

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

O papel da flagelina e do sistema de secreção de *Escherichia coli*
enteroinvasora na resposta imune inata dos macrófagos

Lucas Gonçalves Ferreira

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

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

São Paulo
2012

Lucas Gonçalves Ferreira

O papel da flagelina e do sistema de secreção de *Escherichia coli*
enteroinvasora na resposta imune inata dos macrófagos

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

11/12/12

São Paulo, _____ de _____.

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

F383p Ferreira, Lucas Gonçalves
O papel da flagelina e do sistema de secreção de *Escherichia coli* enteroinvasora na resposta imune inata dos macrófagos / Lucas Gonçalves Ferreira. -- São Paulo, 2012.
116p.

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

Orientador: Almeida, Sandro Rogério de
....Co-orientador: Martinez, Marina Baquerizo

1. Microbiologia médica 2. Relação hospedeiro-parasita
3. Diarréia I. T. II. Almeida, Sandro Rogério de, orientador. III
Martinez, Marina Baquerizo, co-orientador.

616.01 CDD

DEDICATÓRIA

***Dedico o presente trabalho aos meus pais, JULIO e MARA, pelo apoio incondicional; ao meu amor ALEXANDRA, que esteve comigo em todas as etapas deste trabalho; e à minha filha
LARA***

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Sandro Rogério de Almeida, pela orientação e por ter aberto as portas para meu crescimento intelectual em seu laboratório. Meus agradecimentos por todos esses anos de trabalho juntos!!

À minha orientadora Marina Baquerizo Martinez, que transmitiu conhecimentos e experiências essenciais para minha formação e para meu crescimento intelectual. Meus agradecimentos por todos esses anos de trabalho juntos!!!!

À minha esposa Alexandra, que sempre esteve ao meu lado, nos momentos mais felizes e mais difíceis, sempre me incentivando e me apoiando. Muito obrigada por toda sua dedicação, seu amor, carinho, e, é claro, pela nossa pequena Larinha!!

À minha grande família, pelo apoio e força, em especial à minha querida irmã, Tissiane.

À Hadassa e Reneé, com quem dividi inúmeros experimentos, discussões e momentos agradáveis.... Saudades desde já meninas!!!

À Carol, por ter me guiado durante os primeiros passos dessa jornada.

À Profª Regina, pelo espaço de trabalho cedido.

À Profª Tania e à Suely, pelo auxílio na construção da cepa mutante.

À Profª Elza e Irene, pela amizade e carinho.

À Renatinha, pelo auxílio na citometria.

À Fabi e Soninha, pelo auxílio em tudo no laboratório.

À Grasi, Gilberto e Fabinho, pelas inúmeras discussões e experimentos que realizamos juntos.

Aos companheiros de laboratório, Harummy, Fernanda, Silvinha, Juliana, Milton, Isabel, Suelen, Poliana, Eliver, Zé, Telma, Lavinia, Glorinha, Karen, Carla, pela amizade e agradáveis dias que passamos juntos durante esse período.

Ao Ale, Artemir, Juliana, pela amizade.

À Profª Karina Bortoluci pelas discussões, sugestões e por todo o apoio necessário para o desenvolvimento deste trabalho...À todos os seus alunos pelos agradáveis momentos juntos...

Aos componentes da Banca de Qualificação, Waldir e Luis Carlos; que muito contribuíram para a finalização dessa.

Aos amigos do ICB-IV, Lucas, Juciane, Érica, Juliana, Carina, Matheus, Ângela, Paulo, Zé Antonio, Esther, Juciane, Pedro, Ernandes, Thaís, Obrigado galera pelos momentos de descontração essenciais durante esses anos!!

Às secretárias Ana, Sueli, Dora e Edna.

Às meninas da limpeza Dorlei, Claudinha, Carmem e Rose

Ao Jorge e Elaine, da secretaria da Pós-graduação.

Aos meus amigos Paulo Abi Jaudi , Miceli e Paulo, que mesmo de longe me apoiaram em todos os momentos durante essa etapa.

Àqueles que por ventura deixei de mencionar e que contribuíram para a realização desse trabalho.

Muito obrigada a todos vocês!!!

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

RESUMO

Escherichia coli enteroinvasora (EIEC) é um dos agentes etiológicos da disenteria bacilar. Seu processo fisiopatológico é desencadeado pela expressão de fatores de virulência, que proporcionam sua invasão e sobrevivência nas células do hospedeiro, ativando o sistema imune inato e adaptativo da mucosa intestinal. Trabalhos recentes têm salientado a importância do sistema de secreção e da flagelina bacteriana como agonista de receptores da imunidade inata dos macrófagos, em especial alguns dos receptores do tipo NLR. Uma vez que esta espécie de *E. coli* também é capaz de expressar flagelina e fazer a montagem completa do flagelo e do sistema de secreção do tipo III, a nossa proposta foi avaliar o papel da flagelina e do sistema de secreção de EIEC na resposta imune dos macrófagos murinos. Para isso, utilizamos três cepas de EIEC: a cepa selvagem; a cepa mutante no gene responsável pela síntese da flagelina; e a cepa sem o plasmídeo de virulência plnv, deficiente no sistema de secreção, para a infecção de macrófagos peritoniais de camundongos C57Bl/6, caspase-1^{-/-}, IPAF^{-/-} e ASC^{-/-}. Neste estudo foi possível observar que o escape bacteriano e a morte dos macrófagos infectados por EIEC, assim como a ativação da caspase-1 e posterior secreção de IL-1 β é independente da flagelina bacteriana, mas dependente do sistema de secreção, além disso, a ativação da caspase-1 de macrófagos infectados por EIEC é dependente do receptor IPAF e parcialmente da proteína adaptadora ASC. Assim, no nosso modelo, a ativação da caspase-1 dos macrófagos infectados por EIEC parece estar envolvida com o processamento e secreção de IL-1 β e, possivelmente na secreção de IL-18, mas não na morte celular. No modelo de infecção *in vivo*, o sistema de secreção bacteriano foi importante para a sobrevivência bacteriana no hospedeiro, assim como para a indução de uma resposta inflamatória no local da infecção. Ainda, a caspase-1 parece ter um papel importante para o controle da infecção *in vivo* por EIEC, podendo assim contribuir para uma resposta imune protetora do hospedeiro.

Palavras-chave: *Escherichia coli* enteroinvasora, Flagelina, Sistema de Secreção, Macrófagos, caspase-1, Inflamação.

ABSTRACT

Enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) is one of the etiologic agents responsible for bacillary dysentery. The pathophysiological process induced by this bacteria is triggered by the expression of virulence factors that provide the invasion and survival in host cells, resulting in activation of innate and adaptive immune system present on intestinal mucosa. Recent studies have emphasized the importance of the secretion system and bacterial flagellin as agonist of innate immune receptors present in macrophage, especially NLR (*Nod like receptors*). Then, our proposal was evaluate the role of flagellin (fliC) and secretion system of EIEC in the induction of immune response of murine macrophages using the EIEC strains wild type (WT), mutant flagellin gene (fliC), and a strain deficient in secretion system (DSS) for infection of peritoneal macrophages of C57Bl/6, caspase-1^{-/-}, IPAF^{-/-} and ASC^{-/-} mice. In this study we observed that the bacterial escape and death of infected macrophages with EIEC, the caspase-1 activation and subsequent IL-1 β secretion is independent of bacterial flagellin, but dependent of secretion system, moreover, the caspase-1 activation in infected macrophages is IPAF-dependent and partially dependent of the adapter protein ASC. Thus, in our model, the caspase-1 activation in EIEC infected macrophages seems to be involved with the processing and secretion of IL-1 β and possibly with the secretion of IL-18, but not involved with cell death. In the infection model *in vivo*, bacterial secretion system was important for bacterial survival in the host, as well as for the inflammatory response induction at the infection site. In addition, caspase-1 seems to have an important role to the control of *in vivo* infection by EIEC and can contribute to a protective immune response of the host.

Keywords: Enteroinvasive *Escherichia coli*, Flagellin, Secretion System, macrophages, caspase-1, Inflammation.

LISTA DE ABREVIATURAS

EIEC – *Escherichia coli* enteroinvasora

EPEC – *Escherichia coli* enteropatogênica

EHEC - *Escherichia coli* enterohemorrágica

ETEC – *Escherichia coli* enterotoxigênica

EAEC - *Escherichia coli* enteroagregativa

Ipa – Invasion plasmid antigens (Antígenos plasmidiais de invasão)

OMPs – Proteínas de membrana externa

PRR - “*Patter Recognition Receptor*” (Receptor de reconhecimento de padrões)

DC - “*Dendritic cells*” (Células dendríticas)

MHCII - “*Major histocompatibility complex*” (Complexo principal de histocompatibilidade)

FliC - “*Flagellin*” (Flagelina)

PMN - Polimorfonucleares

IL - “*Interleukin*” (Interleucina)

i.p. – Intraperitoneal

i.t. - Intratraqueal

LPS - “*Lipopolysaccharid*” (Lipopolissacarídeo)

PGN – “*Peptidoglican*” (Peptidoglicano)

SFM - Sistema Mononuclear Fagocítico

NO - “*Nitric Oxide*” (Óxido nítrico)

IFN- γ - "*Interferon gama*" (Interferon gama)

GALT - "Gut-associated lymphoid organ" (Órgão linfóide associado ao intestino)

NK - "*Natural Killer*" (células natural killer)

FMO - "*Fluorescence Minus One*" (Fluorescência menos um)

PAMP - "*Pathogen-associated molecular pattern*" (Padrões moleculares associados à patógenos)

TLR - "*Toll like receptors*" (Receptores do Tipo Toll)

TIR - "*Toll/IL-1R domain*" (Domínio Toll/IL-1R)

NLR - "*NOD like receptors*" (Receptores do Tipo Nod)

ICE - "*IL-1 beta Converting enzyme*" (Enzima de conversão de IL-1 beta)

NOD-LRR - "*Nucleotide-binding oligomerization domain- Leucin rich repeats*" (Domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeo- Sequências ricas em leucina)

Apaf - "*Apoptotic protease activating factor*" (Fator de ativação de protease apoptótica)

Ipaf - "*ICE- protease activating factor*" (Fator de ativação de protease ICE)

Naip - "*Neuronal apoptosis inhibitor protein*" (Proteína inibidora de apoptose neuronal)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática do sistema de secreção do tipo III de *S. flexneri*

Figura 2 - Representação esquemática da patogênese da infecção por EIEC

Figura 3 - Imunohistoquímica dos macrófagos residentes na mucosa intestinal humana

Figura 4 - Representação esquemática dos inflamassomas NALP3 e IPAF

Figura 5 - Representação esquemática do reconhecimento de macrófagos via receptores TLRs e NLRs

Figura 6 - Caracterização fenotípica da cepa EIEC O124:H-

Figura 7 - Construção da cepa de EIEC deficiente na flagelina

Figura 8 - Caracterização das três cepas de EIEC: selvagem (WT), deficiente no plasmídeo de virulência (DSS) e deficiente na flagelina (*fliC*)

Figura 9 - Análise fenotípica dos macrófagos peritoneais

Figura 10 - Ensaio de fagocitose

Figura 11 - Ensaio de sobrevivência intracelular e escape bacteriano

Figura 12 - Ensaio de transcrição relativa dos genes *ipaB* e *ipaC*

Figura 13 - Ensaio de formação de poros na membrana celular

Figura 14 - Ensaio de lise dos macrófagos

Figura 15 - Ensaio de determinação da produção das citocinas pró-inflamatórias

Figura 16 - Ensaio de citocina intracelular

Figura 17 - Produção das citocinas pró-inflamatórias por macrófagos de animais C57Bl/6 e Caspase -1-/-

Figura 18 - Ensaio de determinação da produção de óxido nítrico (NO)

Figura 19 - Produção das citocinas pró-inflamatórias por macrófagos de animais C57Bl/6 e IPAF-/- e ASC-/-

Figura 20 - Ensaio de fagocitose e escape bacteriano em macrófagos de animais C57Bl/6 e Caspase-1-/-

Figura 21 - Ensaio de lise celular de macrófagos de animais C57Bl/6 e Caspase-1-/-

Figura 22 - Ensaio de lise celular de macrófagos de animais C57Bl/6 IPAF-/- e ASC-/-

Figura 23 - Ensaio de apoptose

Figura 24 - Ensaio de sobrevivência bacteriana e mortalidade

Figura 25 - Histologia dos pulmões de animais infectados por EIEC

Figura 26 - Ensaio de sobrevivência bacteriana *in vivo*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Amostras bacterianas

Tabela 2 - Iniciadores utilizados nas reações de PCR

Tabela 3 - Iniciadores utilizados nas reações de PCR

Tabela 4 - Iniciadores utilizados nas reações de RT-PCR

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Escherichia coli</i> enteroinvasora (EIEC)	2
1.2 Macrófagos	12
1.3 Interação patógeno-hospedeiro	15
2 OJETIVOS	27
2.1 <i>Objetivo geral</i>	28
2.2 <i>Objetivos específicos</i>	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 <i>Amostras bacterianas</i>	30
3.2 <i>Padronização do inóculo bacteriano</i>	31
3.3 <i>Animais</i>	32
3.4 <i>Cultura Celular</i>	32
3.5 <i>Ensaio de infecção dos macrófagos (in vitro)</i>	33
3.6 <i>Ensaio de infecção in vitro</i>	34
3.7 <i>Construção da cepa fliC</i>	34
3.7.1. <i>Sequenciamento</i>	34
3.7.2. <i>Análise do gene fliC</i>	35
3.7.3. <i>Mutagênese</i>	35
3.8 <i>Curva de crescimento</i>	38
3.9 <i>Ensaio de motilidade</i>	39
3.10 <i>Ensaio de UFC</i>	39
3.11 <i>Extração de RNA</i>	40
3.12 <i>Síntese de DNA complementar</i>	41
3.13 <i>RT-PCR</i>	41
3.14 <i>Ensaio de formação de poros na membrana celular</i>	43
3.15 <i>Ensaio de lise celular</i>	44
3.16 <i>Ensaio de apoptose</i>	44
3.17. <i>Ensaio de detecção de células produtoras de IL-10</i>	45
3.18. <i>Ensaio de ELISA</i>	46
3.19. <i>Detecção de óxido nítrico</i>	47
3.20. <i>Análises estatísticas</i>	47
4 RESULTADOS	48
4.1 <i>Construção da cepa EIEC O124:H- deficiente no gene da flagelina</i>	49
4.2 <i>Caracterização das cepas de EIEC</i>	52
4.3 <i>Caracterização da cultura de macrófagos</i>	54

<i>4.4 A fagocitose de EIEC pelos macrófagos é um processo independente do sistema de secreção e da flagelina</i>	57
<i>4.5 O escape dos macrófagos é dependente do sistema de secreção de EIEC e suas proteínas efetoras</i>	58
<i>4.6 A morte dos macrófagos induzida por EIEC é dependente do sistema de secreção e suas proteínas efetoras</i>	62
<i>4.7 A produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatória é dependente do sistema de secreção de EIEC</i>	65
<i>4.8 A ativação da caspase-1 e secreção de IL-1β de macrófagos infectados por EIEC é dependente do sistema de secreção</i>	69
<i>4.9 A ativação da caspase-1 de macrófagos infectados por EIEC é dependente do receptor IPAF e parcialmente da molécula adaptadora ASC</i>	72
<i>4.10 A fagocitose e o escape de EIEC dos macrófagos são independentes da caspase-1</i>	74
<i>4.11 A morte dos macrófagos infectados por EIEC é independente da caspase-1 e de apoptose</i>	76
<i>4.12 O sistema de secreção de EIEC é importante para a patogênese da infecção por EIEC</i>	81
<i>4.13 A caspase-1 é importante no controle da infecção de EIEC in vivo</i>	85
5 DISCUSSÃO	86
6 CONCLUSÕES	97
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
8 ANEXO I – COMITÊ DE ÉTICA	113
9 ANEXO II – FICHA DO ALUNO	115

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC)

Escherichia coli é uma bactéria pertencente à família *Enterobacteriaceae* e caracteriza-se por ser um bacilo gram-negativo, anaeróbico facultativo, que faz parte tanto da microbiota intestinal do homem e de animais, como também compreende diversas amostras patogênicas. As amostras patogênicas de *E. coli*, podem, entretanto, causar infecções, tanto no trato gastrointestinal como infecções extraintestinais.

Atualmente, tomando-se por base uma série de parâmetros, como a produção de fatores de virulência específicos, os tipos de interação com linhagens celulares e a patogenicidade para animais de laboratório, as amostras de *E. coli* associadas à diarreia são classificadas 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).

A primeira descrição de EIEC foi realizada por EWING e GRAWATTI (1947). Uma amostra de *E.coli* foi isolada a partir de fezes de soldados americanos com diarreia, durante a segunda guerra mundial. Estudos posteriores, realizados por SERÈNY, demonstraram que essa amostra provocava ceratoconjuntivite em cobaia e pertencia ao sorogrupo O124 (SERÈNY, 1963).

No Brasil, a primeira amostra capaz de produzir ceratoconjuntivite em cobaia, foi isolada de fezes de um paciente com enterite aguda, por TRABULSI e colaboradores, em 1965. Posteriormente, essa cepa de EIEC foi identificada

como pertencente ao sorogrupo O136 (TRABULSI & FERNANDES, 1969). O potencial invasor de EIEC pode ser avaliado pela capacidade de causar ceratoconjuntivite em cobaias – ensaio denominado teste de Serèny (SERÈNY, 1957).

Os primeiros trabalhos enfatizando as características bioquímicas particulares de amostras de EIEC foram apresentados simultaneamente, no Brasil, por TRABULSI e colaboradores (1967), e no Japão por SAKAZAKI e colaboradores (1967). As 28 amostras estudadas no Brasil pertenciam aos sorogrupos O28, O124, O136, O144 e O152. Destas, 92,8% haviam sido isoladas a partir de casos diarréicos tanto de crianças como de adultos (TRABULSI *et al.*, 1967). As amostras do Japão foram isoladas de crianças e adultos com diarreia e pertenciam aos sorogrupos O28, O112, O124, O136, O143 e O144 (SAKAZAKI *et al.*, 1967).

Até o momento, foram relatados 15 sorotipos de EIEC: O28ac:H-, O29:H-, O112ac:H-, O121:H-, O124:H-, O124:H30, O135:H-, O136:H-, O143:H, O144:H-, O152:H-, O159:H-, O164:H-, O167:H- e O173:H- (ORSKOV *et al.*, 1991; MATSUSHITA *et al.*, 1993; NATARO & KAPER, 1998).

As cepas de EIEC possuem características bioquímicas, genéticas e patogênicas semelhantes às espécies de *Shigella*. São caracterizadas bioquimicamente e geneticamente com propriedades específicas que diferem das *E. coli* não invasivas: a EIEC não descarboxila a lisina e tem a presença do gene *ipaH*, similares aos observados no gênero *Shigella*. Pelo método de aglutinação com os antissoros específicos é possível diferenciar a EIEC das bactérias do gênero *Shigella* (VAN DEN BELD & REUBSAET, 2011). Estas características fenotípicas podem, muitas vezes, dificultar a identificação

correta deste patotipo, principalmente quando não se utiliza os antissoros específicos, uma vez que essas bactérias possuem o mesmo perfil bioquímico.

Devido à grande similaridade entre as duas espécies, pode-se supor que as duas compartilhavam um mesmo ancestral e que num dado momento da evolução houve uma divisão. O clone formado pelas EIEC seria o elo da cadeia. No entanto, dados obtidos por nosso grupo e outros trabalhos nos levam a especular que as amostras de EIEC formam clones distintos dos de *Shigella* e dos outros grupos de *E. coli* (PUPO *et al.*, 1997; BANDO *et al.*, 1998; ROLLAND *et al.*, 1998; LAN *et al.*, 2004; VAN DEN BELD & REUBSAET, 2011).

EIEC foi responsabilizada por vários surtos epidêmicos, porém há poucos relatos sobre vias de transmissão e a distribuição dessa bactéria na natureza. Água e queijo foram descritos como possíveis fontes (BÓRIAN *et al.*, 1959; TULLOCH *et al.*, 1973; VALENTINI *et al.*, 1992), assim como a transmissão direta através do contato pessoa a pessoa (HARRIS *et al.*, 1985). Na década de 70 foi relatado um importante surto de diarreia nos Estados Unidos, que acometeu 387 pacientes. O veículo de transmissão foi um queijo importado, contaminado pelo sorogrupo O124 (MARIER *et al.*, 1973). Segundo o órgão de controle de alimentos e drogas dos Estados Unidos (FDA - *Food and Drug Administration*), os surtos causados por EIEC têm sido associados com leite e seus derivados e carne bovina; no entanto, qualquer alimento ou água contaminado com fezes humanas de um indivíduo doente pode causar a doença em outros indivíduos (FDA, 2009).

