muito amor é o que te desejo hoje e sempre!! A Renatinha Albuquerque, que além de me ajudar muuuuito nos experimentos e análises com FACS, sempre pude contar fora da área de trabalho. Obrigada pelos momentos ímpares e animados ao seu lado! Sucessos e um lindo novo amor na sua vida, que te faça mais feliz!! =) A

Patrícia Mendonça, por estar junto nas aulas de danças, momentos que me ajudavam a esquecer aquele experimento que havia dado errado, rs ... época boa, né?! Sucessos Paty e muito obrigada!

*As meninas da secretaria Edna Batista, Marilisa Fernandes e Samantha Carvalho pela ajuda nas questões burocráticas a este trabalho. Também quero agradecer as ex-secretárias lindas e charmosas Dora Lima e **Sueli Providelo** pelo carinho e amizade até mesmo após a aposentadoria de vocês. Em especial a Susu, seu marido Vavá e seu filho Guilherme, família linda que me acolheram e amenizaram a dor da saudade da minha família, na reta final do meu trabalho. Obrigada por abrir a porta da casa de vocês e deixar eu me sentir em casa! Amo vocês e serei eternamente grata por tudo que fizeram por mim!!! Que Deus abençoe vocês e prospere-os em todas as áreas de vossas vidas!! =)*

As meninas da limpeza, Claudinha, Rose, Dona Márcia e Francisca. Se não fossem vocês o ambiente de trabalho seria uma sujeira, rs. Obrigada pelo carinho e os "bons dias" de cada dia. Ahhh! E pelo cafezinho também!!! Santa ajuda! Rs.

Em geral, a todos os 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 FAPESP, pelo apoio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

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

Muitíssimo obrigada a todos vocês!!

"Foi péssimo o gosto do remédio, mas o paciente precisava disso. Algumas vezes a vida pode te atingir na cabeça com um tijolo. Não perca a fé. Me convenci que a única coisa que me fez seguir em frente é que eu amava o que fazia. Você tem que achar o que ama.

E isso é tão verdade para o trabalho, quanto é para as pessoas que ama. Seu trabalho vai preencher boa parte da sua vida. E é a única maneira de ser verdadeiramente satisfeito. É fazer o que acredita ser um ótimo trabalho, e a única maneira de fazer um ótimo trabalho, é amar o que você faz.

Se você não achou isso ainda, continue procurando, e não desista. Como todos os assuntos do coração, você saberá quando encontrar. (...)Não desista".

[Steve Jobs, Discurso na Universidade de Stanford]

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro concedido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

RESUMO

Santos, H.C.A.S. **Processo autofágico no reconhecimento de *Escherichia coli* enteroinvasora: um possível mecanismo da degradação bacteriana por células epiteliais**. Tese de doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

O reconhecimento de bactérias invasoras pelas células hospedeiras através do processo autofágico é um fator chave na determinação da infecção bacteriana. *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC) possui uma proteína, denominada IcsB, que em estudos em *Shigella*, é responsável pela inativação deste processo de degradação bacteriana. Uma vez que EIEC expressa menos IcsB do que *S. flexneri*, nos propusemos a investigar o processo autofágico na infecção por EIEC, utilizando as técnicas de mutação gênica por inserção, *western-blot*, microscopia de fluorescência e eletrônica de transmissão e *microarray*. Verificamos que a proteína IcsB é um fator de virulência importante na camuflagem de EIEC, pois quando pouco ou nada expresso, há um maior reconhecimento da bactéria pelas células hospedeiras, favorecendo sua menor disseminação. Isto corrobora não somente com a transcrição gênica, mas com a importância da sequência de nucleotídeos deste gene, uma vez que a cepa de *E. coli* SM124/13 complementada com o *icsB* de *Shigella* se mostrou mais eficiente na disseminação dentro da célula hospedeira. De forma interessante, IcsB apresentou um papel inédito na regulação da resposta inflamatória das células HeLa, onde a ausência de IcsB em EIEC promoveu uma intensa perturbação na homeostase da célula hospedeira, com aumento da secreção de IL-6, IL-8 e morte celular. Adicionalmente, ficou evidente que a célula eucariótica responde de maneira distinta frente a infecção por EIEC e *Shigella flexneri*. EIEC provavelmente ativou o processo autofágico em células humanas de forma não canônica. Nossa hipótese seria de que EIEC é reconhecida pelo processo autofágico, podendo ser este um importante fenômeno de reconhecimento bacteriano que colabore para a menor disseminação intracelular de EIEC, e assim tornar sua doença mais branda, quando comparada com a infecção por *Shigella*.

Palavras-chaves: *E. coli* enteroinvasora, proteína IcsB, disseminação, autofagia, controle da infecção.

ABSTRACT

Santos. H.C.A.S. **Autophagy in recognition of Enteroinvasive *Escherichia coli*: a possible bacterial degradation mechanism by epithelial cells.** Thesis (Doctoral degree). School of Pharmacy, São Paulo University, São Paulo, 2016.

The invasive bacteria recognition by host cells through autophagy is a key factor for determining bacterial infection. Enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) express a protein IcsB, which in *Shigella*, is known for inactivating the bacterial degradation process. Once EIEC showed less expression of *icsB* when compared to *S. flexneri*, we proposed to investigate the autophagy caused by EIEC infection, using techniques such as gene mutation by insertion, western blot, fluorescence microscopy, transmission electron microscopy and microarray. Our results showed that IcsB protein is an important virulence factor in EIEC because it causes a camouflage of the bacteria in the eukaryotic cell. When there is a low expression of the protein, the cell recognition of the invasive bacteria is high, decreasing the bacteria dissemination. This found confirms the importance of the gene transcription and the gene sequence, since the strain *E. coli* SM124/13, complemented with *icsB* from *Shigella*, showed higher dissemination efficiency inside of the host cell. Interestingly, IcsB showed a new role on regulating the inflammatory response in Hela cells. The absence of IcsB in EIEC generated an intense disturbance of the cell homeostasis, increased the secretion of IL-6 and IL-8, and caused cell death. Additionally, our results revealed that eukaryotic cell infected by EIEC or *Shigella flexneri* showed distinguish responses. In EIEC infection, the autophagy was activated in human cells, but not in a conventional mode. Our hypothesis is that EIEC is recognized by autophagy, being an important cell process for bacterial recognition. This process can cause a decrease in the intracellular spread of EIEC making the infection less severe when compared to the infection caused by *Shigella*.

Keywords: Enteroinvasive *E. coli*, IcsB protein, dissemination, autophagy, infection control.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Modelo de infecção induzida por <i>Shigella</i> .	28
Figura 2.	Mapa esquemático da ilha de patogenicidade de 31 kb do plasmídeo de <i>S. flexneri</i> .	29
Figura 3.	Movimento intracelular de <i>S. flexneri</i> pela polimerização de actina.	32
Figura 4.	Modelo proposto para a camuflagem contra o reconhecimento autofágico durante a infecção de <i>Shigella</i> .	32
Figura 5.	O processo de macro autofagia.	34
Figura 6.	Evasão bacteriana ou subversão de vias autofágicas.	38
Figura 7.	Região completa de <i>icsB</i> de FBC124/13	47
Figura 8.	Rearranjo no genoma causado por recombinação homóloga.	53
Figura 9.	Esquema do procedimento de amplificação do cRNA.	67
Figura 10.	Construção de bactéria doadora contendo pJP5603 + <i>icsB</i> .	69
Figura 11.	Através da técnica de PCR, utilizando os iniciadores M13-F e MutB-R.	71
Figura 12.	Transcrição gênica de <i>icsB</i> e <i>ipaA</i> .	72
Figura 13.	Curva de crescimento.	73
Figura 14.	Invasão bacteriana em células HeLa.	75
Figura 15.	Concentração bacteriana intracelular em células HeLa.	76

Figura 16.	Análise de morte celular por dosagem de LDH.	77
Figura 17.	Análise de escape bacteriano nos períodos de disseminação em células HeLa.	77
Figura 18.	Análise de morte celular por FACS.	78
Figura 19.	Produção de IL-6 e IL-8 em células HeLa desafiadas com diferentes cepas bacterianas.	79
Figura 20.	Reconhecimento da proteína LC3-II por <i>Western blot</i> .	80
Figura 21.	Células HeLa com LC3 fusionado a GFP.	81
Figura 22.	Microscopia eletrônica de transmissão após infecção bacteriana em células HeLa.	82
Figura 23.	Redes de interação transcricional de genes de Caco-2 após disseminação de EIEC e M90T.	84-93
Figura 24.	Análise de interação transcricional gênica por <i>microarray</i> , com foco nos genes autofágicos (<i>atg</i>).	94
Figura 25.	Modelo representativo de múltiplas vias de degradação bacteriana.	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Lista para distinguir entre Xenofagia, Fagocitose associada a LC3 (LAP) e Fagocitose.	40
Tabela 2.	Características e fontes de cepas e vetores plasmidiais usados neste estudo.	48
Tabela 3.	Cepa mutante SM124/13 complementada com diferentes plasmídeos com o gene <i>icsB</i> [Sequência gênica de EIEC O124/13 (SANTOS, 2012) e de <i>S. flexneri</i> M90T (GenBank N° nc_002698.1)].	56
Tabela 4.	Iniciadores sintetizados a partir da cepa de <i>Shigella flexneri</i> depositada no GenBank (N° nc_002698).	58

SUMÁRIO

I	INTRODUÇÃO	22
1	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasora	23
2	Epidemiologia	24
3	Mecanismos de Patogenicidade	26
4	Autofagia	33
5	Macro Autofagia	34
6	Autofagia x bactérias intracelulares	36
7	Autofagia e EIEC	40
II	OBJETIVOS	42
III	MATERIAL E MÉTODOS	44
1	Microrganismos utilizados	46
2	Preparação do inóculo bacteriano	46
3	Cultura de células humanas HeLa e Caco-2	46
4	Mutação do gene <i>icsB</i>	47
4.1	Desenho dos iniciadores	47
4.2	Obtenção do inserto	47
4.3	Ligação do inserto ao vetor pGEM-T Easy	49
4.4	Transformação por eletroporação	49
4.5	Seleção do clone contendo o inserto <i>icsB</i> no vetor pGEM-T Easy	50
4.6	Extração do vetor pJP5603	51
4.7	Ligação do inserto ao vetor pJP5603	51
4.8	Transformação por eletroporação	51
4.9	Seleção do clone contendo o inserto <i>icsB</i> no vetor pJP5603	52
4.10	Indução da resistência a Ácido Nalidíxico	52
4.11	Conjugação das amostras DH5 α <i>pir</i> / <i>icsB</i> com as amostras de EIEC resistentes a Ácido Nalidíxico	53
5	Complementação do gene <i>icsB</i>	54
5.1	Ligação do inserto ao vetor pGEM-T Easy	54
5.2	Sub-clonagem do inserto no vetor pSPORT1	55
5.3	Transformação por eletroporação e seleção de clones	55
6	RT-PCR de <i>icsB</i> e <i>ipaA</i>	56

6.1	Extração de RNA	56
6.2	Quantificação de RNA	56
6.3	Síntese de fita DNA complementar (cDNA)	57
6.4	RT-PCT	57
7	Curva de crescimento	58
8	Ensaio de invasão (CFU)	59
9	Ensaio de disseminação/reinfecção (CFU)	60
10	Ensaio de citotoxicidade por LDH	60
11	Ensaio de apoptose por Citometria de fluxo	61
12	Dosagem de citocinas	61
13	Obtenção da proteína LC3 através da técnica Western Blot	62
13.1	Obtenção dos extratos proteicos	62
13.2	Separação das proteínas no gel de SDS-PAGE e transferência para Membrana	62
13.3	Incubação das membranas com anticorpos primários e secundários	63
14	Superexpressão por células humanas HeLa do gene LC3 fusionado a GFP clonado em lentivírus	63
15	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	65
16	Análise de expressão global de genes	65
16.1	RNA eucarioto	65
16.2	Análises do transcriptoma pelo método de microarranjos	65
17	Análise Estatística	67
IV	RESULTADOS	68
1	Mutação do gene <i>icsB</i> pela técnica de recombinação homóloga	69
2	Complementação do gene <i>icsB</i>	71
3	Confirmação da transcrição gênica de <i>icsB</i> e <i>ipaA</i> pelo método de RT-PCR	72
4	Curva de crescimento	73
5	Cinética de invasão bacteriana e viabilidade das células HeLa após a invasão	74
6	Cinética da concentração bacteriana intracelular e viabilidade das células HeLa após a disseminação/reinfecção	75
7	Análise da morte celular e produção de citocinas inflamatórias células HeLa após infecção bacteriana por citometria de fluxo	78

8	Avaliação da produção das proteínas LC3/Atg8 e SQSTM1/p62 por células HeLa infectadas e confirmação da expressão proteica LC3 através da microscopia de fluorescência	80
9	Análise de vacúolos por microscopia eletrônica de transmissão	81
10	Genes em redes de interação transcricional, diferencialmente expressos, em células Caco-2 infectadas ou não com EIES e <i>S. flexneri</i>	83
V	DISCUSSÃO	95
VI	CONCLUSÃO	108
VII	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110
VIII	ANEXOS	128

I. Introdução

1. *Escherichia coli* enteroinvasora

A espécie *Escherichia 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, M. M., 1987). As amostras de *E. coli* diarreio gênicas podem ser divididas em seis categorias: *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* que adere difusamente (DAEC) (NATARO; KAPER, 1998).

EIEC é um agente etiológico da disenteria bacilar, principalmente em países em desenvolvimento (MORENO, A. C. et al., 2010; PACHECO-GIL et al., 2006). A primeira descrição dessa bactéria foi feita por EWING e GRAVATTI em 1947, que isolaram amostras de *E. coli* a partir de fezes de soldados americanos com diarreia, durante a Segunda Guerra Mundial. Estudos posteriores realizados por SERENY (1963) demonstraram que essa amostra bacteriana provocava ceratoconjuntivite em cobaias e pertencia ao sorogrupo O124. No Brasil, TRABULSI e colaboradores (1965) isolaram das fezes de um paciente com enterite aguda a primeira amostra capaz de produzir ceratoconjuntivite em cobaia. Estudos posteriores revelaram que esta pertencia ao sorogrupo O136 (TRABULSI; FERNANDES; ZULIANI, 1967).

As amostras de EIEC se apresentam nos seguintes sorotipos: O28ac:H⁻, O29:H⁻, O112ac:H⁻, O121:H⁻, O124:H30, O124:H⁻, O135:H⁻, O136:H⁻, O143:H⁻, O144:H⁻, O152:H⁻, O164:H⁻, O167:H⁻ e O173:H⁻. Alguns deles foram descritos pela

primeira vez no Brasil, sendo O29:H⁻, O136:H⁻, O144:H⁻, O152:H⁻, O167:H⁻ (FERNANDES; TRABULSI, 1967; GROSS et al., 1983; TOLEDO, M. R.; REIS; TRABULSI, 1980; TOLEDO, M. R. F.; TRABULSI, 1990; TRABULSI et al., 1967; TRABULSI; ZULIANI; SERRANO, 1965).

Essas bactérias apresentam propriedades bioquímicas particulares e os primeiros trabalhos mostrando tais especificidades sobre EIEC foram apresentados por TRABULSI *et al.*, 1967, no Brasil, e por SAKAZAKI *et al.* 1967, no Japão. Ambos foram isolados a partir de casos diarreicos, tanto em crianças acima de 5 anos como em adultos, causando uma intensa inflamação (MORENO, A. C. et al., 2010; PACHECO-GIL et al., 2006). Todas as amostras foram positivas para o teste de Serény e apresentaram duas características em comuns: não descarboxilavam a lisina e eram imóveis, com exceção de uma amostra do sorogrupo O124 que era móvel, cujo antígeno flagelar era H30 (TRABULSI et al., 1967). Em 1980, SILVA e colaboradores, obtiveram três amostras não tipáveis, que posteriormente foram identificadas como O167 (GROSS et al., 1983).

2. Epidemiologia

A principal forma de transmissão de EIEC é pela via fecal-oral, de pessoa para pessoa, e é geralmente por contato direto. Porém, alguns estudos mostraram que a transmissão não obedece a um padrão de uniformidade. Marier e colaboradores, em 1973, descreveram surto de diarreia nos Estados Unidos, que atingiu 384 indivíduos, e o veículo de transmissão foi um queijo importado da França contaminado pelo sorogrupo O124. Em 2011, o *Food and Drug Administration* (FDA) relatou que não

sabe quais alimentos poderiam abrigar EIEC, porém surtos têm sido associados com hambúrguer de carne e leite não pasteurizado, mas qualquer alimento contaminado com fezes humanas de um indivíduo doente, seja diretamente ou através de água contaminada, pode causar doença em outros indivíduos (FDA, 2011).

TOLEDO e TRABULSI (1990) pesquisaram a presença de EIEC em diferentes áreas da cidade de São Paulo, avaliando principalmente crianças de até cinco anos, moradores ou não de comunidades carentes. Foram encontradas 17 amostras em 107 crianças de comunidades carentes com diarreia (15,8%) e em 16 de 701 das crianças não moradoras de comunidades carentes (2,3%). Esses dados também mostram que as condições sanitárias e socioeconômicas podem favorecer o estabelecimento da doença (TOLEDO, M. R. F.; TRABULSI, 1990).

Estudos realizados fora da cidade de São Paulo mostraram baixa prevalência deste microrganismo (ALMEIDA et al., 1998). Em 130 casos estudados em Porto Velho (RO), se obteve apenas um isolado (ORLANDI et al., 2001). No entanto, em 2006, Orlandi e colaboradores encontraram 7 casos (1,4%) de EIEC em um total de 86 amostras de crianças, sendo sua frequência maior do que EHEC (3 casos - 0,6%). Já no estado do Rio de Janeiro, foi encontrado EIEC em uma única amostra de uma criança de 10 meses de idade, sendo isolado o sorotipo O143 (REGUAMANGIA et al., 2004). Em um estudo realizado em João Pessoa, Nordeste do Brasil, foram analisadas amostras de 290 crianças com diarreia e 290 crianças saudáveis, porém das que apresentavam diarreia, apenas cinco crianças foram constatadas com infecção por EIEC (MORENO, A. C. et al., 2010).

Outros países, em sua maioria países em desenvolvimento, estudos de prevalência também foram realizados. Enquanto no Equador, estudos entre 2004 e

2010 encontraram uma prevalência de 8.3 pessoas infectadas para cada 100 pessoas, em 16 comunidades estudadas (BHAVNANI et al., 2016), na China e outros países asiáticos encontrou-se uma prevalência de 7% e 4%, respectivamente (ECHEVERRIA et al., 1992; KAIN et al., 1991; TAMURA et al., 1996). Outros estudos mostraram que na Nigéria (OGUNSANYA; ROTIMI; ADENUGA, 1994) e Irã (KATOULI et al., 1990) a distribuição de EIEC encontrou-se abaixo das taxas encontradas em países desenvolvidos, sendo menor do que 0,1%; na Espanha, por exemplo, foi encontrada uma frequência de 0,2% (PRATS; LLOVET, 1995). Porém, recentemente no Irã, especificamente no hospital da cidade de Tehran, a prevalência de EIEC em um grupo de 140 pacientes hospitalizados com diarreia foi de 10% dos casos (MOHAMMADZADEH et al., 2015).

VIEIRA e colaboradores, 2007, relataram a alta prevalência de EIEC isolada numa região no norte do Equador, no entanto essa bactéria tem sido pouco reportada como agente etiológico nas pesquisas sobre a diarreia (VIEIRA et al., 2007). A justificativa é que as análises utilizadas nos laboratórios de rotina geralmente não conseguem distinguir entre os agentes EIEC e *Shigella*, devido à grande similaridade bioquímica, genética e fisiopatológica apresentada por essas bactérias (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; PARSOT, 2005; SILVA; TOLEDO; TRABULSI, 1980). Assim, a doença causada por EIEC é incomum, mas pode ser confundida com Shigelose e sua prevalência pode ser subestimada.

3. Mecanismos de Patogenicidade

EIEC são capazes de invadir e colonizar as células do cólon intestinal humano, e assim, desencadear uma infecção semelhante à provocada por amostras de *Shigella*

sp (PARSOT, 2005). Embora a infecção por EIEC seja clinicamente semelhante 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, H. L. et al., 1971).

Após a ingestão, ambas as bactérias passam pela barreira ácida estomacal, invadem a mucosa do cólon intestinal e iniciam uma resposta inflamatória (RATHMAN et al., 2000), causando assim a doença denominada disenteria bacilar. O quadro clínico é caracterizado por diarreia líquida e/ou sanguinolenta, podendo ter a presença de leucócitos e muco, frequentemente acompanhada de dor abdominal severa, vômitos, cefaleia, febre, calafrios e mal-estar generalizado (DUPONT, H. L. et al., 1971; FAUNDEZ et al., 1988; MORENO, A. C. et al., 2010).

A rota de entrada utilizada pela bactéria se dá através das células M (*microfold cells*) presentes na mucosa intestinal (MENARD; DEHIO; SANSONETTI, 1996). Penetrando por estas células, a bactéria encontra células fagocíticas na lâmina própria e a fagocitose por macrófagos e/ ou células dendríticas é o primeiro passo para a produção da resposta inflamatória contra as cepas bacterianas. Após o escape do fagossomo, a bactéria invade o enterócito pelo lado basolateral, e se dissemina para as células adjacentes (**Figura 1**). Os processos de invasão, multiplicação e disseminação se repetem, levando a destruição da monocamada do epitélio intestinal (PARSOT, 2005).

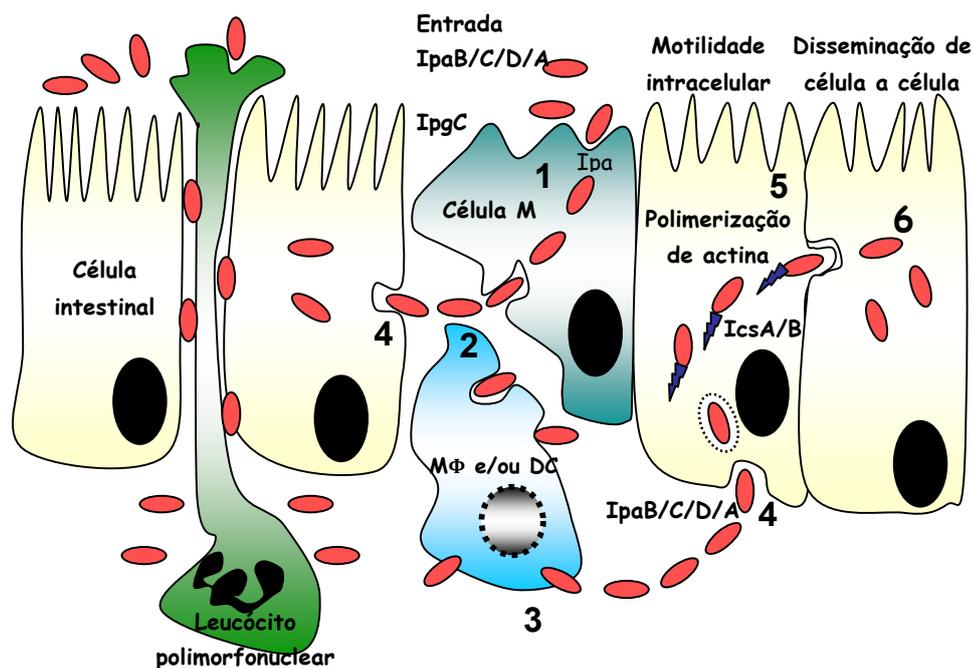


Figura 1 - Modelo de infecção induzida por *Shigella*. Translocação bacteriana através das células M (1). Fagocitose pelos macrófagos e/ou células dendríticas residentes (2), escape por indução a apoptose celular (3), invasão do enterócito através da região basolateral (4), disseminação (5) e indução a formação de protrusões e lise da dupla membrana com liberação da bactéria na célula vizinha (6) (modificado de PARSOT, 2005).

Um conjunto específico de fatores de virulência está envolvido na invasão e sobrevivência de EIEC e *Shigella* no interior das células intestinais. A secreção de um conjunto de proteínas efetoras através do Sistema de Secreção do Tipo III (SSTT) nas células hospedeiras é um passo crucial para iniciar o processo de internalização. Neste processo, genes cromossomais e plasmidiais estão envolvidos, onde estímulos ambientais como pressão osmótica, pH e temperatura são importantes para a ativação da expressão dos genes de virulência em EIEC (ALBUQUERQUE, 2006; KONKEL; TILLY, 2000). O gene cromossomal *hns* regula a expressão de genes de acordo com a temperatura, reprimindo a transcrição dos genes plasmidiais durante o crescimento a 30°C (BERLUTTI et al., 1998; PROSSEDA et al., 1998; ULISSI et al., 2014).

Alguns genes envolvidos no mecanismo de virulência de EIEC estão albergados em uma região de 31 Kb, formado por 32 genes, que se encontra em um Plasmídeo de Virulência (VP) denominado *pInV*, de aproximadamente 230 Kb. É composto pelos seguintes genes: *virB* (ativador transcricional dos operons: *ipa*, *mxi* e *spa*); *virF* (regulador de *virB* e *icsA*); lócus *mxi-spa* (sistema de secreção das Ipas); *ipa* (genes de invasão); *ipg* (genes de chaperonas) e *ics* (genes de disseminação) (FORMAL; HALE; SANSONETTI, 1983) (**Figura 2**). Estes genes codificam proteínas de síntese do sistema de secreção tipo III (Mxi e Spa), de invasão (Ipas), de disseminação (Ics) e chaperoninas (Ipg) (LE GALL et al., 2005).

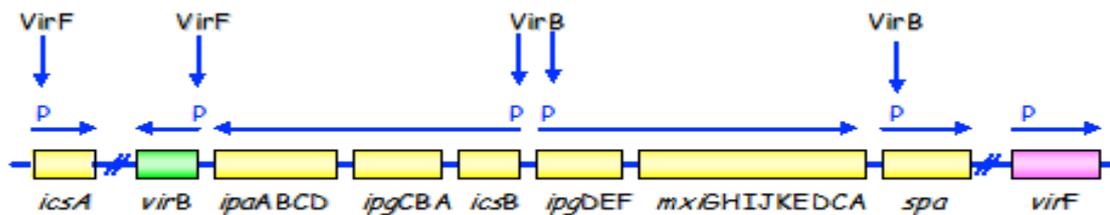


Figura 2 - Mapa esquemático da ilha de patogenicidade de 31 kb do plasmídeo de *S. flexneri*. A orientação da transcrição está indicada com as flechas azuis, a localização dos promotores (P) e as flechas verticais indicam a ponto de regulação das proteínas VirF e VirB (modificado de (PORTER; DORMAN, 1997).

A regulação da transcrição dos genes se dá através de uma proteína denominada VirF (codificado pelo gene *virF*), um membro da família das AraC de ativadores transcricionais, que regula positivamente a transcrição dos genes *virB* e *icsA* (HURT et al., 2010). VirB, por sua vez, regula a transcrição dos operons *ipa*, *mxi* e *spa* e também os genes *icsB* e *ipg* (A, B, C, D, E e F).

O aparato do SSTT é ativado no contato do microrganismo com a célula hospedeira (MENARD et al., 1996; WINCHELL et al., 2016), onde forma um poro na

membrana celular, possibilitando a passagem de proteínas efetoras para o interior do citoplasma da célula hospedeira. Dentre essas proteínas efetoras, as Ipas tem um papel importante na internalização nas células eucarióticas, conhecidas como IpaA (78 kDa), IpaB (62 kDa), IpaC (43 kDa) e IpaD (38 kDa). Uma das primeiras proteínas a ser ejetada para o citoplasma da célula hospedeira durante a invasão é a IpaA, que interage com a vinculina, e este complexo liga-se aos filamentos de actina levando a um rearranjo do citoesqueleto, sendo este processo conhecido como macropinocitose (COSSART; SANSONETTI, 2004).

O citoplasma das células intestinais é um nicho replicativo para EIEC. Neste microambiente, a bactéria é protegida das células do sistema imune presente no meio extracelular. Porém, o microrganismo tem que escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro e se preparar para disseminar para novos nichos de replicação. A sobrevivência intracelular e a disseminação para as células adjacentes dependem de mecanismos utilizados pela bactéria para se mover através da polimerização de actina. Esse mecanismo tem sido extensivamente estudado em patógenos intracelulares (GOUIN; WELCH; COSSART, 2005; STEVENS; GALYOV; STEVENS, 2006).