Pouco se conhece sobre a epidemiologia de EIEC, todavia os relatos mostram que a prevalência não obedece a um padrão de uniformidade. Os

dados relatados nos estudos sobre a diarreia mostram uma alta prevalência das infecções por EIEC, dependendo da população investigada (TAYLOR *et al.*, 1986; TOLEDO & TRABULSI, 1990; ECHEVERRIA *et al.*, 1992; OGUNSANYA *et al.*, 1994; PRATS & LLOVET, 1995; TAMURA *et al.*, 1996; ALMEIDA *et al.*, 1998; VIEIRA *et al.*, 2007).

No Brasil, um estudo na década de 90, realizado por TOLEDO & TRABULSI, relatou a presença de EIEC em crianças com até cinco anos de idade em diferentes áreas da cidade de São Paulo. Essa bactéria foi encontrada em 17 das 107 crianças, de comunidades carentes, com diarreia (15,8%) e em 16 das 701 crianças com diarreia de comunidades não carentes com diarreia (2,3%). No grupo de comunidades carentes, EIEC foi o enteropatógeno mais frequentemente isolado nas crianças entre 2 e 5 anos de idade. Nas crianças não carentes da mesma faixa etária, foi o quarto agente mais isolado (TOLEDO & TRABULSI, 1990).

Recentemente, foi relatada a alta prevalência de EIEC em relação à *Shigella* e outros enteropatógenos, isolada numa região do Equador (VIEIRA *et al.*, 2007). Porém essa bactéria tem sido ainda pouco reportada como agente etiológico nas pesquisas sobre a diarreia. A justificativa para tal fato é que as análises utilizadas nos estudos geralmente não conseguem distinguir entre os agentes EIEC e *Shigella*, devido à grande similaridade bioquímica, genética e patogênica apresentada por essas bactérias (PARSOT, 2005). Além disso, a maioria dos estudos sobre diarreia é realizado em crianças e, muito pouco se conhece sobre a importância desse patógeno na doença na população jovem e adulta.

A diarreia continua sendo uma das maiores causas de morbidade e mortalidade no mundo e as enterobactérias, *Escherichia coli*, *Shigella* e *Salmonella* são os agentes etiológicos mais importantes na diarreia infecciosa que acomete a humanidade (W.H.O., 2009).

A diarreia induzida por *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC) e as espécies de *Shigella* – denominada disenteria bacilar – são caracterizadas pela invasão e destruição da mucosa intestinal, com uma intensa reação inflamatória devido à ativação de células epiteliais intestinais e, ainda, à ativação e morte de células fagocíticas, como os macrófagos e células dendríticas. Ambos os mecanismos levam à produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, as quais são mediadores de lesão tissular (PHALIPON & SANSONETTI, 2007).

A disenteria bacilar é considerada endêmica, sendo que 99% dos 160 milhões de casos anuais ocorrem em países em desenvolvimento, onde as condições sanitárias e sócio-econômicas favorecem o estabelecimento da doença. O número de mortes anuais, em consequência da disenteria bacilar, é de aproximadamente um milhão, sendo a maioria dos casos observado em crianças entre um e cinco anos (KOTLOFF *et al.*, 1999). As manifestações clínicas comumente relatadas na disenteria bacilar são: febre, mal-estar generalizado, cólicas abdominais e diarreia aquosa, seguida de disenteria constituída de muco, sangue e poucas fezes (DuPONT *et al.*, 1971).

Foi evidenciada a produção de um grande repertório de mediadores inflamatórios na mucosa intestinal de pacientes com disenteria bacilar. Na fase aguda da infecção, observou-se um aumento significativo das citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, IFN- γ , TGF- β , e IL-10. A gravidade da doença foi relacionada

com o aumento significativo na produção de IL-1 β e TNF- α (RAQIB *et al.*, 1995). A análise de biópsias do cólon intestinal mostra um infiltrado de células inflamatórias, e na camada epitelial é observado edema tissular com áreas de destruição do epitélio intestinal (MARTINO *et al.*, 2005).

Apesar da similaridade entre as cepas de EIEC às espécies de *Shigella* na doença, para que ocorra o processo infeccioso no homem, a dose infectante de EIEC é da ordem de 10⁶, enquanto que para *Shigella* é de 10² microrganismos (DuPONT, 1971). Contudo, devido à maior incidência da infecção por *Shigella*, a maioria dos estudos relacionados com a patogenicidade desses microrganismos foi realizada com cepas de *S. flexneri* e os resultados obtidos com tal bactéria podem ser aplicados às outras espécies de *Shigella* e a EIEC, pela similaridade que essas cepas bacterianas apresentam (PARSOT, 2005).

Há um processo complexo na colonização e sobrevivência de EIEC na barreira gastrointestinal. Nesse processo, múltiplos genes bacterianos estão envolvidos, tanto cromossomais, como plasmidiais.

Um aspecto importante na sobrevivência de enteropatógenos no hospedeiro é a sobrevivência ao stress ácido. Enquanto transitam pelo trato gastrointestinal, devem suportar o pH extremamente baixo do estômago (~2,5) – devido à presença do ácido clorídrico –, bem como os ácidos graxos presentes no intestino e nas fezes. Foi evidenciado em EIEC que o pH baixo leva a modificações na expressão do lipopolissacarídeos (LPS) e nas proteínas de membrana externa (OMPs), assim como de causar ceratoconjuntivite em cobaia – Teste de Serèny negativo (AZEVEDO, 1998). O pH estomacal causa, portanto, alterações importantes na célula bacteriana, que provocam alterações

na patogenicidade de EIEC. Foi observado, porém, que essas alterações são reversíveis dentro de 3 a 6 horas, dependendo do sorotipo, após a bactéria retornar ao pH neutro, retornando sua alta virulência e causando ceratoconjuntivite em cobaias (AZEVEDO, 1998), justificando assim a capacidade de EIEC sobreviver em condições ácidas encontradas no estômago e iniciar sua colonização no intestino humano.

Os mecanismos essenciais de patogenicidade bacteriana de EIEC e *Shigella* na célula do hospedeiro (invasão, sobrevivência, escape e disseminação) dependem da presença de um plasmídio de virulência de 213 Kb (pINV) (HARRIS *et al.*, 1982; SANSONETTI *et al.*, 1982a). Foi demonstrado que não há diferenças significantes entre os plasmídios de virulência das duas espécies (FORMAL *et al.*, 1983).

Também houve evidências de que bactérias sem o plasmídio de virulência não causam ceratoconjuntivite em cobaias (SANSONETTI *et al.*, 1982b). A maioria dessas funções está relacionada a proteínas codificadas por um fragmento de 31Kb do plasmídio de virulência formado por 38 genes. Entre esses genes estão *ipaA*, *ipaB*, *ipaC*, *ipaD* (responsáveis pela invasão, sobrevivência intracelular e escape bacteriano) (SASAKAWA *et al.*, 1989; VENKATESAN & BUYSSE, 1990; MENARD *et al.*, 1993; MENARD *et al.*, 1994a), *ipgC* (chaperona responsável pela estabilidade de *ipaB* e *ipaC*) (MENARD *et al.*, 1994b), *virB* (proteína responsável para transcrição dos genes *ipa* e *mxi-spa*) (ADLER *et al.*, 1989), *icsA*, *icsB* (responsáveis pela disseminação celular e inibição da autofagia) (MAKINO *et al.*, 1986; BERNARDINI *et al.*, 1989; OGAWA *et al.*, 2005), *ospC1*, *ospF*, *ospG* (responsáveis pela regulação da resposta imune do hospedeiro) (ZURAWSKI

et al., 2006; KIM *et al.*, 2008) e os genes do lócus *mxi-spa* (responsáveis pelo aparato do sistema de secreção do tipo III) (VENKATESAN *et al.*, 1992; SASAKAWA *et al.*, 1993; RATHMAN *et al.*, 2000). O contato da bactéria com a superfície celular do hospedeiro induz à secreção dessas proteínas efetoras no interior de células hospedeiras, essenciais na sobrevivência bacteriana na célula do hospedeiro, conduzidas pelo sistema de secreção do tipo III (COSSART & SANSONETTI, 2004).

Foi demonstrado que o sistema de secreção do tipo III é essencial à patogenicidade de uma ampla gama de bactérias gram-negativas (HAYES *et al.*, 2010). O sistema de secreção do tipo III é considerado um complexo sistema de transferência de proteínas, capaz de injetar diversos substratos protéicos através de ambas as membranas, bacteriana e das células do hospedeiro, diretamente para o interior do citoplasma. Uma vez injetados no interior da célula hospedeira, os fatores de virulência ou efetores irão induzir ou inibir as vias de sinalização da célula a promoverem respostas benéficas para bactéria (HUECK, 1998; PARSOT, 2009). O sistema de secreção do tipo III é muito conservado em termos estruturais e funcionais nas diferentes espécies, enquanto os efetores secretados são bastante diversos (HAYES *et al.*, 2010). Dentre as proteínas efetoras secretadas por EIEC e *Shigella*, a *ipaB* foi descrita como essencial na invasão bacteriana na célula epitelial intestinal (HIGH *et al.*, 1992; TRAN VAN NHIEU *et al.*, 1999), e nos macrófagos foi demonstrado que a *ipaB* e a *ipaC* desempenham um papel crucial na sobrevivência bacteriana intracelular após a fagocitose (KUWAE *et al.*, 2001). Estudos posteriores também mostraram que a ausência dessas proteínas impossibilita a secreção de uma série de outros efetores, uma vez que essas duas proteínas,

juntamente com a ipaD, interagem com a membrana da célula eucariota e são essenciais na montagem eficiente do sistema de secreção do tipo de III de *S. flexneri* (HAYES *et al.*, 2010) (**Figura 1**).

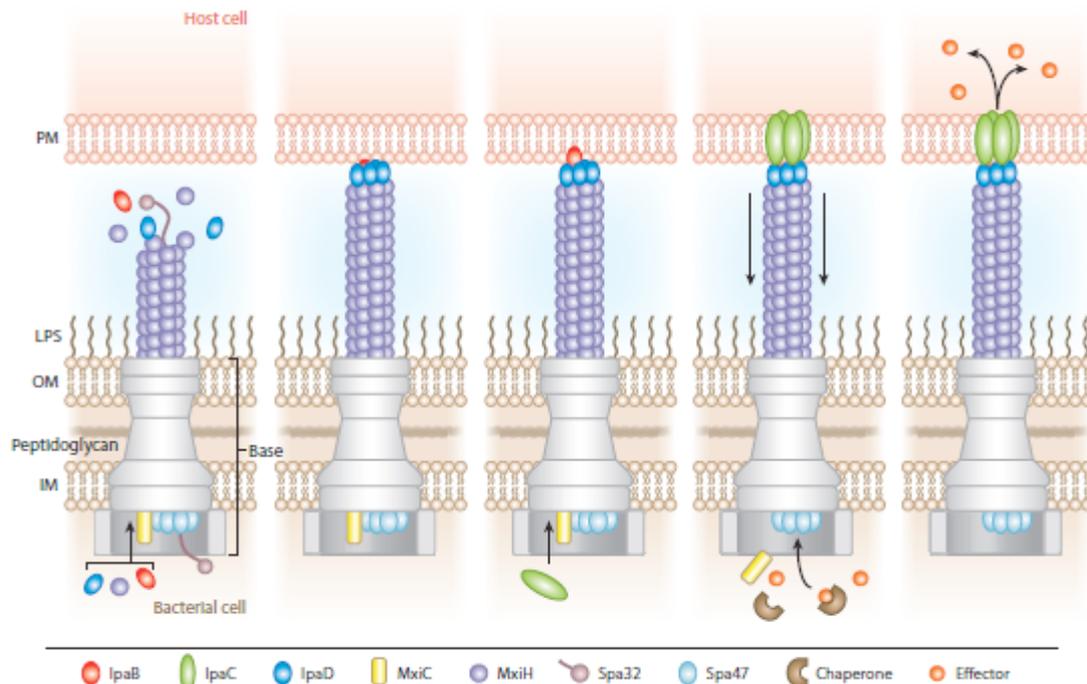


Figura 1: Representação esquemática do sistema de secreção do tipo III de *S. flexneri*. As proteínas IpaB, IpaC, IpaD e as proteínas do locus *mxi-spa* compõem o aparato do sistema de secreção do tipo III. A proteína MxiH é o principal componente estrutural do sistema de secreção (HAYES *et al.*, 2010).

EIEC, assim como outros enteropatógenos, utiliza as células M (*microfold cells*) presentes na mucosa intestinal como porta de entrada para a mucosa intestinal (PARSOT & SANSONETTI, 1996; SANSONETTI & PHALIPON, 1999). As células M apresentam a capacidade de capturar antígenos solúveis, células apoptóticas do epitélio intestinal ou bactérias do compartimento luminal e transportá-los para o sub-epitélio (Placas de Peyer), onde esses antígenos são reconhecidos por macrófagos e células dendríticas residentes (NEWBERRY & LORENZ, 2005). Penetrando pelas células M, a

bactéria encontra macrófagos residentes na lâmina própria e a fagocitose por esses macrófagos é o primeiro passo para a produção da resposta inflamatória contra as cepas bacterianas (COSSART & SANSONETTI, 2004; ASHIDA *et al.*, 2011) (Figura 2).

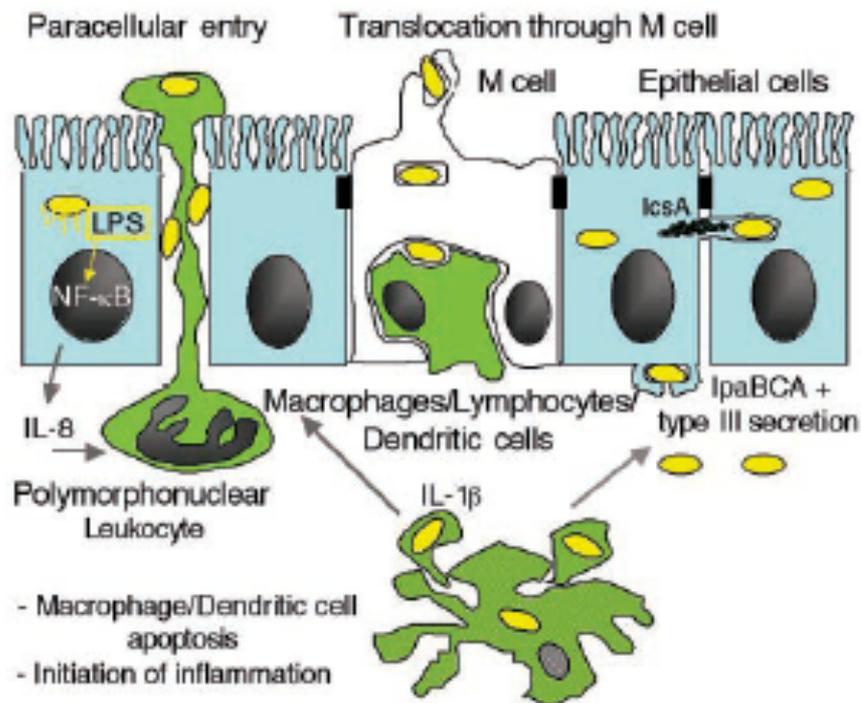


Figura 2. Representação esquemática da patogênese da infecção por EIEC. EIEC utiliza as células M (*microfold cells*) presentes na mucosa intestinal como porta de entrada para a mucosa intestinal. Penetrando pelas células M, a bactéria encontra macrófagos residentes na lâmina própria e a fagocitose por esses macrófagos é o primeiro passo para a produção da resposta inflamatória. Após o escape dos macrófagos, a bactéria penetra na célula intestinal, pelo lado basolateral e se dissemina para as células adjacentes, causando uma intensa resposta inflamatória no local, caracterizada pela secreção de mediadores inflamatórios que atuam no recrutamento de células do sistema imune inato, como os neutrófilos (COSSART & SANSONETTI, 2004).

1.2. Macrófagos

Os macrófagos são células pertencentes ao sistema fagocítico mononuclear, originados a partir de um progenitor mielóide, compartilhado também por granulócitos (VOLKMAN & GOWOANS, 1965). Após deixarem a medula óssea, são liberados no sangue periférico, onde circulam por vários dias como monócitos, antes de alcançarem os tecidos e se diferenciarem em macrófagos (VAN FURTH, 1985).

A primeira descrição de macrófagos foi realizada por um notável biólogo russo, ÉLLIE METTCHNIKOFF (1845-1916), que introduziu o conceito de fagocitose após observar que partículas estranhas eram ingeridas por células móveis. Essas células foram classificadas como fagócitos, divididas, com base no tamanho das células, em dois subtipos: os macrófagos e os micrófagos (PMN - polimorfonucleares) (GORDON, 2007; AUFRAY *et al.*, 2009).

Durante a década de 60, os estudos de COHN foram fundamentais para o conhecimento da biologia dos macrófagos (COHN, 1962a; COHN, 1962b; COHN, 1962c). Após esse período, houve uma notável progressão nos estudos, abordando os eventos posteriores à fagocitose, especialmente por meio dos modelos murinos desenvolvidos nos estudos pioneiros. De maneira geral, os macrófagos murinos são caracterizados fenotipicamente pela expressão de altos níveis da cadeia CD11b, da integrina Mac-1 e da glicoproteína F4/80 (MOSSER & EDWARDS *et al.*, 2008).

Os macrófagos são considerados essenciais para o funcionamento do sistema imune, participando tanto na imunidade inata, como na imunidade

adaptativa (GORDON *et al.*, 2007). Dentre suas funções, destacam-se a fagocitose e destruição de microorganismos (ADEREM & UNDERHILL, 1999), indução de processos inflamatórios (GORDON *et al.*, 2007), remoção de células apoptóticas (ADEREM & UNDERHILL, 1999), resolução de processos inflamatórios (LEIBOVICH & ROSS, 1975), angiogênese (POLVERINI *et al.*, 1977), reparo e remodelamento tissular (WERB & GORDON, 1975) e apresentação de antígenos para linfócitos T (ERIKSSON *et al.*, 1995).

A mucosa gastrointestinal abriga o maior reservatório de macrófagos, tanto do organismo humano (SHEHZAD *et al.*, 2008), como do camundongo (LEE *et al.*, 1985).

Sabe-se que os macrófagos residentes na mucosa gastrointestinal estão intimamente envolvidos na homeostasia da mucosa intestinal e na resposta inflamatória aos microrganismos invasores (MOWAT & BAIN, 2011). Os macrófagos intestinais estão localizados na mucosa subepitelial - lamina própria -, estrategicamente nos locais preferenciais na entrada de antígenos, o que favorece uma rápida eliminação dos antígenos ou microrganismos que ultrapassarem a barreira epitelial (WEBER *et al.*, 2009) (**Figura 3**). Foi evidenciada uma maior capacidade microbicida dos macrófagos intestinais, quando comparado com os monócitos e outros macrófagos, sugerindo que a alta eficiência fagocítica e atividade microbicida dos macrófagos intestinais são essenciais no controle da disseminação desses microrganismos invasores (SMYTH *et al.*, 2005).

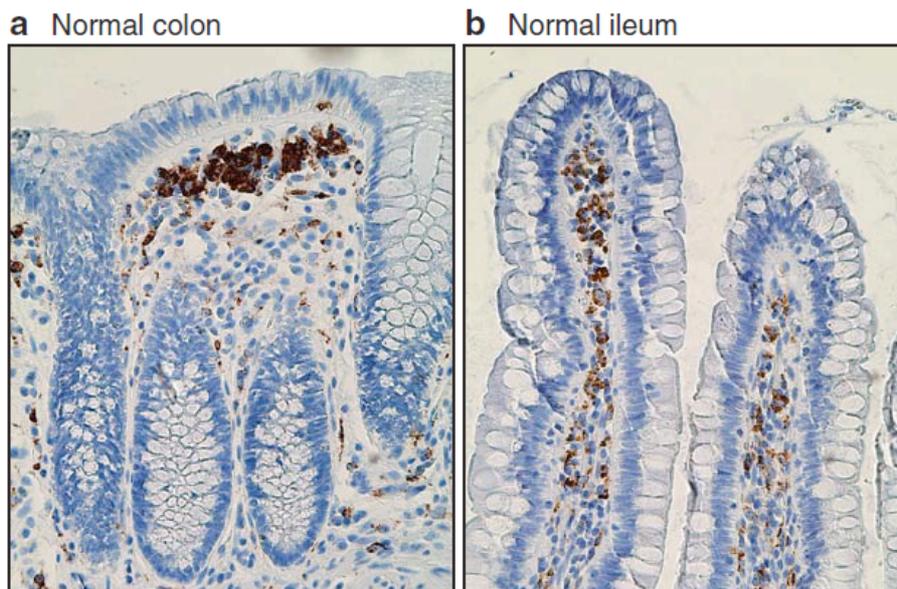


Figura 3. Imunohistoquímica dos macrófagos residentes na mucosa intestinal humana. Os macrófagos intestinais (CD68+) presentes na lamina própria no cólon (A) e no íleo (B) do intestino humano (WEBER et al., 2009).

Apesar dos macrófagos estarem diretamente envolvidas na relação entre o patógeno e o sistema imune do hospedeiro – o que, na maioria das vezes, desencadeia uma eficiente resposta inflamatória –, alguns patógenos possuem a capacidade de afetar as funções biológicas dessas células, através da inibição de suas moléculas de superfície, bem como da indução ou inibição da síntese de mediadores inflamatórios.

Dessa forma, podemos dizer que a interação entre EIEC e macrófagos pode ser considerada como um fator crucial na patogênese da infecção no hospedeiro, controlando ou não a infecção.

1.3. Interação patógeno-hospedeiro

Durante uma infecção, uma complexa sequência de eventos é iniciada após a invasão de microrganismos patogênicos no hospedeiro (MEDZHITOV & JANEWAY, 2002). A resposta imune compreende todos os mecanismos de que o hospedeiro lança para reconhecer ou identificar aquilo que lhe é estranho, como os microrganismos invasores, reagindo para poder neutralizá-lo e eliminá-lo, com ou sem prejuízos de seus próprios tecidos.

Sabe-se que é na mucosa intestinal que ocorre o início da interação de enteropatógenos com o hospedeiro. A barreira gastrointestinal é formada por uma monocamada de células epiteliais, um complexo número de agentes na superfície luminal e por tecidos linfóides organizados (GALTs – *gut-associated lymphoid tissues*), constituídos por macrófagos, células dendríticas e linfócitos B, T e NK residentes, designados a assistir uma função protetora contra antígenos estranhos (NEWBERRY & LORENZ, 2008). Para manter a função intestinal ótima, a resposta imune inflamatória, vital no combate aos enteropatógenos, deve ser intimamente controlada. Os receptores da imunidade inata de macrófagos residentes e sua regulação têm papel central no controle de inflamação da mucosa intestinal (SANSONETTI, 2006b).

Os microrganismos patogênicos têm desenvolvido uma série de estratégias para invadir o hospedeiro, evitar ou resistir a resposta imune e colonizar sítios específicos do organismo humano no intuito de estabelecer e manter a infecção (SANSONETTI & DI SANTO, 2007). Essas estratégias são comumente relacionadas a fatores de virulência das bactérias patogênicas, como moléculas de adesão, sistemas de secreção, sistemas de invasão,

enzimas e toxinas. Alguns desses fatores de virulência mimetizam proteínas de células eucarióticas, as quais podem induzir ou inibir as vias de sinalização das células infectadas do hospedeiro. Esse fato pode ocasionar diversas consequências, entre elas a reorganização do citoesqueleto celular e a inibição ou indução da resposta imune, possibilitando, assim, a invasão bacteriana na célula do hospedeiro e o estabelecimento de nichos específicos para sua colonização. Todos esses eventos facilitam a alta adaptação do patógeno e sua colonização no hospedeiro (SCHMIDT & HENSEL, 2004; FINLAY & MCFADDEN, 2006; ARBIBE *et al.*, 2007). Em contrapartida, células do sistema imune inato desenvolveram estratégias para detectar a presença desses patógenos e controlar sua multiplicação. O reconhecimento bacteriano pelas células do hospedeiro induz uma resposta inflamatória caracterizada pela secreção de uma série de mediadores solúveis (MEDZHITOV & JANEWAY, 1997).

O reconhecimento de patógenos consiste em uma séria dificuldade para a imunidade inata, devido à enorme variabilidade e alta taxa de mutação característica dos microrganismos. Em contrapartida, o sistema imune inato desenvolveu receptores, que têm como alvos estruturas moleculares comuns a grandes grupos de patógenos, ou que são produzidos por patógenos e não pelo hospedeiro. Essas estruturas são denominadas Padrões Moleculares Associados à Patógenos (PAMPs) (MEDZHITOV & JANEWAY, 2002). Os PAMPs são reconhecidos pelos receptores denominados Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs). Membros de várias famílias de proteínas funcionam como PRRs e são expressos em células responsáveis pela primeira linha de defesa do organismo, como as células apresentadoras de antígenos

(APCs), os macrófagos e células dendríticas (MEDZHITOV & JANEWAY, 2002).

Vários tipos de PRR são conhecidos, como os receptores do tipo Lectina, que se ligam a carboidratos frequentemente presentes na superfície de microrganismos (como manose e β -glucanos) (MCGREAL, 2005). Receptores tipo *scavenger* e domínios ricos em repetições de leucina (LRR) estão envolvidos no reconhecimento, tanto de lipoproteínas, como de eritrócitos e células apoptóticas, além de uma variedade de patógenos (GREAVES & GORDON, 2005; TAYLOR *et al.*, 2005). Esses receptores atuam como um botão molecular para disparar a ativação da imunidade inata e regular uma subsequente resposta imune adaptativa, essenciais no controle das infecções, tanto bacterianas, como fúngicas e virais (AKIRA *et al.*, 2006).

Recentemente, os receptores tipo *Toll-like receptor* (TLR) e *Nod-like receptor* (NLR) ganharam bastante destaque na literatura.

O envolvimento dos receptores TLR na imunidade inata foi inicialmente descrito em *Drosophila* e, posteriormente, foram identificados homólogos em humanos (MEDZHITOV & JANEWAY, 2002). Os TLR são moléculas transmembrânicas que contêm um domínio externo à membrana com sequências ricas em leucina (LRR), particulares para cada TLR, e uma cauda intracelular que mostra grande homologia com o domínio intracelular do receptor para a IL-1 (IL-1R), chamada domínio Toll/IL-1R (TIR) (GAY & KEITH, 1991). A família dos receptores do tipo Toll compreende, até o momento, onze proteínas identificadas em mamíferos (11 receptores identificados em camundongos e 10 receptores em humanos) (NETEA *et al.*, 2004). Entre seus diversos ligantes, os mais caracterizados são peptidoglicanos (PGN) e

lipoproteínas bacterianas (ligantes de TLR2); flagelina, componente do flagelo microbiano (ligante de TLR5); sequências de DNA não metilados, ricas em CpG, presentes em bactérias e vírus (ligante de TLR9); RNA dupla-fita, comuns em vírus (ligante de TLR3); LPS presentes na parede de bactérias gram-negativas (ligante de TLR4), entre outros (AKIRA *et al.*, 2006). A ativação do TLR por seus ligantes induz o recrutamento de proteínas adaptadoras específicas, como o Myd88 e IRAK, que transduzem o sinal, ativando quinases e fatores de transcrição, como o NF- κ B. Já foi estabelecido que a ativação de NF- κ B, após infecção por microrganismo, resulta na indução de um amplo repertório de genes, muitos dos quais contribuem para o estabelecimento da resposta inflamatória (SCHOTTELIUS & DINTER, 2006).

Os receptores do tipo Nod (NLR) têm como característica peculiar sua localização citosólica e compreendem proteínas NOD1 e NOD2 (Nucleotide-binding oligomerization domain containing 1 ou 2), NAIP (neuronal apoptosis inhibitor protein), APAF (apoptotic protease activating factor), IPAF (ICE-protease activating factor), entre outras (INOHARA *et al.*, 2005). Essas proteínas são formadas essencialmente por três domínios, um domínio N-terminal variável, um domínio central do tipo Nod e uma porção C-terminal com LRR (*leucine-rich repeat*). O reconhecimento de padrões se dá pela cauda LRR, e induz uma cascata de ativação que culmina na ativação do fator de transcrição NF- κ B ou da protease caspase-1, dependendo do tipo de receptor recrutado (MARTINON *et al.*, 2007).

Análises genéticas e bioquímicas têm revelado que as proteínas NLR participam do reconhecimento da imunidade inata de maneira independente dos TLR, embora esses dois tipos de receptores possam cooperar para

otimizar a resposta contra produtos microbianos (MIAO *et al.*, 2007; BERGSBAKEN *et al.*, 2009).

De maneira similar ao TLR, o reconhecimento bacteriano via NOD1 e NOD2 induz a ativação do fator de transcrição NF- κ B e secreção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6 e IL-12 (INOHARA *et al.*, 2005). Em contraste, alguns dos receptores do tipo NLR, como NALP3 e IPAF, são componentes de um grande complexo protéico denominado inflamassoma, que possui a função de recrutar e ativar a protease caspase-1 (*ICE – IL-1 β Convertase Enzyme*) (BERGSBAKEN *et al.*, 2009). A caspase-1 é produzida como um zimogênio, denominada pro-caspase-1, que é clivada em 2 subunidades – uma com 20 kDa (p20) e outra com 10 kDa (p10) – e assim transformada numa enzima ativa, que tem a capacidade de clivar proteínas em regiões específicas, como as citocinas IL-1 β e IL-18 (MARIATHASAN & MONACK, 2007). Estudos mostraram que o receptor IPAF recruta a pro-caspase-1 até o inflamassoma, através de interações diretas (Inflamassoma IPAF) ou, assim como a maioria dos inflamassomas que contêm as proteínas da família NALP, recruta pró-caspase-1 através da proteína adaptadora ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) (Inflamassoma NALP3) (MARIATHASAN *et al.*, 2004; MARTINON *et al.*, 2009) (**Figura 4**).

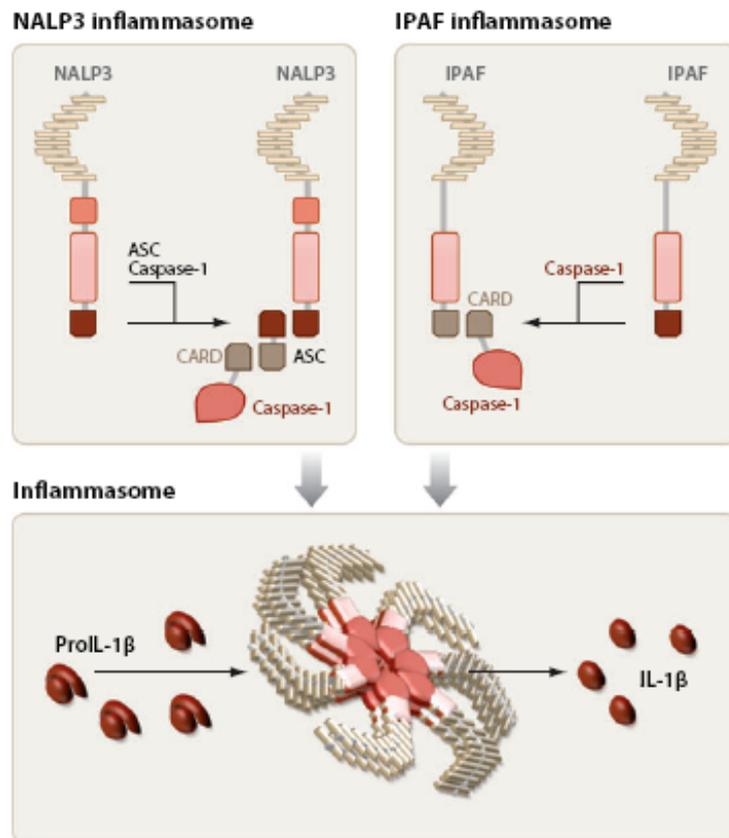


Figura 4. Representação esquemática dos inflamassomas NALP3 e IPAF. O receptor NALP3 recruta pró-caspase-1 através da proteína adaptadora ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) (Inflamassoma NALP3); e o receptor IPAF recruta a pró-caspase-1 até o inflamassoma através de interações diretas (Inflamassoma IPAF). Ambos receptores são componentes do complexo protéico denominado inflamassoma, que tem a capacidade de clivar a IL-1 β em sua forma ativa (MARTINON *et al.*, 2009).

Estudos vêm demonstrando o envolvimento da ativação de caspase-1 dos macrófagos no controle das infecções. Na infecção por *Shigella*, foi demonstrado que a caspase-1 nos macrófagos desempenha um duplo papel: a clivagem das citocinas pró-IL-1 β e pró-IL-18 em suas formas ativas (HILBI *et al.*, 1998; GUICHON *et al.*, 2001) e a indução da morte celular por piroptose (SUZUKI *et al.*, 2007). A morte celular dependente de caspase-1, denominada piroptose, é caracterizada por induzir uma intensa resposta inflamatória, crucial para controlar as infecções microbianas (BORTOLUCI & MEDZHITOV, 2010; MIAO *et al.*, 2010a). As principais características da piroptose são a ruptura da

membrana plasmática e a liberação do conteúdo intracelular pró-inflamatório (BERGSBAKEN *et al.*, 2009). A IL-18 promove ativação de células NK, a secreção de IFN- γ e resposta de linfócitos Th1; e a IL-1 β apresenta uma gama de funções, induz tanto a inflamação local como a sistêmica (DINARELLO, 1999), e recentemente, foi descrita como essencial na indução da resposta Th17 e no controle da infecção por *Salmonella* (CHUNG *et al.*, 2009; MIAO *et al.*, 2010a).

Na infecção por *Shigella*, o papel da IL-1 β no processo de migração celular relacionado à ruptura da barreira intestinal está bem estabelecido (SANSONETTI *et al.*, 2000). A IL-1 β , juntamente com TNF- α , atua na migração inicial de células do sistema imune inato (principalmente monócitos e neutrófilos) para o local da infecção (SANSONETTI, 2001).

Para que ocorra a secreção de IL-1 β e IL-18 em sua forma ativa, é necessária a ativação de duas diferentes vias: uma via TLR ou NOD1-2 (NLR), que culmina na produção da pro-IL-1 β (forma inativa), e outra via receptor NALP3, IPAF ou NAIP5 (NLR), o qual recruta e ativa a caspase-1 e, com isso, a secreção de IL-1 β em sua forma ativa (**Figura 5**) (BERGSBAKEN *et al.*, 2009).

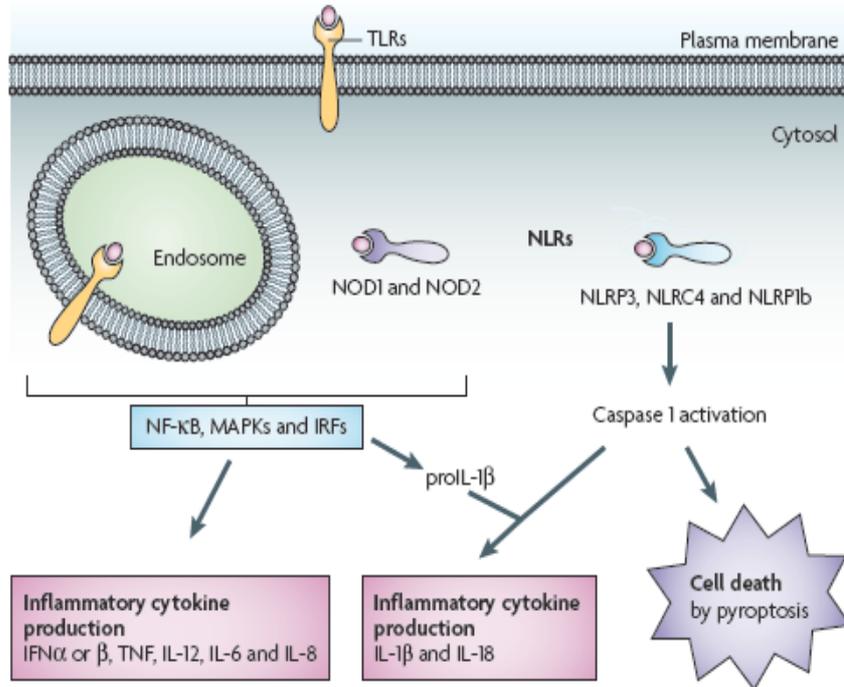


Figura 5: Representação esquemática do reconhecimento de macrófagos via receptores TLRs e NLRs. O reconhecimento via TLR ou NOD1-2 (NLR) induz a produção de citocinas inflamatórias e da pro-IL-1 β (formas inativas); e o reconhecimento via receptor NALP3, IPAF ou NAIP5 (NLR) induz a ativação de caspase-1 e, com isso, a secreção de IL-1 β e IL-18 em suas formas ativas e a morte dos macrófagos por piroptose (BERGSKAKEN *et al.*, 2009).

Aproximadamente há 20 anos, descobriu-se que macrófagos infectados com *Shigella* e *Salmonella* morriam rapidamente por um processo mediado pela ativação de caspase-1, denominado inicialmente como apoptose (ZYCHLINSKI *et al.*, 1992; ZYCHLINSKI *et al.*, 1996; CHEN *et al.*, 1996). Tanto para *Shigella* quanto para *Salmonella*, a secreção de proteínas efetoras, pelo sistema de secreção do tipo III diretamente para o citoplasma de macrófagos, levava à ativação de morte celular dependente de caspase-1, o que limitava a replicação bacteriana (CHEN *et al.*, 1996, HERSH *et al.*, 1999). Esses dados mostraram que *Shigella* e *Salmonella* geram uma potente resposta imune inata mediada por caspase-1 e a qual envolve o reconhecimento de produtos bacterianos secretados no citoplasma da célula do hospedeiro.

A ativação de caspase-1, induzida por *Shigella*, foi previamente atribuída à IpaB (HILBI et al., 1998). Uma vez que IpaB é um componente integral do complexo transmembrânico poroso do sistema de secreção que se insere na membrana celular do hospedeiro, um mutante em *ipaB* é incapaz de translocar muitas das proteínas efetoras via SSTT. Assim, torna-se difícil atribuir definitivamente a ativação de caspase-1 somente à IpaB pelo estudo de *Shigella* mutantes em *ipaB*. Em *Salmonella*, sugeriu-se que SipB, homólogo da IpaB, interage diretamente com caspase-1 e medeia sua ativação (HERSH et al., 1999). Entretanto, a ativação de caspase-1 induzida por *Salmonella* dependeu da percepção de flagelina intracelular por IPAF, e não por SipB, na qual mutantes de flagelina não induziram a ativação de caspase-1, mesmo com SipB funcional (FRANCHI et al., 2006; MIAO et al., 2006). Além disso, a expressão de SipB em macrófagos resultou em autofagia, morte independente de caspase-1 (HERNANDEZ et al., 2003). SipB é uma proteína transmembrânica com afinidade por superfícies hidrofóbicas e podem, de alguma maneira, se ligar inespecificamente com outras proteínas (HUEFFER & GALLAN, 2004), justificando assim os estudos em *Salmonella* que mostraram a ligação direta de sipB com caspase-1 (HERSH et al., 1999), e em *Shigella*, a ligação da ipaB bacteriana com a caspase-1 dos macrófagos (HILBI et al., 1998).

Diversos estudos têm salientado a importância do sistema de secreção do tipo III e IV e da flagelina bacteriana na ativação de caspase-1 e resposta imune do hospedeiro (REN et al., 2006; ROY & ZAMBONI, 2006; MIAO et al., 2006; FRANCHI et al., 2006; MIAO et al., 2007; SUZUKI et al., 2007; MIAO et

al., 2008; CASE *et al.*, 2009; MIAO *et al.*, 2010a; MIAO *et al.*, 2010b; ZHAO *et al.*, 2011).

Ainda não foi contemplada a importância do sistema de secreção do tipo III na patogenicidade de EIEC. EIEC é considerada uma bactéria imóvel, porém ANDRADE e colaboradores demonstraram que esta espécie de *Escherichia coli* também é capaz de expressar flagelina e fazer a montagem completa do flagelo (ANDRADE *et al.*, 2002). Devido ao encontro de flagelo em EIEC consideradas imóveis, é necessário esclarecer se o flagelina é um fator de virulência importante para patogenicidade de EIEC.