Um dos mediadores bacteriano na polimerização de actina é a proteína IcsA/VirG (*inter and intracellular spread*), localizada em um dos polos da bactéria (JAIN et al., 2006). A localização unipolar desta proteína é importante para que ocorra a formação da “cauda” de actina (ROBBINS et al., 2001), pois se sua localização for distribuída disformemente pela membrana bacteriana, a sua motilidade será desordenada (STEINHAEUER et al., 1999). No entanto, a localização unipolar e atividade de IcsA são controlados por uma serina protease SopA/IcsP e uma ATP-difosfohidrolase (apirase) PhoN2 (JAIN et al., 2006; SANTAPAOLA et al.,

2002; STEINHAEUER et al., 1999), sendo IcsP de extrema importância, pois a sua ausência leva a uma alteração na distribuição de IcsA, fazendo com que esta proteína não se instale na região polar da membrana do microrganismo, além de ser o responsável pela clivagem de IcsA para que esta se desloque para a membrana externa (STEINHAEUER et al., 1999).

IcsA promove o recrutamento e ativação da proteína *neuronal Wiskott-Aldrich syndrome protein* (N-WASP), que por sua vez recruta o complexo Arp2/3, que medeia a nucleação e polimerização dos filamentos de actina. O acúmulo de filamentos forma uma cauda estilo “cometa” na região polar da bactéria, proporcionando então uma motilidade de propulsão do microrganismo para frente (BERNARDINI et al., 1989; EGILE et al., 1999; RATHMAN et al., 2000) (**Figura 3**).

Porém, para que o mecanismo de formação da cauda de actina e, conseqüentemente, para que a propulsão da bactéria ocorra, necessita-se de outra proteína bacteriana denominada IcsB, que se liga a uma região da proteína IcsA (Figura 4), impedindo que ocorra um processo de degradação do patógeno, denominado autofagia (OGAWA et al., 2005).

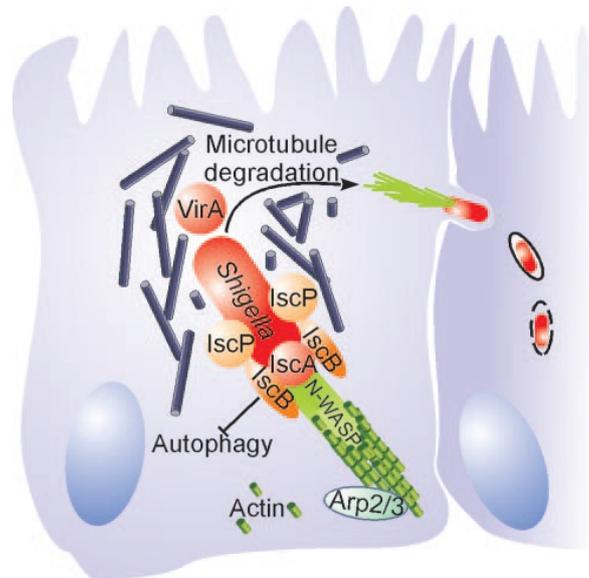


Figura 3 - Movimento intracelular de *S. flexneri* pela polimerização de actina. Devido a atividade da serina protease SopA/IcsP, o IcsA de *S. flexneri* se localiza em um dos polos da bactéria, onde interage com a proteína celular N-WASP. O complexo IcsA/N-WASP recruta e ativa o complexo Arp 2/3, mediando a nucleação da actina. O alongamento da cauda de actina propulsiona *S. flexneri* através do citoplasma. O movimento é facilitado por VirA, que abre o caminho degradando a rede de microtúbulos. Para evitar o sistema de defesa por autofagia, a proteína IcsB mascara IcsA, pois esta é uma proteína que é reconhecida pelo processo autofágico. Modificada de (SCHROEDER; HILBI, 2008).

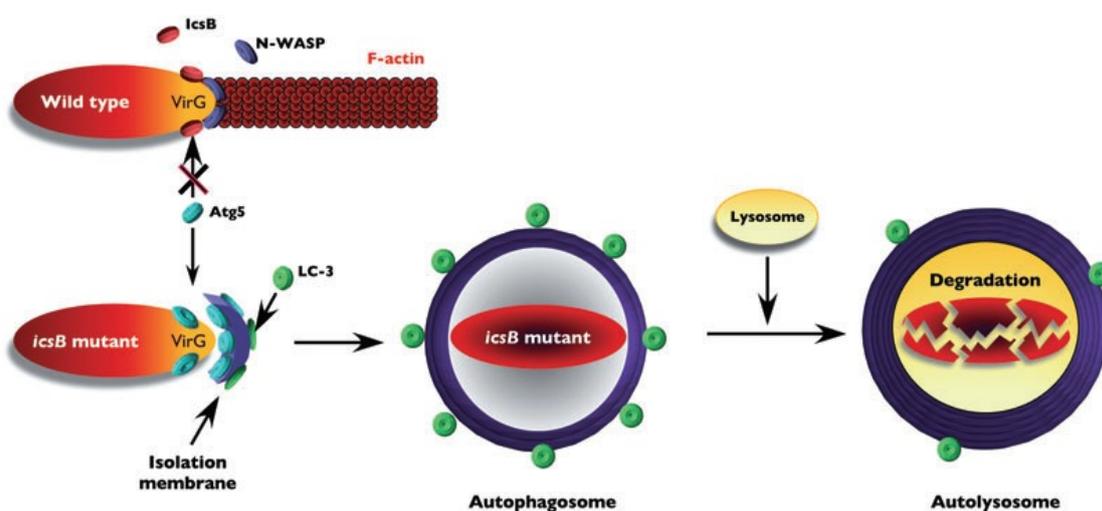


Figura 4: Modelo proposto para a camuflagem contra o reconhecimento autofágico durante a infecção de *Shigella*. Na presença de IcsB (selvagem), este liga-se a VirG e inibe competitivamente a ligação do Atg5 a VirG. Na ausência de IcsB (IcsB mutante), Atg5 pode se ligar ao VirG da bactéria, e no meio intracelular são reconhecidos pela autofagia e degradada por autolisossomos (OGAWA et al., 2005).

4. Autofagia

O processo de autofagia pode ser considerado uma forma de “autodigestão” celular, pois esse nome se refere a vias de degradação de componentes do citoplasma (proteínas e organelas desnecessárias ou danificadas) que são levadas ao lisossomo para sua degradação. A consequência desta autodigestão pode ser como uma adaptação ao estresse causado por privação de nutrientes (MIZUSHIMA et al., 2008), prevenção da morte celular (MAIURI et al., 2007) ou até uma rota alternativa para morte celular (LEFRANC; BROTTCHI; KISS, 2005). E já se sabe que autofagia também é um mecanismo de defesa imune inato contra vários patógenos intracelulares (CEMMA; BRUMELL, 2012; DERETIC, 2010).

A autofagia inclui três vias diferentes: Macro autofagia; Micro autofagia e autofagia mediada por chaperonas. A macro autofagia é um processo de sequestro de organelas, proteínas e outros, em uma vesícula chamada de fagóforo, que pode se originar a partir da membrana citoplasmática, do retículo endoplasmático ou da membrana mitocondrial externa. A fusão das extremidades do fagóforo leva a formação de uma estrutura fechada com dupla membrana, o autofagossomo. Essa vesícula se funde a lisossomos, formando o que é chamado de autolisossomo, sendo o seu conteúdo degradado (**Figura 5**) (MOSTOWY; COSSART, 2012; VAN LIMBERGEN et al., 2009). A micro autofagia, é uma via conservada desde leveduras a mamíferos, tal como a macro autofagia. Porém, na micro autofagia, os componentes citosólicos são incorporados diretamente em lisossomos através das invaginações da membrana lisossomal (VAN LIMBERGEN et al., 2009). A autofagia mediada por chaperonas (CMA), é somente observada em células de mamíferos.

Esta é mediada por chaperonas específicas, que permitem a translocação de determinadas proteínas para o lúmen lisossomal através da membrana, por interação com o receptor LAMP-2A, resultando no desenrolamento das proteínas e sua degradação (VALDOR; MACIAN, 2012).

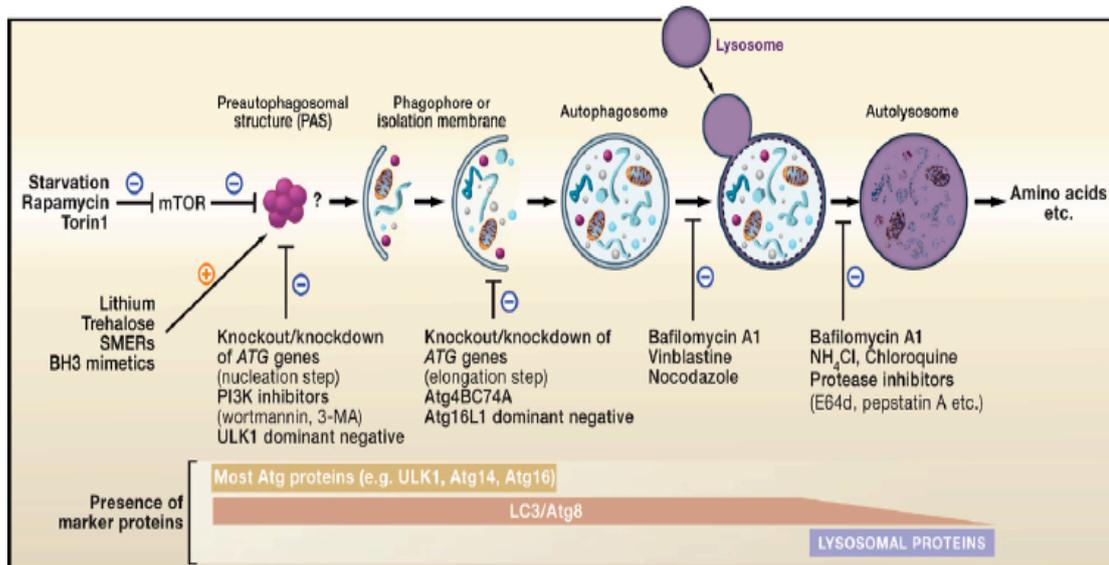


Figura 5. O processo de macroautofagia: Uma porção do citoplasma, incluindo organelas ou microrganismos, é inicialmente fechada por uma membrana, o fagóforo, e após totalmente isolado forma o autofagossomo. A membrana externa do autofagossomo se funde com os lisossomos e o material interno será degradado no autofagolisossomo. Uma lista parcial de tratamentos e reagentes que modulam a autofagia é indicada. Proteínas ATG que têm sido até agora identificadas nas membranas de isolamento incluem Ulk1 / 2, Atg5, Beclin-1, LC3, Atg12, Atg13, Atg14, ATG16L1, FIP200, e Atg101, podem ser analisadas. Modificado de (MIZUSHIMA; YOSHIMORI; LEVINE, 2010).

5. Macroautofagia

A via autofágica relacionada ao combate contra os patógenos intracelulares é a macroautofagia, no qual essa via é dividida em 3 distintas etapas, que podem ser avaliadas separadamente para qualquer tipo de estudo (**Figura 5**), o que possibilita

um maior entendimento deste processo, quando relacionado aos patógenos intracelulares.

A macro autofagia divide-se em três processos básicos distintos, tais como, indução, alongamento/oclusão e maturação/degradação, controladas principalmente pelas proteínas autofágicas denominadas Atg (Autofagia) (DWIVEDI; AHNN, 2009).

Indução

A indução engloba a formação de uma dupla membrana lipídica de isolamento, denominada fagóforo (VAN LIMBERGEN et al., 2009). Em mamíferos, as proteínas principais envolvidas nesta etapa inicial são a PI3K III (fosfatidilinositol 3-cinase de classe III), *Beclin 1* (Atg6), e Atg14L, além de outras. O complexo formado por essas proteínas leva à formação de fosfatidilinositol-3-fosfato, o que resulta no local de nucleação do fagóforo (PAS - “*Phagophore Assembly Site*”) (MURROW; DEBNATH, 2013). A partir do PAS, ocorre reconhecimento dos materiais a incluir no fagóforo e segue-se a fase de alongamento (RAVIKUMAR et al., 2010).

Alongamento/oclusão

A expansão da membrana autofágica é mediada pela interação inicial de Atg5 com Atg12, e em seguida interage com Atg10 e Atg7, conduzindo à formação do complexo Atg16L1. A Atg7 e Atg10, são também importantes para o recrutamento de outras proteínas para a membrana, tal como a LC3 (equivalente ao Atg8) (LIU, Z.; LENARDO, 2007). A proteína LC3 existe em duas formas, a LC3-I (citosol) e a sua derivada proteolítica LC3-II (membrana do fagóforo). A LC3 é inicialmente processada a pró-LC3 e alterada posteriormente pela Atg4 à sua forma madura,

LC3-I. Esta é processada por uma protease de cisteína deixando um resíduo de glicina exposto, para uma posterior conjugação com fosfatidiletanolamina e processar LC3-II (LIU, C. et al., 2010).

A LC3 é a única proteína Atg que se encontra em células eucariontes associada ao autofagossomo maduro, e a quantificação da LC3-II é normalmente utilizada para estimar a abundância de autofagossomos. Após a fusão do autofagossomo com o lisossomo, esta proteína é degradada (GLICK; BARTH; MACLEOD, 2010).

Maturação/degradação

Os autofagossomos formados no citoplasma celular, fundem-se com os lisossomos para formar um estado denominado anfissomo que, eventualmente, torna-se em uma organela plena de atividade lítica denominado autolisossomo. Os autolisossomos são delimitados por uma única membrana que contém produtos degradados de alvos capturados (DERETIC, 2010).

6. Autofagia x bactérias intracelulares

Enquanto algumas bactérias são mortas por autofagia, outras podem fugir ou até mesmo explorar a autofagia para causar a doença (**Figura 6**). Por exemplo, *S. flexneri* pode escapar da captura autofágica no citosol. Em células HeLa, *Staphylococcus aureus* utilizam a via autofágica para se replicar no autofagossomo

após a infecção e, em seguida, escapar do autofagossomo para o citosol e assim, induzir a apoptose das células hospedeiras (SCHNAITH et al., 2007).

Enquanto algumas bactérias bloqueiam a fusão do autofagossomo com o lisossomo, outras adiam este evento e evoluem para uma forma resistente ao meio ácido. *Coxiella burnetti* reside em um vacúolo grande e ácido, o vacúolo parasitóforo (PV), dentro do qual as bactérias podem se multiplicar. Esses vacúolos apresentam marcadores autofágicos, como LC3 e *Beclin-1*. Da mesma forma que a LC3, *Beclin-1* é uma proteína muito importante para o início do processo autofágico. Além disso, *C. burnetti* explora *Beclin-1* para inibir a autofagia e, portanto, estabelecer uma infecção persistente (VAZQUEZ; COLOMBO, 2010). *Legionella pneumophila* é capaz de retardar a maturação autofágica durante 4-6 horas, a fim de se diferenciar em uma forma ácido-tolerante (STURGILL-KOSZYCKI; SWANSON, 2000) e após o autofagossomo se fundir com o lisossomo, *L. pneumophila* é capaz de se replicar em um ambiente ácido.

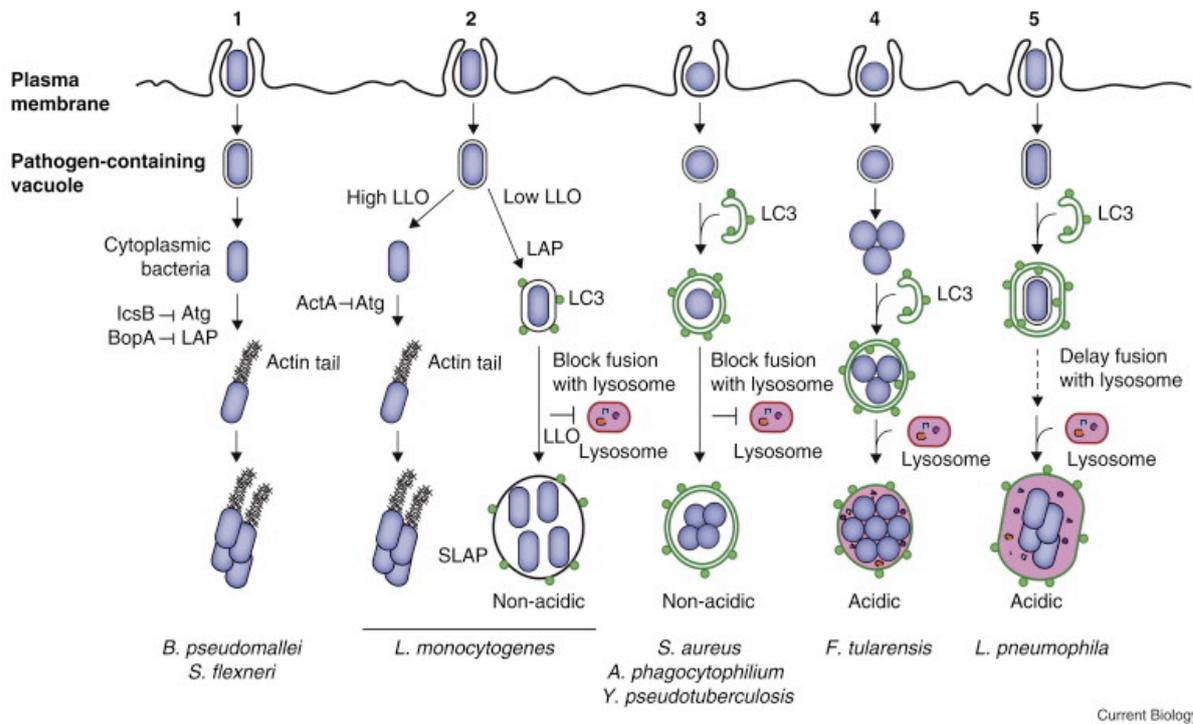


Figura 6: Evasão bacteriana ou subversão de vias autofágicas.

(1) *S. flexneri* e *B. pseudomallei* escapam do fagossomo, ganham motilidade intracelular e replicam no citosol. Efeitores bacterianos como IcsB e BopA evitam degradação das bactérias por autofagia. (2) *L. monocytogenes* pode escapar do fagossomo utilizando a toxina listeriolisina de formação de poros (LLO) e outros fatores de virulência. Quando os níveis de LLO são altos, *L. monocytogenes* escapa com sucesso e se multiplica no citoplasma. No entanto, quando os níveis de LLO são baixos, *L. monocytogenes* reside em um espaço chamado fagossomo contendo *Listeria* (SLAP). (3) *S. aureus*, *A. phagocytophilum* e *Y. pseudotuberculosis* criam um nicho de replicação em um autofagossomo bloqueando a sua fusão com os lisossomos. (4) *F. tularensis* inicialmente escapa do fagossomo e replica no citoplasma do hospedeiro. Em seguida, entra na via autofagia e continua a replicar no autofagossomo maduro. (5) *L. pneumophila* atrasa a fusão do autofagossomo com os lisossomos, até que se torne uma forma resistente ao ácido e pode replicar no autofagolisossomo ácida. Modificado de (CEMMA; BRUMELL, 2012).

Assim, o processo autofágico serve como uma faca de dois gumes: por um lado, a autofagia pode eliminar alguns patógenos e toxinas bacterianas, enquanto que, por outro lado, alguns patógenos podem iludir ou explorar a autofagia para a sobrevivência e replicação na célula hospedeira.

Recentemente, o campo deste estudo tornou-se mais complexo uma vez que os componentes da maquinaria autofágica desempenham suas funções no processo infeccioso, ou seja, atua no controle da infecção, e impedindo a morte celular do hospedeiro (MOSTOWY; COSSART, 2012). Estas descobertas recentes destacam o fato de que as nossas células têm múltiplos sistemas de impedir os invasores microbianos indesejáveis, e que os patógenos de sucesso evoluíram mecanismos para evitar esses sistemas para promover a infecção no seu hospedeiro (FUJITA; YOSHIMORI, 2011; SCHNAITH et al., 2007; STURGILL-KOSZYCKI; SWANSON, 2000; VAZQUEZ; COLOMBO, 2010).

Estudos sobre a autofagia usando a interface patógeno-hospedeiro são susceptíveis de produzir *insights* importantes sobre a biologia celular e para muitas doenças humanas ligadas a autofagia. Porém, é de extrema importância saber reconhecer a autofagia canônica na infecção, onde este necessita apresentar LC3 positivo, a presença da dupla membrana, a fusão lisossomal e em alguns microrganismos a presença da proteína ULK1/ATG1 (BAUCKMAN; OWUSU-BOAITEY; MYSOREKAR, 2015; BAXT; GOLDBERG, 2014). Pois, algumas proteínas autofágicas podem participar de outros mecanismos de defesa do hospedeiro, como é visto na Fagocitose associada a LC3 (LAP), onde um dos seus marcadores principais é a proteína LC3 (CEMMA; BRUMELL, 2012).

Tabela 1: Lista para distinguir entre Xenofagia, Fagocitose associada a LC3 (LAP) e Fagocitose (BAUCKMAN et al., 2015).

Xenofagia	Fagocitose associada a LC3 (LAP)	Fagocitose
LC3-II Positivo	LC3-II Positivo	LC3-II Negativo
Dupla membrana	ULK1/ATG1 independente	Membrana simples
Fusão com lisossomos	Indução de ROS	Fusão com lisossomos pode ocorrer
ULK1/ATG1 dependente		

7. Autofagia e EIEC

Em nosso laboratório, observamos que a expressão dos genes *icsA* e *icsB* e a disseminação bacteriana em células intestinais são menores em EIEC quando comparado à *S. flexneri* (MORENO, A. C. R.; FERREIRA; MARTINEZ, 2009). A expressão diferencial destes dois genes também foi observada em macrófagos murinos desafiados com EIEC e *S. flexneri* (BANDO et al., 2010). Em 2012, Santos pode observar que a sequência gênica de *icsA* e *icsB* eram distintos quando comparados com *S. flexneri* M90T. Diante dos resultados observados e tendo como hipótese que a menor disseminação de EIEC teria alguma relação com sua morte intracelular, nos perguntamos: a autofagia está relacionada com a morte de EIEC na célula hospedeira? Seria este um dos mecanismos que torna EIEC mais susceptível ao reconhecimento pela célula hospedeira? (SANTOS, 2012)

Desta forma, nos propomos a estudar o processo autofágico no reconhecimento de EIEC mediado por IcsB, sendo este um possível mecanismo da degradação bacteriana por células epiteliais.

II. Objetivos

Verificar se o mecanismo de autofagia está relacionado com a menor virulência de EIEC quando comparada com a *Shigella flexneri*. Desta forma, propusemo-nos:

- Estudar a importância de *icsB* na infecção por EIEC em células hospedeiras;
- Estudar o processo autofágico no reconhecimento de EIEC, pela avaliação da expressão de LC3 fusionado a GFP, a formação de vacúolos autofágicos e a expressão proteica de LC3 e p62;
- Avaliar o transcriptoma pela técnica de *microarray*, e verificar a alteração da expressão de genes da célula do hospedeiro frente a infecção bacteriana relacionados com autofagia.

III. Material e métodos

Com o objetivo de avaliar o papel da proteína IcsB frente ao processo autofágico, a estratégia de mutagênese não polar foi empregada com a finalidade de se obter uma derivada da amostra FBC124/13 que não expressasse IcsB. Para atingir este objetivo, foi utilizado o vetor suicida pJP5603, clonado com parte do gene a ser nocauteado. Após este procedimento, a cepa mutante foi complementada com diferentes plasmídeos, que carregavam tanto o gene *icsB* de EIEC como o de *Shigella*. Uma vez obtidas as variantes de EIEC desejáveis, o fenômeno de disseminação, utilizado por essas bactérias invasoras, foi observado através da infecção em células humanas. Mais ainda, foram avaliados os tipos de morte celular, assim como a produção de citocinas envolvidas durante o processo de disseminação bacteriana. Para investigar a ativação do processo autofágico nas células humanas infectadas, a indução da produção da proteína LC3 foi analisada por duas técnicas: *western-blot* e análise de microscopia de fluorescência em células HeLa contendo LC3 marcado com GFP. A presença da autofagia convencional ocorre tanto pelo recrutamento de LC3 como pela formação de uma dupla-membrana ao redor da bactéria, onde esta foi analisada por microscopia eletrônica de transmissão. Para corroborar com o estudo, vias de sinalização de interesse foram identificadas pela análise do transcriptoma pelo método de *microarray*. As metodologias utilizadas estão descritas a seguir:

1. Microrganismos utilizados: Foram utilizadas as cepas FBC124/13 (GIBOTTI et al., 2004) e M90T (SANSONETTI et al., 1996) pertencentes à bacterioteca do laboratório de Microbiologia Clínica (Tabela 2). As cepas selecionadas foram submetidas ao teste de Serény (SERENY, 1963), para confirmação de sua capacidade invasora e congeladas a -80°C.

2. Preparação do inóculo bacteriano: Em todos os ensaios de infecção, as amostras bacterianas foram semeadas em ágar Vermelho Congo (VC) e incubadas a 37°C por 48 horas. Após o período de incubação, foram selecionadas colônias VC positivas (VC⁺) para semeadura em meio *Tryptic Soya Broth* (TSB), sob agitação a 220 rpm a 37°C, por aproximadamente 4 horas, para obtenção da fase *log* de crescimento. Após esse período, as bactérias foram centrifugadas a 2.000 rpm por 5 minutos e ressuspensas em meio de cultura Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM) (SIGMA, D1152). A absorbância foi quantificada em espectrofotômetro e acertada para se obter uma concentração bacteriana inicial de aproximadamente de 10⁸ bactérias por mL.

3. Cultura de células humanas HeLa e Caco-2: As células foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 25mM de glicose e solução antibiótica penicilina-streptomina (100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomina), em estufa a 37°C, com atmosfera de 5% de CO₂. Os estoques celulares foram mantidos em 90% de SFB e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) e armazenados a -80°C.

4. Mutação do gene *icsB*

4.1 Desenho dos iniciadores

Os iniciadores para a promoção da mutação de *icsB* foram desenhados de acordo com o sequenciamento deste gene, realizado em trabalhos anteriores (SANTOS, 2012). Assim, os iniciadores denominados “Mut” foram customizados (SIGMA) (Figura 7).

```

ATGAGCCTCAAAATTAGCAATTTTCATTGACGCAAGCAATACAAAAGGGCCTATACGCGTTGAAGATACAGAGCATGGACCTAT
ATTGGTAGCACAGAAATTCACCTAAAGGATCTCTTTTTTCAGAACATTAAGCACTATTAATGCAAAGATAAAATTCACAGATAT
TAAATGAACAACATAAAAAATATCGACTAGCGAATCAAAAAATCCTTATTGCTTTTCCTCAAGACATTAGCTAGCGAAAAATCT
GCAGAAAAGTGCCTTTGCCGCTATGAAGCAGCTAAAAATTC AATTCAACATCTTTTTACAGGTAAAGACATCAAATTAATGTT
GAATACCGCAGAGCGTTTTTCATGGCATCGGTACAGCCAAAAATCTTGAAAGACATTTAGTGTTCGTTGCTGGGGAAATAGAG
GCATAACCCATTTAGGGCATACCAGTATCAGTATAAAAAACAATTTACTACAGGAACCAACTCATACTATCTCAGCTGGTAT
CCC GGCGGGAATGTTACAAAAGA TACAGAAATAAACTACCTTTTTGAAAAACGCTCAGGTTACAGTGTTCGATACCTATAAAAC
AGACAAACTAAATATGATTTTCAGACCAAACAGCCGAAAGACTTGATGCAGGCCAAGAGGTTAGAAACTTATTTAAATTCAAAAC
AAGATCAAAATAACAACAAAAAATATTTTTTCCCAGAGCTAATCAAAAAAAGACCCCTATGGTTATTGGGGGGTCAGTGCT
GATAAAGTATACATTCATTATCAGGTGATAATAAAACAAAGGATGGTAAAAATCAGCTATAACCTTTTTGGCCTTGATGAAAC
AAACATGTCAAAATTTATATGCCAAAAGAAAAGCAGATGCTTTCAGACAATTGGCAAATTATAAATTAATCAGTAAATCTGAAA
ACTGTGCTGGTATGGCACCTAATGTTCTTAAAGCAGGAAATCTGAAATATACTTTCCACTCCCTGACGTTAAATTTGGTTGCT
ACACCTAACAAATGTATACGCGTATGCAATAAAG TTAGGCAACGCATTGAAAG TCTCAATCAGTCTTATAACGAGATAATGAA
GTATATTGAATCTGATTTTGATCTTTCCAGATTGACTCAATTACGACGTAGCTATCTTAAAAGTTTCAATAAAATTAACCTTA
TCCACACCCCAAAAACATTCAAGCCTTTATCAATTTCACTTTACAAACATCCTACTGAAAATGTATCTTCAGAAGACTTTGAT
GCGGTCATCAACGCTTGCCACTCATACTTAGTAAAATCAGCACCCAGCAATATGTCTCGTGTATTAACGAATTA AAAACCGA
AGCAACAGATAAAAAAGAAGAAATCATCGAAAAATCAATAAAAAATTATTGATTATTACAATTTCTTAAATCGCCAGATCTTG
GAACCAACTTTACATTCACGACTTATTACAGGTCAATAAGCTTTTATTGAATAACTCTCATTCTAATATATAG

```

Figura 7: Região completa de *icsB* de FBC124/13. O gene total possui 1485 pb. E em verde, encontram-se os iniciadores para a amplificação de 548 pb, demonstrado em azul (Leitura 5´- 3´).

4.2 Obtenção do inserto *icsB*. O fragmento interno do gene *icsB* de 548 pb foi amplificado pela técnica de PCR (MORENO, A. C. R. et al., 2009). Após a eletroforese em gel de agarose, o produto da PCR foi purificado pelo kit *DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare), de acordo com as recomendações do fabricante. As cepas bacterianas e plasmídeos utilizados estão descritos na tabela 2.

Tabela 2: Características e fontes de cepas e vetores plasmidiais usados neste estudo

Cepa ou Plasmídeo	Características relevantes	Referencia ou fonte
<i>E. coli</i> FBC124/13	Amostra selvagem de EIEC O124:H ⁻ , Séreny positivo	(GIBOTTI et al., 2004)
<i>S. flexneri</i> M90T	<i>Shigella flexneri</i> , Séreny positivo	Cedido pelo Dr Phillip Sansonetti, Institut Pasteur, Paris, France
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (Φ 80 <i>lac</i> Δ M15)	(SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989)
<i>E. coli</i> DH5 α (λ pir)	DH5 α transduzidas com λ pir	(ELLIOTT; KAPER, 1997)
<i>E. coli</i> SM124/13	EIEC sem transcrição do gene <i>icsB</i>	Neste estudo
pGEM-T Easy	Vetor plasmidial utilizado para clonagem de produtos amplificados por PCR	REF A1360 Promega
pJP5603	Plasmídeo 3.1-kb R6K-baseado em vetor suicida (Km)	(PENFOLD; PEMBERTON, 1992)
pSPORT1	4.1 kb – Alto número de cópias - Life Technologies	REF 18248-013 Invitrogen
pACYC184	4.2 kb – baixo número de cópias	(CHANG, A. C.; COHEN, 1978)

4.3 Ligação do inserto ao vetor pGEM-T Easy. O fragmento de 548pb de *icsB* foi clonado no vetor comercial pGEM-T Easy (PROMEGA) segundo recomendações do fabricante. A quantidade de inserto adicionado à mistura comercial foi calculada de forma que representasse aproximadamente três vezes a concentração do vetor (3:1). A reação foi incubada a 4°C *overnight*.

4.4 Transformação por eletroporação. Para a eletroporação do plasmídeo em *E. coli* DH5 α , as células eletrocompetentes foram preparadas conforme descrição a seguir: A amostra *E. coli* DH5 α foi pré-cultivada em 3 mL de caldo Luria-Bertani (LB) *overnight* a 37°C, sob agitação. Uma alíquota de 2 mL do pré-inoculo da amostra foi transferida para 250 mL de caldo LB e cultivada sob as mesmas condições anteriores, até atingir a absorbância de 0,5 a 0,6 em comprimento de onda de 600 nm. As células bacterianas foram então incubadas em banho de gelo por 15 min, transferidas para um tubo de centrifugação pré-resfriado e centrifugadas na centrífuga Sorvall Superspeed RC2-B (Sorvall, EUA), por 20 min a 5.000 rpm sob refrigeração de 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado duas vezes com 250 mL de água MilliQ estéril resfriada a 4°C. As células foram gentilmente ressuspensas em 30 mL de glicerol 10% resfriado a 4°C e centrifugadas a 5.000 g por 10 min sob refrigeração a 4°C. Ao sedimento bacteriano foram adicionados 300 μ L de glicerol resfriado a 4°C para ressuspender gentilmente as células bacterianas. Essa suspensão foi alíquotada em volumes de 50 μ L em tubos *ependorf* pré-resfriados e imediatamente congeladas a – 80°C.

Para a transformação, as células eletrocompetentes foram descongeladas em banho de gelo e adicionada 3 μ L do plasmídeo submetido a reação de ligação. Essa mistura foi transferida para cubetas apropriadas de 0,2 cm (Biorad, EUA)

previamente resfriadas, e eletroporadas utilizando o eletroporador *GenePulser* (Biorad), sob as condições de 2,5 kV, 25 μ F e controle de pulso a 200 Ω . Após a eletroporação, foi adicionado imediatamente 1 mL de meio SOC (triptona 2%; extrato de levedura 0,5%; cloreto de sódio 10 mM; cloreto de potássio 2,5 mM; sulfato de magnésio 20 mM; cloreto de magnésio 10 mM; glicose 20 mM) à reação, e a mesma foi incubada a 37°C durante 1h sob agitação de 250 rpm. A suspensão foi plaqueada em volumes de 50 μ l, 100 μ l, 200 μ l em ágar LB acrescido de 40 μ g/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo (X-Gal), 1 mM de isopropil- β -D-tiogalactosidase (IPTG) e 100 μ g/ml de ampicilina, sendo em seguida incubados a 37°C por 18h (VASCONCELOS, 2014).

4.5 Seleção do clone contendo o inserto *icsB* no vetor pGEM-T Easy. As colônias recombinantes que apresentaram resistência a ampicilina e não metabolizaram o X-Gal (colônias brancas) foram selecionadas para confirmação da clonagem do gene *icsB* através de reação de PCR com os iniciadores *Mut(F)* e *Mut(R)*. Após análise eletroforética em gel de agarose, uma amostra apresentando o amplicon correspondente ao gene *icsB* (528 pb) foi selecionada para cultivo em caldo LB contendo ampicilina com 15% de glicerol e mantida a - 80°C. Essa amostra foi denominada DH5 α /*icsB*.

As cepas bacterianas contendo o plasmídeo pGEM-T+*icsB* foram submetidas à extração do DNA plasmidial utilizando-se o QUIAGEN® *Plasmid Mini Kit* (Quiagen, EUA), a partir de um cultivo a 37°C sob agitação de 300 rpm em 10 mL de cultura em caldo LB contendo ampicilina (100 μ g/ml). O plasmídeo pGEM-T+ *icsB* foi digerido com a enzima de restrição EcoRI (Invitrogen), por 3h de incubação a 37°C, seguindo as recomendações do fabricante. Em seguida, as digestões foram

avaliadas através da corrida eletroforética em gel de agarose a 1%. Após confirmação da digestão, o fragmento contendo as regiões flanqueadas pelas sequências de restrição para EcoRI, foi purificado a partir do gel, utilizando o *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) e quantificados e mantidos a -20°C para posterior clonagem no vetor suicida pJP5603 (ELIAS et al., 1999).

4.6 Extração do vetor pJP5603. O plasmídeo pJP5603 foi extraído da amostra hospedeira, com auxílio do QUIAGEN® *Plasmid Midi Kit* (Quiagen, EUA), a partir de um volume de 100 ml de cultura em caldo LB contendo canamicina (50 $\mu\text{g/ml}$). O plasmídeo extraído foi digerido com a enzima EcoRI, seguindo as recomendações do fabricante e em seguida quantificado em gel de agarose a 0,8%, comparando-se a intensidade da banda obtida com o marcador *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen).

4.7 Ligação do inserto ao vetor pJP5603. O inserto flanqueado pela região de restrição para a enzima EcoRI foi liberado do vetor pGEM-T Easy e religado ao vetor pJP5603 utilizando T4 DNA ligase (Invitrogen), segundo recomendações do fabricante. A concentração de inserto utilizada foi cerca de 5 vezes maior que a concentração do vetor. A reação de ligação foi incubada *overnight* a 4°C .

4.8 Transformação por eletroporação. Foram preparadas células competentes de *E. coli* DH5 α *pir* e em seguida realizada a eletroporação do plasmídeo pJP5603+*icsB*. As bactérias transformadas foram semeadas com volumes de 50, 100 e 200 μl em placas de ágar LB acrescidas de canamicina (50 $\mu\text{g/ml}$) e incubadas por 18h a 37°C .

4.9 Seleção do clone contendo o inserto *icsB* no vetor pJP5603. As colônias recombinantes que apresentaram resistência a canamicina foram selecionadas para confirmação da clonagem do gene *icsB* através da PCR com os iniciadores Mut(F) e Mut(R). Uma amostra apresentando o amplicon correspondente ao gene *icsB* foi selecionada para cultivo em caldo LB contendo canamicina com 15% de glicerol e mantida a - 20 °C. Essa amostra foi denominada DH5 α *pir/icsB*.

4.10 Indução da resistência a Ácido nalidíxico. Foi realizado a concentração inibitória mínima (CIM) através da técnica de micro diluição em caldo Mueller hinton (CLSI, 2012) das bactérias DH5 α *pir* e EIEC, e verificou-se que as concentrações inibitórias mínimas a ácido nalidíxico eram menores em EIEC (MIC=0,5 μ g/mL) do que em *E. coli* DH5 α *pir* que apresentou CIM de 16 μ g/mL. Desta forma, tivemos que optar pela indução da resistência a esse antimicrobiano em EIEC para que a seleção de colônias EIEC portadoras do plasmídeo pJP5603+*icsB* fosse possível, após o ensaio de conjugação.

A indução ao ácido nalidíxico foi realizado a partir de um pré-inóculo de EIEC em 3 mL de caldo LB sob agitação *overnight* a 37°C. Cada 1 mL foi semeado para uma placa de ágar LB contendo a concentração inicial de 0,5 μ g/mL de ácido nalidíxico e incubado *overnight* a 37°C. As colônias que cresceram foram reisoladas em novas placas de LB contendo uma concentração maior do antimicrobiano (5 μ g/mL, 10 μ g/mL, 25 μ g/mL) e assim sucessivamente, até chegar na concentração final de 50 μ g/mL.

4.11 Conjugação das amostras DH5 α pirlicsB com as amostras de EIEC resistentes a Ácido Nalidíxico. As amostras DH5 α pirlicsB e EIEC FBC124/13 ácido nalidíxico resistentes foram cultivadas por 18 horas a 37°C em 5 mL de caldo LB com Canamicina (50 μ g/ml) e ácido nalidíxico (50 μ g/ml), respectivamente. Destes, 100 μ l das culturas bacterianas foram passados separadamente para um tubo cônico (50mL) contendo 10 mL de LB sem antimicrobiano. E foram incubados a 37°C a 175 rpm até atingir DO 0.5 a 0.7 (600nm). 5 mL de cada suspensão bacteriana foram passados para um *Erlenmeyer* estéril e incubado a 37°C por 24 horas sem agitação. Após o período, foi inoculado 50 μ l, com o auxílio de *Drigalsky* em placa de ágar LB contendo Canamicina (50 μ g/ml) e ácido nalidíxico (50 μ g/ml) (ELIAS et al., 1999) (Figura 8).

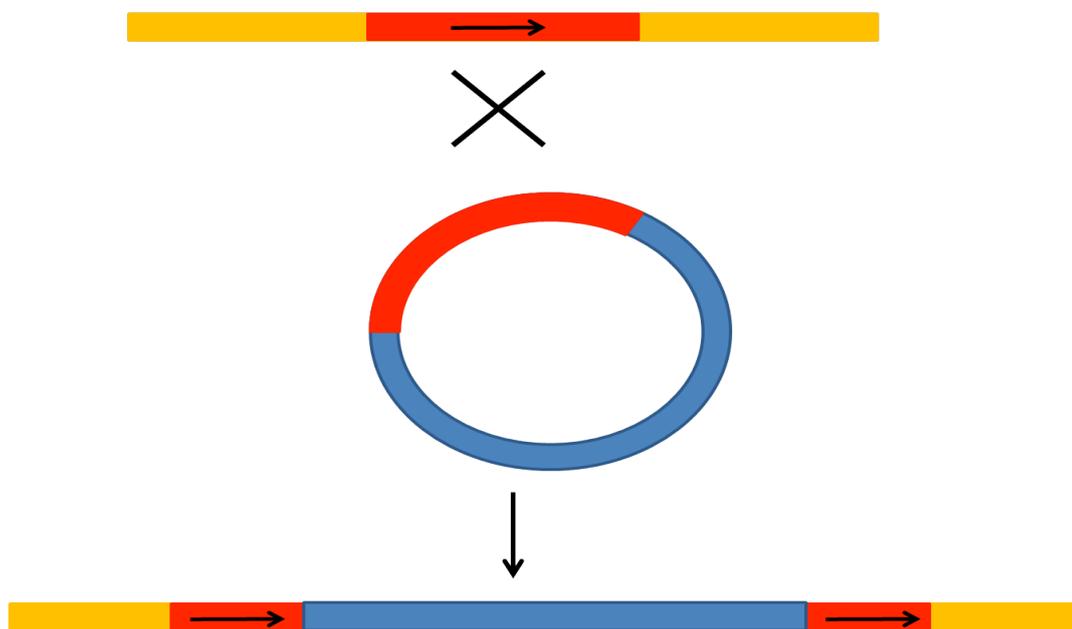


Figura 8: Rearranjo no genoma causado por recombinação homóloga. A recombinação entre uma sequência homóloga no plasmídeo (pINV) e em outro DNA circular (pJP5603 + inserto) pôde levar à inserção do plasmídeo pJP5603+inserto no plasmídeo pINV de EIEC. Em amarelo representa o gene *icsB*, em azul o plasmídeo pJP5603 e em vermelho representa a região homóloga de 548pb de *icsB*. Após a recombinação homóloga, o plasmídeo pJP5603+inserto de 548pb de *icsB* insere-se no gene *icsB* do plasmídeo pINV causando um bloqueio em sua transcrição, causando uma mutação não polar.

5. Complementação do gene *icsB*

Após obtenção do mutante, utilizamos plasmídeos de alto número de cópias (pSPORT1) e de baixo número de cópias (pACYC184) contendo tanto o gene *icsB* de *Shigella flexneri* M90T como de EIEC FBC124/13, para a complementação na cepa mutante. A inserção do gene de *icsB* de EIEC e *S. flexneri* no plasmídeo pACYC184 foi realizada pela empresa FastBio (www.genscript.com). A inserção do gene *icsB* no plasmídeo pSPORT1 foi realizado em nosso laboratório, de acordo com a descrição abaixo:

5.1. Ligação do inserto ao vetor pGEM-T Easy. O fragmento de 1.485 pb (Tamanho total do gene) de *icsB* de *S. flexneri* e de EIEC foram clonados ao vetor comercial pGEM-T Easy (PROMEGA) segundo recomendações do fabricante. A reação de ligação foi eletroporada juntamente com *E. coli* DH5 α eletrocompetente e selecionadas de acordo com a descrição citada anteriormente (Item 1.4.). As colônias recombinantes que apresentaram resistência a ampicilina e não metabolizaram o X-Gal (colônias brancas) foram selecionadas para confirmação da clonagem do gene total de *icsB* através de reação de PCR com os iniciadores:

icsB-F (AGAGTAGTTAAGGATGAG)

icsB-R (CCCCTTATTTCTTTTCTCC)

A amostra contendo o amplicon correspondente a este gene foi selecionada para cultivo em caldo LB contendo ampicilina denominada DH5 α /*icsB* total. O plasmídeo foi extraído para posteriormente ser digerido pela enzima EcoRI. Os fragmentos contendo as regiões flanqueadas pelas sequências de restrição para

EcoRI, foram purificados a partir do gel, utilizando o *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) e quantificados e mantidos a -20°C para posterior clonagem no plasmídeo pSPORT1.

5.2 Sub-clonagem do inserto no vetor pSPORT1. O plasmídeo pSPORT1 foi extraído da amostra hospedeira, com auxílio do QUIAGEN® *Plasmid Midi Kit* (Quiagen, EUA). O plasmídeo extraído foi digerido com a enzima EcoRI (Item 1.6.) e o inserto flanqueado pela região de restrição para a enzima EcoRI liberado do vetor pGEM-T Easy foi religado ao vetor pSPORT1 utilizando T4 DNA ligase (Invitrogen), segundo recomendações do fabricante.

5.3 Transformação por eletroporação e seleção dos clones. Foram preparadas células eletrocompetentes de *E. coli* SM124/13 e em seguida realizada a eletroporação com os plasmídeos (pSPORT1 e pACYC184) contendo o inserto de *icsB*. As bactérias transformadas foram semeadas em placas de ágar LB acrescidas de ampicilina (100 µg/ml) para os clones com o plasmídeo pSPORT1 e cloranfenicol (50 µg/ml) para os clones com o plasmídeo pACYC184 e incubadas por 18h a 37°C. As colônias recombinantes que apresentaram resistência ao antimicrobiano foram selecionadas para confirmação da clonagem do gene *icsB* através da PCR com os iniciadores *IcsB*(F) e *IcsB*(R). Após análise em eletroforese em gel de agarose, uma amostra que apresentou o amplicon correspondente ao gene *icsB* foi selecionada pra cultivo em caldo LB contendo antimicrobiano seletivo para cada plasmídeo com 15% de glicerol e mantida a -20°C. Assim, que foi obtido as cepas complementares, esses foram denominados de acordo com a tabela 3.

Tabela 3: Cepa mutante SM124/13 complementada com diferentes plasmídeos com o gene *icsB* [Sequencia gênica de EIEC O124/13 (SANTOS, 2012) e de *S. flexneri* M90T (GenBank - N° nc_002698.1)].

Nomenclatura	Plasmídeo	Sequência gênica de <i>icsB</i>
HCE124/13	pSPORT1*	<i>icsB</i> de O124/13
HCS124/13	pSPORT1*	<i>icsB</i> de M90T
LCE124/13	pACYC184**	<i>icsB</i> de O124/13
LCS124/13	pACYC184**	<i>icsB</i> de M90T

(*) Plasmídeo de alto n° de cópias, (**) Plasmídeo com baixo n° de cópias.

6. RT-PCR de *icsB* e *ipaA*

6.1 Extração de RNA. As cepas de *E. coli* FBC124/13, SM124/13, HCE124/13, HCS124/13, LCE124/13 e LCS124/13 foram submetidas à extração de RNA total pelo Kit Rneasy (Qiagen Laboratories, Uniscience do Brasil), 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 1,0% foi realizada no final do ensaio para observar a qualidade da extração. As preparações de RNA total foram estocadas a -80°C até o momento da utilização.

6.2 Quantificação do RNA. 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. As

amostras foram diluídas para 10 ng/μL para posterior síntese da primeira fita de DNA complementar.

6.3 Síntese de fita DNA complementar (cDNA). A primeira fita de cDNA foi sintetizada utilizando o kit *SuperScript™ First-Strand synthesis System for RT-PCR*, segundo recomendações do fabricante (Invitrogen). 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 MgCl₂, 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.

6.4 RT-PCR. 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 sequência de *Shigella flexneri* depositada no *GenBank*, número nc_002698. Para um volume final de 20 μL, utilizou-se 1x Solução tampão 10X, 1,5 mM de MgCl₂, 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). Para a análise de *ipaA* foi realizado: um ciclo a 94°C por 2 min; a 94°C por 40 s, 50°C por 30 s e 72°C por 50 s. A reação foi concluída com um ciclo a 72°C por 5 min. Para o gene *icsB* foi realizado: um ciclo de 94°C por 5 min; a 94°C por 45 s, 55°C por 45 s e 72°C por 2 min e 30s. E concluída com um ciclo a 72°C por 5 m. 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 (MORENO, A. C. R. et al., 2009).

Tabela 4: Iniciadores sintetizados a partir da cepa de *Shigella flexneri* depositada no GenBank (N° nc_002698).

Gene	Sequencia (5' – 3')	Tamanho do fragmento (pb)
<i>ipaA</i>	ipaA-F AAGATTCGCATCCTATCCAAG	307
	ipaA-R TGTGGTAGAACGGAAGTTAC	
<i>icsB</i>	Mut F – GGCGGGAATGTTACAAAAGA	548
	Mut R – CTTTCAATGCGTTGCCTAA	

7. Curva de crescimento

A curva de crescimento das cepas de *E. coli* FBC124/13, SM124/13, HCE124/13, HCS124/13, LCE124/13 e LCS124/13 foi realizado para avaliar se entre elas haviam um crescimento exponencial diferenciado. Para esta análise, as bactérias foram semeadas em ágar MacConkey e deixadas por 18-24 horas de crescimento em estufa a 37°C, após este período foi coletada uma colônia de cada

cepa que foram colocadas em tubos com LB. E uma alíquota de 100 µL de cada suspensão na concentração de 0,5 de Mc Farland foi colocada em 2,9 mL de meio LB, e crescidas em meio estático a 37 °C por 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 24 horas. Os experimentos foram realizados em unicata e em dois dias diferentes.

8. Ensaio de invasão (CFU)

Células HeLa foram cultivadas em placas para cultura celular. Após confluência, cada poço foi infectado com 1×10^7 bactérias (100 bactérias/células) e centrifugados por 5 minutos a $1 \times 100 \times g$ e colocadas em estufa de CO₂ a 37°C por 2 e 4 horas de invasão. Posteriormente, foi adicionado meio DMEM contendo 50 µg/mL de gentamicina e mantidas em estufa de CO₂/37°C por 50 minutos. O meio foi retirado e as células foram lavadas 2 vezes com PBS, e em seguida foram lisadas com Triton X-100 a 0,1%. As células lisadas foram plaqueadas em ágar MacConkey e colocadas em estufa a 37°C por 18 horas. As colônias crescidas nas placas de ágar MacConkey foram contadas manualmente para obtenção do CFU. Como controle negativo, utilizou-se células HeLa sem contato bacteriano. Experimento realizado em três dias diferentes e em unicata.

9. Ensaio de disseminação/reinfecção (CFU)

As células Hela confluentes foram infectadas por 2,5 horas, período escolhido para o processo de invasão. Posteriormente, foi adicionado meio DMEM contendo 50µg/mL de gentamicina e mantidas em estufa de CO₂/37°C por 50 minutos. o meio contendo antimicrobiano foi retirado e as célula foram lavadas duas vez com PBS e em seguida foi adicionado em cada poço DMEM + SFB por 2 e 4 horas. O meio foi retirado, em cada tempo, e as células foram lavadas 2 vezes com PBS, e em seguida foram lisadas com Triton X-100 a 0,1%. As células lisadas foram plaqueadas em ágar MacConkey e colocadas em estufa a 37°C por 18 horas. As colônias crescidas nas placas de ágar MacConkey foram contadas manualmente para obtenção do CFU. Como controle negativo, utilizou-se células HeLa sem contato bacteriano. Experimento realizado em dois dias diferentes e em unicata.

10. Ensaio de citotoxicidade por LDH

A citotoxicidade das células humanas infectadas foi mensurada pela detecção de LDH no sobrenadante das culturas pelo kit colorimétrico *Cytotox 96 kit* (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. Foram analisadas as células infectadas com as cepas de *E. coli* FBC124/13, SM124/13 e LCE124/13 nos intervalos de 0,1,2,3 e 4 horas após 2,5 horas de invasão devido ao tempo já estipulado para todos os experimentos utilizando células HeLa. Para o cálculo da percentagem de citotoxicidade foram utilizadas como controle negativo, as células não-infectadas, e

como controle positivo as células lisadas com 0,9% de Triton X-100. Ambos os experimentos foram realizados em triplicata e em dois dias diferentes.

11. Ensaio de apoptose por Citometria de fluxo

Para avaliar a possível indução de apoptose das células HeLa infectadas, foi utilizado o *kit Apoptosis Detection* (Sigma-Aldrich, USA), segundo as recomendações do fabricante. As células foram mantidas em contato com as cepas (FBC124/13, SM124/13 e LCE124/13) por 4 horas, após 2,5 horas de invasão. As células foram então coletadas e lavadas com PBS e re-suspendidas em solução *Binding buffer* 1x. Aos tubos foram adicionados 5µL de anexina V-FITC e 5µL de iodeto de propídio, incubados por 15 minutos, a temperatura ambiente e em ambiente escuro. Após esse período, as amostras foram adquiridas no equipamento BD FACS CANTO II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) e analisadas no software FlowJo (Orlando, FL, USA). Os ensaios foram realizados em triplicata para cada espécie bacteriana.

12. Dosagem de citocinas

Para análise das citocinas, células HeLa foram infectadas (50 bactérias/célula) com as cepas de *E. coli* FBC124/13, SM124/13, HCE124/13, HCS124/13, LCE124/13 e LCS124/13 pelo período de 12 e 24 horas, após 2,5 horas de invasão. O sobrenadante foi utilizado para a dosagem das citocinas IL-10, IL-8, IL-1β, IL-6, IL-12 p70 e TNF, utilizando o *kit Human Inflammatory Cytokine Kit* BD

Cytometric Bead Array-CBA (cat. 551811). As amostras foram preparadas seguindo as recomendações do fabricante e adquiridas no equipamento BD FACS CANTO II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). As concentrações das citocinas foram determinadas, utilizando o software FACP Array Version 3,0 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). O experimento foi realizado em triplicata e em um único dia.

13. Obtenção da proteína LC3 através da técnica de Western Blot

13.1 Obtenção dos extratos proteicos. Foram utilizados extratos proteicos totais. As células HeLa foram infectadas com as diferentes cepas bacterianas (100 bactérias/célula). Como controle positivo utilizou-se a bafilomicina (16 μ M), e como controle negativo apenas células. As células foram lisadas com tampão RIPA (NaCl 150mM; Tris HCl (ph 7,5) 50 mM; NP-40 5%; EDTA 0,1mM) na presença de inibidores de proteases (Protease inhibitor cocktail tables –Roche, Mannheim, Germany) e incubadas a 4°C por 20 min e então transferidas para microtubo (1,5 mL). Após centrifugação por 20 minutos a 4°C, os sobrenadantes foram mantidos a –80°C. A concentração proteica foi determinada pelo método de Bradford (TORMO et al., 2009).

13.2 Separação das proteínas no gel de SDS-PAGE e transferência para membrana. Para separação foi feito gel de SDS-PAGE com 15% de acrilamida. Em cada canaleta foram colocados 100 μ g de extrato proteico total em 20 μ l de tampão de lise + 5 μ l de tampão de amostra 5X (Tris-HCl 62,5mM pH6.8, SDS 2%, Glicerol 10%, Azul de Bromofenol 0,1%, DTT 50mM) aquecido à 90°C por 10' (condições desnaturantes) e 8 μ l de marcador de peso molecular Rainbow (RPN800V,

Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA) em cada gel. A corrida foi feita à 70V / 30min durante o gel de empilhamento e à 100V / 1:30h durante o gel de separação. Em seguida foi realizada a transferência úmida das amostras de proteína para uma membrana de polivinilidene difluoreto (PVDF) (Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA) utilizando o Tampão de Transferência (Tris Base 25mM, Glicina 192mM pH8.3, com 20% de Metanol) à 4°C / 200mA / 1:30h.