Apesar de a flagelina ser caracterizada como uma proteína extracelular, ela pode ser enviada para o citoplasma das células hospedeiras pelo sistema de secreção bacteriano. Foi demonstrado que a interação de *Salmonella* com células mamíferas induz a produção de flagelina pelas bactérias, uma consequência da liberação de lisofosfolípedes liberados pelas células hospedeiras e detectados pela bactéria. A produção e secreção da flagelina monomérica pela *Salmonella* induzida por lisofosfolípedes mostraram melhorar a resposta inflamatória pelas células epiteliais intestinais (SUBRAMANIAN *et al.*, 2006).

O gene *fliC* é responsável por codificar a flagelina (FliC), o principal componente do filamento flagelar, que consiste em milhares de subunidades de resíduos da proteína flagelina. O monômero de flagelina é constituído por duas regiões conservadas, denominadas N e C terminais, que flanqueiam a região central. Foi demonstrado que a região central é hipervariável e não conserva seu tamanho nem a sua composição (YONEKURA *et al.*, 2003). Em 2001, estudos utilizando frações purificadas de *Listeria monocytogenes*

caracterizaram a flagelina como o ligante para o receptor extracelular TLR-5, com posterior produção de citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α (HAYASHI *et al.*, 2001).

Estudos mais recentes com *S. Typhimurium* mostraram o papel essencial dos receptores extracelulares, TLR-4 e TLR-5, e intracelulares, IPAF e NALP3, na proteção da infecção (FEULLIT *et al.*, 2006; LARA-TEJERO *et al.*, 2006; RAUPACH *et al.*, 2006; BROZ *et al.*, 2010). Esses dados mostraram que o LPS, o sistema de secreção e a flagelina da *Salmonella* são capazes de induzir a secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, assim como a secreção de IL-1 β e IL-18, reconhecida extracelularmente por TLR-4 (ligante de LPS) e por TLR-5 (ligante de flagelina), para síntese da pro-IL1 β , e intracelularmente por IPAF (ligante de flagelina e de proteína do aparato do sistema de secreção - Rod) ou por NALP3 (ligante desconhecido), para ativação da caspase-1 e posterior processamento e secreção de IL-1 β assim como a indução de morte por piroptose (MIAO *et al.*, 2011) (**Figura 6**).

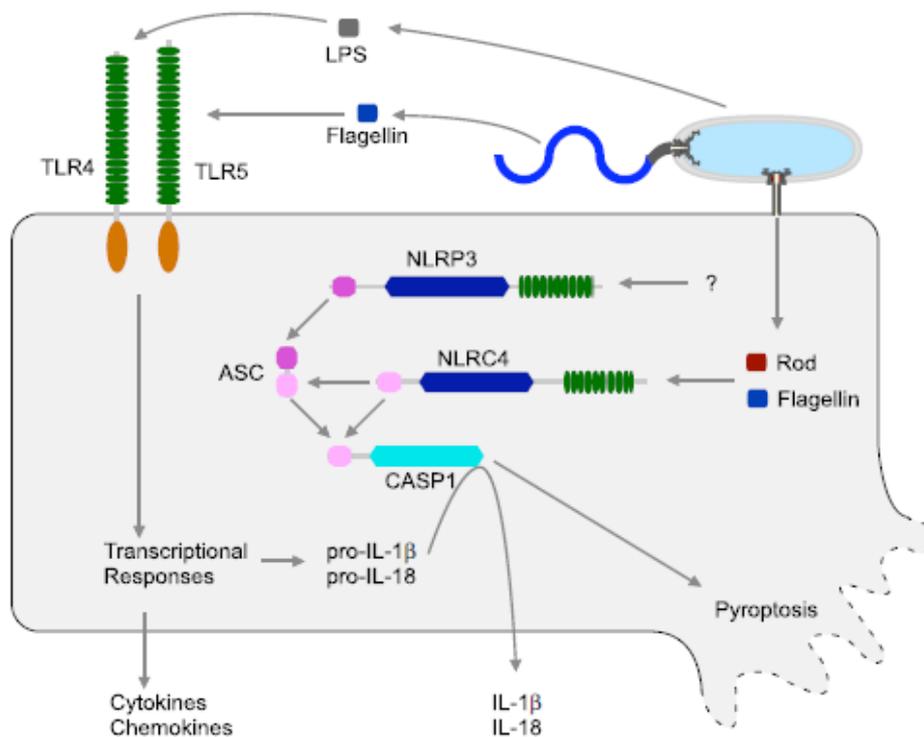


Figura 6. Representação esquemática do reconhecimento extracelular e intracelular de *Salmonella Typhimurium*. O reconhecimento via TLR-4 ou TLR-5 induz a produção de citocinas e quimiocinas e da pro-IL-1 β e pro-IL-18 (formas inativas); e o reconhecimento intracelular via receptor NALP3, ou IPAF induz a ativação de caspase-1 e, com isso, a secreção de IL-1 β e IL-18 em suas formas ativas e a morte dos macrófagos por piroptose (MIAO *et al.*, 2011)

Os estudos que abordam EIEC e o hospedeiro são praticamente inexistentes. Essa escassez de dados na literatura deixa sem resposta importantes questões sobre a virulência bacteriana, bem com a resposta do hospedeiro na infecção por EIEC. Como o curso da doença depende da relação patógeno-hospedeiro, a nossa proposta foi avaliar o papel do sistema de secreção e da flagelina na resposta imune induzida por EIEC em macrófagos, uma vez que na mucosa intestinal essas células são a primeira linha de defesa do organismo contra essas bactérias.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo avaliar a resposta imune induzida por *Escherichia coli* enteroinvasora em macrófagos murinos.

2.2. Objetivos Específicos

- Construir a cepa de EIEC deficiente na flagelina;
- Avaliar o papel do sistema de secreção e da flagelina de EIEC na sobrevivência intracelular e escape dos macrófagos;
- Avaliar o papel do sistema de secreção e da flagelina de EIEC na morte e resposta inflamatória dos macrófagos;
- Avaliar o papel da caspase-1 na resposta inflamatória e na morte dos macrófagos infectados por EIEC;
- Avaliar o papel do receptor IPAF e da molécula adaptadora ASC na resposta inflamatória e na morte dos macrófagos infectados por EIEC;
- Avaliar o papel do sistema de secreção de EIEC e da caspase-1 do hospedeiro na infecção *in vivo*;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostras bacterianas

Para os ensaios de infecção, utilizamos três cepas de *Escherichia coli* enteroinvasora: a cepa selvagem (WT); a cepa sem o plasmídio de virulência plnv, deficiente no sistema de secreção (DSS); e a cepa com deleção no gene responsável pela síntese da flagelina (*fliC*) (**Tabela 1**). Para os ensaios fenotípicos utilizamos as cepas de *Shigella flexneri* M90T (cedida pelo Dr. Phillipe Sansonetti), *Salmonella* Ohio (bacterioteca do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo) e *Escherichia coli* K-12 (bacterioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo). O cultivo das amostras bacterianas foi realizado em caldo tríptico de soja (TSB) (Oxoid, Inglaterra) ou ágar MacConkey (MC) (Becton Dickison, França) incubadas a 37°C em estufa bacteriológica. Os estoques bacterianos foram mantidos em meio TSB, suplementado com 10% de glicerol e, posteriormente, armazenados a -70°C.

Tabela 1 - Amostras bacterianas

Cepa	Características	Fonte
WT	Amostra selvagem de EIEC O124:H ⁻ (FBC124-13), isolada de fezes diarréicas, possui o plasmídio plnv. Teste de Sèreny positivo.	Moreno <i>et al.</i> , 2009
<i>fliC</i>	Amostra de EIEC O124:H ⁻ (FBC124-13) com deleção no gene <i>fliC</i> , possui o plasmídio plnv. Não foi realizado o teste de Sèreny.	Deste trabalho
SSTT	Amostra de EIEC O29:H ⁻ (FBC029-8), isolada de fezes diarréicas, não possui o plasmídio plnv. Não foi realizado o teste de Sèreny.	Bacterioteca (FCF/USP)

3.2. Padronização do inóculo bacteriano

Em todos os ensaios de infecção, as amostras de EIEC foram semeadas em ágar Vermelho Congo e incubadas a 37°C, por 48 horas. O ágar Vermelho Congo é composto por *Trypto-casein soya agar* (TSA), com 0,02% de corante vermelho congo (Sigma-Aldich, USA), como previamente descrito por PAYNE & FINKELSTEIN (1977). A coloração vermelha das colônias bacterianas é o resultado da precipitação do corante pelas proteínas secretadas através do aparato do sistema de secreção do tipo III, sendo utilizada para distinguir amostras altamente virulentas (colônias VC⁺) (MAURELLI *et al.*, 1984).

Após o período de incubação, mencionado acima, foram selecionadas colônias VC⁺, com exceção da amostra DSS (sem o plasmídio pINV, que contém os genes necessários para síntese do sistema de secreção do tipo III), para semeadura em meio *Tryptic Soya Broth* (TSB), sob agitação a 220 rpm, a 37°C (agitador TE-420, Tecnal), por aproximadamente 4 horas, para obtenção da fase *log* de crescimento. Em seguida, as bactérias foram centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos e ressuspensas em meio de cultura RPMI. A absorbância foi quantificada em espectrofotômetro (*Spectronic 20*, Bausch & Lomb) e a turvação foi acertada para se obter uma concentração bacteriana de cerca de 10⁸ bactérias por mL. A concentração bacteriana foi confirmada por semeadura da diluição em ágar MC, com posterior contagem de colônias.

3.3. Animais

Os animais utilizados foram C57Bl/6 selvagens, fêmeas, com 8-12 semanas de idade, os quais foram mantidos em condições “livres de patógenos”. Uma parte desses animais foi fornecida pelo Biotério de Camundongos Isogênicos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP) e os camundongos caspase-1^{-/-}, IPAF^{-/-} e ASC^{-/-} da linhagem C57Bl/6, nas mesmas condições, foram gentilmente cedidos pela Dra. Karina Bortolucci, da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

3.4. Cultura celular

Os macrófagos foram obtidos por lavado intraperitoneal (LIP) (SCHLEICHE & BOGDAN, 2009). Os camundongos foram estimulados via intraperitoneal, com 4% de tioglicolato (Sigma-Aldrich, Reino Unido), por 4 dias antes da coleta celular. Em seguida, foi adicionado, no peritônio do camundongo, 7 mL de solução salina tamponada (PBS – 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 2 mM KH₂PO₄), homogenizado e removido o volume máximo de PBS contendo as células peritoniais. As células totais foram quantificadas com azul de tripan, para se observar a viabilidade celular, centrifugadas e o *pellet* foi ressuspenso em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Reino Unido), contendo 10% de soro bovino fetal (SBF) inativado. Foram adicionados $2,4 \times 10^5$ e $2,4 \times 10^6$ de células totais por poço, as quais ficaram incubadas 2h a 37 °C, em atmosfera contendo 5% de CO₂, em placas de 24 e 6

poços (TPP, Suíça), para aderência dos macrófagos. Após as duas horas de incubação, as placas contendo as células peritoneais totais foram lavadas vigorosamente com PBS, a fim de eliminar as células não-aderentes – restando, aderidos à superfície da placa apenas os macrófagos peritoneais.

3.5. Ensaio de infecção dos macrófagos (*in vitro*)

Os ensaios de infecção *in vitro* foram conduzidos segundo SUZUKI e colaboradores (2007), porém com algumas modificações. Os macrófagos foram previamente estimulados com LPS (200 ng/mL) e incubados por 2 horas, a 37 °C, em atmosfera contendo 5% de CO₂. Para os ensaios de infecção, utilizamos diferentes MOIs (multiplicidade de infecção), de 1, 10, 25, 50 e 100 bactérias por macrófago. Após a adição do inóculo bacteriano, as placas de cultura foram centrifugadas a 100 g por 5 minutos, para sincronizar a infecção. As células infectadas e não-infectadas (controle negativo) foram incubadas por 30 minutos a 37 °C, em atmosfera contendo 5% de CO₂ (período de fagocitose). Depois desse período, o meio de cultura foi removido, para a posterior adição de meio contendo 100 µg/ml de gentamicina, e a cultura celular foi incubada por diferentes intervalos de tempo: 1, 2, 3, 5 e 10 horas, para remover as bactérias extracelulares e evitar, assim, a reinfeção bacteriana (período denominado pós-fagocitose).

3.6. Ensaio de infecção *in vivo*

Os ensaios de infecção *in vivo* foram conduzidos segundo descrito por SANSONETTI e colaboradores (2000). Os animais selvagens ou nocautes foram infectados via intra-traqueal (i.p.) com 50 uL de PBS contendo ou não 2×10^8 bactérias de EIEC. Após 24, 48 e 96 horas pós-infecção, os animais foram sacrificados e os pulmões retirados para quantificação bacteriana e para realização de cortes histológicos.

3.7. Construção da cepa *fliC*

3.7.1. Sequenciamento

A extração do DNA bacteriano foi realizada com o *kit Wizard Genomic DNA Purification* (Promega, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. O sequenciamento foi realizado a partir da amplificação do gene *fliC* de EIEC O124:H-, utilizando-se de iniciadores para regiões conservadas deste gene (*fliC*) (**tabela 2**). O produto da PCR foi purificado com o *kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) e quantificado por NanoDrop ND-1000 (Uniscience, Brasil). Na reação, utilizamos 100ng de DNA, 10pmol de iniciadores e o *BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle sequencing Kit* (Applied Biosystems), de acordo com as recomendações do fabricante.

A sequência de nucleotídeos foi realizada pelo Serviço de Sequenciamento de DNA do Instituto de Química da Universidade de São

Paulo (IQ-USP), com a utilização do sequenciador *ABI PRISM® 3100 GeneticAnalyzer* (HITACHI).

Tabela 2 - Iniciadores utilizados nas reações de PCR

Gene	Sequência (5´-3´)	Tamanho do fragmento (pb)	Temperatura de hibridização
<i>fliC</i>	<i>fliCt F</i> – CCCTGCAGCAGAGACAGAA <i>fliCt R</i> – ACCAACAGCCTCTCGCTGA	1750	60°C
<i>fliC</i>	<i>fliCint F</i> – CCCTGCAGCAGAGACAGAA <i>fliCint R</i> – ACCAACAGCCTCTCGCTGA	1032	58°C

3.7.2. Análise do gene *fliC*

As sequências foram analisadas pelo software BioEdit (HALL, 1999) e BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990) e os resultados foram alinhados com as sequências, depositadas no GenBank, de *E. coli* K-12. Com a análise da sequência do gene da flagelina de EIEC O124:H-, foram sintetizados os iniciadores necessários para realização da mutagênese do gene *fliC* de EIEC.

3.7.3. Mutagênese

Os plasmídeos necessários para técnica de mutação foram cedidos pelo Dr. Chantal LeBouguéneq, do Instituto Pasteur, França. O gene *fliC* foi deletado da cepa selvagem de EIEC pelo sistema de mutagênese por λ -red, descrito por DATSENKO & WANNER, 2000.

Para realizar a recombinação alélica, inicialmente foi realizada a amplificação do fragmento por PCR. Para isso, utilizamos iniciadores contendo

40 pares de base (pb) com regiões homólogas ao 5' (*fliC.zeo F*) e 3' (*fliC.zeo R*) (**Tabela 3**) das extremidades do gene *fliC* e a sequência específica para o gene que codifica a resistência a zeocina (o gene *sh ble*) (CHANTALL *et al.*, 2004). Os reagentes foram utilizados nas seguintes concentrações: 1,0 mM de MgCl₂, 150 µM de dNTPs, 0,4 µM de cada iniciador, 1,5 U de *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen, Carlsbad), tampão da enzima 1x concentrado, 1 µL de DNA bacteriano – na concentração de 50 ng/µL – e água miliQ estéril, em um volume final de 50 µL. As condições de PCR foram as seguintes: etapa inicial de desnaturação por 5 minutos, a 94°C; cerca de 30 ciclos com desnaturação por 45 segundos, a 94°C; anelamento por 45 segundos, a 57°C; extensão a temperatura de 68°C, por 1min e etapa final de 68°C, por 7 minutos. O produto de PCR foi purificado em gel de agarose a 1,5%, após separação eletroforética por 90 minutos em tampão de corrida TBE 1x. O gel foi corado em brometo de etídio (10 ug/ml) para observação das bandas sob luz ultravioleta (UV) e o fragmento correspondente ao produto esperado foi cortado e purificado com o kit de acordo com as recomendações do fabricante (PROMEGA). As amostras foram quantificadas utilizando-se o *NanoDrop ND-1000* (Unisciense, Brasil) a 260nm, com sua pureza avaliada em comprimento de onda de 260/280nm.

Para a obtenção da bactéria competente, foi preparado um pré-inoculo, o qual foi mantido *overnight*, sob agitação a 220 rpm, a 37°C e diluído a uma DO_{600nm} de 0,1, em um *erlenmeyer* contendo 50mL de meio LB. Este inoculo foi mantido sob agitação e temperatura já mencionada até alcançar uma DO_{600nm} de 0,6. As células foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 min, a 4°C e lavadas com água milliQ estéril. Posteriormente foram centrifugadas nas

mesmas condições citadas acima e lavadas duas vezes com 10 mL contendo 10% de glicerol estéril, e centrifugadas novamente a 12.000 rpm por 5 min, a 4° C, em cada etapa de lavagens. Após as lavagens, as células foram ressuspensas em solução com 10% de glicerol estéril e ajustadas a uma concentração de 10^{11} bactérias/mL. O plasmídeo pKOBEG-Apra (PICHON *et al.*, 2009) foi introduzido na bactéria por eletroporação, utilizando-se 100 ng do plasmídeo e 50 μ L da célula eletrocompetente. As células eletroporadas foram ressuspensas em 1 mL de meio LB, mantidas sob agitação por 90 min, a 30°C e então plaqueadas em placas LB ágar contendo apramicina na concentração de 100 μ g/mL. As placas foram incubadas, por 24 horas, a 30°C.

Foi realizado, com a bactéria contendo o plasmídeo pKOBEG-Apra, um pré-inóculo, mantido sob agitação *overnight* a 220 rpm, a 30°C, e 3 mL desta cultura foi centrifugada a 12.000 rpm por 3 minutos, a temperatura ambiente. Foram ressuspensas em 1 mL de meio LB e adicionado L-arabinose a fim de obter-se uma concentração final de 0,2%. Posteriormente esse mesmo inóculo foi mantido sob agitação por 2 horas, a 37°C, para ativar a transcrição dos genes do sistema γ -red. Após este período de incubação, as células foram centrifugadas a 12.000 rpm por 3 minutos, em temperatura ambiente e ressuspensas em 100 μ L de 10% de glicerol estéril. Essas células foram eletroporadas utilizando-se 1 μ g do produto de PCR purificado, nas mesmas condições já descritas, ressuspendendo-as em 1 mL de meio LB e incubando-as por 2 horas, a 30°C, sob agitação a 220 rpm.

As células eletroporadas recuperadas foram plaqueadas em placas de petri contendo LB ágar acrescido de zeocina na concentração de 60 μ g/mL. Para verificar se houve a recombinação alélica, as colônias obtidas foram

selecionadas em placas de LB ágar contendo apramicina (100 µg/mL) ou zeocina (60 µg/mL). As colônias capazes de crescer em zeocina, e não em apramicina (perda do plasmídeo), foram selecionadas e verificadas por PCR, para a amplificação do fragmento do gene *sh ble*, porém usamos os iniciadores *ampli.zeo F* e *ampli.zeo R* (Tabela 3).