13.3 Incubação das membranas com anticorpos primários e secundários. O bloqueio das membranas foi realizado com solução de TBS-T 0,1% (50 mM Tris, 150mM NaCl, 0,1% Tween 20, pH 7.6) com leite (sem gordura) a 5%. A membrana foi incubada com os anticorpos primários anti-LC3 (Abgent #AM1800a) e Beclin-1 (Cell signaling #3495S) a 4°C *overnight*. Após 3 lavagens de 10 min cada com TBS-T 0,1%, a membrana foi incubada com anticorpo secundário anti-mouse (RPN4201V, GE Healthcare UK) diluído 1:5.000 em TBS-T 0,1% durante 2 horas à TA. Após incubação com o anticorpo secundário, as membranas foram lavadas 3 vezes / 10 min com TBS-T 0,1%, e em seguida reveladas com kit ECL (Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA) e expostas ao filme (Amersham Hyperfilm ECL).

14. Superexpressão por células humanas HeLa do gene LC3 fusionado a GFP clonado em lentivírus

Para geração de células HeLa com expressão forçada do gene LC3 fusionado ao GFP foram utilizados plasmídeos contendo a construção LC3-GFP. O vetor lentiviral utilizado foi pLV e as sequências foram inseridas no mesmo. O sistema

utilizado para empacotamento lentiviral foi o *Mission shRNA* (Sigma, USA), conforme a recomendação do fabricante.

Inicialmente, os plasmídeos lentivirais contendo a sequência do gene de interesse foram transfectados juntamente com os plasmídeos empacotadores nas células HEK 293T (*Human Embryo Kidney 293T* – Células empacotadoras para a produção de partículas virais contendo o vetor lentiviral), de acordo com instruções do fabricante. Os vetores lentivirais sem a sequência de interesse ou contendo sequência aleatória de nucleotídeos (*scramble*) foram utilizados para a geração dos controles. O empacotamento viral gera as partículas virais inativas que são secretadas no meio de cultura das células HEK 293T.

As células HeLa foram então infectadas com este título viral e os clones transduzidos foram selecionados de acordo com o plasmídeo utilizado, sendo os clones LC3-GFP selecionados pela emissão de fluorescência (GFP) (MIZUSHIMA et al., 2008; TORMO et al., 2009).

As células HeLa LC3-GFP foram cultivadas em placas para cultura celular (2×10^6 células/poço) e infectadas com as bactérias FBC124/13, SM124/13, HCE124/13, HCS124/13, LCE124/13 e LCS124/13 por 3 horas após 2,5 horas de invasão, e analisadas em microscópio de fluorescência invertido, Nikon EclipseTi series, filtro GFP e observadas em software NisElements. As imagens foram capturadas em 10x – exposição 600ms e 40x – exposição 1s.

15. Microscopia Eletrônica de transmissão (MET)

Para a realização da MET, as células HeLa infectadas com FBC124/13, SM124/13, HCE124/13, HCS124/13, LCE124/13 e LCS124/13 (3 horas pós-invasão) foram re-suspendidas em 2,0% glutaraldeído (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) e enviadas ao Departamento de Histologia do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo para a produção das *grids* de cobre (CAMPBELL-VALOIS et al., 2015). As *grids* foram examinadas no microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1010 a 100Kv e foto documentadas com o aparelho Kodak *Electron Microscope Film* 4489.

16. Análise de expressão global de genes

16.1 RNA eucarioto

Para análise da transcrição gênica de células Caco-2 não-infectadas e infectadas com EIEC e *S. flexneri* M90T utilizou-se o método de *Microarray*. Para a análise, três grupos foram estudados: grupo controle (Caco-2 apenas), EIEC (Caco-2 infectada com EIEC) e *Shigella* (Caco-2 infectado com *Shigella*) e cada grupo foi analisado em diferentes intervalos (0, 1 e 2 horas) de tempo após 1,5 h de invasão.

16.2 Análise do transcriptoma pelo método de microarranjos

A fim de determinar perfis de expressão gênica, foram utilizadas lâminas de DNA microarrays 44 K (*Whole Human Genome Microarray Kit*, Agilent Technologies, cat no. G2519F, Santa Clara, CA) para as análises dos genes

eucariotos. O procedimento para hibridação foi conforme as instruções do fabricante (*One -Color Microarray - Baseados em Análise de Expressão Gênica – Quick Amp Labeling*) (Figura 9). As imagens foram capturadas pelo leitor Agilent Bundle de acordo com os parâmetros recomendados para *bioarrays* e extraídas pela Agilent software Feature Extraction versão 10.3, considerando pontos com nenhuma ou apenas uma bandeira (ou seja, de baixa intensidade, saturação, controles, etc.). As transcrições selecionadas foram utilizadas para análise usando a versão do software R 2.11.1 (R Development Core Team, 2010) e o teste *Lowess* para normalização dos *arrays*. Por meio da versão do software TMEV 4.6.1 (SAEED et al., 2003) foi obtido genes diferencialmente expressos anotados usando o procedimento de análise da significância dos *microarrays* (SAM), todos up-regulados no grupo controle (*fold* ≥ 3.0).

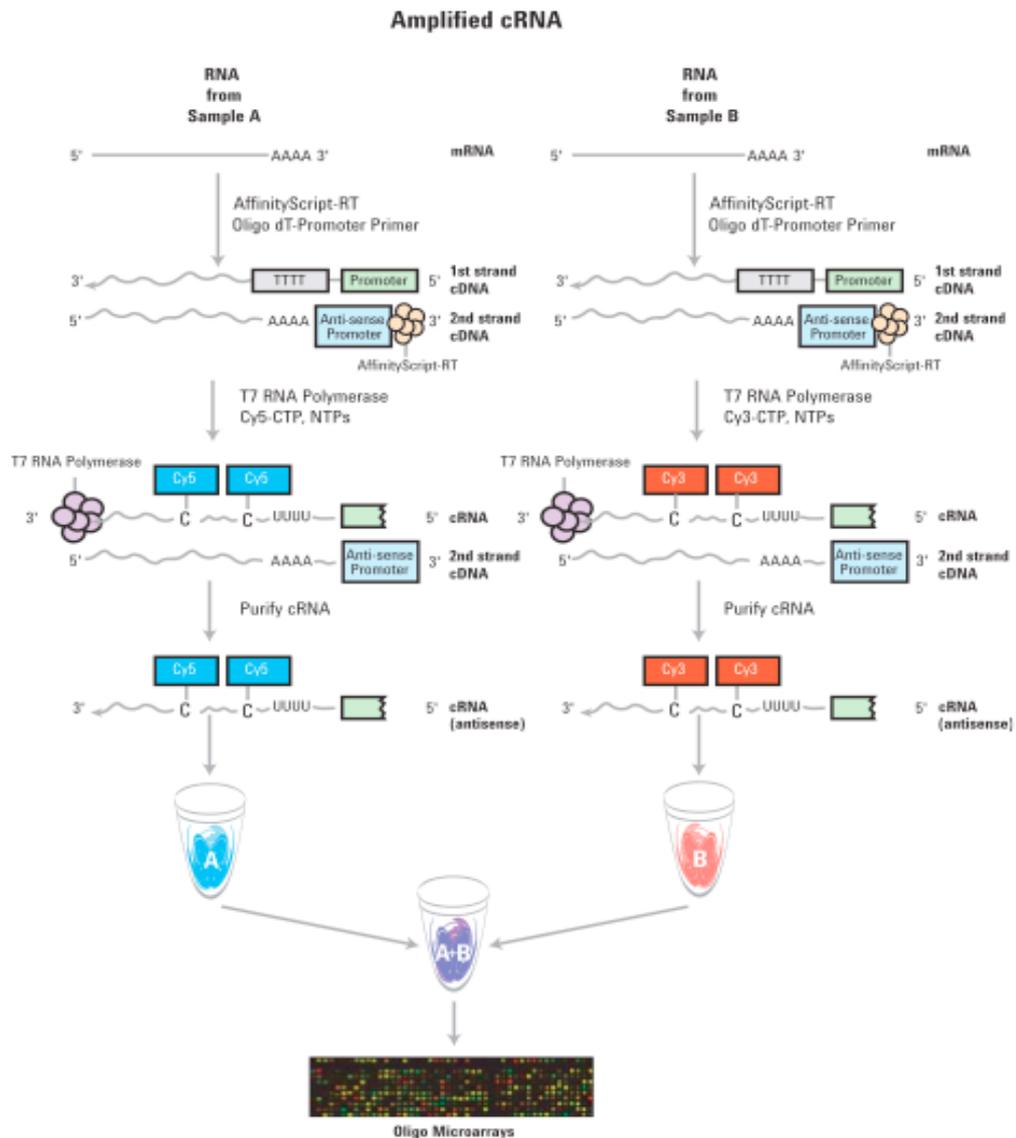


Figura 9: Esquema do procedimento de amplificação do cRNA. Geração de cRNA para um experimento de *microarray* de duas-cores é mostrado. Ao gerar metas para um experimento de *microarray* de uma-cor, apenas a amostra “B” marcado com Cy3 é produzido e hibridado (Retirado do protocolo da © Agilent Technologies, Inc. 2007-2010).

17. Análise estatística.

Análises estatísticas de significância foram realizadas através do teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni para comparação entre os diferentes grupos experimentais. Todos os testes foram realizados utilizando-se o programa GraphPad Prism 5, e diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

IV. Resultados

1. Mutação do gene *icsB* pela técnica de recombinação homóloga

Após a construção do inserto de 548 pb, para recombinação homóloga, o mesmo foi inserido em pJP5603 e a inserção foi confirmada por gel de eletroforese. O tamanho do plasmídeo com o inserto (≈ 3.6 Kb) foi maior do que o plasmídeo pJP5603 original (3.1 Kb) (Figura 10A). Para avaliar se o tamanho do inserto (548 pb) encontrava-se íntegro, uma digestão do pJP5603 + *icsB* foi realizado com EcoRI por apresentar sítios de restrição em suas extremidades. O fragmento de 548 pb do gene *icsB* foi confirmado e o tamanho do plasmídeo digerido foi igual ao plasmídeo original (Figura 9B), confirmando a integridade do fragmento.

Após a construção do pJP5603 + *icsB*, o plasmídeo foi eletroporado em uma *E. coli* DH5 α pir eletrocompetente. A presença do gene *icsB* foi confirmada por PCR e um amplicon de aproximadamente 580 pb foi detectado em gel de eletroforese (Figura 10C), confirmando a inserção do plasmídeo na bactéria. Deste modo, pôde-se obter uma bactéria doadora DH5 α pir contendo o plasmídeo pJP5603 com a sequência interna de *icsB*.

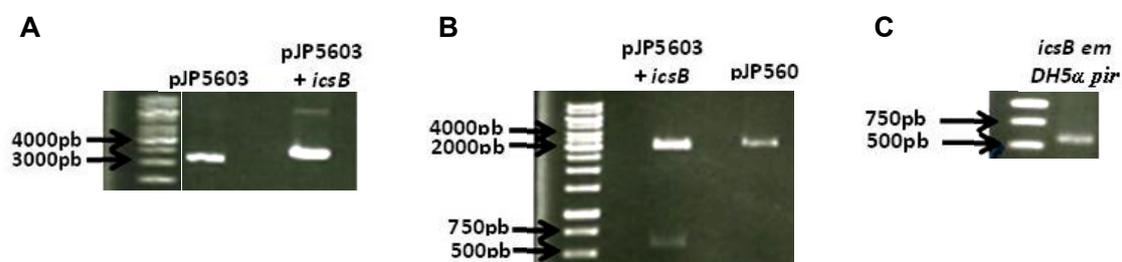


Figura 10. Construção de bactéria doadora contendo pJP5603 + *icsB*. a) Extração plasmidial realizado com o plasmídeo sem o inserto e contendo o inserto (*icsB*) antes de ser digerido pela enzima. b) Após digestão com a enzima EcoRI, é possível observar o tamanho de *icsB* (548pb) separado do plasmídeo pJP5603. c) Fragmento de 548 pb obtido por PCR a partir do plasmídeo contendo o inserto após inserção deste na bactéria DH5 α pir.

Para dar início ao processo de mutação, foi preciso que EIEC apresentasse resistência a pelo menos um antimicrobiano, já que não o possuía naturalmente. Assim, o ácido nalidíxico foi o antimicrobiano de escolha devido a trabalhos anteriores de *E.coli* o utilizarem para seleção da bactéria após ensaios de conjugação (ELIAS et al., 1999).

Após realizar a concentração inibitória mínima (CIM), EIEC apresentou CIM de 0.5 µg/mL enquanto que *E. coli* DH5αλ*pir* apresentou CIM de 16 µg/mL ao ácido nalidíxico, inviabilizando a seleção das colônias de EIEC contendo o pJP5306 + *icsB* após ensaios de conjugação. Desta forma, a indução da resistência a ácido nalidíxico foi realizada em EIEC selvagem e colônias com CIM de 50 µg/mL foram obtidas, que nos possibilitou a distinção entre a bactéria DH5αλ*pir* e EIEC que continha o plasmídeo pJP5603 com o inserto de *icsB* resistente a canamicina, sendo a doadora e a receptora respectivamente. Como o plasmídeo pJP5306 apresenta resistência a canamicina, EIEC mutante foi selecionada em ágar LB contendo 50 µg/mL de canamicina e 50 µg/mL de ácido nalidíxico após o ensaio de conjugação.

Como o iniciador M13-F liga-se somente a região presente no plasmídeo suicida (pJP5603) e o iniciador Mut-R na sequência de *icsB*, pode-se concluir, que apenas as amostras de EIEC mutante contendo a inserção do plasmídeo pJP5603 foram amplificadas (Figura 11).

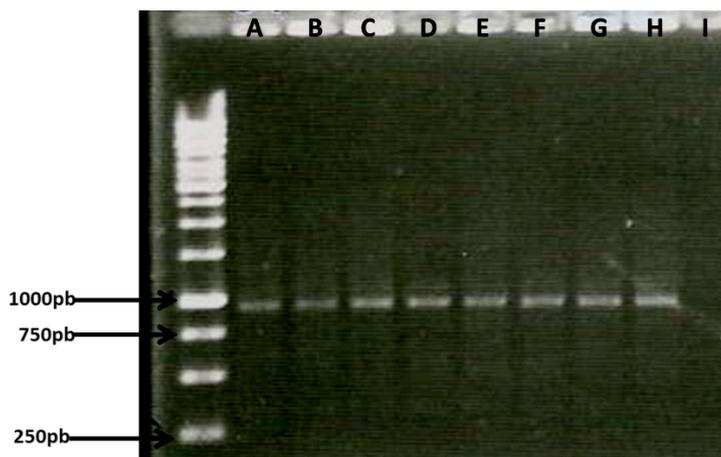


Figura 11. Pela técnica de PCR, utilizando os iniciadores M13-F e MutB-R, foi possível obter a amplificação da região do plasmídeo pJP5603+*icsB* inserido no plasmídeo pINV de EIEC resistente a ácido nalidixico (50µg/mL) nas cepas de A a H. E a amplificação não foi observada quando realizada em EIEC selvagem (I).

2. Complementação do gene *icsB*

Devido à diferença entre os genes de disseminação de EIEC e *S. flexneri* (MORENO, A. C. R., 2007; SANTOS, 2012), bem como sua transcrição, na qual *S. flexneri* transcreve o gene *icsB* de uma forma mais rápida e eficaz do que EIEC, tanto em células intestinais humanas como em macrófagos murinos (BANDO et al., 2010; MORENO, A. C. R. et al., 2009) estudamos cepas de EIEC mutantes complementadas com plasmídeo de alto número de cópias, para verificar se o aumento da transcrição do gene *icsB* afetaria o comportamento de disseminação das cepas geradas, quando comparado com EIEC selvagem. Outro fator que avaliamos foi se o polimorfismo observado na sequência nucleotídica do gene *icsB* de EIEC poderia ser responsável pela diferença na disseminação entre EIEC e *S. flexneri*. Assim, inserimos o gene de *S. flexneri* nos dois plasmídeos (alto e baixo número de cópias) e complementamos na cepa de *E. coli* SM124/13 (Item 5.3.).

3. Confirmação da transcrição gênica de *icsB* e *ipaA* pelo método de RT-PCR

Para confirmarmos que a técnica de mutação por inserção e as complementações realizadas foram satisfatórias, utilizamos a técnica da RT-PCR. A transcrição de *ipaA* para as cepas selecionadas confirmaram que o gene pertence a EIEC (Figura 12B). Ao analisar a transcrição de *icsB*, constatamos que na cepa mutante (SM124/13) não houve sua transcrição, e nas cepas complementares (HCE124/13, HCS124/13, LCE124/13 e LCS124/13) a transcrição deste gene foi restaurado após inserção do plasmídeo + *icsB* (FIGURA 12A), assim como há em EIEC selvagem (FBC124/13).

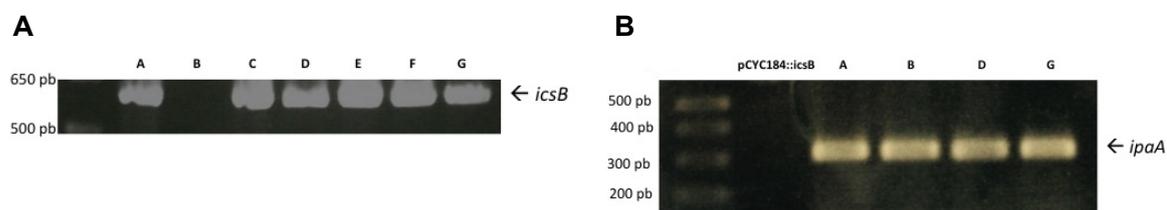


Figura 12. Transcrição gênica de *icsB* e *ipaA*. Após o ensaio de transcrição gênica através da RT-PCR, utilizando os iniciadores MutB (F e R) e os iniciadores *ipaA* (F e R), pode-se observar que a transcrição gênica da amostra B não foi realizada (figura A), sendo as amostras (A) cDNA de FBC124/13, (B) cDNA de SM124/13, (C) cDNA de HCE124/13, (D) cDNA de LCE124/13, (E) cDNA de M90T, (F) cDNA de HCS124/13 e (G) cDNA de LCS124/13, confirmando assim que o bloqueio do gene *icsB* foi obtida com sucesso. Na figura B, foi possível observar que a transcrição gênica de *ipaA* foi obtida em todas as cepas (A, B, D e G), não sendo alterada pela mutação. A amostra bacteriana contendo apenas o plasmídeo pACYC184 com o gene completo de *icsB*, não houve transcrição do gene *ipaA*, confirmando que todas as demais amostras são EIEC.

4. Curva de crescimento

Devido as mutações em SM124/13, o ensaio de curva de crescimento foi essencial para saber se a capacidade de divisão e multiplicação bacteriana foram afetadas nas cepas sem o *icsB* e as complementadas pelo mesmo gene. De acordo com a figura 13, todas as cepas de EIEC cresceram de uma forma semelhante, no qual, tais mudanças no seu genoma não prejudicaram seu crescimento em meios de culturas.

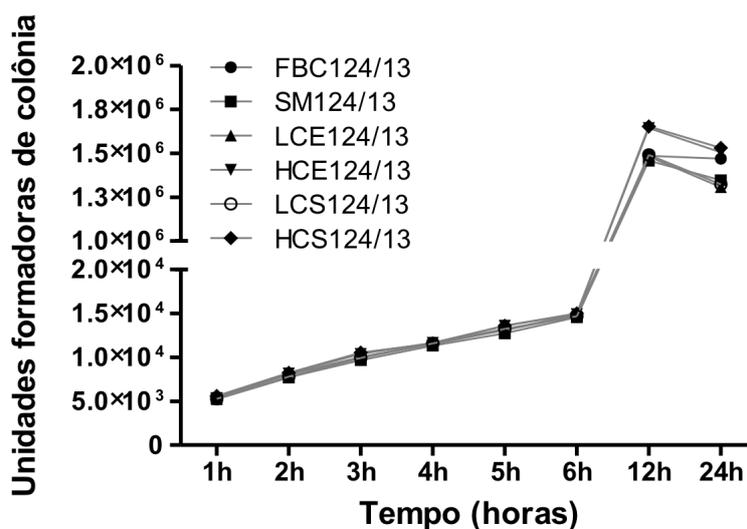


Figura 13. Curva de crescimento comparativa entre EIEC selvagem, EIEC mutante e EIEC complementadas. As bactérias não apresentaram diferenças em crescimento. Os experimentos foram realizados em unicata e em dois dias diferentes.

5. Cinética de invasão bacteriana e viabilidade das células HeLa após a invasão.

Com o intuito de se conhecer a capacidade invasora das cepas bacterianas, foi realizada uma cinética de invasão bacteriana em células HeLa. Este ensaio foi realizado com o propósito de escolher um tempo de infecção adequado para os estudos posteriores que utilizariam as células HeLa como hospedeira. Em um experimento piloto observamos que em células HeLa, tanto FBC124/13, SM124/13 e LCE124/13 invadiram as células humanas a partir de uma hora de infecção (Dados não mostrados). Porém, no tempo de 2,5 horas a média das bactérias internalizadas foram maiores do que no primeiro intervalo analisado, o que mostra uma quantidade de bactérias suficiente para posteriores extrações de RNA de bactérias intracelulares.

Concomitantemente a este experimento, analisamos a enzima intracelular lactato desidrogenase (LHD) que é rapidamente liberada pelas células danificadas para o sobrenadante da cultura de células. Assim, quantificamos esta enzima para verificar o quanto que as células HeLa sofriam após infecção, e foi possível observar que não ocorreu morte celular significativa em todos os tempos analisados, sendo abaixo de 5% (Dados não mostrados). Devido a esses resultados, escolhemos o tempo de 2,5 horas para ser o marco da invasão celular em células HeLa e não com 1,5 horas como foi usado em células Caco-2 (MORENO, A. C. R. et al., 2009). Desse modo, após a obtenção de todos os mutantes de EIEC, foi realizado o mesmo experimento para verificar se a mutação gênica interferiria na invasão da bactéria em células HeLa (Figura 14), assim, foi possível observar que todas as cepas analisadas invadiam as células de uma forma semelhante.

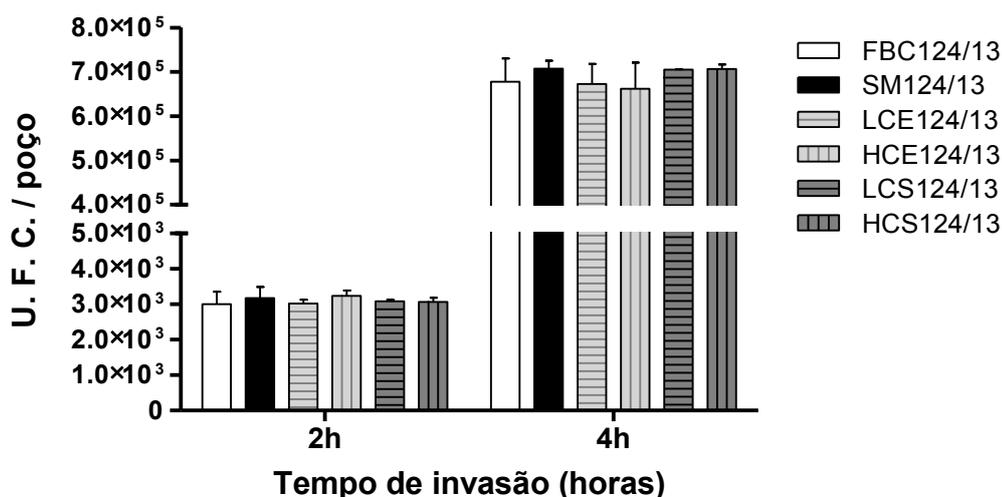


Figura 14. Invasão bacteriana em células HeLa. Células HeLa foram infectadas com 10^7 bactérias por diferentes intervalos de tempo (eixo X). As unidades formadoras de colônias (U.F.C.) (eixo Y) foram obtidas pela semeadura do lisado celular (pós-infecção) em ágar MacConkey e contagem do número de colônias crescidas após 18-24 horas de incubação em estufa bacteriológica a 37°C. Observa-se que não houve diferenças de invasão entre as cepas de EIEC. Gráfico representativo de uma média de três experimentos independentes. (Não houve diferenças estatísticas).

6. Cinética de concentração bacteriana intracelular e viabilidade das células Hela após disseminação/reinfecção.

A proposta deste ensaio foi avaliar a capacidade de disseminação de cada espécie bacteriana e sua concentração intracelular como também avaliar a integridade das células HeLa no decorrer do experimento, ao dosar o LDH da cultura celular pós-infecção. Os resultados mostram que a cepa SM124/13 causa mais morte celular do que as outras amostras (Figura 16), mesmo com um número menor de bactérias intracelulares (Figura 15). Com esses dados foi questionado se o menor número de bactérias intracelulares estaria relacionado com o seu escape extracelular ou com a sua morte devido ao aumento da morte da célula hospedeira. Para esclarecer se o menor número de bactérias intracelulares estaria relacionado

ao escape extracelular, foram analisados os sobrenadantes do experimento de disseminação/reinfecção celular apenas das cepas FBC124/13 e SM124/13, e vimos que a bactéria mutante morre com o processo de degradação da célula hospedeira (Figura 17) e não escapa para o meio extracelular.

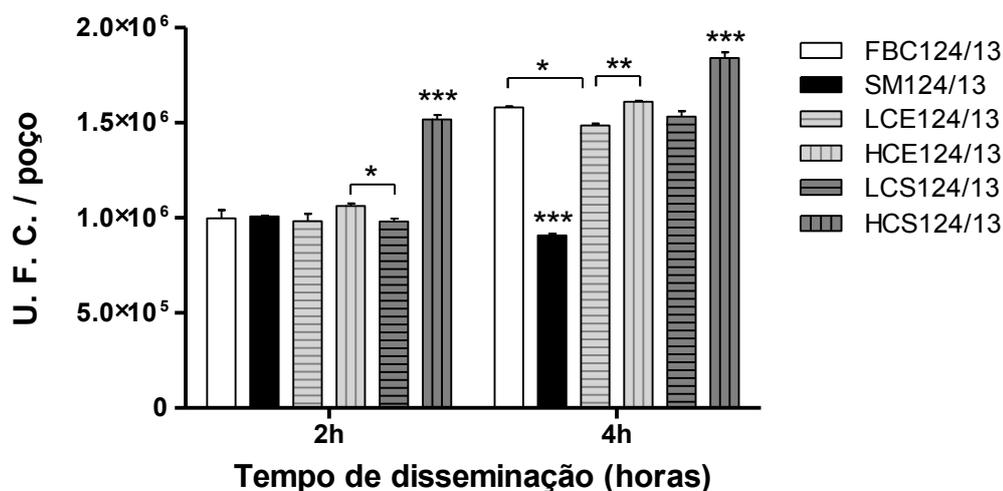


Figura 15. Concentração bacteriana intracelular em células HeLa. Células HeLa foram infectadas com 10^7 bactérias por diferentes intervalos de tempo (eixo X). As unidades formadoras de colônias (U.F.C.) (eixo Y) foram obtidas pela semeadura do lisado celular (pós-infecção) em ágar MacConkey e contagem do número de colônias crescidas após 18-24 horas de incubação em estufa bacteriológica a 37°C . Observa-se que houve diferença de concentração entre a cepa SM124/13 quando comparadas com as demais cepas. E a cepa HCS124/13 se apresentou numa concentração maior do que as outras bactérias, nos dois intervalos de tempos estudados. Gráfico representativo de uma média de dois experimentos independentes. * $p < 0,05$ (LCS124/13 versus HCE124/13), no intervalo de 2 horas; LCE124/13 versus FBC124/13 no intervalo de 4 horas; ** $p < 0,01$ (HCE124/13 versus HCE124/13); *** $p < 0,001$ (HCS124/13 versus outros nos intervalos de 2 e 4 horas; SM124/13 versus outros no intervalo de 4 horas). Análise estatística realizada pelo teste *Two Way ANOVA*.

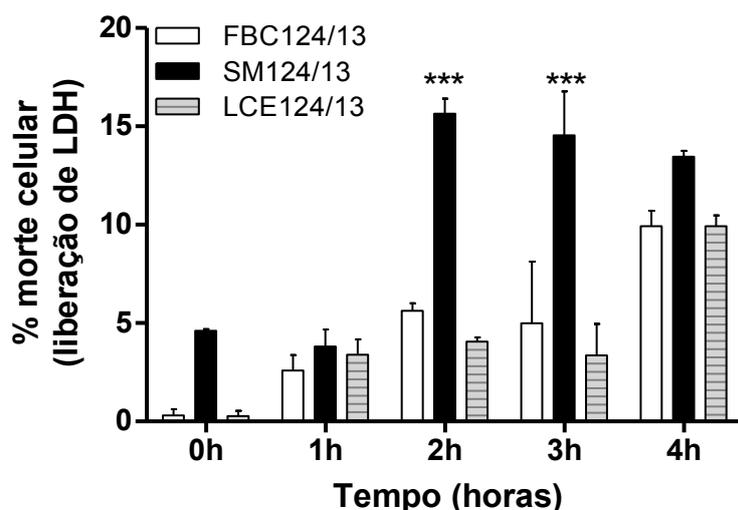


Figura 16. Análise de morte celular por dosagem de LDH. As células HeLa foram inoculadas com as bactérias por 2,5 horas. Em seguida, as células foram lavadas e deixadas em cultura por 0, 1, 2, 3 e 4 horas para disseminação bacteriana. Resultados representativos de uma triplicata de experimentos. *** $p < 0,001$ (SM124/13 versus FBC124/13 e LCE124/13 nos intervalos de 2 e 3 horas). Análise estatística realizada pelo teste *Two Way ANOVA*.

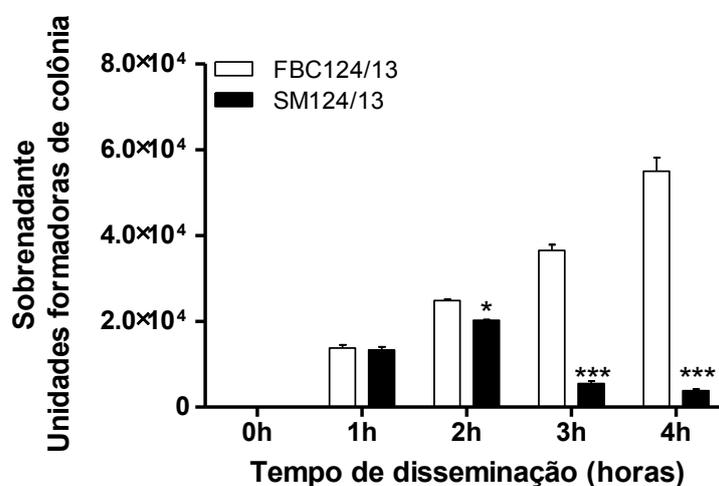


Figura 17. Análise de escape bacteriano nos períodos de disseminação em células HeLa. As células HeLa foram desafiadas com as bactérias por 2,5 horas. Em seguida, as células foram lavadas e deixadas em cultura por 0, 1, 2, 3 e 4 horas para disseminação bacteriana. Em cada intervalo foi analisada o sobrenadante, através da sementeira em ágar MacConkey. Resultados representativos de uma triplicata de experimentos. *** $p < 0,001$ (EIEC mutante versus EIEC selvagem); * $p < 0,05$ (EIEC mutante versus EIEC selvagem). Análise estatística realizada pelo teste *Two Way ANOVA*.

7. Análise da morte celular e produção de citocinas inflamatórias pelas células HeLa após infecção bacteriana por citometria de fluxo.

Devido ao aumento da morte das células HeLa causada pela infecção da cepa SM124/13, nos propomos a verificar se essa morte estaria relacionada a via de apoptose. Então, pelos resultados obtidos (Figura 18), observamos que a morte celular causada por SM124/13 não é por apoptose. Este dado nos levou a analisar o perfil de citocinas produzidas pela interação patógeno-hospedeiro. Desta forma, avaliamos a produção de citocinas inflamatórias das células infectadas com as cepas de *E. coli* FBC124/13, SM124/13, HCE124/13, HCS124/13, LCE124/13 e LCS124/13. As interleucinas pró-inflamatórias IL-8 e IL-6 foram as mais produzidas pelas células HeLa quando infectada com todas as cepas bacterianas, mas a produção causada por SM124/13 já foi maior a partir de 2 horas pós-invasão, para ambas as citocinas (Figura 19). As demais citocinas analisadas tiveram uma menor produção que o controle, no caso de IL-1 β e TNF, ou não foram detectadas.

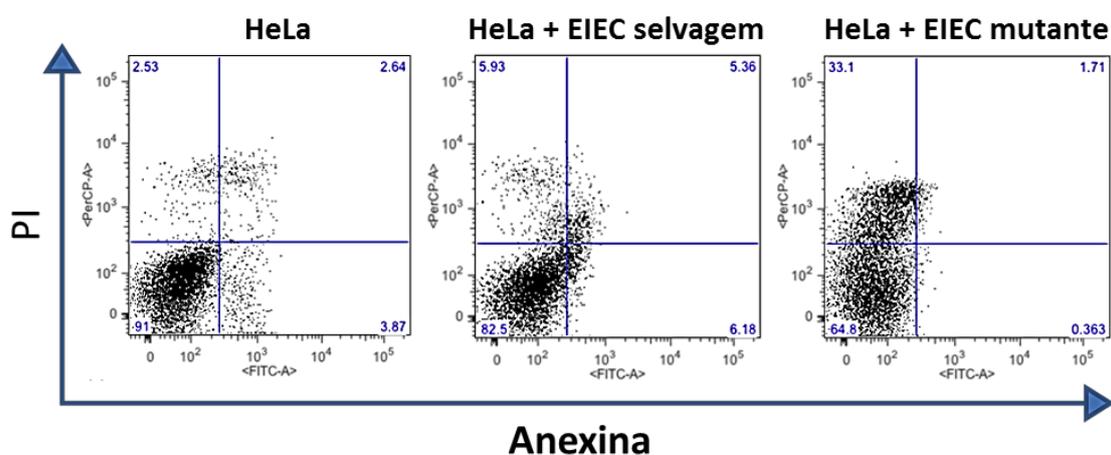


Figura 18. Análise de morte celular por FACS. As células HeLa foram desafiadas com as bactérias por 2,5 horas. Em seguida, as células foram lavadas e deixadas em cultura por 4 horas para disseminação/reinfecção bacteriana. Resultados representativo de um único experimento.

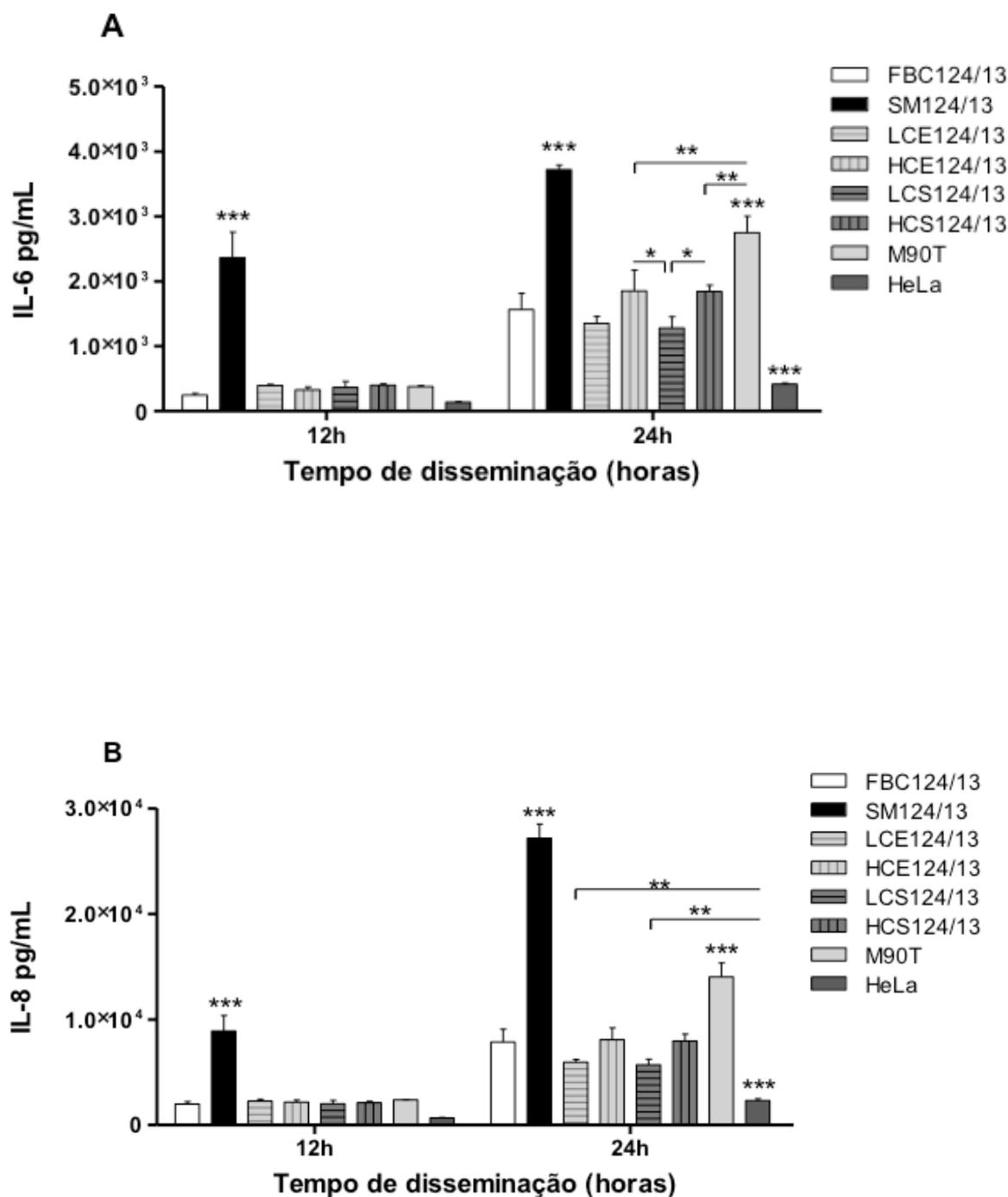


Figura 19. Produção de IL-6 e IL-8 em células HeLa desafiadas com diferentes cepas bacterianas. Níveis de IL-6 (A) e IL-8 (B) produzidos pelas células HeLa na presença das bactérias FBC124/13, SM124/13, HCE124/13, HCS124/13, LCE124/13, LCS124/13 e M90T. As citocinas foram detectadas por FACS após utilização do kit CBA. Os resultados apresentam as médias \pm DP obtidos nos diferentes tempos de infecção. O nível de significância admitido foi de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

8. Avaliação da produção das proteínas LC3/Atg8 e SQSTM1/p62 por células HeLa infectadas e confirmação da expressão proteica de LC3 através da microscopia de fluorescência.

Como sabemos da importância das proteínas LC3/Atg8 (MIZUSHIMA; YOSHIMORI, 2007) e SQSTM1/p62 (KOMATSU et al., 2007) na via autofágica, avaliamos a expressão destas proteínas através do extrato proteico após infecção bacteriana em células HeLa. Pelos resultados apresentados na figura 20, é possível observar que todas as cepas bacterianas expressam a proteína na isoforma lipídada LC3-II (16kD) e foi confirmado através da microscopia de fluorescência, no qual as células apresentam a ativação desta proteína, devido a presença de pontilhados verdes (Figura 21). Ao analisar a expressão da proteína p62, podemos observar que em todas as amostras houve a produção desta proteína, até mesmo nosso controle negativo (Figura 20), porém não podemos esquecer que a autofagia é um processo comum de homeostasia da célula, favorecendo a presença de p62 em células não infectadas.

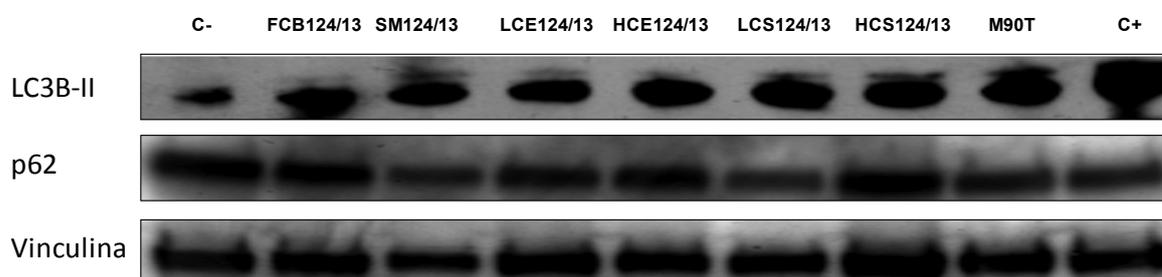


Figura 20. Reconhecimento da proteína LC3-II por *Western blot*. Durante o processo autofágico ocorre a conversão da forma citoplasmática da proteína LC3 (LC3 I – 18 kDa) para a forma lipídada (LC3 II – 16 kDa). Essa conversão da proteína é uma das formas para a análise e quantificação do processo autofágico. Devido a isso, analisamos o extrato proteico da disseminação das cepas bacterianas, após 2,5 horas de invasão em células HeLa. Como controle positivo para LC3 utilizamos células HeLa em contato com Bafilomicina (16 μ M) e como controle negativo utilizamos apenas células HeLa.

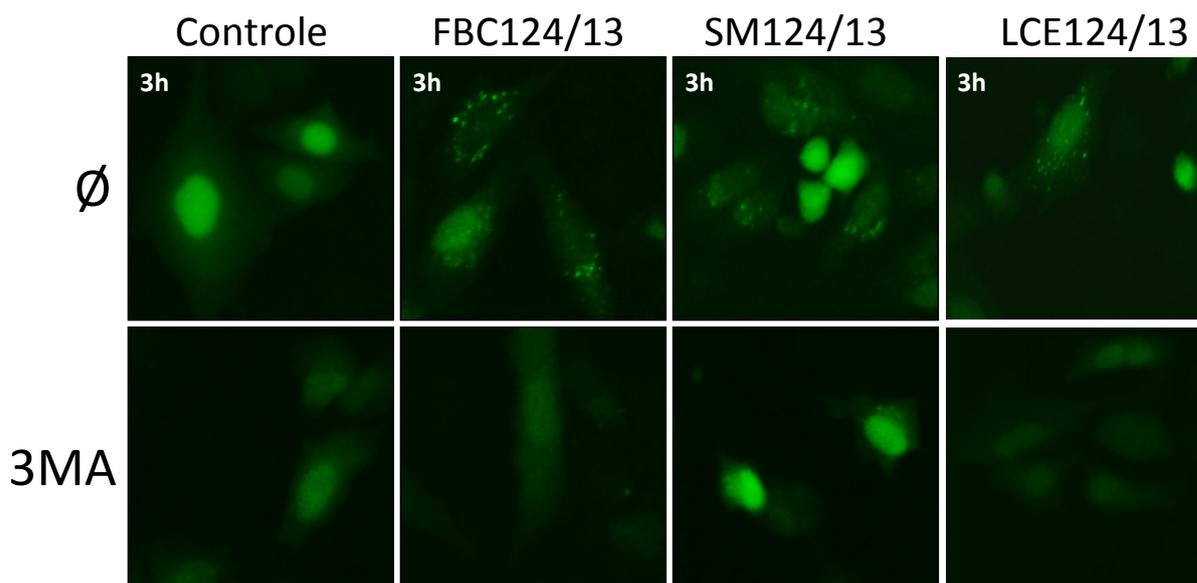


Figura 21. Células HeLa com LC3 fusionado a GFP. Após o ensaio de transfecção através do Lentivírus, obtemos células HeLa fusionada com GFP para LC3. E com os ensaios de infecção com as cepas FBC124/13, SM124/13 e LCE124/13 foi possível observar a presença da proteína LC3 ativa através da microscopia de fluorescência.

9. Análise de vacúolos por microscopia eletrônica de transmissão.

Como o “padrão ouro” para confirmação do processo autofágico é a visualização da dupla membrana que ocorre quando forma o autofagossomo, analisamos as imagens obtidas pela MET após a infecção celular das cepas FBC124/13, SM124/13, LCE124/13 e HCE124/13. Observamos que todas as bactérias se encontram livres no interior da célula, porém a cepa SM124/13 apresentou-se tanto na forma livre como internalizada em uma membrana citoplasmática (Figura 22).

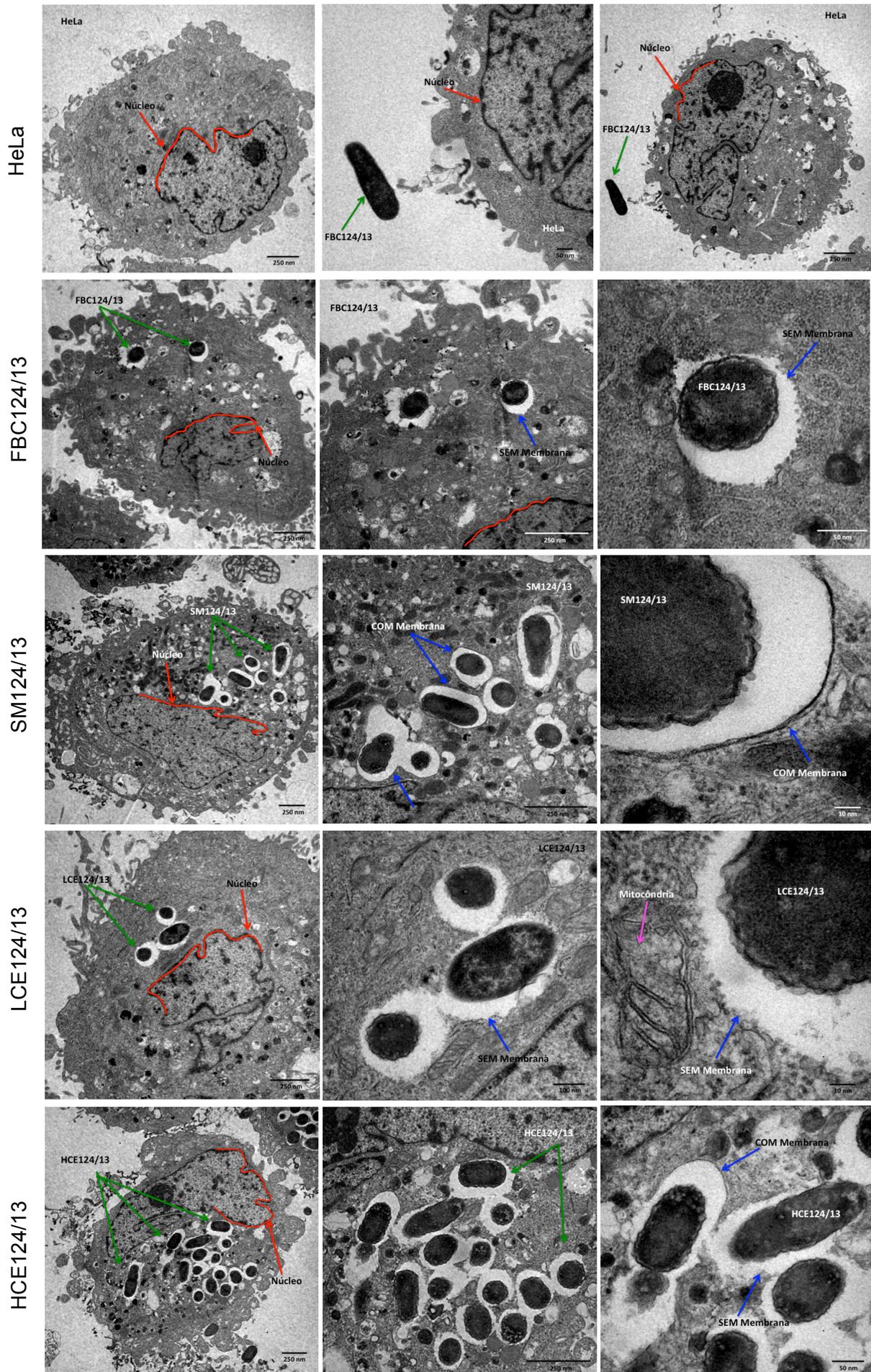


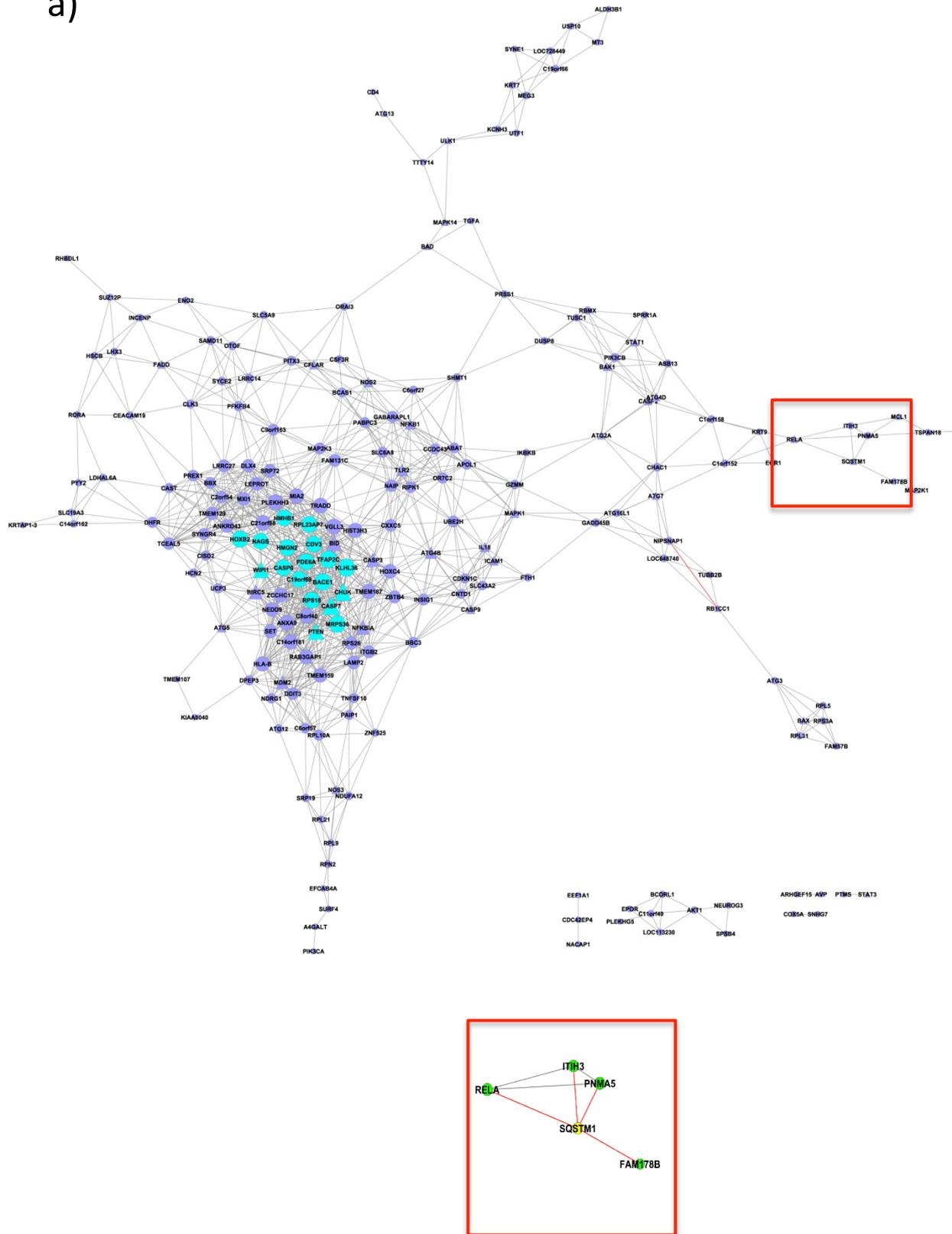
Figura 22: Microscopia eletrônica de transmissão após infecção bacteriana em células HeLa.

10. Genes em redes de interação transcricional, diferencialmente expressos, em células Caco-2 infectadas ou não com EIEC e *S. flexneri*.

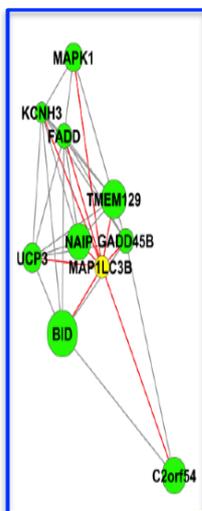
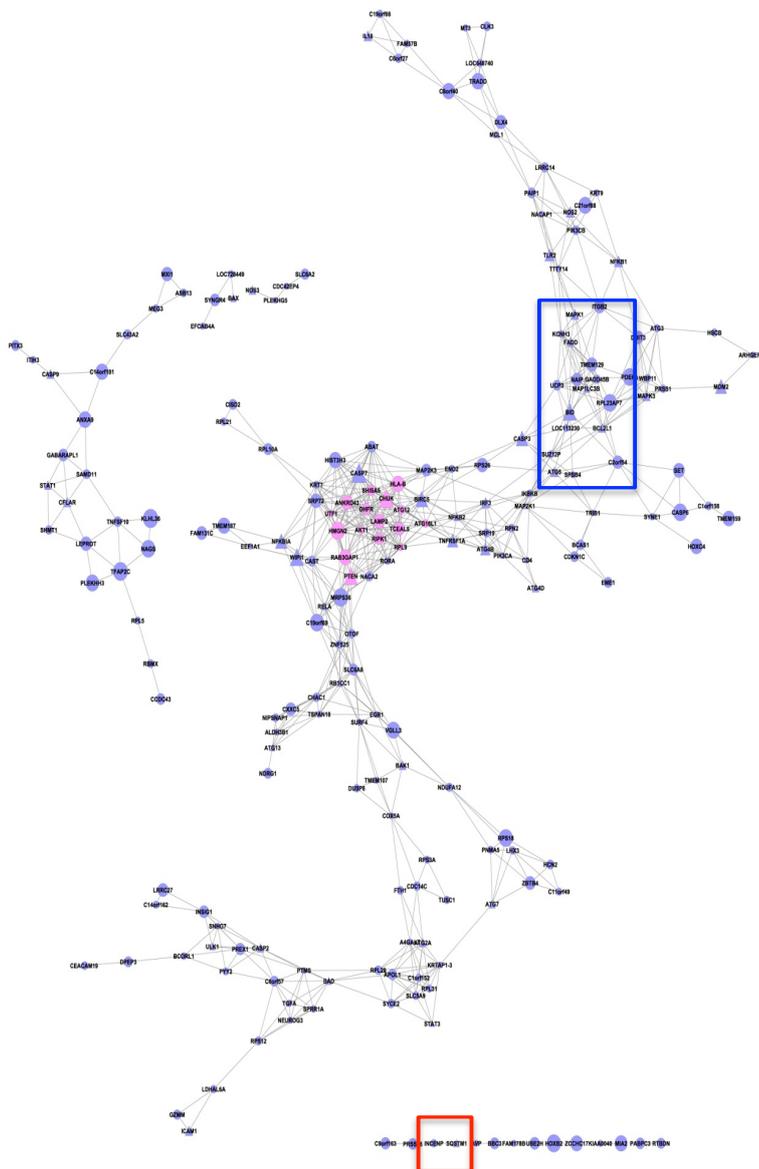
Pela técnica de *microarray*, foi possível analisar as redes formadas entre os genes transcritos das células Caco-2 após infecção com EIEC e *S. flexneri*, em diferentes intervalos de tempo (0, 1 e 2 horas de disseminação) e podemos afirmar, que há diferenças importantes no perfil das redes de interação transcricional dos genes expressos de células Caco-2, após infecção de cada bactéria, ou seja, a célula hospedeira responde, na transcrição de seus genes, de forma diferente em cada espécie bacteriana (Figura 23). Em cada grupo analisado foi enfatizado apenas os genes ligados à expressão das proteínas LC3/Atg8 e SQSTM1/p62, relacionadas ao processo autofágico. Na figura 24, podemos observar que os genes *atg*, em células Caco-2, tiveram uma maior ligação com outros genes da rede, quando desafiadas com EIEC, principalmente no intervalo de 2 horas pós-invasão.