Tabela 3 - Iniciadores utilizados nas reações de PCR

Gene	Sequência (5´-3´)	Tamanho do fragmento (pb)	Temperatura de hibridização
<i>fliC.zeo</i>	<i>fliC.zeo F</i> – ATGGCACAAGTCATTAATACCA ACAGCCTCTCGCTGATCACTCATCGCTTGC ATTAGAAAGG <i>fliC.zeo R</i> –GCAGCAGAGACAGAACCTGCT GCGGTACCTGGTTGAATGATGCAGAG ATTAAGCCCTGCAGCAGAGACAGAA	1640	57°C
<i>ampli.zeo</i>	<i>ampli.zeo F</i> – CCCTGCAGCAGAGACAGAA <i>ampli.zeo R</i> – ACCAACAGCCTCTCGCTGA	550	59°C

3.8. Curva de crescimento

Para determinar a curva de crescimento das cepas de EIEC, uma cultura *overnight* foi mantida sob agitação constante a 37°C, e posteriormente foi diluída a uma DO_{600nm} de 0,05, em tubos de rosca contendo 3 mL de meio TSB. O crescimento bacteriano foi avaliado de acordo com a sua densidade óptica, conforme os intervalos de tempo de 20min, 40min, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 9h, 12h, 24h e 32h. Esse ensaio foi realizado em quintuplicata para cada espécie bacteriana.

3.9. Ensaio de motilidade

A determinação do fenótipo de motilidade foi realizada em frascos de vidro contendo 5 mL de meio *Trypto-casein soya broth* (TSB), acrescido de 0,17%, 0,2%, 0,3% e 0,4% de ágar (MERCK, Alemanha). As cepas bacterianas foram inoculadas com uma agulha de platina e incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas, a 37°C. Como controle positivo do ensaio, foi utilizado a *Salmonella* OHIO e como controle negativo foi utilizado a *Shigella flexneri* M90T. Tal ensaio foi realizado em quintuplicata para cada espécie bacteriana.

3.10. Ensaio de UFC

Os ensaios de UFC foram conduzidos segundo BANDO e colaboradores (2010) com algumas modificações. Para quantificação de bactérias intracelulares realizamos ensaio similar ao citado no **item 3.5** (período de fagocitose). Após esse período, a cultura celular foi incubada, por 0h, 1h e 2h, em meio com antibiótico. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e lisadas com Triton X - 100 a 0,1%. Diluições seriadas foram realizadas, semeadas superficialmente em placas contendo ágar MacConkey e incubadas a 37 °C (estufa 002-CB, Fanem, Brasil), por 24 horas, para contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). Os ensaios foram realizados em triplicata para cada espécie bacteriana.

Para avaliar a capacidade de escape bacteriano, o mesmo protocolo acima foi utilizado. No entanto, após os períodos de 1h e 2h de incubação em

meio com antibiótico, o meio foi retirado e adicionado meio sem antibiótico, por 30 minutos, para permitir a sobrevivência bacteriana após o escape dos macrófagos. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e lisadas com Triton X - 100 a 0,1%. Diluições seriadas foram realizadas, semeadas superficialmente em placas contendo ágar MacConkey e incubadas a 37 °C (estufa 002-CB, Fanem, Brasil), por 24 horas, para contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). Os ensaios foram realizados em triplicata para cada espécie bacteriana.

Para avaliar a sobrevivência bacteriana na infecção *in vivo*, os órgãos pulmões foram macerados em PBS e diluições seriadas foram realizadas, semeadas superficialmente em placas contendo ágar MacConkey e incubadas a 37 °C (estufa 002-CB, Fanem, Brasil), por 24 horas, para contagem das unidades formadoras de colônias (UFC).

3.11. Extração de RNA

Foi realizado ensaio similar ao descrito no **item 3.5** (período de fagocitose) para extração do RNA total, o qual foi utilizado nos ensaios de RT-PCR. Após diferentes tempos de infecção, 1, 2 e 3 horas, o meio contendo gentamicina foi retirado e a extração do RNA total das células foi realizada utilizando o *Kit RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Brasil), de acordo com as recomendações do fabricante. A preparação foi tratada com DNase (*RNase-Free DNase set*) (Qiagen) e as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,5% no tampão de corrida TBE 1x (Trisma-base 0,1M, ácido bórico 0,09M e EDTA 1mM) e analisadas após coloração com brometo de

etídio (10 ug/ml) sob luz ultravioleta (UV), para observar a integridade do RNA.

O RNA total foi quantificado no *NanoDrop ND-1000* (Unisciense, Brasil) a 260nm, com sua pureza avaliada em comprimento de onda de 260/280nm e estocado a -80 °C até o momento da utilização.

3.12. Síntese de DNA complementar

O RNA foi diluído até uma concentração final de 50 ng/μL para síntese de DNA complementar (cDNA), utilizando-se o *Kit Superscript First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen, Brasil), de acordo com as recomendações do fabricante. Como iniciador, utilizamos *Random Hexamer* para o RNA do procarioto e *oligo(Dt)*, o qual se hibridiza com a cauda poly(A), encontrada na maioria do RNA de células eucarióticas. O cDNA obtido foi diluído e utilizado no RT-PCR.

3.13. RT-PCR

O cDNA obtido foi amplificado por reação de PCR, para análise da transcrição dos genes avaliados. Os reagentes foram utilizados nas seguintes concentrações: 1,5 mM de MgCl₂, 150 μM de DNTPs, 0,4 μM de cada iniciador, 1,5 U de Taq DNApolimerase, tampão da enzima 1x concentrado (Fermentas), 1 μL de cDNA e água miliQ estéril em um volume final de 20 μL. As condições de PCR foram as seguintes: etapa inicial de desnaturação por 5 minutos, a 94°C; cerca de 20-30 ciclos com desnaturação por 45 segundos, a 94°C;

anelamento por 45 segundos, na temperatura ideal de cada par de iniciadores e extensão por cerca de 1 minuto, a 72°C; etapa final de extensão por 7 minutos. Os iniciadores utilizados e seus respectivos tamanhos estão descritos na **tabela 4**.

Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose a 1,5%, após separação eletroforética por 60 minutos em tampão de corrida TBE 1x. O gel foi corado em brometo de etídio (10 ug/ml), para observação das bandas sob luz ultravioleta (UV). As imagens foram digitalizadas pelo sistema *Photodocumentation System*, modelo: *DP-001.FDC version 10* (Vilber Lourmat, França) e impressas pelo sistema de *Vídeo Graphic UP-895CE* (Sony).

Após obtenção da imagem digital, os tamanhos dos fragmentos de DNA foram submetidos à análise densitométrica da intensidade das bandas no programa *PhotoCaptMw version 10.01 for Windows*. O nível de expressão de cada gene foi calculado como a razão da intensidade da banda do gene de interesse, sobre a intensidade da banda utilizada como controle. Como controle bacteriano, foi utilizado o gene 16S (BANDO *et al.*, 2010) e o controle eucarioto foi o gene da enzima gliceraldeído-fosfato desidrogenase (GAPDH), expresso constitutivamente. O gene *gapdh*, conhecido pelo seu papel fundamental no metabolismo da glicose e produção de grupos fosfato de alto armazenamento energético, tem sido amplamente utilizado como controle interno (OTTAWAY & APPS, 1994).

Tabela 4 - Iniciadores utilizados nas reações de RT-PCR

Gene	Sequência (5´-3´)	Tamanho do fragmento (pb)	Temperatura de hibridização
<i>fliC</i>	<i>fliCrt F</i> - CCCTGCAGCAGAGACAGAA <i>fliCrt R</i> - ACCAACAGCCTCTCGCTGA	192	60°C
<i>ipaB</i>	<i>ipaB F</i> - CCGGCAATTCCTTCATGGAAC <i>ipaB R</i> - AGTTGAGAAGAAAAATTCCTG	310	55°C
<i>ipaC</i>	<i>ipaC F</i> - GTCACACAAGTAGGTATAACG <i>ipaC R</i> - TCTGGGTGTCAATTTTATCCT	301	50°C
<i>16S</i>	16S-F CAGCAGCCGCGTAATAC 16S-R ACCAGGGTATCTAATCCTGT	283	60°C

3.14. Ensaio de formação de poros na membrana celular

Para avaliar a formação de poros na membrana celular dos macrófagos (CASE *et al.*, 2009), foi realizado ensaio similar ao descrito no **item 3.5**, a cultura celular foi incubada por 2h e, após esse período, as células foram recolhidas, lavadas com *Staining Buffer* (PBS contendo 1% SFB e 0,05% de azida) e ressuspensas em tubos com alíquotas celulares iguais. Nas alíquotas celulares, foi adicionado o iodeto de propídio (PI) (50µg/ml) diluído em PBS, por 5 minutos, em ambiente escuro. Após esse período, 100 mil eventos foram captados em Citômetro de Fluxo (*FacsCanto II*, Becton-Dickinson) e as amostras foram analisadas no programa *FlowJo version 7.2.4*, de acordo com a intensidade de fluorescência. Os ensaios foram realizados em duplicata para cada espécie bacteriana.

3.15. Ensaio de lise celular

Para avaliar a morte dos macrófagos infectados com as cepas de EIEC, foi realizado ensaio similar ao citado no **item 3.5** (período de fagocitose). Após esse período, a cultura celular foi incubada por diferentes intervalos de tempo, de 1, 3 e 5 horas, para retirada do sobrenadante da cultura celular. A morte dos macrófagos foi mensurada pela detecção de LDH no sobrenadante das culturas pelo kit colorimétrico Cytotox 96 kit (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. Como controle negativo, foram utilizadas as células não-infectadas, e como controle positivo, adicionamos solução de lise (Promega) às células. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada espécie bacteriana.

3.16. Ensaio de apoptose

Para avaliar a indução de apoptose dos macrófagos infectados, foi utilizado o *kit Apoptosis Detection* (Sigma-Aldrich, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. Foi realizado ensaio similar ao descrito no **item 3.5**. Posteriormente a cultura celular foi incubada por 2h e, após esse período, as células foram recolhidas, lavadas e ressuspensas com a solução *Binding buffer* 1x, diluída em PBS, em tubos com alíquotas celulares iguais. Nas alíquotas celulares, adicionamos a anexina V-FITC por 15 minutos e em seguida, o iodeto de propídio por 5 minutos, em ambiente escuro. Após esse período, 100 mil eventos foram captados em Citômetro de Fluxo (*FacsCanto II*, Becton-Dickinson) e as amostras foram analisadas no programa *FlowJo version*

7.2.4, de acordo com a expressão de anexina-V (FITC) e PI (PE). Os ensaios foram realizados em duplicata para cada espécie bacteriana.

3.17. Ensaio de detecção de células produtoras de IL-10

Utilizamos a citometria de fluxo para detecção intracelular da citocina IL-10 nas células não-infectadas ou infectadas com as cepas de EIEC. Também realizamos ensaio similar ao citado no **item 3.5**, e a cultura celular foi incubada com monensina (*Stop Golgi*) (Pharmingen), por 10h, a 37 °C, em atmosfera contendo 5% de CO₂. Após lavagens com *Staining Buffer*, foi feita a marcação extracelular com anticorpos monoclonais anti-F4/80, por 30 min, a 4 °C. Em seguida, as células foram fixadas com Citofix (Pharmingen) (100 µl/10⁶ células) por 10 min. Após lavagens com *Staining Buffer*, as células foram permeabilizadas com 100 µl de PermWash (Pharmingen). Nessa etapa, as células foram incubadas com um anticorpo monoclonal anti-IL-10 por 30 minutos, em ambiente protegido de luz. Após esses procedimentos, as células foram lavadas, ressuspendidas em 0,2 mL de *Staining Buffer* e analisadas em citômetro de fluxo *FacsCanto II* (Becton Dickinson), de acordo com a intensidade de fluorescência (FL1, FL2) e a dispersão frontal (FSC) e lateral (SSC) do feixe luminoso. Os resultados foram analisados no programa *FlowJo version 7.2.4*. Os ensaios foram realizados em duplicata para cada espécie bacteriana.

3.18. Ensaio de ELISA

Para avaliação da concentração das citocinas IL-1 β e TNF- α foram realizados ensaios similares aos descritos no **item 3.5** (30 minutos de infecção), por diferentes intervalos de tempo pós-fagocitose, de 5 e 10 horas, para retirada do sobrenadante da cultura celular. A concentração das citocinas no sobrenadante celular foi determinada por ELISA de captura (R&D), de acordo com as recomendações do fabricante. Placas de 96 poços foram sensibilizadas com o anticorpo de captura diluído em PBS e incubadas *overnight*. Após lavagem com PBS acrescido de tween-20 a 0,05%, as placas foram incubadas por 1 hora, com PBS contendo 0,1% de BSA (Sigma-Aldrich, EUA), para promover o bloqueio dos sítios livres do plástico. A curva-padrão foi realizada com a utilização de citocinas recombinantes diluídas em PBS com 1% de BSA, e as amostras foram incubadas por 2 horas.

As placas foram lavadas com PBS acrescido de *tween-20* a 0,05% e incubadas por 2 horas, com os anticorpos de detecção conjugados à biotina, e diluídos em PBS acrescido 0,1% BSA. Após esse período, foram lavadas e incubadas com conjugado estreptoavidina-peroxidase, por 30 minutos. Depois foram novamente lavadas e adicionamos a elas o-fenilenodiamina (1 mg/mL) diluída em tampão citrato de sódio (0,1 M, pH 4,5). Por fim foram incubadas por 30 minutos para posterior revelação. Para o bloqueio da reação, foi utilizado ácido sulfúrico 4N e a leitura das densidades ópticas foi realizada em leitor automático (comprimento de onda de 450 nm). As concentrações de cada citocina nas amostras foram calculadas mediante equação de regressão linear com base na curva-padrão. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

3.19. Detecção de óxido nítrico

A produção de óxido nítrico foi analisada pelo método de Griess (RESTA-LENERT & BARRETT, 2002). Foram realizados ensaios similares aos descritos no **item 3.5**, no intervalo de pós-infecção de 10 horas para retirada do sobrenadante da cultura celular.

Resumidamente, 50 µl dos sobrenadantes de cultura foram incubados com 50 µl do reagente de Griess (Sigma, EUA), por 5 minutos, em temperatura ambiente. A concentração de nitrito (NO_2^-) foi determinada por leitura da densidade óptica a 550 nm em referência ao padrão da solução de NaNO_2 . As dosagens foram realizadas em triplicata.

3.20. Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada no software *GraphPad Prism version 5.0*, através da análise de variância *one way ANOVA* (Teste Turkey). As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando o valor de p for <0.05 .

4. RESULTADOS

4.1. Construção da cepa EIEC O124:H- deficiente no gene da flagelina

Nossos resultados confirmaram a presença dos genes plasmídias *ipaB* e *ipaC*, e do gene *fliC* no DNA de EIEC O124:H⁻, sugerindo a possível síntese do sistema de secreção do tipo III e da proteína flagelina. Esses dados corroboram com os dados obtidos anteriormente por nosso grupo (ANDRADE *et al.*, 2004; MORENO *et al.*, 2009). A síntese do sistema de secreção de EIEC foi evidenciada no cultivo bacteriano em meio contendo vermelho congou, uma vez que induz a montagem do sistema de secreção, assim como a secreção de proteínas que se precipitam com o corante, formando colônias vermelhas. Como controle positivo da síntese do sistema de secreção do tipo III, utilizamos a *S. flexneri* M90T (**Figura 6A**).

A síntese da flagelina e a montagem da estrutura do flagelo de EIEC foram confirmadas pelo fenótipo de disseminação em ágar semi-sólido (*soft agar*). A concentração de ágar no meio freqüentemente utilizado em testes de motilidade para o diagnóstico clínico é 0,4% (EWING, 1986). No entanto, nessa concentração de ágar a motilidade da EIEC não pode ser visualizada e por isso é considerada uma bactéria imóvel. Por isso avaliamos a motilidade das cepas de EIEC na concentração de 0,4% mas também em concentrações menores: 0,2% e 0,17%. De fato, a concentração de 0,4% não é favorável para a motilidade da EIEC em 24 horas de incubação. Contudo, essa capacidade pode ser claramente evidenciada no meio com concentração de 0,2% de ágar, e em especial no meio com a menor concentração analisada, 0,17% de ágar (**Figura 6B**). Como controle positivo de motilidade foi utilizado a cepa de *Salmonella* Ohio e como controle negativo a *Shigella flexneri* M90T.

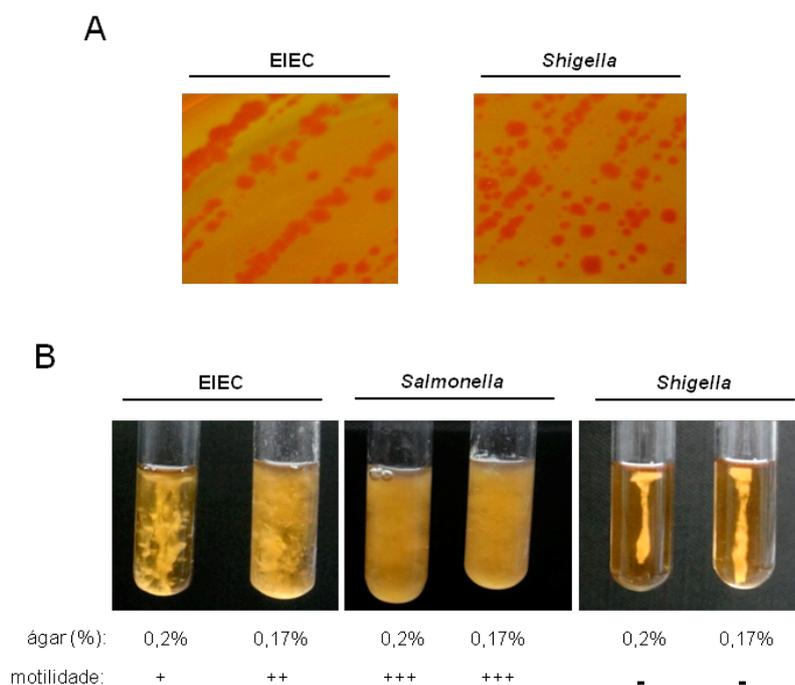


Figura 6: Caracterização fenotípica da cepa EIEC O124:H-. Placa de ágar vermelho congo semeados com a cepas de EIEC O124:H- e *Shigella flexneri* M90T, incubados a 37°C por 48 horas (**A**). Ensaio de motilidade de EIEC O124:H-, *Salmonella* Ohio e *S. flexneri* M90T em meio TSB contendo 0,2% e 0,17% de ágar e incubados a 37°C por 24 horas após inoculação com agulha de platina (**B**). (+++) motilidade alta, (++) motilidade moderada, (+) motilidade baixa, (-) sem motilidade. Os dados são representativos de três experimentos independentes.

Devido à ausência de dados referentes ao genoma da *E.coli* enteroinvasora (EIEC), os produtos do PCR do gene *fliC* de EIEC O124:H- foram purificados e sequenciados. A partir da reação de sequenciamento, foi possível identificar uma relativa similaridade após o alinhamento com o gene *fliC* da *E. coli* K12 MG1655I, apresentando 82,4% de nucleotídeos idênticos (**Figura 7A**). Isso é condizente com a literatura, pois há uma similaridade entre o C-terminal e o N-terminal da proteína, porém na região central foi demonstrado que há uma grande variabilidade genética entre diferentes cepas e espécies, contendo as porções da proteína descritas como os diferentes tipos de antígenos H (flagelar).

No intuito de avaliar o papel da flagelina de EIEC na resposta imune de macrófagos, construímos uma cepa mutante deficiente no gene *fliC*, o qual é responsável pela síntese da flagelina bacteriana. A mutação foi baseada por uma recombinação eficiente entre o gene alvo (*fliC*) e um produto da PCR, o cassete de resistência ao antibiótico (zeocina). Assim, os mutantes do gene alvo foram isolados como colônias resistentes ao antibiótico zeocina. A construção da cepa deficiente na flagelina (*fliC*) foi confirmada pela amplificação do gene da zeocina inserido na cepa mutante e, como esperado, não houve amplificação do gene zeocina na cepa selvagem (**Figura 7**).

Com a cepa mutante foi possível a realização de ensaios para verificar as possíveis diferenças existentes entre as cepas selvagens e a cepa deficiente em *fliC*, além da resposta imune induzida por essas bactérias.

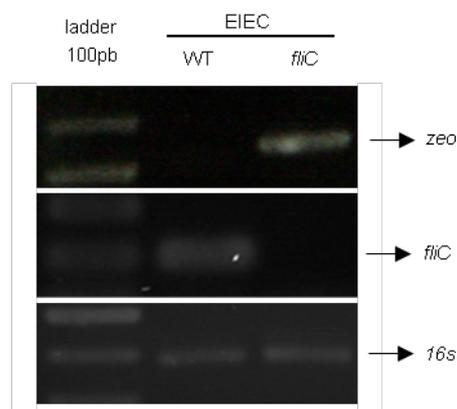


Figura 7: Construção da cepa de EIEC deficiente na flagelina. Gel de agarose com os produtos de PCR dos genes *zeo*, *fliC* e *16S* da cepa de EIEC selvagem (WT) e deficiente em flagelina (*fliC*).

4.2. Caracterização das cepas de EIEC

Para melhor entendimento da patogênese da EIEC, bem como a resposta inflamatória dos macrófagos em relação a essa espécie bacteriana, nos ensaios de infecção utilizamos três cepas de *Escherichia coli* enteroinvasora: a cepa selvagem (WT), a cepa sem o plasmídio de virulência, deficiente no sistema de secreção do tipo III (DSS) e a cepa mutante no gene responsável pela síntese da flagelina (*fliC*).

Com o intuito de avaliar se a ausência do plasmídio Inv ou a deleção do gene *fliC* resultou em mudanças na expressão de outros genes essenciais ao crescimento bacteriano, o próximo passo foi avaliar a curva de crescimento das diferentes cepas de EIEC. A deleção no gene *fliC* ou a ausência do plasmídio não alterou a regulação de outros genes bacterianos, uma vez que não foi observada nenhuma diferença entre o crescimento das cepas WT, DSS e *fliC* (**Figura 8A**).

Como mencionado anteriormente, o meio de cultura contendo vermelho congo é utilizado para verificar a funcionabilidade do sistema de secreção bacteriano. O cultivo bacteriano neste meio confirmou a falha na montagem do aparato de secreção da cepa DSS (colônias incolores) e a presença do aparato de secreção das cepas WT e *fliC* (colônias vermelhas) (**Figura 8B**). Apesar da falha na montagem do sistema de secreção, nossos resultados mostraram que a cepa SSTT conserva a sua motilidade, já que os genes responsáveis pela síntese da flagelina e do flagelo bacteriano estão localizados no DNA cromossomal, enquanto os genes responsáveis pela síntese do sistema de secreção estão localizados no plasmídio de virulência na EIEC. Como

esperado, foi evidenciada a falta de motilidade da EIEC deficiente em flagelina (fliC) (**Figura 8C**).

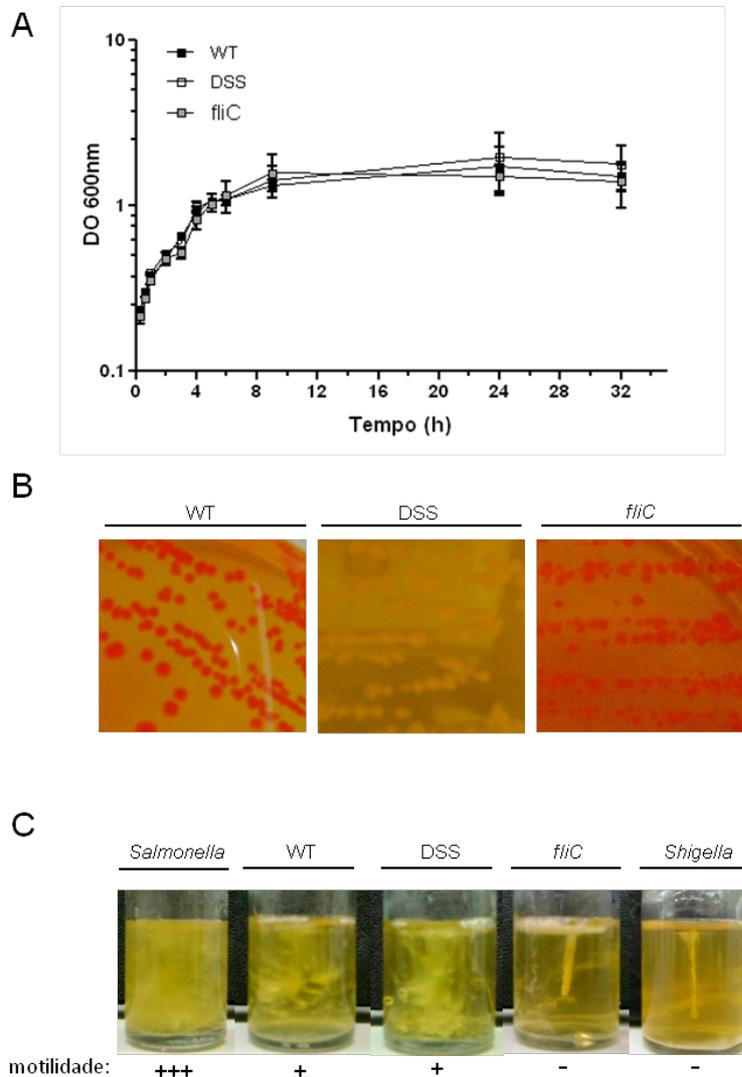


Figura 8: Caracterização das três cepas de EIEC: selvagem (WT), deficiente no plasmídio de virulência (DSS) e deficiente na flagelina (fliC). Curva de crescimento das cepas de EIEC em meio TSB, incubados no agitador a 37°C por diferentes intervalos de tempo (**A**). Placa de ágar vermelho congo semeadas com as diferentes cepas de EIEC e incubadas a 37°C por 48 horas (**B**). Ensaio de motilidade em meio TSB contendo 0,2% de ágar e incubados a 37°C por 24 horas após inoculação com agulha de platina de Salmonella Ohio, das diferentes cepas de EIEC (WT, DSS e fliC) e *S. flexneri* M90T (**C**). (+++) motilidade alta, (++) motilidade moderada (+) motilidade baixa, (-) sem motilidade. Os dados são representativos de três experimentos independentes.

4.3. Caracterização da cultura de macrófagos

Para avaliar a resposta imune induzida pelas diferentes cepas de EIEC, foi utilizado macrófagos peritonias de camundongos previamente estimulados com tioglicolato. A cavidade peritoneal abriga grande parte dos órgãos e nela está presente uma variedade de células do sistema imune, entre elas linfócitos T, linfócitos B, células matadoras naturais (NK), granulócitos e fagócitos do sistema mononuclear. Uma vez que os fagócitos podem ser facilmente enriquecidos e isolados do compartimento peritoneal, essas células vêm sendo extensivamente utilizadas como ferramenta experimental desde o início dos estudos da biologia dos macrófagos. De maneira geral, os macrófagos murinos são caracterizados fenotipicamente pela expressão de altos níveis da cadeia CD11b, da integrina Mac-1 e da glicoproteína F4/80 (MOSSER *et al.*, 2008).

Para analisar as células peritoneais após inoculação com tioglicolato, as células foram marcadas com anticorpo monoclonal para F4/80 (marcador de macrófagos murinos) e analisadas em citometro de fluxo. A análise dos dados foi inicialmente realizada pela exclusão de *doublets* (duas células aderidas entre si) e posteriormente a expressão de F4/80 foi verificada. Como controle negativo da marcação para F4/80, foi considerado o FMO (*Fluorescence Minus One*), no qual as células são marcadas com todos os anticorpos, exceto aquele de interesse. Assim, as células com marcação acima de seu FMO foram consideradas positivas para F4/80.

Após quatro dias de estímulo, cerca de 80% das células totais do peritônio eram positivas para F4/80, o que caracteriza o fenótipo de macrófagos elicitados (**Figura 9A**). O protocolo utilizado para purificação dos

macrófagos peritoneais foi a aderência em placas de cultura. Após 2 horas de aderência quase a totalidade das células (>95%) eram macrófagos (F4/80⁺) (**Figura 9B**). Além disso, as células aderentes apresentam características morfológicas de macrófagos, sendo arredondadas ou espreiadas, e com grande citoplasma (**Figura 9C**).

Esses dados mostram que a população de macrófagos utilizada nos experimentos subsequentes estava pura o suficiente para a avaliação da resposta imune induzida pelas diferentes cepas de EIEC.

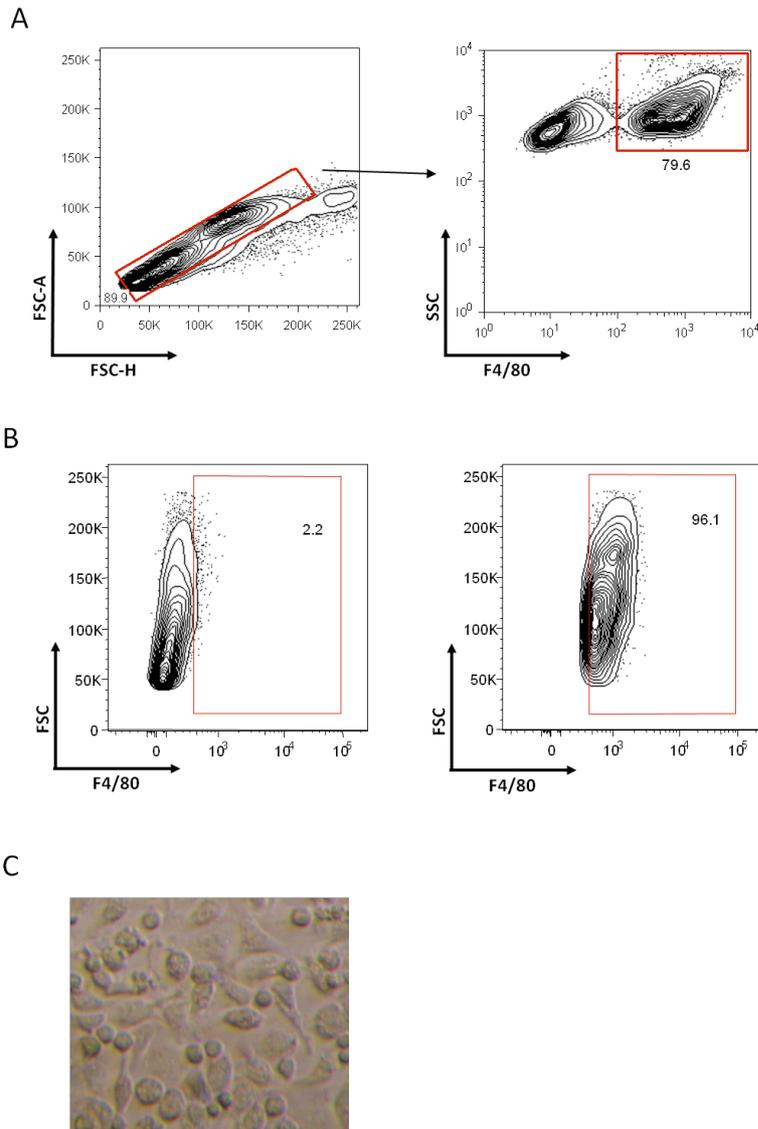


Figura 9: Análise fenotípica dos macrófagos peritoneais. As células peritoneais de camundongos C57Bl/6 elicitadas com tioglicolato foram coletadas após 4 dias de estímulo e marcadas com anticorpos específicos para F4/80 antes ou após o protocolo de aderência celular (Materiais e Métodos). As células foram captadas em um FACS CANTO e pelo menos 10^5 eventos foram adquiridos. Para a caracterização dos macrófagos peritoneais, primeiramente, os *doublets* foram excluídos utilizando os parâmetros FSc-H por FSc-A. Em seguida, a porcentagem de células F4/80⁺ foi avaliada após serem selecionadas em um *gate* de acordo com o perfil SSC e a expressão de F4/80 (A). Para a verificação da pureza da população de células aderentes, as células peritoneais elicitadas foram colocadas em cultura para aderir por 2 horas, após esse período as células não aderentes foram removidas e então as células aderentes foram desplaqueadas e marcadas para F4/80. A análise desses dados foi realizada selecionando as células viáveis em um *gate* e posteriormente verificando a porcentagem de células F4/80⁺ de acordo com o FMO (*Fluorescence minus one*) (B). Imagens da cultura de células aderentes na placa de 24 poços. As figuras representam um aumento de 40x de imagens captadas pela câmera Sony (zoon 3.0) (C).

4.4. A fagocitose de EIEC pelos macrófagos é um processo independente do sistema de secreção e da flagelina

Inicialmente foi avaliada a capacidade de fagocitose dos macrófagos após o contato com as diferentes cepas de EIEC. É importante ressaltar que após a adição do inoculo bacteriano, as placas de cultura foram centrifugadas para sincronizar o contato das bactérias com os macrófagos. Não houve diferenças na captura inicial ou fagocitose das três bactérias pelos macrófagos, uma vez que no período avaliado, de 0h (ou 30 minutos em meio sem antibiótico - período de fagocitose que precedeu os ensaios posteriores), a quantidade de bactérias intracelulares foi similar entre as três cepas de EIEC (**Figura 10**). Esses dados sugerem que a fagocitose de EIEC pelos macrófagos é um processo independente do reconhecimento do sistema de secreção e da flagelina bacteriana.

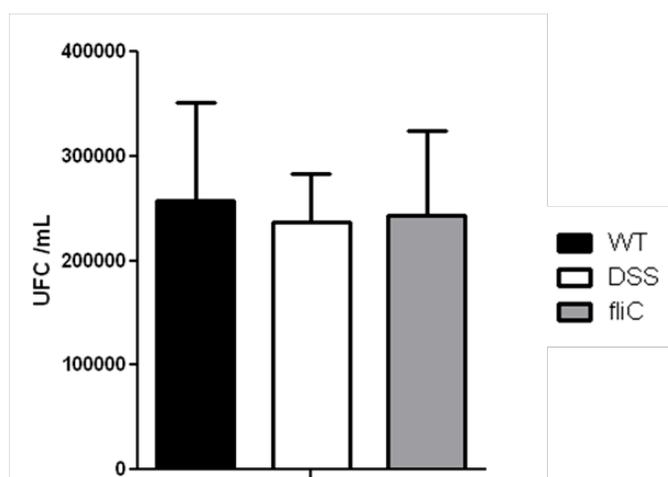


Figura 10: Ensaio de fagocitose. As cepas de EIEC selvagem (WT), deficiente no sistema de secreção (DSS) e deficiente na flagelina (fliC) foram adicionadas na cultura de macrófagos peritoniais de animais C57Bl/6 na multiplicidade de infecção de 100. Posteriormente, as placas de cultura foram centrifugadas para sincronizar o contato das bactérias com os macrófagos e incubadas por 30 minutos. Após esse período, as células foram lavadas, lisadas e semeadas superficialmente em placas de ágar MacConkey. Foi determinado o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) das bactérias encontradas no interior dos macrófagos. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

4.5. O escape dos macrófagos é dependente do sistema de secreção de EIEC e suas proteínas efetoras

Posteriormente foi avaliado a sobrevivência intracelular e o escape de EIEC dos macrófagos através da contagem de UFC oriundas das bactérias que se encontravam no interior celular ou no sobrenadante da cultura durante uma cinética em diferentes intervalos de tempo. As bactérias encontradas no sobrenadante celular representam as bactérias que escaparam dos macrófagos e não aquelas não fagocitadas, uma vez que a cultura foi tratada com antibiótico após o período determinado para a fagocitose, como descrito em Materiais e Métodos. Nos intervalos de tempo avaliados na cinética, 1 hora e 2 horas, não houve diferenças entre o número de bactérias viáveis das diferentes cepas de EIEC encontradas no interior dos macrófagos (**Figura 11A**). Contudo, houve uma diminuição na quantidade das 3 cepas bacterianas encontradas no interior celular, no período de 1 hora e principalmente de 2 horas, o que sugere a capacidade microbicida do macrófago frente as bactérias ou ainda o escape bacteriano.

Assim, o próximo passo foi avaliar a capacidade de escape bacteriano dos macrófagos. Para isso, foi realizada uma cinética nos intervalos de tempo pós-fagocitose de 1 e 2 horas. Em ambos os intervalos de tempo não houve diferenças significativas entre o número de UFC de EIEC WT e fliC (**Figura 11B**). Contudo, em ambos os intervalos de tempo, a quantidade de bactérias de WT e fliC encontradas no sobrenadante foi maior quando comparado com o número de bactérias extracelulares de DSS. Em uma hora, o número de UFC de WT e fliC no sobrenadante é praticamente quatro vezes maior que o número

de UFC de DSS. Essa diferença é ainda maior no intervalo de duas horas, quando a média de UFC de WT e fliC é doze vezes maior que o número de UFC de DSS ($p < 0,05$). As médias de UFC de WT, fliC e DSS encontradas no sobrenadante da cultura foram $4,3 \times 10^4$, $4,5 \times 10^4$ e $0,95 \times 10^4$ após 1 hora, $6,5 \times 10^4$, $6,2 \times 10^4$ e $0,56 \times 10^4$ após 2 horas, respectivamente (**Figura 11B**).

Esses resultados indicam que essas bactérias apresentam uma capacidade semelhante de sobreviver no interior dos macrófagos, no entanto o escape bacteriano parece ser dependente do sistema de secreção, mas não da flagelina de EIEC.

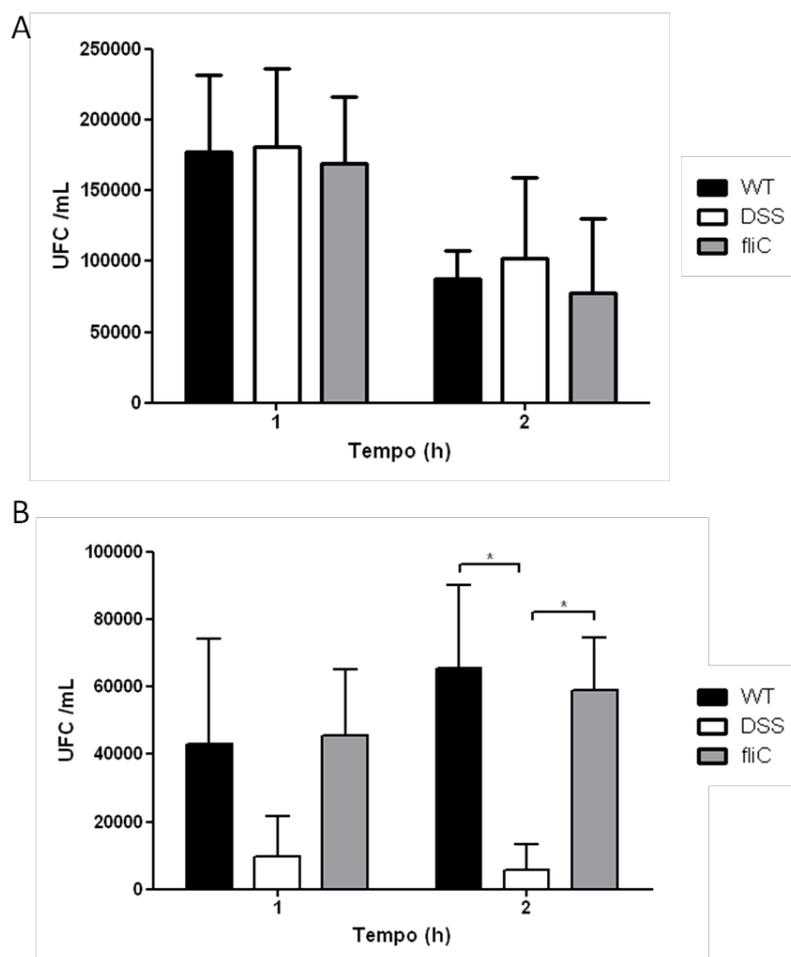


Figura 11: Ensaio de sobrevivência intracelular e escape bacteriano. Os macrófagos de animais C57Bl/6 foram infectados com as cepas de EIEC selvagem (WT), deficiente em flagelina (fliC) e deficiente no sistema de secreção (DSS) utilizando MOI de 100 e incubadas em meio sem gentamicina (fagocitose) por 30 minutos. Após esse período, as células foram mantidas em meio contendo gentamicina, nos intervalos de 1 e 2 horas pós-fagocitose para avaliação da sobrevivência bacteriana. Por fim, as células foram lisadas e semeadas superficialmente em placas de ágar MacConkey. Foi determinado o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) das diferentes cepas de EIEC encontradas no interior dos macrófagos (A). No ensaio de escape bacteriano após os intervalos de 1 e 2 horas pós-fagocitose, o meio de cultura contendo antibiótico foi retirado e a cultura celular foi mantida por 30 minutos em meio sem antibiótico. Após esse período, os sobrenadantes foram semeados superficialmente em placas de ágar MacConkey e o número de UFC das bactérias extracelulares encontradas no sobrenadante da cultura Foi determinado (B). * ($p < 0,05$) em relação (WT x DSS); (fliC x DSS) para um mesmo intervalo de tempo analisado. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

Posteriormente avaliamos a transcrição relativa dos genes *ipaB* e *ipaC* por RT-PCR 1 e 2 horas de infecção pós-fagocitose com as três cepas de EIEC. As proteínas *ipaB* e *ipaC* de *S. flexneri* foram descritas como essenciais no escape do fagossoma dos macrófagos (TRAN VAN NHIEU *et al.*, 1999). Nos dois intervalos de tempo analisados, o nível da transcrição dos genes *ipaB*

e *ipaC* foi similar entre as cepas WT e *fliC* e, como esperado, não foi observado à transcrição desses genes na cepa sem o plasmídio de virulência SSTT (Figura 12). Assim, esses dados indicam que a ausência da flagelina não influencia a transcrição dos genes *ipaB* e *ipaC* e possivelmente a síntese do sistema de secreção, o que pode justificar o escape bacteriano semelhante observado entre as cepas WT e *fliC*.