Caco-2

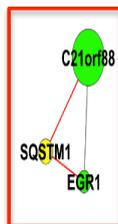
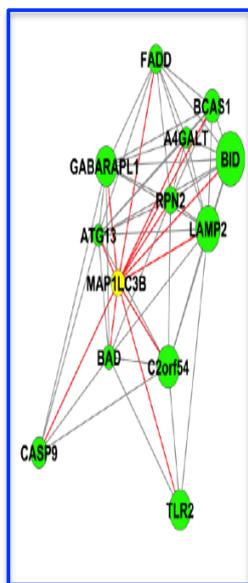
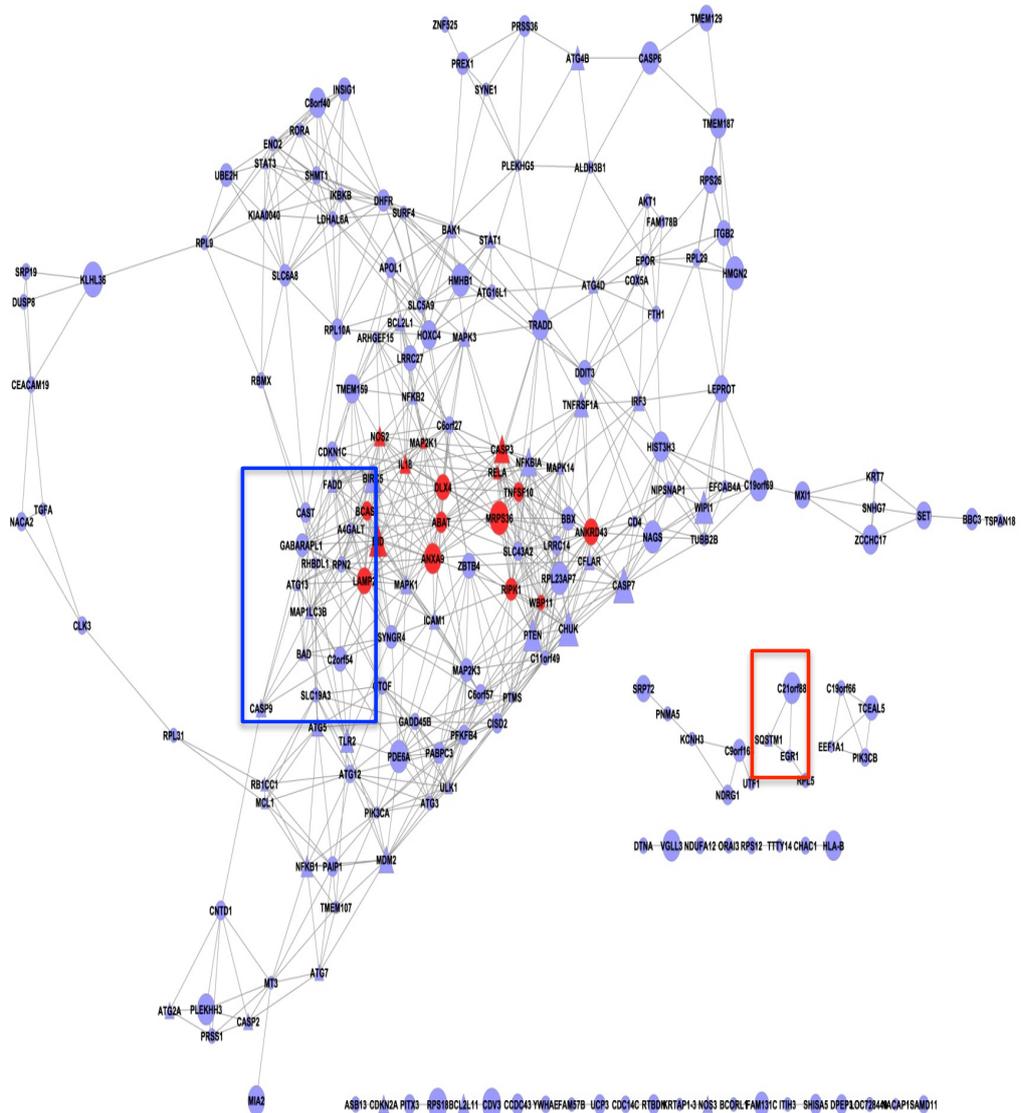
a)



b)

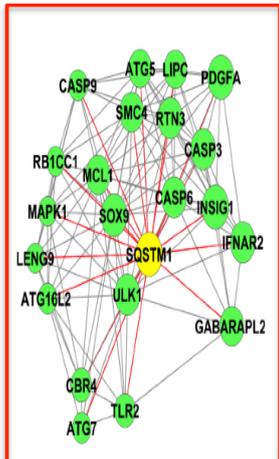
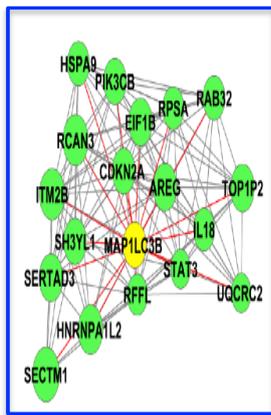
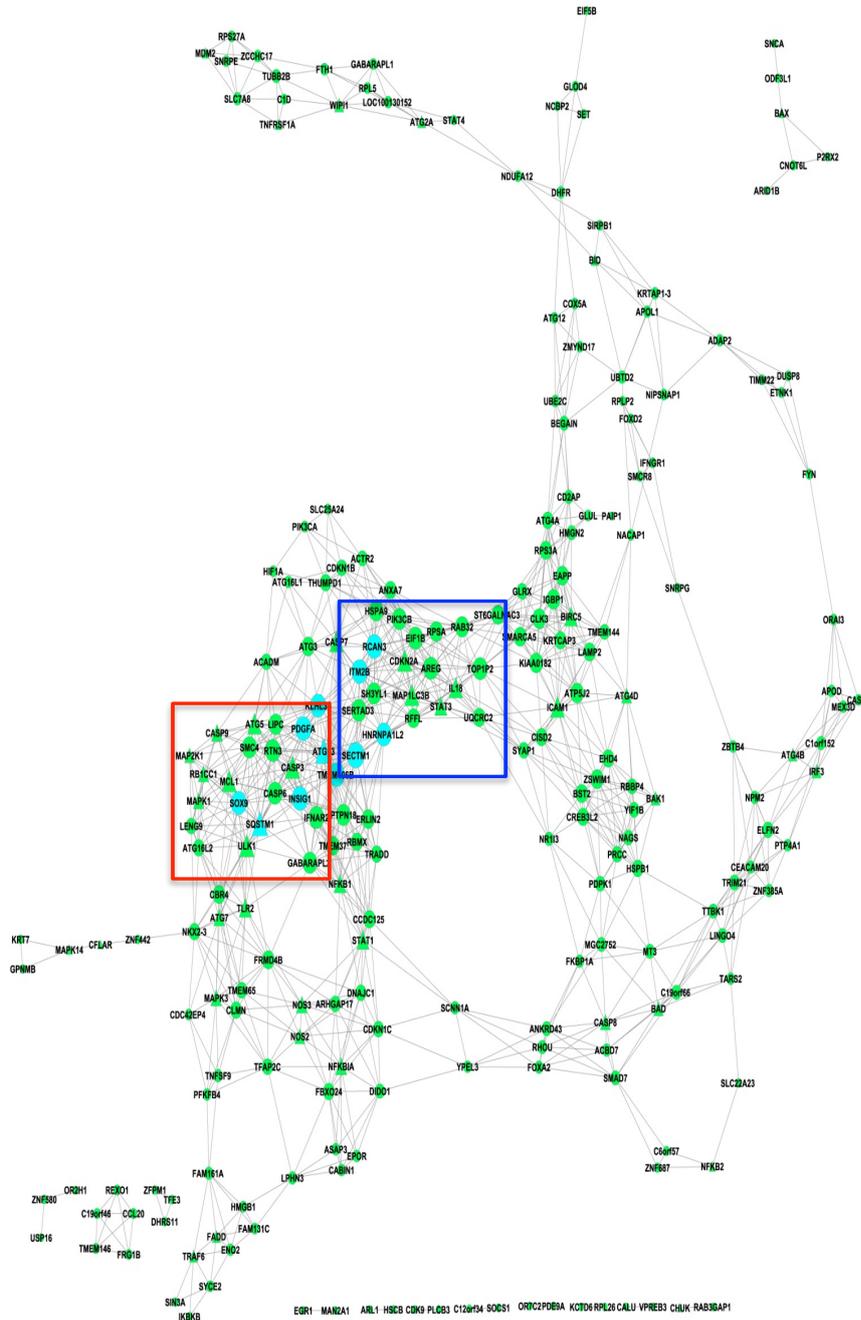


c)

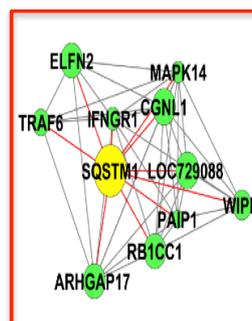
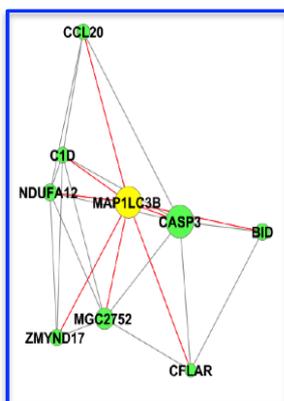
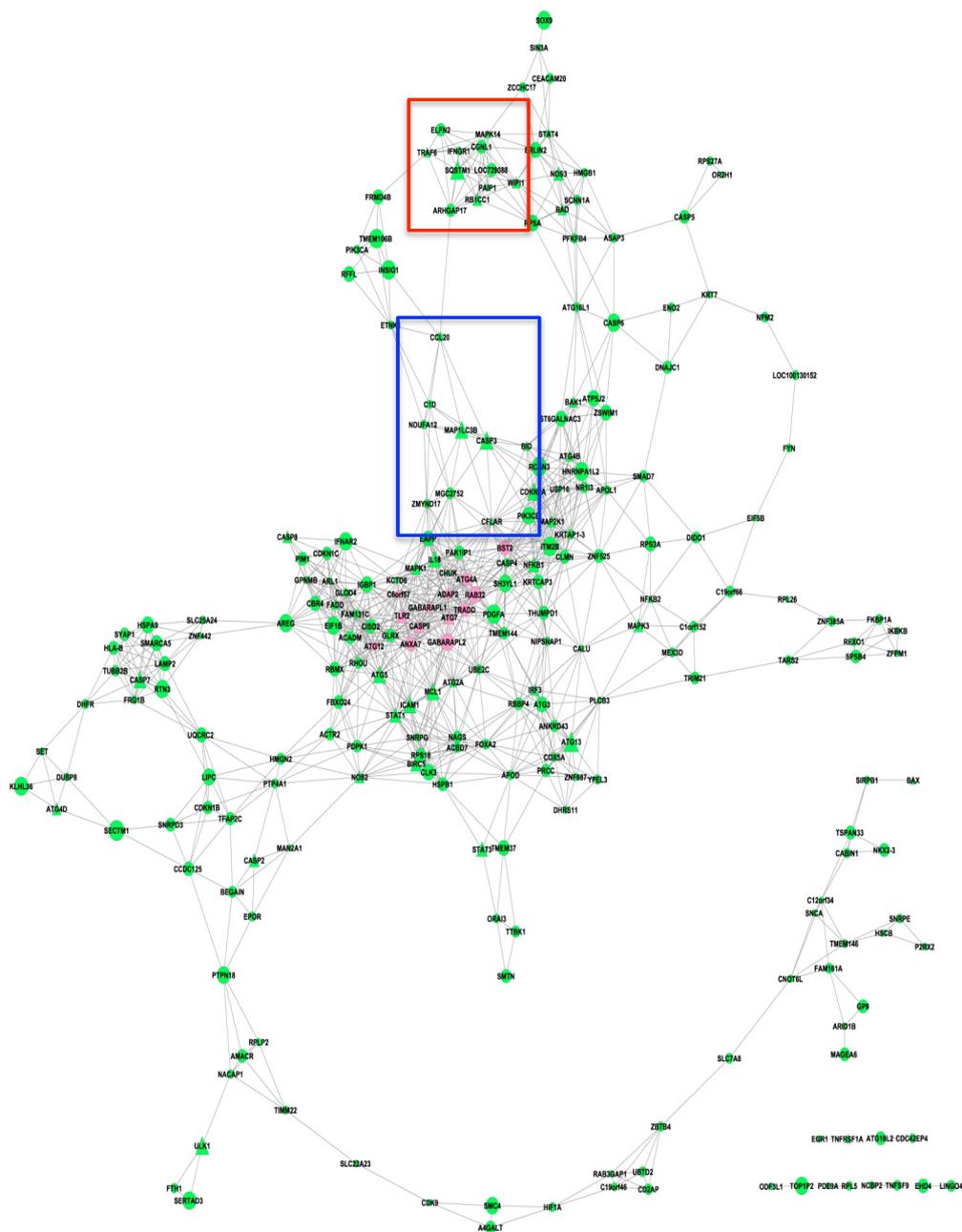


Caco-2 infectada por EIEC

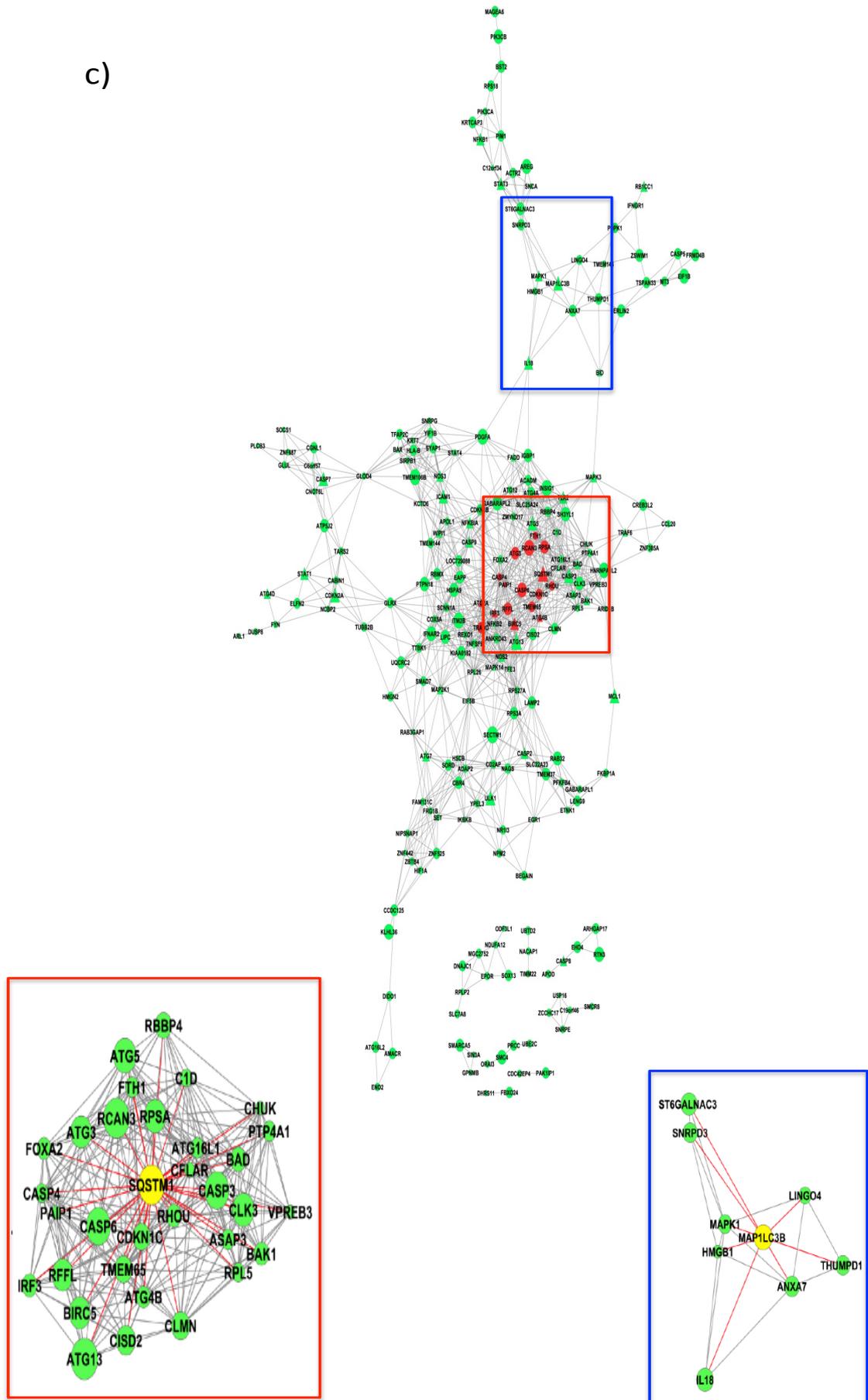
a)



b)

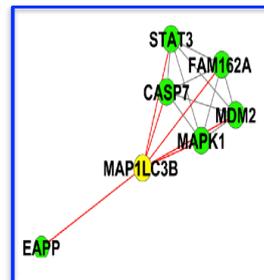
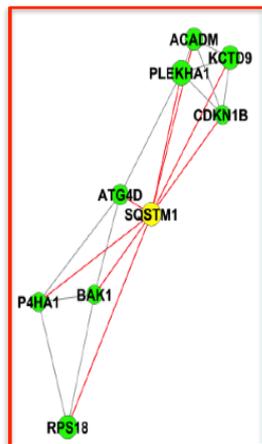
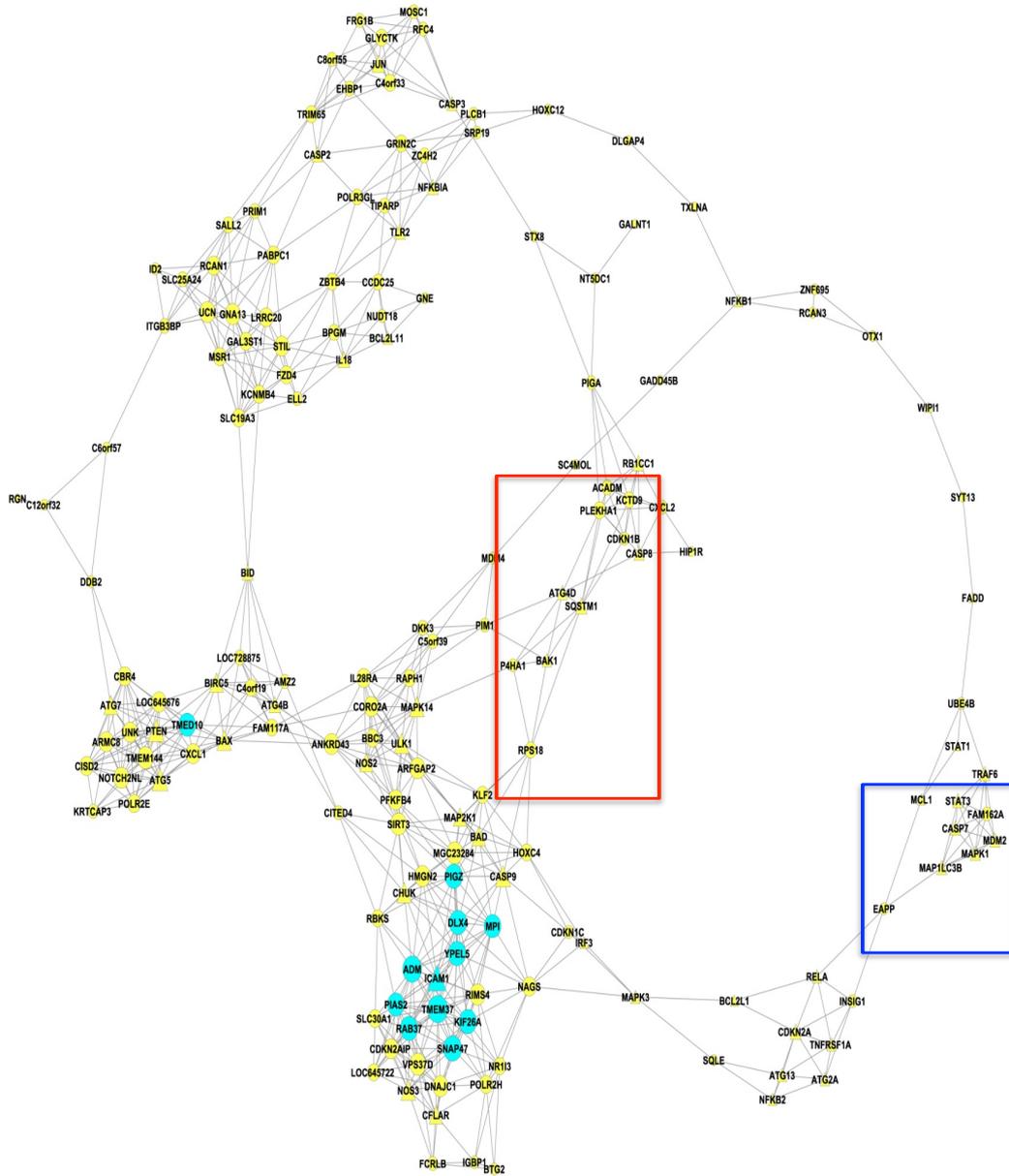


c)

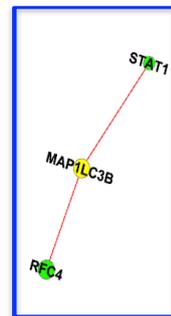
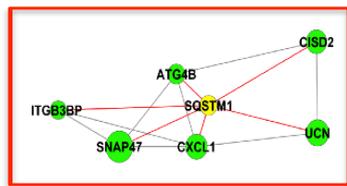
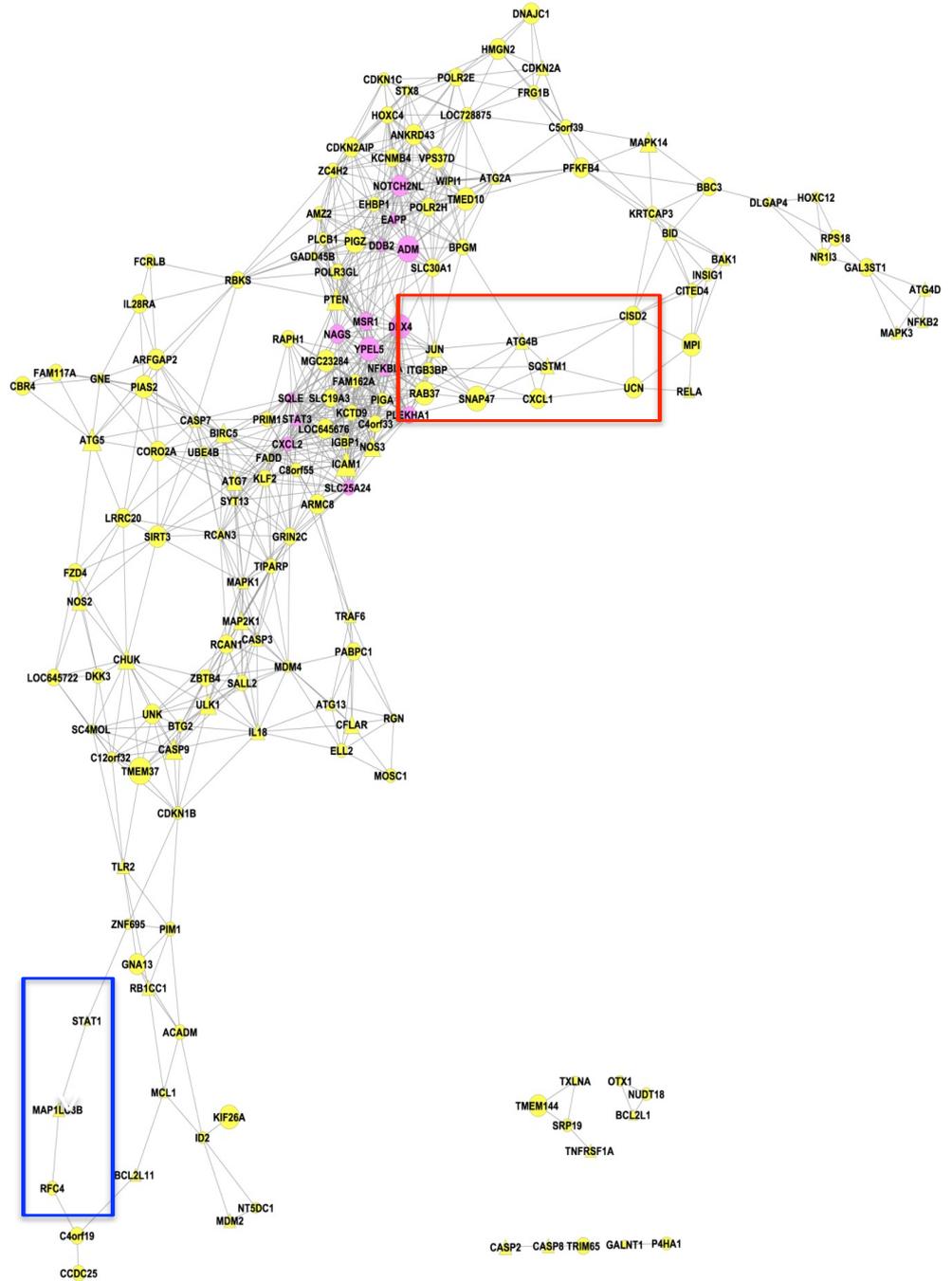


Caco-2 infectada por *Shigella*

a)



b)



c)

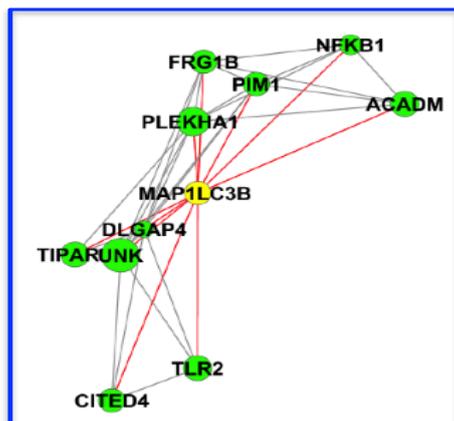
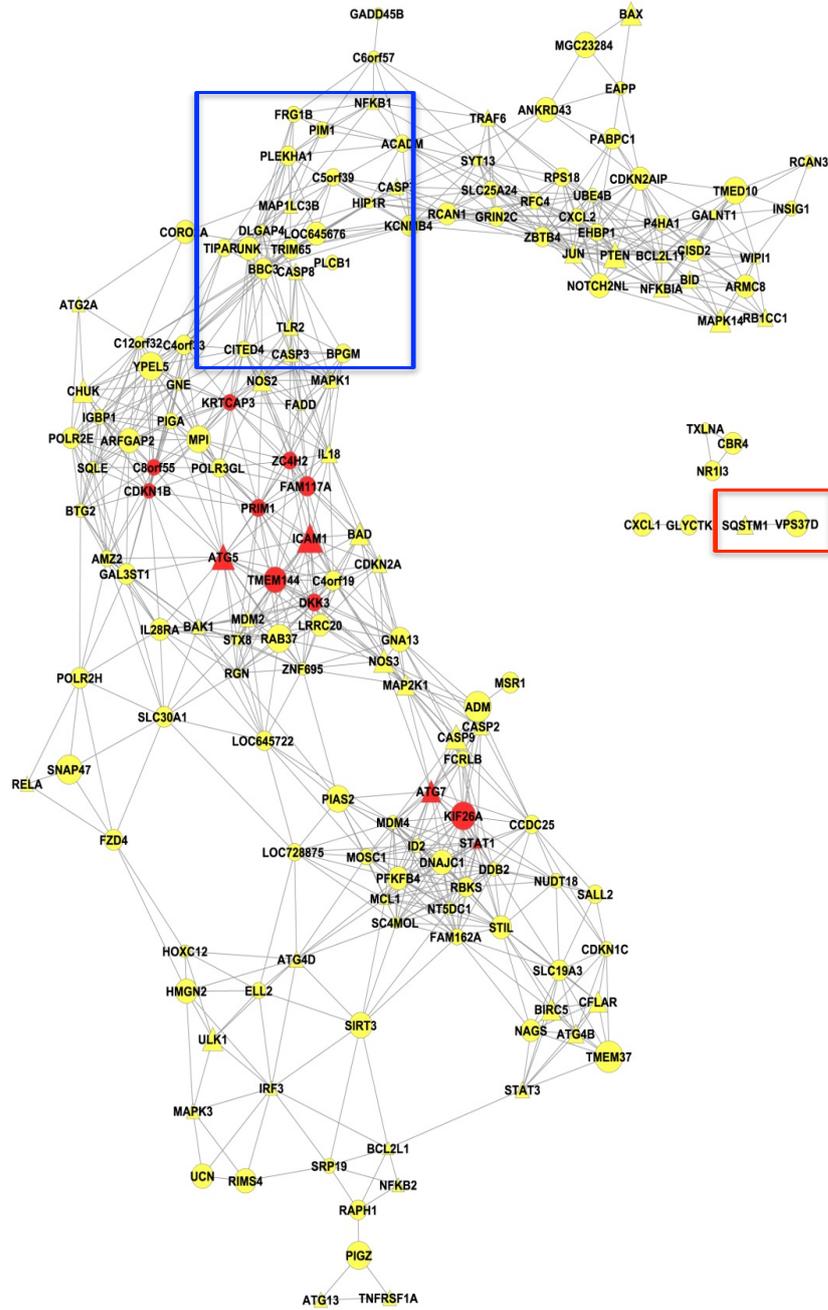


Figura 23. Redes de interação transcricional de genes de Caco-2 após disseminação de EIEC e M90T. (a) após 1h30 de invasão ou 0h de disseminação; (b) após 1h de disseminação; (c) após 2h de disseminação. O tamanho dos nós corresponde ao *node degree* de cada gene da rede 'tempo zero' (1h30 de invasão) e propagadas para as redes 1 e 2 horas após a invasão. Esta visualização permite acompanhar os genes mais conectados no início do processo de infecção e onde e com quem estarão conectados ao longo do tempo. O nó de forma geométrica triangular corresponde aos genes de interesse incluídos (inflamação, morte celular e autofagia). Rede de cor lilás refere-se ao grupo Caco-2. Rede de cor verde refere-se ao grupo Caco-2 + EIEC. Rede de cor amarela refere-se ao grupo Caco-2 + *Shigella*. As cores diferenciadas dos nós indicam os *hubs* selecionados para cada rede: azul celeste para 0h, rosa para 1h e vermelho para 2h. O quadrado Vermelho refere-se a localização do gene SQSTM1 e o quadrado Azul refere-se a localização do gene MAP1LC3B (LC3) na rede de cada tempo. Programa utilizado para essa análise foi o Cytoscape v. 2.8.2.