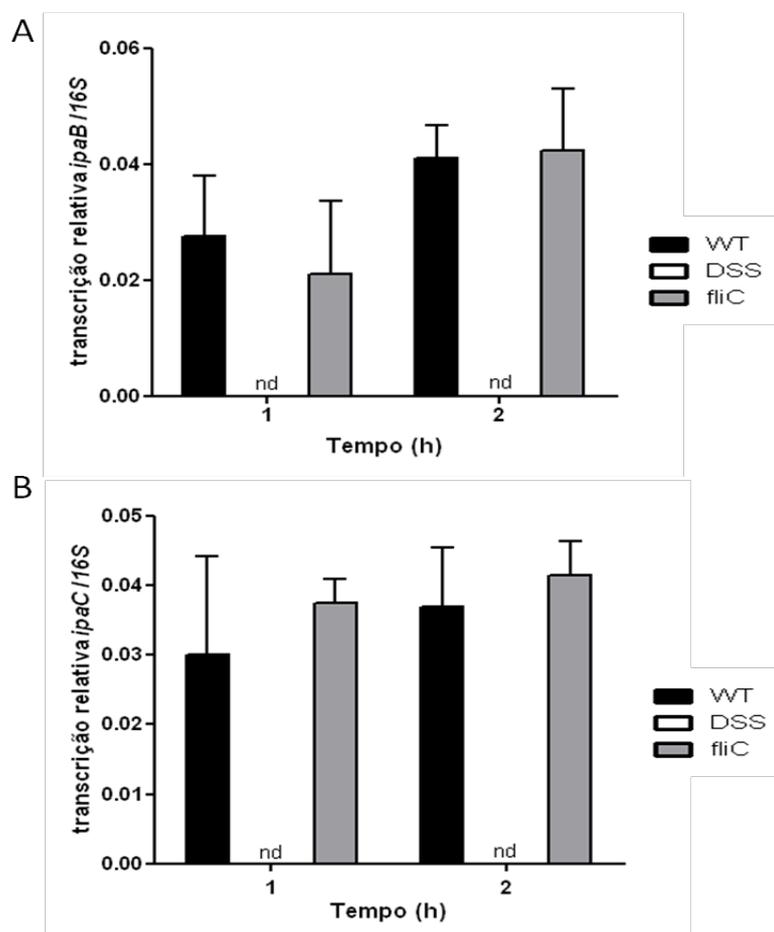


Figura 12: Ensaio de transcrição relativa dos genes *ipaB* e *ipaC*. Macrófagos peritoniais foram infectados com as cepas de EIEC selvagem (WT), deficiente no sistema de secreção (DSS) e deficiente em flagelina (*fliC*) e após de 1 e 2 horas de incubação com meio contendo gentamicina, o RNA foi extraído para realização do RT-PCR dos genes *ipaB* (A) e *ipaC* (B). Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

4.6. A morte dos macrófagos induzida por EIEC é dependente do sistema de secreção e suas proteínas efetoras

Como o escape bacteriano está relacionado com a indução de morte dos macrófagos, a próxima etapa consistiu em avaliar a formação de poros e a lise de macrófagos infectados com as diferentes cepas de EIEC. Para avaliar a formação de poros na membrana celular, utilizamos o Iodeto de Propídio (PI). Diferentemente das células não infectadas, quando a membrana plasmática do macrófago está danificada, o PI se incorpora no DNA, emitindo fluorescência e sugerindo, desse modo, a formação de poros. O intervalo de tempo escolhido foi 2 horas pós-fagocitose já que nesse período houve uma diferença significativa no escape bacteriano entre as cepas WT e fliC quando comparadas com a cepa DSS. Os resultados foram normalizados com a porcentagem de dano na membrana celular das células não infectadas em cada concentração bacteriana avaliada. A capacidade de induzir poros, nas duas concentrações bacterianas analisadas, foi significativamente maior nas cepas WT e fliC, quando comparado com a cepa SSTT ($p < 0,05$). No entanto, não houve diferenças na indução de poros entre a cepa selvagem e deficiente em flagelina (**Figura 13**).

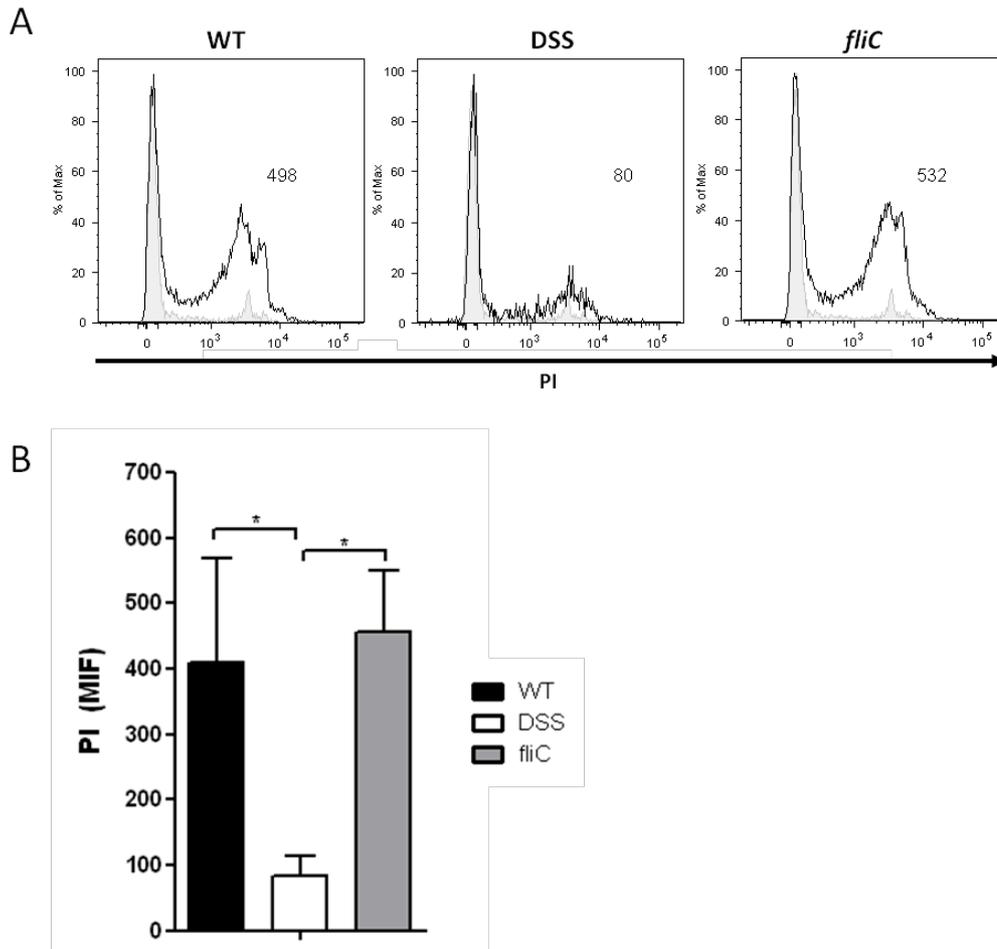


Figura 13: Ensaio de formação de poros na membrana celular. Os macrófagos peritoniais de animais C57Bl/6 foram infectados com as cepas de EIEC selvagem (WT), deficiente no sistema de secreção (DSS) e deficiente em flagelina (*fliC*) utilizando MOI de 100 e previamente incubadas, por 30 minutos, com as bactérias em meio sem gentamicina (fagocitose). Após esse período, as células foram mantidas em meio contendo gentamicina por 2 horas e a análise da intensidade da expressão de Iodeto de propídeo (PI) nas células infectadas (em preto) e não-infectadas (em cinza) foi realizada por citometria de fluxo (**A**). Gráfico representativo da intensidade de expressão de PI nas células infectadas em relação as células não-infectadas com as diferentes cepas de EIEC (**B**). Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

Posteriormente avaliamos a cinética de lise ou morte celular nos intervalos de tempo de 1, 3 e 5 horas pós-fagocitose. Para isso, foi avaliada a liberação de lactato desidrogenase (LDH) no sobrenadante dos macrófagos infectados pelas três cepas de EIEC. A enzima intracelular LHD é rapidamente liberada das células que perderam a integridade da membrana. A cepa de EIEC incapaz de montar o sistema de secreção (DSS) não induziu lise dos macrófagos nos três intervalos de tempo analisados. Como esperado, os danos

celulares aumentaram conforme o passar do tempo de infecção, sugerindo que esse evento é tempo dependente. No período de 3 horas, houve um aumento na porcentagem de células mortas em resposta as cepas WT e fliC e, esse perfil foi ainda mais evidente no período de 5 horas, quando cerca de 18% das células estavam mortas. Por outro lado, as cepas WT e fliC induziram a morte dos macrófagos de maneira semelhante (**Figura 14**).

Esses dados mostram que tanto a formação de poros na membrana quanto à morte dos macrófagos infectados por EIEC, assim como o escape bacteriano, é um processo independente da flagelina e dependente do sistema de secreção e de suas proteínas efetoras.

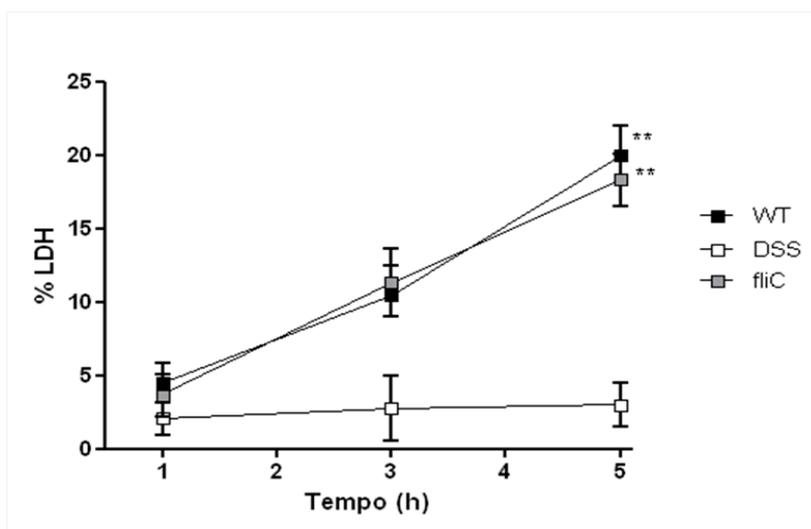


Figura 14: Ensaio de lise dos macrófagos. Os macrófagos peritoniais de animais C57Bl/6 foram infectados com as cepas de EIEC selvagem (WT), deficiente no sistema de secreção (DSS) e deficiente em flagelina (fliC) utilizando MOI de 100 e previamente incubadas, por 30 minutos, com as bactérias em meio sem gentamicina (fagocitose). Após esse período, as células foram mantidas em meio contendo gentamicina, por 1, 3 e 5 horas pós-fagocitose, para retirada do sobrenadante. A concentração de LDH foi avaliada a partir dos sobrenadantes das culturas celulares de acordo com as instruções do fabricante. ** ($p < 0,01$) em relação a cepa de EIEC DSS. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

4.7. A produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatória é dependente do sistema de secreção de EIEC

A próxima etapa consistiu em avaliar o papel da flagelina e do sistema de secreção de EIEC no perfil inflamatório dos macrófagos após ativação. Para isso, determinamos a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α após 5 horas de infecção e a presença de macrófagos produtores da citocina anti-inflamatória IL-10 após 10 horas de infecção.

Houve uma produção significativa de IL-1 β pelos macrófagos infectados por EIEC selvagem e deficiente na flagelina, quando comparada com as células não infectadas (produção basal) ($P < 0,001$). Mais uma vez não houve diferença significativa na produção de IL-1 β induzida pelas bactérias selvagens e deficientes na flagelina após a infecção dos macrófagos (**Figura 15A**). No entanto, a cepa de EIEC sem o plasmídeo de virulência não foi capaz de induzir níveis significativos de IL-1 β no sobrenadante das culturas de macrófagos.

Assim como observado para a produção de IL-1 β , a produção de TNF- α pelos macrófagos infectados por EIEC selvagem e deficiente na flagelina foi significativamente maior do que o observado no sobrenadante das células não infectadas (produção basal) ($P < 0,001$) (**Figura 15B**). Além disso, foram observadas diferenças estatísticas entre as células infectadas por EIEC selvagem e deficiente na flagelina quando comparadas com as células infectadas por SSTT ($P < 0,05$).

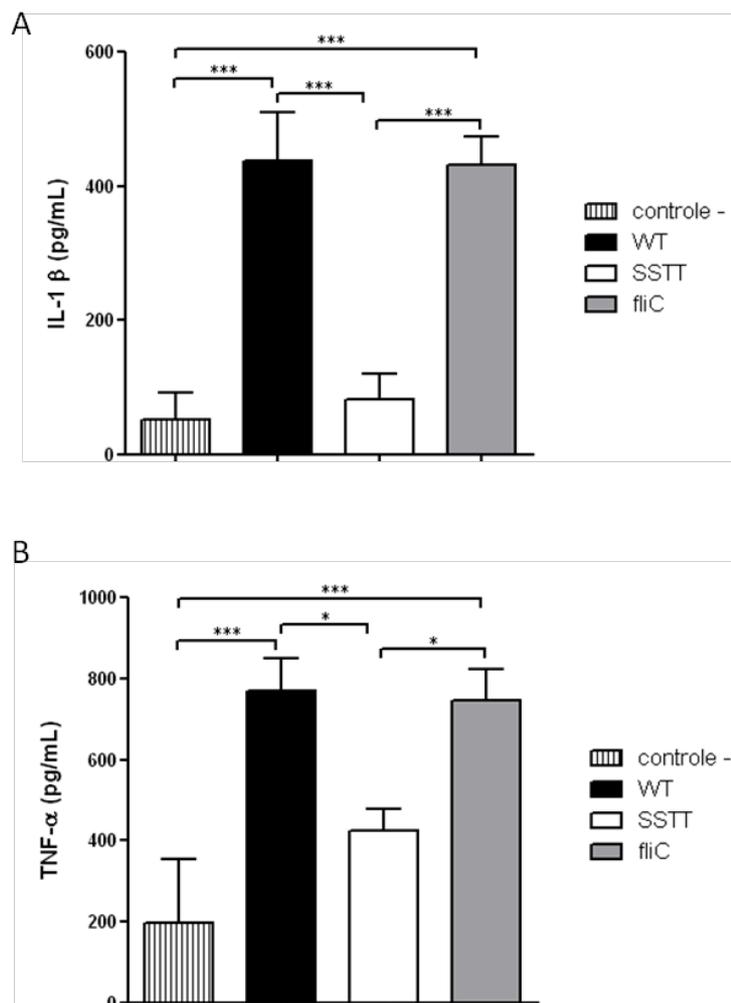


Figura 15: Ensaio de determinação da produção das citocinas pró-inflamatórias. Os macrófagos peritoniais de animais C57Bl/6 foram infectados com as cepas de EIEC selvagem (WT), deficiente no sistema de secreção (DSS) e deficiente em flagelina (fliC) utilizando MOI de 100 e previamente incubadas, por 30 minutos, com as bactérias em meio sem gentamicina (fagocitose). Após esse período, as células foram mantidas em meio contendo gentamicina, por 5 horas pós-fagocitose, para retirada do sobrenadante e dosagem de IL-1 β (A) e TNF- α (B) por ELISA. * ($p < 0,05$) e *** ($p < 0,001$). Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

A citocina IL-10 produzidas por macrófagos na infecção tem um importante papel no controle homeostático das reações da imunidade inata e da imunidade celular, tendo inúmeras funções, como inibir a produção de IL-12 e TNF- α pelos macrófagos ativados, inibir a expressão de moléculas co-estimulatórias e MHC de classe II, e estimular a proliferação de células B (COUPER *et al.*, 2008). Em adição a produção de tal citocina por macrófagos está relaciona com um perfil regulador ou M2 (MOSSER *et al.*, 2009). Para

avaliar a presença de macrófagos IL10⁺, as células peritoneais totais foram colocadas em cultura por 10 horas na presença das diferentes cepas bacterianas e de monensina (*Stop Golgi*). Após esse período, as células foram marcadas com anticorpos monoclonais para F4/80 e IL-10 e a presença de macrófagos (F4/80⁺) produtores de IL-10 foi avaliada por citometria de fluxo. Para análise dos dados, inicialmente as células viáveis foram selecionadas em uma janela de acordo com o perfil SSC/FSC e na seqüência as células F4/80⁺ foram avaliadas quanto à expressão de IL-10. As cepas de EIEC selvagem e deficiente na flagelina induziram a presença de macrófagos produtores de IL-10 quando comparados com os macrófagos não-infectados de maneira semelhante. Já o estímulo com a cepa SSTT não induziu um aumento na proporção de macrófagos IL-10⁺ (**Figura 16A/B**).

Dessa maneira, esses resultados em conjunto indicam que EIEC induz a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α e da citocina anti-inflamatória IL-10 de maneira independente da flagelina. Além disso, a produção de IL-1 β e IL-10, mas não de TNF- α , foi dependente do sistema de secreção bacteriano.

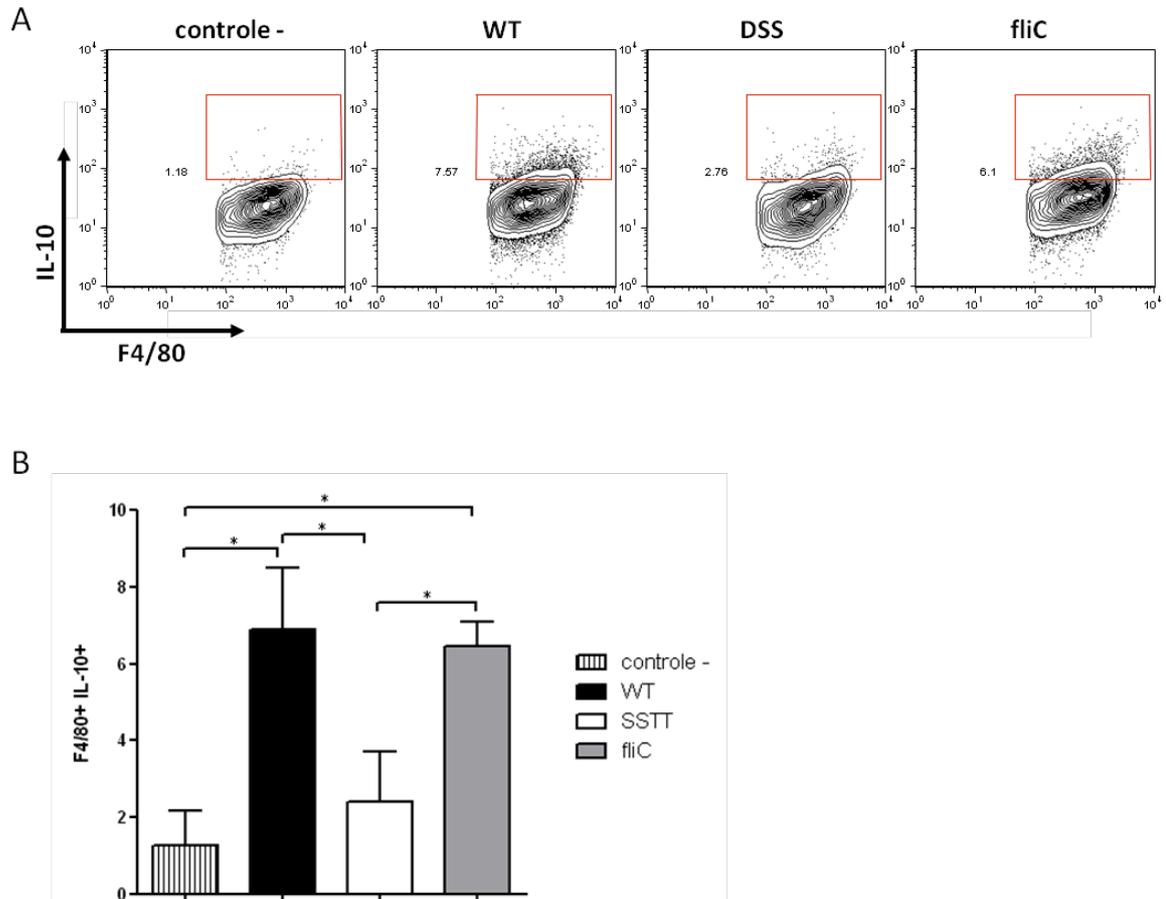


Figura 16: Ensaio de citocina intracelular. Os macrófagos peritoneais de animais C57Bl/6 foram infectados ou não (controle -) com as cepas de EIEC selvagem (WT), deficiente no sistema de secreção (DSS) e deficiente em flagelina (fliC) utilizando MOI de 100 e previamente incubadas, por 30 minutos, com as bactérias em meio sem gentamicina (fagocitose). Após esse período, as células foram mantidas em meio contendo gentamicina, por 10 horas pós-fagocitose na presença de monensina. As células foram marcadas para F4/80 e fixadas e permeabilizadas para posterior marcação intracelular com anti-IL-10. As células foram captadas em um FACSanto e pelo menos 10^5 eventos foram adquiridos. A população de macrófagos (F4/80+) foi selecionada como descrito na figura 9. Os valores no interior dos plots mostram a porcentagem de células produtoras de IL-10 de acordo com seu respectivo FMO (A). Nos gráficos de barras, cada barra representa a média da porcentagem de células F4/80⁺IL-10⁺ (C). Os dados são representativos de 2 experimentos independentes.