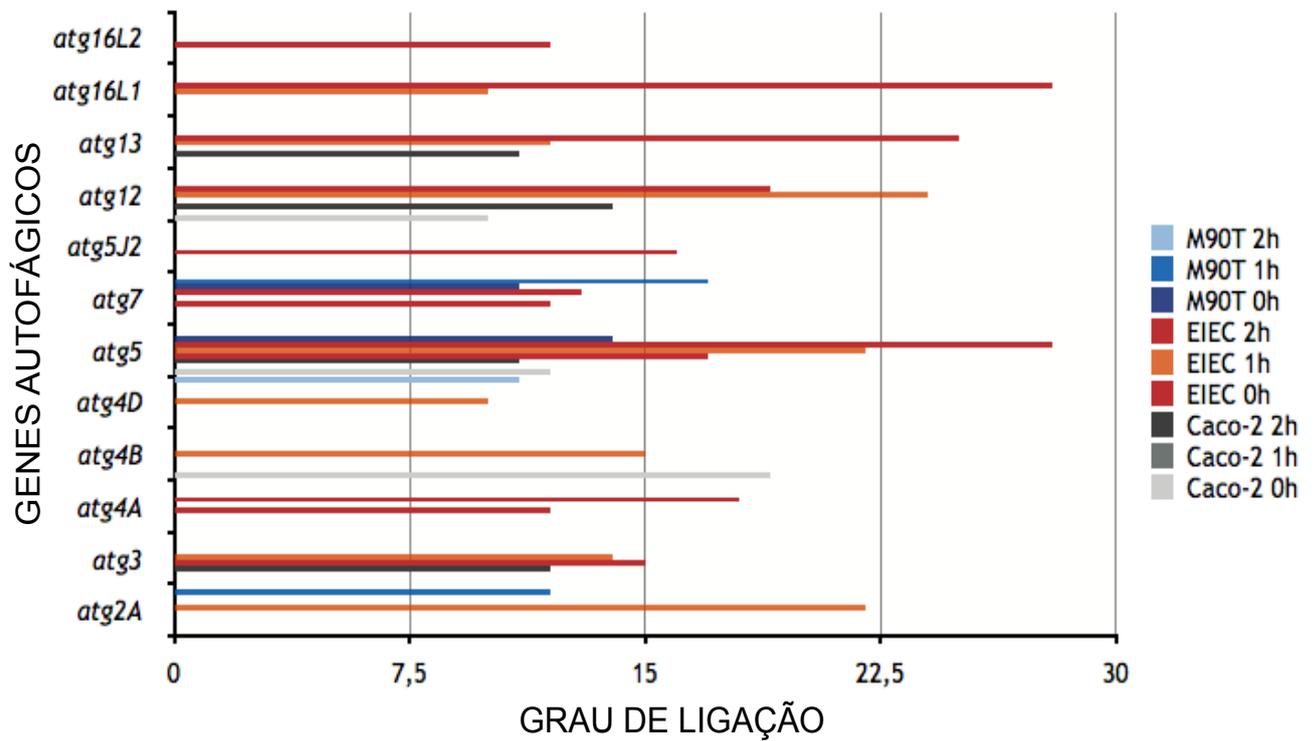


Figura 24. Análise de interação transcricional gênica por *microarray*, com foco nos genes autofágicos (*atg*). Após 1h30 de invasão ou 0h de disseminação; 1h de disseminação e 2h de disseminação, todos os grupos analisados obtiveram um grau de ligação com outros genes transcritos na rede. Quanto mais ligação o gene tiver, mais importante se apresenta na rede.

V. Discussão

O citoplasma das células intestinais é um nicho replicativo para bactérias invasoras. Ali, a bactéria é protegida das células do sistema imune presente no meio extracelular. Porém, alguns microrganismos necessitam escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro e se preparar para disseminar para novos nichos de replicação (YANG et al., 2014). Sua sobrevivência intracelular e a disseminação para as células adjacentes dependem de mecanismos utilizados pela bactéria para se mover através da polimerização de actina (GOUIN et al., 2005; STEVENS et al., 2006). A autofagia, um importante mecanismo utilizado na homeostasia das células hospedeiras, vem sendo estudado com a finalidade de conhecer o papel deste fenômeno no controle de uma possível infecção (CHANG, S. Y. et al., 2013; OGAWA et al., 2003).

A autofagia relacionada ao reconhecimento de patógenos intracelulares é denominada Xenofagia, sendo este um importante fenômeno a ser estudado para que a doença bacteriana seja melhor compreendida (CEMMA; BRUMELL, 2012). Embora a autofagia seja um mecanismo bem estudado, surpreendentemente a xenofagia é um novo fenômeno observado na remoção de patógenos intracelulares após invasão na célula hospedeira (BAUCKMAN et al., 2015). Esse termo vem de “xeno” que quer dizer estrangeiro (de fora), diferente de “auto” que significa próprio. Assim, a xenofagia refere-se à degradação de algo que vem de fora, de um invasor, uma denominação excelente para classificar a relação entre as células hospedeiras e microrganismos invasores (BAUCKMAN et al., 2015).

Pela importância desta relação patógeno-hospedeiro, a necessidade do presente estudo se dá pela carência de conhecimento a respeito da patogenicidade de EIEC. Apesar da sua semelhança bioquímica e genética com *Shigella* sp, observa-se que EIEC é menos patogênica (BANDO et al., 2010; DUPONT, H. L. et

al., 1971; MORENO, A. C. et al., 2012) e tem uma menor disseminação quando em contato com células intestinais (MORENO, A. C. R. et al., 2009). Estudos relacionados com o sistema autofágico contra a invasão por *S. flexneri* nas células eucarióticas tem sido bem estudados (CAMPBELL-VALOIS et al., 2015; OGAWA et al., 2003). De acordo com estes estudos, *S. flexneri* escapa do processo autofágico impedindo sua degradação. Contudo, quando a bactéria não produz a proteína IcsB, ela se torna susceptível ao reconhecimento pelas proteínas autofágicas, sendo degradada e conseqüentemente ocorre uma menor disseminação entre as células eucarióticas (OGAWA et al., 2005).

Devido à importância de IcsB na patogênese de *Shigella*, estudo sobre possíveis diferenças na estrutura dessa proteína de EIEC foram realizados. 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 (MORENO, A. C. R., 2007; SANTOS, 2012). Não se pode afirmar que essa mudança conformacional seja significativa em relação à atividade proteica (SANTOS, 2012). Porém, mostram que há polimorfismos no *icsB* de EIEC, o que poderia gerar uma proteína diferente, favorecendo o reconhecimento das proteínas autofágicas e conseqüentemente a degradação bacteriana.

Dada a importância da função do gene *icsB* na proteção bacteriana contra as proteínas autofágicas, nosso primeiro objetivo foi a obtenção de uma cepa de EIEC mutante que não expressasse IcsB (SM124/13). Após o sucesso na mutação, cepas complementares foram geradas. Nos ensaios fenotípicos realizados, observou-se que as alterações encontradas na cepa SM124/13 foram restabelecidas nas cepas

complementadas e não causaram mudanças no seu crescimento exponencial (Figura 13).

Para comparar com os trabalhos anteriores do grupo (FERREIRA, 2008; MORENO, A. C. R., 2007; SANTOS, 2012) todos os experimentos seriam realizados em células Caco-2. Encontramos, porém, dificuldade na obtenção de uma eficiente transfecção celular para a geração de células Caco-2 com LC3 fusionada ao GFP. De fato, alguns estudos mostraram que a transfecção em células Caco-2 é muito baixa e muitas das vezes ineficiente devido à produção exacerbada de muco pela célula em sua fase de diferenciação, e este muco seria um repressor para a transfecção celular (SAMBUY et al., 2005). Sabe-se que diversos estudos sobre bactérias enteroinvasoras e autofagia foram realizados em células epiteliais humanas de origem não intestinal, como por exemplo: células MDCK, Hep-2, HeLa, BHK e entre outras (GOMES; DIKIC, 2014; OGAWA et al., 2011; OGAWA et al., 2005; SUZUKI et al., 2007). Desta forma, como alternativa às dificuldades encontradas em células Caco-2, utilizamos as células HeLa (células de tumor cervical) para avaliar os mecanismos utilizados pelas cepas de EIEC na invasão e disseminação/reinfecção celular, assim como o comportamento da célula hospedeira frente a esta infecção.

Para se determinar o número de bactérias viáveis no interior das células HeLa durante o processo de disseminação bacteriana, escolhemos o tempo de 2,5 horas de pré-infecção (invasão bacteriana), que antecede os demais tempos da análise experimental. No início deste experimento, as bactérias estavam presentes na mesma concentração e, desta forma, inferimos que os estudos comparativos estavam sincronizados, já que todas as cepas não diferiram quanto à capacidade invasora nos diferentes tempos estudados (Figura 14).

A análise da disseminação bacteriana nos mostrou que nas primeiras duas horas pós-invasão, a cepa HCS124/13 mostrou uma maior concentração intracelular quando comparada com as demais cepas bacterianas. De fato, a cepa HCS124/13 apresentou um fenótipo de disseminação bacteriana mais eficiente em ensaio de placas de lise (dados não mostrados) em relação a todas as outras cepas, inclusive a cepa HCE124/13. A cepa LCS124/13 apresentou um perfil de disseminação semelhante à cepa HCE124/13 (Figura 15). Nossos resultados trazem à luz não apenas a importância da eficiência da transcrição de *icsB*, como também mostram pela primeira vez a importância da sequência de nucleotídeos deste gene, uma vez que mesmo a cepa HCE124/13, ou seja, complementada com *icsB* de EIEC em um plasmídeo de alto número de cópias, apresentou diferença no potencial de disseminação bacteriana em relação à cepa HCS124/13 (complementada com *icsB* de *S. flexneri* em um plasmídeo de alto número de cópias). Os dados obtidos no presente trabalho nos levam a propor que não só a quantidade, mas também a estrutura da proteína IcsB de EIEC contribuem para sua menor disseminação, observada por Moreno et al., 2009 e Santos 2012.

Sabe-se que o processo de disseminação bacteriana está envolvida na fisiopatologia da doença desencadeada por *Shigella* e EIEC, e leva a danos epiteliais devido à destruição celular (MORENO, A. C. R. et al., 2009; PARSOT, 2005). Desta forma, foi também avaliado a viabilidade das células HeLa durante uma cinética de disseminação/reinfecção entre as bactérias FBC124/13, SM124/13 e LCE124/13. O perfil de citotoxicidade de FBC124/13 e LCE124/13 foi dependente do tempo, ou seja, quanto maior o tempo de exposição da monocamada celular às bactérias, maior foi o dano causado. Os resultados para SM124/13 foi significativamente diferente a partir do tempo de duas horas, onde desencadeou

mais danos às células HeLa do que as cepas selvagem (FBC124/13) e LCE124/13 (Figura 16). O ápice da morte celular (16,5%) induzida por SM124/13 foi a partir de duas horas pós-invasão, ao passo que para as demais cepas foi em quatro horas (10,5%). Estes resultados foram surpreendentes, pois esperava-se que independente do tempo de exposição, FBC124/13 provocaria mais danos às células HeLa do que SM124/13, já que esta apresentava-se em menor concentração no interior das células eucarióticas, e quando restabelecido o gene *icsB* na cepa mutante, LCE124/13 se apresentou de forma similar no comportamento da cepa selvagem (FBC124/13) (Figura 16). Diante desses resultados, analisamos a morte celular induzida por SM124/13 e observamos que esta cepa induziu 30% de morte celular por via independente de apoptose (Figura 18), sendo esta morte intensamente inflamatória, acompanhada de uma exacerbada produção das citocinas IL-6 e IL-8 (Figura 19).

Ao se ter o aumento das interleucinas na infecção por SM124/13, pode-se sugerir um mecanismo de regulação da resposta inflamatória ainda desconhecido, mediado por *icsB*. De fato, não há dados na literatura que façam alguma correlação entre *IcsB*, IL-6, IL-8 e morte da célula eucariótica. Nossos dados mostram que a proteína *IcsB* é um importante fator de virulência que quando pouco expresso ou ausente, facilita o reconhecimento de EIEC pela célula hospedeira. Mais ainda, além de competir com Atg5 e camuflar a presença do patógeno intracelular, observou-se um papel que até o momento não tinha sido descrito. O *IcsB* em EIEC pode atuar na regulação da resposta inflamatória induzida em células HeLa, promovendo uma perturbação intensa na homeostase da célula hospedeira quando não expresso.

Já é conhecido que a autofagia também é uma rota alternativa para morte celular (LEFRANC et al., 2005) quando causada por patógenos (SHI et al., 2012). A

ativação exacerbada deste processo leva a desestruturação da homeostasia da célula hospedeira, levando-a a morte. As proteínas autofágicas podem estar relacionadas com a resposta imune inata e adaptativa, bem como as proteínas efetoras liberadas durante a infecção por patógenos (LEVINE, B.; MIZUSHIMA; VIRGIN, 2011).

Na imunidade inata, há um sinergismo entre os receptores de reconhecimento padrão (PRR's) e receptores de perigo para a detecção de agentes patogênicos. PRR's, tais como os receptores toll-like (TLR's), ligam-se aos chamados padrões moleculares associados a patógenos (PAMP's), que são ligantes microbianos evolutivamente conservados e essenciais para a viabilidade microbiana. Portanto, PRR's podem detectar diretamente a presença de microrganismos. Receptores de perigo, como os inflamassomas, detectam a presença de microrganismos indiretamente através dos distúrbios sensoriais na homeostase da célula hospedeira, tipicamente causada por infecções, tais como a liberação citocinas, espécies reativas de oxigênio e alarminas (BOYLE; RANDOW, 2013). Estudos sobre autofagia relacionados à resposta imunológica na sinalização inflamatória tiveram um grande avanço, porém muitas dúvidas ainda precisam ser esclarecidas sobre esse mecanismo de autodefesa na imunidade celular (LEVINE, B. et al., 2011).

Assim, ao ter como hipótese de que a cepa mutante em *icsB* está mais exposta ao reconhecimento pela célula hospedeira e, uma vez que a bactéria está dentro da célula há a ativação de sinais de perigo, como a ativação dos inflamassomas e/ou reconhecimento do processo autofágico. Iniciamos o estudo autofágico pelas análises das proteínas LC3/Atg8 e p62/SQSTM1. Na qual p62 é importante no reconhecimento de organelas e/ou proteínas a serem degradadas, e em alguns estudos foram vistos que podem reconhecer a bactéria no interior do

citoplasma (MURROW; DEBNATH, 2013). Assim, ela se liga diretamente à LC3/Atg8 (presentes na membrana externa e interna do autofagossomo) através da região de interação, denominada por sequência de reconhecimento LC3 (LRS – *LC3 recognition sequence*). Essa ligação da p62 com LC3 permite que os componentes sejam envolvidos totalmente, formando assim o autofagossomo. Em seguida, a proteína Atg4 entra em ação clivando a LC3 citoplasmática que resulta em LC3-I, enquanto o complexo Atg3 e Atg7 lipida LC3-I em LC3-II. Como LC3-II se liga ao autofagossomo, ele é usado como um marcador de autofagossomo (WINCHELL et al., 2016). Nossos resultados mostraram que em todas as cepas estudadas, incluindo *Shigella*, ocorreu a lipidação da proteína LC3-I para LC3-II, bem como a produção de p62 (Figura 20). A presença da proteína LC3 foi confirmada após infecção em células HeLa marcadas com GFP (Figura 21).

Estudos recentes têm revelado diferentes processos para a degradação do patógeno no interior de fagossomos (JO et al., 2013). Após a bactéria ser fagocitada, ao redor dela forma uma membrana celular, denominada fagossomo, este pode seguir vias distintas: (1) o fagossomo se funde diretamente com os lisossomos; (2) o fagossomo é sequestrado pelo autofagossomo, formando uma dupla membrana, seguido por fusão com os lisossomos e assim, ambas as vias degradam o invasor (BAUCKMAN et al., 2015; WINCHELL et al., 2016) (Figura 25). Além, destas duas vias, há uma outra via, recentemente descoberta, denominada LAP (fagocitose associada a LC3), que consiste no recrutamento da LC3 diretamente no vacúolo recém formado, contendo a bactéria durante sua entrada na célula eucariótica (CAMPBELL-VALOIS et al., 2015), e em seguida se funde com lisossomos para ocorrer a degradação bacteriana.

Curiosamente, na macro autofagia, após degradação do autolisossomo a LC3-II do citosol é degradada e reciclada, voltando para a forma de LC3-I e reutilizada, enquanto LC3-II a partir do lado luminal é somente degradada (GLICK et al., 2010; BAUCKMAN et al., 2012), e ao contrário da macro autofagia, em LAP a LC3-II presente no citosol não é reciclada após a degradação da membrana celular formada pela fagocitose (CAMPBELL-VALOIS et al., 2015).

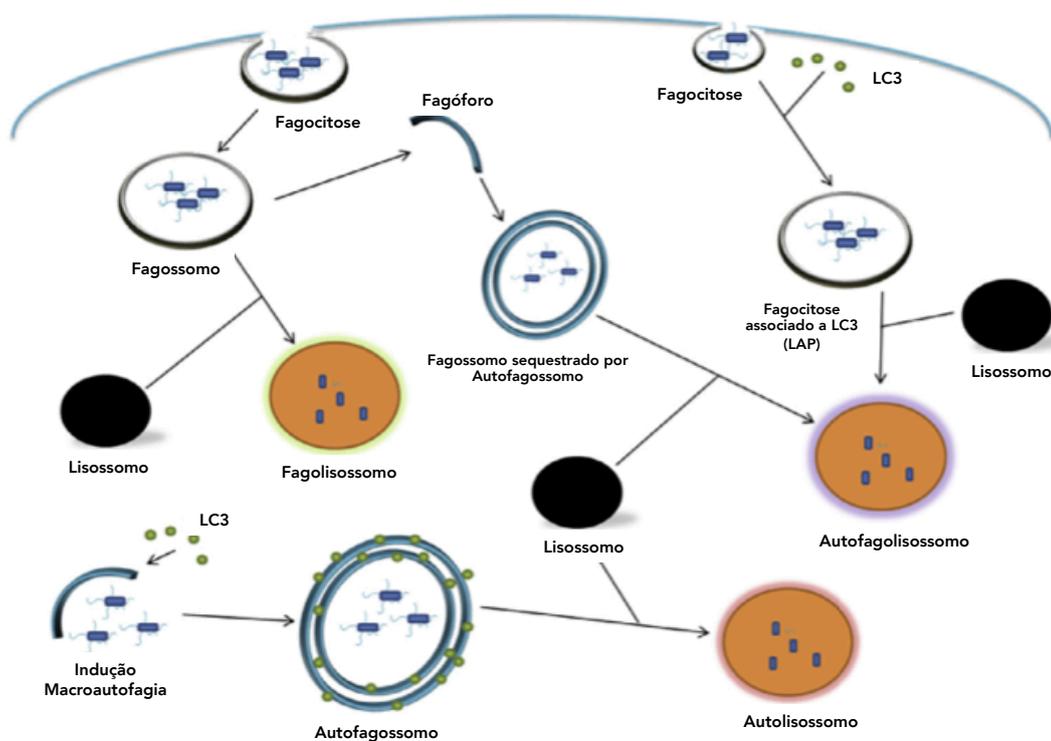


Figura 25. Modelo representativo de múltiplas vias de degradação bacteriana (BAUCKMAN et al., 2015).

Assim, em termos de patógenos intracelulares, é importante considerar que o aumento da LC3-II pode servir como uma pista falsa em estudos autofágicos. Uma série de estudos têm mostrado uma forma não-canônica da autofagia que pode ocorrer após a invasão de agentes patogênicos através da fagocitose (MOSTOWY; COSSART, 2012). Dessa forma, é importante elucidar a forma exata da xenofagia

para qualquer agente patogênico selecionado, onde é necessário o envolvimento autofagossomal, que pode ser confirmada ou excluída com base na participação das proteínas reguladoras a montante e a jusante da via (ver Tabela 1) ou através da sua visualização. Por isso, concluímos que para a confirmação do processo de xenofagia estar ativo no controle da infecção por EIEC, deveríamos observar o autofagossomo, que consiste na dupla membrana, através da microscopia eletrônica (CAMPBELL-VALOIS et al., 2015).

Ao visualizar as imagens, a cepa mutante em *icsB* (SM124/13) apresentou estar mais retida em membranas citoplasmáticas, porém não na forma de um autofagossomo, ou seja, envolta em uma dupla membrana (Figura 22). Neste caso, não podemos afirmar se é apenas uma única membrana ou a fusão do lisossomo com o autolisossomo. É importante notar que é difícil distinguir visualmente, o lisossomo do autolisossomo, pois ambos ficam muito densos - coloração escura - e parecem ser uma única membrana (BAUCKMAN et al., 2015). Para facilitar a distinção, a análise dos vacúolos ácidos formados pelos autolisossomos devem ser avaliados, devido a interação com os lisossomos.

Já ao observar as imagens da cepa HCE124/13, estas apresentaram-se, em sua maioria, livres no citoplasma, porém outras, aparentemente, estavam com uma parte do seu corpo envolto por uma simples membrana e outra parte livre, desta forma, não podemos afirmar, se a bactéria estava 'escapando' do envolto membranar ou se estava no processo de fechamento da membrana ao seu redor (Figura 22). Neste caso, novos estudos devem ser realizados para se avaliar a cinética da formação do autofagossomo para permitir a detecção desde o início da formação do autofagossomo, autofagossomo com sua dupla membrana e por último, a chegada dos lisossomos até o autofagossomo, na qual ocorre a fusão entre eles

formando o autolisossomo (BAUCKMAN et al., 2015).

Em estudos com *Shigella flexneri*, o recrutamento de LC3 restringe a LAP e/ou na marcação dos restos de membrana, causados após a ruptura do vacúolo, no início da infecção (BAXT; GOLDBERG, 2014). Anteriormente, alguns autores acreditavam que *Shigella* escapava do processo autofágico, porém o processo autofágico LC3-dependente dava suporte na limpeza dos restos de membrana encontrados, após ruptura do vacúolo causada pela bactéria, após ser fagocitada pela célula (DUPONT, N. et al., 2009). Recentemente, outros autores indicam que o recrutamento de LC3 é exclusivamente ao redor do vacúolo formado durante a entrada da bactéria no início da infecção, bem como na passagem de uma célula a outra, e nunca ao redor da bactéria que está livre no citoplasma (CAMPBELL-VALOIS et al., 2015). Desta forma, temos como hipótese que na infecção por EIEC, as células eucarióticas reconhecem o invasor já no início da infecção, devido a presença de LC3, sendo mais fácil para controlá-la, já que seu mecanismo de disseminação é menos eficaz do que *Shigella*, tornando sua doença mais branda.

Como ferramenta de análise da expressão gênica, a tecnologia dos micro arranjos de DNA permite a investigação de milhares de transcritos de um célula (tecido), de maneira simultânea (MOREIRA-FILHO et al., 2015). Para corroborar com os resultados do processo autofágico, analisamos os genes ativos das células Caco-2 infectadas com EIEC e *Shigella* pela técnica de *microarray*, já que o microambiente da cultura celular é complexo, onde vários parâmetros devem ser levados em conta, tal como a resposta do hospedeiro frente à infecção bacteriana.

Ao analisarmos os genes ativos das células Caco-2 infectadas com EIEC e *Shigella*, observamos que para cada grupo estudado, bem como para cada intervalo de tempo estudado entre os grupos, encontramos uma formação de redes muito

distintas. Esses dados nos mostram que a resposta da célula hospedeira frente a uma infecção por EIEC ou *Shigella* é modulada de forma distinta. Os genes que transcrevem as proteínas LC3 e p62, em cada tempo analisado, se apresentaram em graus diferentes de importância (Figura 23). Por exemplo, nas células Caco-2 infectadas por EIEC, no intervalo de 0 hora, o gene que transcreve a proteína p62 tem um grau de ligação menor do que no intervalo de 2 horas. No tempo de 2 horas ele se torna um gene Hub, ou seja, gene que além de possuir mais ligações com outros genes, é também crucial na estruturação da rede (BANDO et al., 2010; MOREIRA-FILHO et al., 2015). Tais resultados, corroboram com a importância de uma sequência elaborada de tempo para avaliar o comportamento de cada proteína estudada.

Ao dar importância aos genes autofágicos (*atg*), vimos que em todos os grupos analisados, obtivemos um grau de ligação com outros genes transcritos na rede, sendo que quanto mais ligação o gene tiver, mais importante se apresenta na rede (Figura 24). O grupo de Caco-2 infectada por EIEC, apresentou mais ligações gênicas, mostrando a importância dos genes autofágicos na infecção por EIEC.

Os genes autofágicos presentes na rede de interação após infecção por EIEC foram, *atg16L1*, *atg16L2*, *atg13*, *atg12*, *atg5J2*, *atg7*, *atg5*, *atg4A*, *atg4B*, *atg4D*, *atg3* e *atg2A*. De modo interessante, ao saber a função de cada proteína, proveniente de cada gene citado, percebemos a importância dessas proteínas em diferentes partes do processo autofágico. Por exemplo, a proteína Atg13 participa na etapa de nucleação e início da formação do autofagossomo, já a proteína Atg16L1 interage com Atg5 e Atg12, e esse complexo participa na etapa de alongação do autofagossomo, assim como as proteínas Atg4 (A-D) na fase de isolamento e oclusão completa do autofagossomo (LEVINE, B. et al., 2011).

Dentre esses genes, o *atg5* nos chama atenção, pois no intervalo de 2 horas na infecção por EIEC, apresentou mais ligações com outros genes, tornando-o importante na rede de interação. Sabendo da importância desse gene na ativação do processo autofágico (OGAWA et al., 2005), tais resultados corroborariam com a hipótese de que a infecção por EIEC seria controlada com mais facilidade pelo processo autofágico das células hospedeira.

Assim, podemos dizer que a autofagia desempenha um papel importante na homeostase celular, em resposta a invasão por patógenos, sendo fundamental para a resposta imune inata como na adaptativa. O presente estudo concentrou em um dos principais mecanismos moleculares de eliminação de patógenos invasores por células epiteliais, a autofagia. Como na estratégia desenvolvida pela bactéria para escapar deste processo. Os dados demonstram que a presença das proteínas autofágicas na infecção por EIEC podem estar relacionadas na resposta autofágica não canônica.

A autofagia não-canônica é um conceito novo e em desenvolvimento. Seu mecanismo não requer todas as proteínas de Atg ou a necessidade da formação da dupla membrana, para que o processo de degradação ocorra, e isso é potencialmente favorável em alguns casos de infecção (MOSTOWY; COSSART, 2012). Porém, na infecção por EIEC esse mecanismo foi favorável para controlar a infecção, tornando-a mais branda e auto limitante.

VI. Conclusões

- A proteína IcsB é um importante fator de virulência que quando pouco expresso ou ausente, facilita o reconhecimento de EIEC pela célula hospedeira;
- IcsB, além de competir com Atg5 e camuflar a presença do patógeno intracelular, apresenta um papel inédito na regulação da resposta inflamatória induzida em células HeLa. A ausência de IcsB em EIEC promove uma perturbação intensa na homeostase da célula hospedeira;
- A molécula de IcsB de *Shigella* se mostrou mais eficiência na disseminação do que a cepa de FBC124/13;
- EIEC possivelmente ativa o processo autofágico de uma forma não canônica e, por ser facilmente reconhecida pela célula eucariótica, causa uma menor disseminação intracelular quando comparada à *S. flexneri*;
- A resposta da célula hospedeira frente a uma infecção por EIEC ou *Shigella* é modulada de forma distinta.

VII. Referências Bibliográficas

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**. 2006. 53 (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

ALMEIDA, M. T. et al. [Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in children]. **J Pediatr (Rio J)**, v. 74, n. 4, p. 291-8, Jul-Aug 1998.

BANDO, S. Y. et al. Expression of bacterial virulence factors and cytokines during in vitro macrophage infection by enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: a comparative study. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 6, p. 786-91, Sep 2010.

BAUCKMAN, K. A.; OWUSU-BOAITEY, N.; MYSOREKAR, I. U. Selective autophagy: xenophagy. **Methods**, v. 75, p. 120-7, Mar 2015.

BAXT, L. A.; GOLDBERG, M. B. Host and bacterial proteins that repress recruitment of LC3 to *Shigella* early during infection. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e94653, 2014.

BERLUTTI, F. et al. Expression of the virulence plasmid-carried apyrase gene (*apy*) of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella flexneri* is under the control of H-NS and the VirF and VirB regulatory cascade. **Infect Immun**, v. 66, n. 10, p. 4957-64, Oct 1998.

BERNARDINI, M. L. et al. Identification of *icsA*, a plasmid locus of *Shigella flexneri* that governs bacterial intra- and intercellular spread through interaction with F-actin.

Proc Natl Acad Sci U S A, v. 86, n. 10, p. 3867-71, May 1989.

BHAVNANI, D. et al. Distribution of Enteroinvasive and Enterotoxigenic *Escherichia coli* Across Space and Time in Northwestern Ecuador. **Am J Trop Med Hyg**, v. 94, n.

2, p. 276-84, Feb 3 2016.

BOYLE, K. B.; RANDOW, F. The role of 'eat-me' signals and autophagy cargo receptors in innate immunity. **Curr Opin Microbiol**, v. 16, n. 3, p. 339-48, Jun 2013.

CAMPBELL-VALOIS, F. X. et al. Escape of Actively Secreting *Shigella flexneri* from ATG8/LC3-Positive Vacuoles Formed during Cell-To-Cell Spread Is Facilitated by *IcsB* and *VirA*. **MBio**, v. 6, n. 3, p. e02567-14, 2015.

CEMMA, M.; BRUMELL, J. H. Interactions of pathogenic bacteria with autophagy systems. **Curr Biol**, v. 22, n. 13, p. R540-5, Jul 10 2012.

CHANG, A. C.; COHEN, S. N. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. **J Bacteriol**, v. 134, n. 3, p. 1141-56, Jun 1978.

CHANG, S. Y. et al. Autophagy controls an intrinsic host defense to bacteria by promoting epithelial cell survival: a murine model. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e81095, 2013.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard**. INSTITUTE, C. A. L. S. 2012.

COSSART, P.; SANSONETTI, P. J. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. **Science**, v. 304, n. 5668, p. 242-8, Apr 9 2004.

DERETIC, V. Autophagy in infection. **Curr Opin Cell Biol**, v. 22, n. 2, p. 252-62, Apr 2010.

DUPONT, H. L. et al. Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. **N Engl J Med**, v. 285, n. 1, p. 1-9, Jul 1 1971.

DUPONT, N. et al. *Shigella* phagocytic vacuolar membrane remnants participate in the cellular response to pathogen invasion and are regulated by autophagy. **Cell Host Microbe**, v. 6, n. 2, p. 137-49, Aug 20 2009.

DWIVEDI, M.; AHNN, J. Autophagy--is it a preferred route for lifespan extension? **BMB Rep**, v. 42, n. 2, p. 62-71, Feb 28 2009.

ECHEVERRIA, P. et al. *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* infections in households of children with dysentery in Bangkok. **J Infect Dis**, v. 165, n. 1, p. 144-7, Jan 1992.

EGILE, C. et al. Activation of the CDC42 effector N-WASP by the *Shigella flexneri* IcsA protein promotes actin nucleation by Arp2/3 complex and bacterial actin-based motility. **J Cell Biol**, v. 146, n. 6, p. 1319-32, Sep 20 1999.

ELIAS, W. P., JR. et al. Organization of biogenesis genes for aggregative adherence fimbria II defines a virulence gene cluster in enteroaggregative *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, v. 181, n. 6, p. 1779-85, Mar 1999.

ELLIOTT, S. J.; KAPER, J. B. Role of type 1 fimbriae in EPEC infections. **Microb Pathog**, v. 23, n. 2, p. 113-8, Aug 1997.

FAUNDEZ, G. et al. Characterization of enteroinvasive *Escherichia coli* strains isolated from children with diarrhea in Chile. **J Clin Microbiol**, v. 26, n. 5, p. 928-32, May 1988.

FDA. Food and Drug Administration 2011.

FERNANDES, M. R.; TRABULSI, L. R. A new *Escherichia coli* serotype causing experimental kerato-conjunctivitis in the guinea-pig (culture 412-DEC-66) (preliminary report). **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 9, n. 1, p. 62, Jan-Feb 1967.

FERREIRA, L. G. **Caracterização da Resposta Inflamatória induzida por *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC) e *Shigella flexneri* em células epiteliais intestinais da linhagem Caco-2**. 2008. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

FORMAL, S. B.; HALE, T. L.; SANSONETTI, P. J. Invasive enteric pathogens. **Rev Infect Dis**, v. 5 Suppl 4, p. S702-7, Sep-Oct 1983.

FUJITA, N.; YOSHIMORI, T. Ubiquitination-mediated autophagy against invading bacteria. **Curr Opin Cell Biol**, v. 23, n. 4, p. 492-7, Aug 2011.

GIBOTTI, A. et al. Molecular characterization of enteroinvasive *Escherichia coli* ipa genes by PCR-RFLP analysis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 1-2, p. 74-80, Jan-Jun 2004.

GLICK, D.; BARTH, S.; MACLEOD, K. F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. **J Pathol**, v. 221, n. 1, p. 3-12, May 2010.

GOMES, L. C.; DIKIC, I. Autophagy in antimicrobial immunity. **Mol Cell**, v. 54, n. 2, p. 224-33, Apr 24 2014.

GOUIN, E.; WELCH, M. D.; COSSART, P. Actin-based motility of intracellular pathogens. **Curr Opin Microbiol**, v. 8, n. 1, p. 35-45, Feb 2005.

GROSS, R. J. et al. Enterotoxigenic and enteroinvasive *Escherichia coli* strains belonging to a new O group, O167. **J Clin Microbiol**, v. 17, n. 3, p. 521-3, Mar 1983.

HURT, J. K. et al. High-throughput screening of the virulence regulator VirF: a novel antibacterial target for shigellosis. **J Biomol Screen**, v. 15, n. 4, p. 379-87, Apr 2010.

JAIN, S. et al. Polar localization of the autotransporter family of large bacterial virulence proteins. **J Bacteriol**, v. 188, n. 13, p. 4841-50, Jul 2006.

JO, E. K. et al. Roles of autophagy in elimination of intracellular bacterial pathogens. **Front Immunol**, v. 4, p. 97, 2013.

KAIN, K. C. et al. Etiology of childhood diarrhea in Beijing, China. **J Clin Microbiol**, v. 29, n. 1, p. 90-5, Jan 1991.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat Rev Microbiol**, v. 2, n. 2, p. 123-40, Feb 2004.

KATOULI, M. et al. Aetiological studies of diarrhoeal diseases in infants and young children in Iran. **J Trop Med Hyg**, v. 93, n. 1, p. 22-7, Feb 1990.

KOMATSU, M. et al. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. **Cell**, v. 131, n. 6, p. 1149-63, Dec 14 2007.

KONKEL, M. E.; TILLY, K. Temperature-regulated expression of bacterial virulence genes. **Microbes Infect**, v. 2, n. 2, p. 157-66, Feb 2000.

LE GALL, T. et al. Analysis of virulence plasmid gene expression defines three classes of effectors in the type III secretion system of *Shigella flexneri*. **Microbiology**, v. 151, n. Pt 3, p. 951-62, Mar 2005.

LEFRANC, F.; BROTCHE, J.; KISS, R. Possible future issues in the treatment of glioblastomas: Special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 10, p. 2411-2422, Apr 1 2005.

LEVINE, B.; MIZUSHIMA, N.; VIRGIN, H. W. Autophagy in immunity and inflammation. **Nature**, v. 469, n. 7330, p. 323-35, Jan 20 2011.

LEVINE, M. M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. **J Infect Dis**, v. 155, n. 3, p. 377-89, Mar 1987.

LIU, C. et al. Autophagy and protein aggregation after brain ischemia. **J Neurochem**, v. 115, n. 1, p. 68-78, Oct 2010.

LIU, Z.; LENARDO, M. J. Reactive oxygen species regulate autophagy through redox-sensitive proteases. **Dev Cell**, v. 12, n. 4, p. 484-5, Apr 2007.

MAIURI, M. C. et al. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 9, p. 741-752, Sep 2007.

MENARD, R.; DEHIO, C.; SANSONETTI, P. J. Bacterial entry into epithelial cells: the paradigm of *Shigella*. **Trends in Microbiology**, v. 4, n. 6, p. 220-6, Jun 1996.

MIZUSHIMA, N. et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. **Nature**, v. 451, n. 7182, p. 1069-75, Feb 28 2008.

MIZUSHIMA, N.; YOSHIMORI, T. How to interpret LC3 immunoblotting. **Autophagy**, v. 3, n. 6, p. 542-5, Nov-Dec 2007.

MIZUSHIMA, N.; YOSHIMORI, T.; LEVINE, B. Methods in Mammalian Autophagy Research. **Cell**, v. 140, n. 3, p. 313-326, Feb 5 2010.

MOHAMMADZADEH, M. et al. Molecular detection of lactose fermenting enteroinvasive *Escherichia coli* from patients with diarrhea in Tehran-Iran. **Iran J Microbiol**, v. 7, n. 4, p. 198-202, Aug 2015.

MOREIRA-FILHO, C. A. et al. Community structure analysis of transcriptional networks reveals distinct molecular pathways for early- and late-onset temporal lobe epilepsy with childhood febrile seizures. **PLoS One**, v. 10, n. 5, p. e0128174, 2015.

MORENO, A. C. et al. Recognition of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella flexneri* by dendritic cells: distinct dendritic cell activation states. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 1, p. 138-41, Feb 2012.

MORENO, A. C. et al. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 66, n. 1, p. 50-7, Jan 2010.

MORENO, A. C. R. **Papel das células dendríticas na infecção de células epiteliais intestinais por *Escherichia coli* enteroinvasora**. 2007. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MORENO, A. C. R.; FERREIRA, L. G.; MARTINEZ, M. B. Enteroinvasive *Escherichia coli* vs. *Shigella flexneri* : how different patterns of gene expression affect virulence. **Fems Microbiology Letters**, v. 301, n. 2, p. 156-163, Dec 2009.

MOSTOWY, S.; COSSART, P. Bacterial autophagy: restriction or promotion of bacterial replication? **Trends Cell Biol**, v. 22, n. 6, p. 283-91, Jun 2012.

MURROW, L.; DEBNATH, J. Autophagy as a stress-response and quality-control mechanism: implications for cell injury and human disease. **Annu Rev Pathol**, v. 8, p. 105-37, Jan 24 2013.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin Microbiol Rev**, v. 11, n. 1, p. 142-201, Jan 1998.

OGAWA, M. et al. Manipulation of autophagy by bacteria for their own benefit. **Microbiol Immunol**, v. 55, n. 7, p. 459-71, Jul 2011.

OGAWA, M. et al. 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. 913-31, May 2003.

OGAWA, M. et al. Escape of intracellular *Shigella* from autophagy. **Science**, v. 307, n. 5710, p. 727-31, Feb 4 2005.

OGUNSANYA, T. I.; ROTIMI, V. O.; ADENUGA, A. A study of the aetiological agents of childhood diarrhoea in Lagos, Nigeria. **J Med Microbiol**, v. 40, n. 1, p. 10-4, Jan 1994.

ORLANDI, P. P. et al. Enteropathogens associated with diarrheal disease in infants of poor urban areas of Porto Velho, Rondonia: a preliminary study. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 5, p. 621-5, Jul 2001.

PACHECO-GIL, L. et al. Enteroinvasive *Escherichia coli* severe dysentery complicated by rotavirus gastroenteritis. **J Infect**, v. 53, n. 5, p. e211-3, Nov 2006.

PARSOT, C. *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors. **Fems Microbiology Letters**, v. 252, n. 1, p. 11-8, Nov 1 2005.

PENFOLD, R. J.; PEMBERTON, J. M. An improved suicide vector for construction of chromosomal insertion mutations in bacteria. **Gene**, v. 118, n. 1, p. 145-6, Sep 1 1992.

PORTER, M. E.; DORMAN, C. J. Positive regulation of *Shigella flexneri* virulence genes by integration host factor. **J Bacteriol**, v. 179, n. 21, p. 6537-50, Nov 1997.

PRATS, G.; LLOVET, T. [Enteroinvasive *Escherichia coli*. Pathogenesis and epidemiology]. **Microbiologia**, v. 11, n. 1, p. 91-6, Mar 1995.

PROSSEDA, G. et al. A role for H-NS in the regulation of the virF gene of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli*. **Res Microbiol**, v. 149, n. 1, p. 15-25, Jan 1998.

RATHMAN, M. et al. The development of a FACS-based strategy for the isolation of *Shigella flexneri* mutants that are deficient in intercellular spread. **Mol Microbiol**, v. 35, n. 5, p. 974-90, Mar 2000.

RAVIKUMAR, B. et al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. **Physiol Rev**, v. 90, n. 4, p. 1383-435, Oct 2010.

REGUA-MANGIA, A. H. et al. Frequency and characteristics of diarrhoeagenic *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhoea in Rio de Janeiro, Brazil. **J Infect**, v. 48, n. 2, p. 161-7, Feb 2004.

ROBBINS, J. R. et al. The making of a gradient: IcsA (VirG) polarity in *Shigella flexneri*. **Mol Microbiol**, v. 41, n. 4, p. 861-72, Aug 2001.

SAEED, A. I. et al. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. **Biotechniques**, v. 34, n. 2, p. 374-8, Feb 2003.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. In: (Ed.). Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SAMBUY, Y. et al. 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, n. 1, p. 1-26, Jan 2005.

SANSONETTI, P. J. et al. Infection of rabbit Peyer's patches by *Shigella flexneri*: effect of adhesive or invasive bacterial phenotypes on follicle-associated epithelium. **Infect Immun**, v. 64, n. 7, p. 2752-64, Jul 1996.

SANTAPAOLA, D. et al. Enteroinvasive *Escherichia coli* virulence-plasmid-carried apyrase (*apy*) and *ospB* genes are organized as a bicistronic operon and are subject to differential expression. **Microbiology**, v. 148, n. Pt 8, p. 2519-29, Aug 2002.

SANTOS, H. C. A. S. **Caracterização Molecular e Fenotípica da Disseminação de Diferentes Sorotipos de *Escherichia coli* Enteroinvasora em Células Epiteliais Intestinais da Linhagem Caco-2**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SCHNAITH, A. et al. *Staphylococcus aureus* subvert autophagy for induction of caspase-independent host cell death. **J Biol Chem**, v. 282, n. 4, p. 2695-706, Jan 26 2007.

SCHROEDER, G. N.; HILBI, H. Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. **Clin Microbiol Rev**, v. 21, n. 1, p. 134-56, Jan 2008.

SERENY, B. Biochemical Reactions and Virulence of *E. Coli* O124: K72 (17). **Acta Microbiol Acad Sci Hung**, v. 10, p. 11-8, 1963.

SHI, C. S. et al. Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1beta production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. **Nat Immunol**, v. 13, n. 3, p. 255-63, Mar 2012.

SILVA, R. M.; TOLEDO, M. R.; TRABULSI, L. R. Biochemical and cultural characteristics of invasive *Escherichia coli*. **J Clin Microbiol**, v. 11, n. 5, p. 441-4, May 1980.

STEINHAUER, J. et al. The unipolar *Shigella* surface protein IcsA is targeted directly to the bacterial old pole: IcsP cleavage of IcsA occurs over the entire bacterial surface. **Mol Microbiol**, v. 32, n. 2, p. 367-77, Apr 1999.

STEVENS, J. M.; GALYOV, E. E.; STEVENS, M. P. Actin-dependent movement of bacterial pathogens. **Nat Rev Microbiol**, v. 4, n. 2, p. 91-101, Feb 2006.

STURGILL-KOSZYCKI, S.; SWANSON, M. S. *Legionella pneumophila* replication vacuoles mature into acidic, endocytic organelles. **J Exp Med**, v. 192, n. 9, p. 1261-72, Nov 6 2000.

SUZUKI, T. et al. Differential regulation of caspase-1 activation, pyroptosis, and autophagy via Ipaf and ASC in *Shigella*-infected macrophages. **PLoS Pathog**, v. 3, n. 8, p. e1111, Aug 10 2007.

TAMURA, K. et al. Serotyping and categorisation of *Escherichia coli* strains isolated between 1958 and 1992 from diarrhoeal diseases in Asia. **J Med Microbiol**, v. 45, n. 5, p. 353-8, Nov 1996.

TOLEDO, M. R.; REIS, M. H.; TRABULSI, L. R. New invasive *Escherichia coli* strain. **J Clin Microbiol**, v. 11, n. 4, p. 422-3, Apr 1980.

TOLEDO, M. R. F.; TRABULSI, L. R. Frequency of Enteroinvasive *Escherichia-Coli* in Children with Diarrhea and Healthy Controls, in Sao-Paulo, Sp, Brazil. **Revista De Microbiologia**, v. 21, n. 1, p. 1-4, Jan-Mar 1990.

TORMO, D. et al. Targeted activation of innate immunity for therapeutic induction of autophagy and apoptosis in melanoma cells. **Cancer Cell**, v. 16, n. 2, p. 103-14, Aug 4 2009.

TRABULSI, L. R.; FERNANDES, M. R.; ZULIANI, M. E. [New intestinal bacteria pathogenic to man]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 9, n. 1, p. 31-9, Jan-Feb 1967.

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 Sao Paulo**, v. 7, n. 4, p. 241-6, Jul-Aug 1965.

ULISSI, U. et al. Time-resolved assembly of a nucleoprotein complex between *Shigella flexneri* *virF* promoter and its transcriptional repressor H-NS. **Nucleic Acids Res**, v. 42, n. 21, p. 13039-50, Dec 1 2014.

VALDOR, R.; MACIAN, F. Autophagy and the regulation of the immune response. **Pharmacol Res**, v. 66, n. 6, p. 475-83, Dec 2012.

VAN LIMBERGEN, J. et al. Autophagy: from basic science to clinical application. **Mucosal Immunol**, v. 2, n. 4, p. 315-30, Jul 2009.

VASCONCELOS, F. M. **Estudo do padrão de adesão agregativa de Escherichia coli do sorotipo O142:H34**. 2014. Tese (Doutorado em Biotecnologia) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

VAZQUEZ, C. L.; COLOMBO, M. I. *Coxiella burnetii* modulates Beclin 1 and Bcl-2, preventing host cell apoptosis to generate a persistent bacterial infection. **Cell Death Differ**, v. 17, n. 3, p. 421-38, Mar 2010.

VIEIRA, N. et al. High prevalence of enteroinvasive *Escherichia coli* isolated in a remote region of northern coastal Ecuador. **Am J Trop Med Hyg**, v. 76, n. 3, p. 528-33, Mar 2007.

WINCHELL, C. G. et al. Dining in: intracellular bacterial pathogen interplay with autophagy. **Curr Opin Microbiol**, v. 29, p. 9-14, Feb 2016.

YANG, J. Y. et al. A mouse model of shigellosis by intraperitoneal infection. **J Infect Dis**, v. 209, n. 2, p. 203-15, Jan 15 2014.

VIII. Anexos

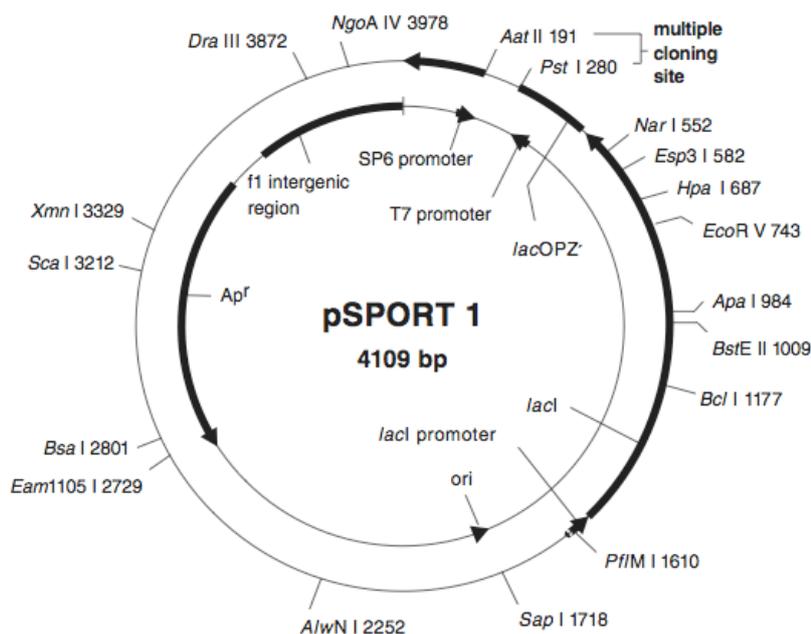


Figura A: Mapa do plasmídeo pSPORT1 onde o fragmento de 1485 pb do gene *icsB* foi inserido (Invitrogen – REF. 18248-013).

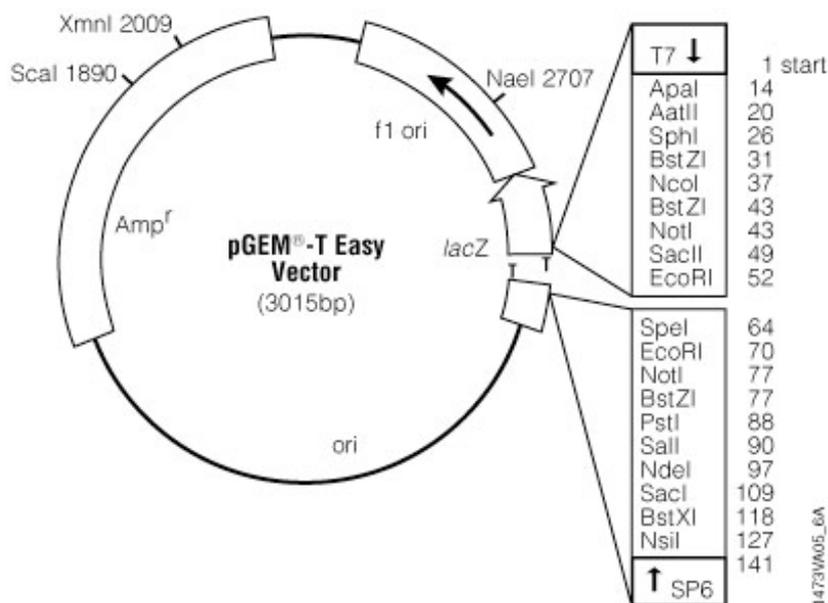


Figura B: Mapa do plasmídeo comercial pGEMT-Easy contendo o sítio de *EcoRI* onde o fragmento de 548 pb (1485 pb) do gene *icsB* foi inserido, para posterior obtenção do inserto contendo em suas extremidades a marcação por esta enzima (Promega – REF. A1360).

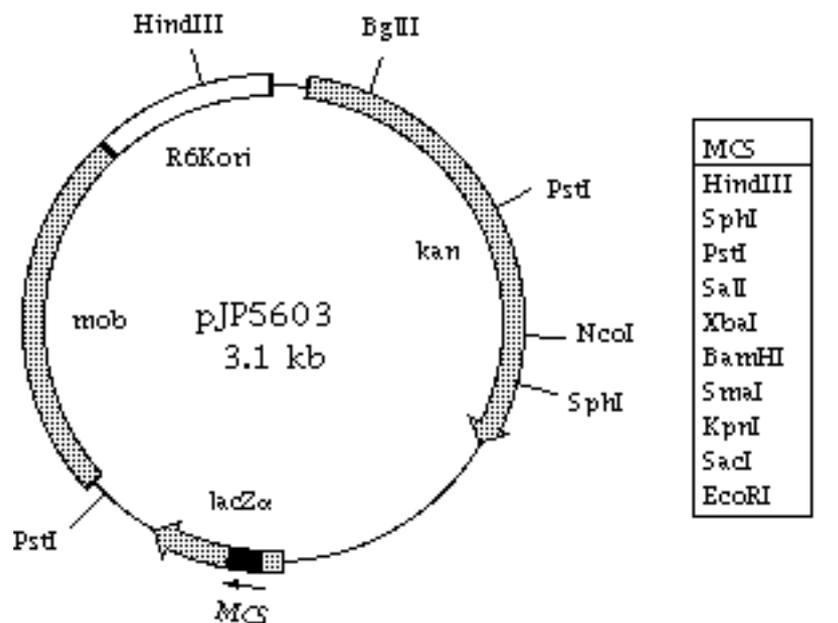


Figura C: Mapa do vetor suicida pJP5603 onde o fragmento de 548 pb do gene *icsB* foi clonado para a obtenção do plasmídeo recombinante PJP5603+*icsB* (PENFOLD e PEMBERTON, 1992).

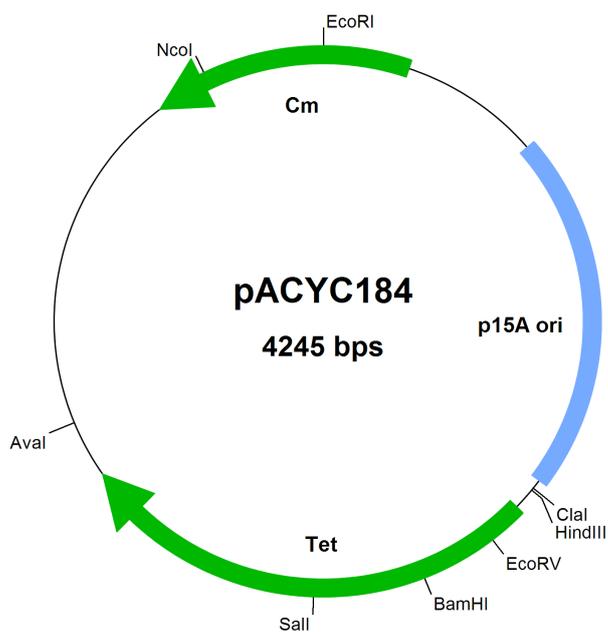


Figura D: Mapa do vetor suicida pJP5603 contendo o sítio de *EcoRI* onde o fragmento de 548 pb do gene *icsB* foi clonado para a obtenção do plasmídeo recombinante PJP5603+*icsB* (CHANG e COHEN, 1978).