4.8. A ativação da caspase-1 e secreção de IL-1 β de macrófagos infectados por EIEC é dependente do sistema de secreção

Uma vez que a produção de IL-1 β em resposta a EIEC foi dependente do sistema de secreção e essa citocina é produzida a partir da ativação via caspase-1, decidimos avaliar o papel da caspase-1 na resposta inflamatória e morte celular. Para avaliar o papel da caspase-1 na resposta inflamatória induzida pelas diferentes cepas de EIEC analisamos a produção de IL-1 β , TNF- α e NO por macrófagos provenientes de camundongos C57BL/6 selvagens e caspase-1 deficientes infectados com as diferentes cepas de EIEC.

De fato, a EIEC é capaz de ativar a caspase-1, já que os macrófagos de camundongos deficientes em caspase-1 não produziram IL-1 β em resposta a infecção com as diferentes cepas de EIEC (**Figura 17A**). Não houve diferença significativa na produção de IL-1 β pelas células infectadas por EIEC WT e fliC. Como mostrado anteriormente, a cepa DSS se mostrou ineficiente para a indução da produção de IL-1 β pelos macrófagos infectados (**Figura 15A e 17A**). A produção de TNF- α pelos macrófagos infectados por EIEC é independente da ativação de caspase-1, uma vez que não houve diferenças na produção de TNF- α entre os macrófagos de camundongos selvagens e os macrófagos deficientes de caspase-1 (**Figura 17B**).

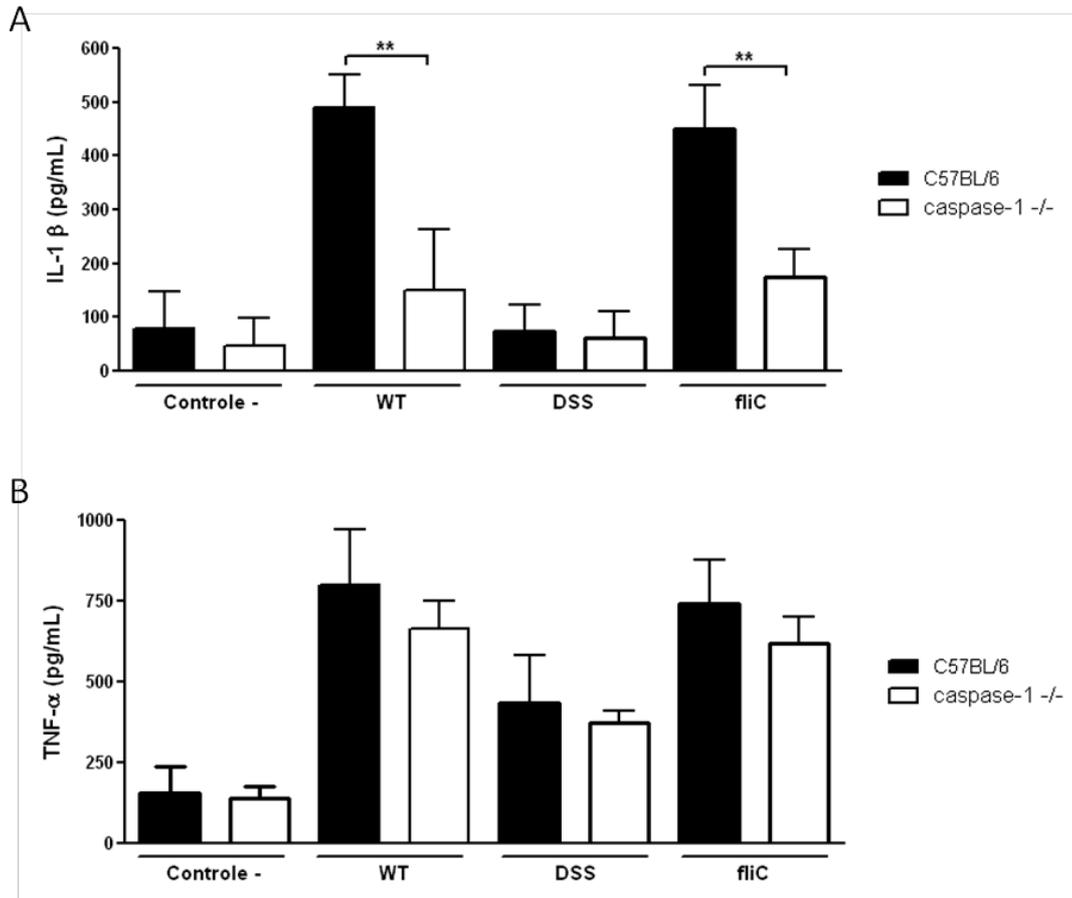


Figura 17: Produção das citocinas pró-inflamatórias por macrófagos de animais C57BL/6 e Caspase-1-/-. Os macrófagos peritoniais provenientes de animais selvagens (C57BL/6) e deficientes em caspase-1 (Caspase -1^{-/-}) foram infectados com as cepas de EIEC selvagem (WT), deficiente no sistema de secreção (DSS) e deficiente em flagelina (fliC) utilizando MOI de 100 e previamente incubadas, por 30 minutos, com as bactérias em meio sem gentamicina (fagocitose). Após esse período, as células foram mantidas em meio contendo gentamicina, por 5 horas pós-fagocitose, para retirada do sobrenadante e dosagem de IL-1β (A) e TNF-α (B) por ELISA. ** (p<0,01) como indicado na figura. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes.

O próximo passo foi avaliar a produção de NO por macrófagos de animais selvagens e caspase-1^{-/-} em resposta às diferentes cepas bacterianas.

As células provenientes de ambos os animais responderam ao estímulo com as cepas WT e fliC produzindo níveis significativos de NO. Interessantemente, os resultados mostraram que a secreção de NO foi parcialmente dependente da flagelina de EIEC, uma vez que houve uma diferença, ainda que mínima, entre os níveis de NO produzidos pelas células infectadas por WT e fliC. Essa alta produção de NO em resposta as cepas

selvagens e deficientes na flagelina ocorreu tanto nos macrófagos de animais selvagens quanto nos macrófagos provenientes de animais caspase-1^{-/-}, sugerindo que produção de NO em resposta a EIEC é independente da ativação da caspase-1 (**Figura 18**).

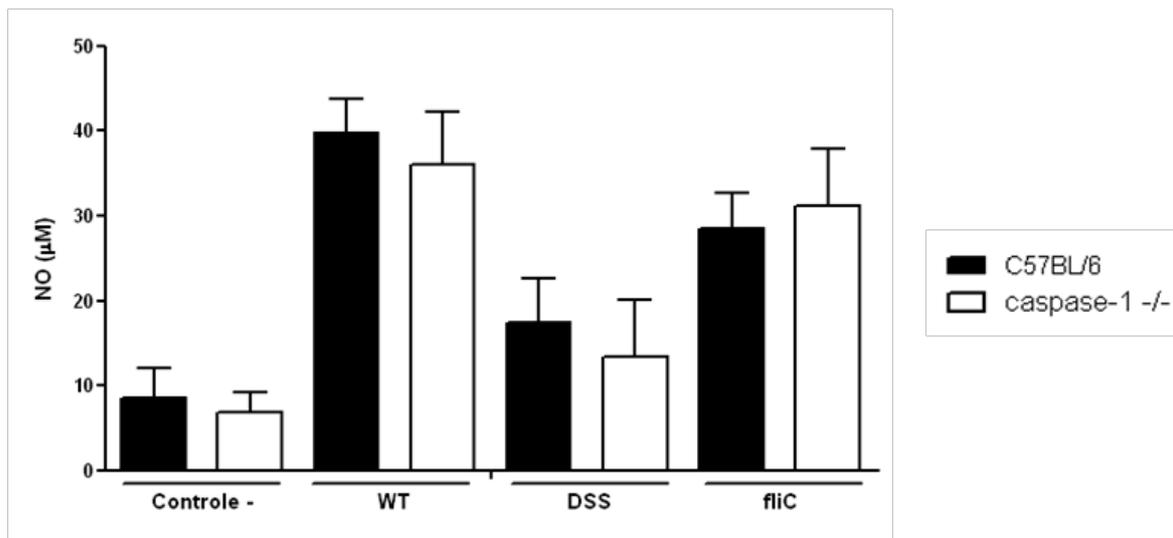


Figura 18: Ensaio de determinação da produção de óxido nítrico (NO). Os macrófagos peritonéus provenientes de animais selvagens (C57BL/6) e deficientes em caspase-1 (Caspase^{-1/-}) foram infectados com as cepas de EIEC selvagem (WT), deficiente no sistema de secreção (DSS) e deficiente em flagelina (fliC) utilizando MOI de 100 e previamente incubadas, por 30 minutos, com as bactérias em meio sem gentamicina (fagocitose). Após esse período, as células foram mantidas em meio contendo gentamicina, por 10 horas pós-fagocitose, para retirada do sobrenadante e dosagem de NO pelo método de Griess. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes.

4.9. A ativação da caspase-1 de macrófagos infectados por EIEC é dependente do receptor IPAF e parcialmente da molécula adaptadora ASC

A próxima etapa foi avaliar o papel do receptor IPAF e da molécula adaptadora ASC na ativação de caspase-1 e processamento de IL-1 β na infecção por EIEC. Para isso, os macrófagos aderentes de camundongos selvagens e IPAF $^{-/-}$ e ASC $^{-/-}$ foram estimulados com as diferentes cepas bacterianas por 5 horas pós-fagocitose e a produção de IL-1 β foi verificada. A ativação de caspase-1 em resposta a EIEC foi dependente do receptor IPAF e parcialmente dependente de ASC, uma vez que a secreção de IL-1 β por macrófagos provenientes de animais Ipa $f^{-/-}$ e ASC $^{-/-}$ foi significativamente menor do que a observada nos macrófagos de camundongos selvagens, ainda que os macrófagos de animais ASC $^{-/-}$ conservem a secreção de níveis mínimos dessa citocina (**Figura 19A**). Como esperado, não houve diferenças significativas na produção de TNF- α entre os macrófagos de camundongos selvagens e os macrófagos deficientes de IPAF e ASC estimulados com as diferentes cepas bacterianas (**Figura 19B**).

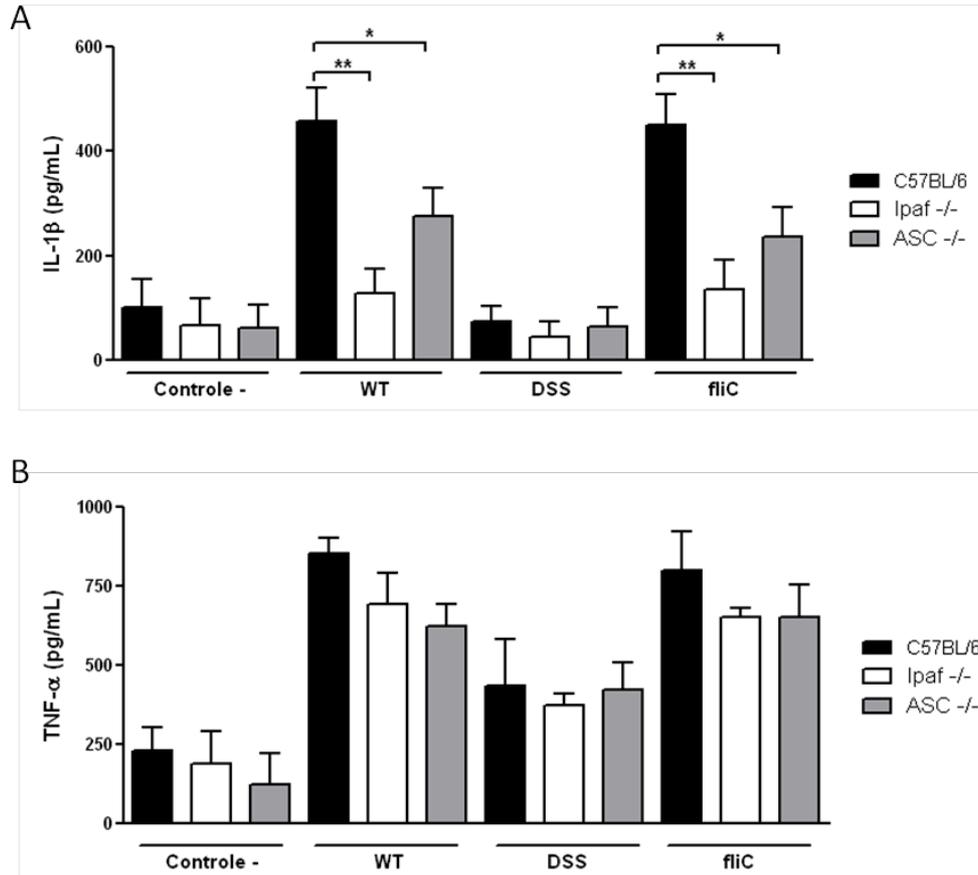


Figura 19: Produção das citocinas pró-inflamatórias por macrófagos de animais C57BL/6 e IPAF^{-/-} e ASC^{-/-}. Os macrófagos peritoniais provenientes de animais selvagens (C57BL/6), deficientes em IPAF (IPAF^{-/-}) e ASC (ASC^{-/-}) foram infectados com as cepas de EIEC selvagem (WT), deficiente no sistema de secreção (DSS) e deficiente em flagelina (fliC) utilizando MOI de 100 e previamente incubadas, por 30 minutos, com as bactérias em meio sem gentamicina (fagocitose). Após esse período, as células foram mantidas em meio contendo gentamicina, por 5 horas pós-fagocitose, para retirada do sobrenadante e dosagem de IL-1 β (A) e TNF- α (B) por ELISA. * ($p < 0,05$) e ** ($p < 0,01$) como indicado na figura. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes.

4.10. A fagocitose e o escape de EIEC dos macrófagos são independentes da caspase-1

A próxima etapa foi avaliar a participação da caspase-1 dos macrófagos na resposta imune induzida por EIEC. Inicialmente foi avaliado a fagocitose e o escape bacteriano dos macrófagos infectados por EIEC. Não houve diferenças na fagocitose, uma vez que no período de 30 minutos a quantidade de bactérias intracelulares foi similar entre os macrófagos selvagens e deficientes na caspase-1 (**Figura 20A**). Para avaliar a capacidade de escape bacteriano dos macrófagos selvagens e deficientes na caspase-1, foi realizada a contagem de UFC oriundas das bactérias que se encontravam no sobrenadante da cultura, dos macrófagos selvagens ou deficientes na caspase-1, no intervalo de 2 horas pós-fagocitose. Como esperado, a quantidade de bactérias de WT e fliC encontradas no sobrenadante foi maior quando comparado com o número de bactérias extracelulares de DSS, no entanto, não houve diferenças significativas entre o número de UFC de EIEC entre os macrófagos selvagens e caspase-1 deficientes (**Figura 20B**).

Esses resultados indicam que tanto a fagocitose dos macrófagos, como o escape bacteriano é um processo independente da ativação de caspase-1.

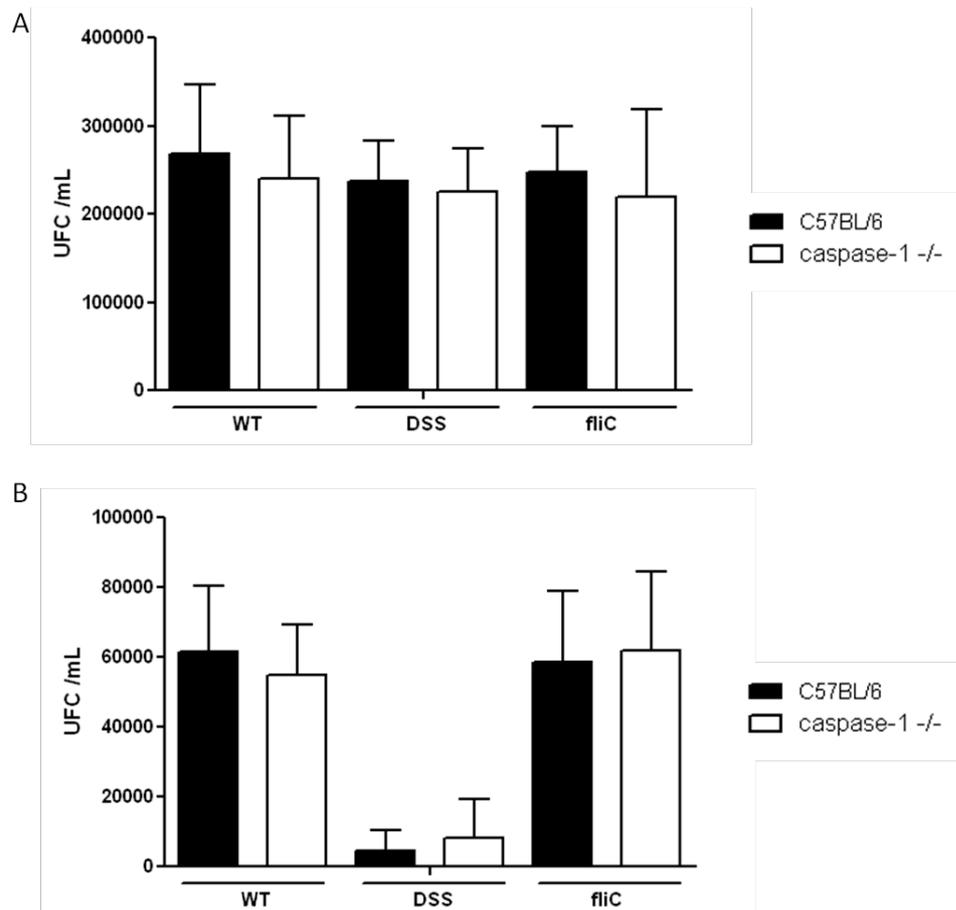


Figura 20: Ensaio de fagocitose e escape bacteriano em macrófagos de animais C57Bl/6 e Caspase-1^{-/-}. As cepas de EIEC selvagem (WT), deficiente no sistema de secreção (DSS) e deficiente na flagelina (fliC) foram adicionadas na multiplicidade de infecção de 100 na cultura de macrófagos de animais selvagens (C57Bl/6) e deficientes na caspase-1 (caspase-1^{-/-}). Posteriormente, as placas de cultura foram centrifugadas para sincronizar o contato das bactérias com os macrófagos e incubadas por 30 minutos. Após o intervalo de tempo, as células foram lavadas, lisadas e semeadas superficialmente em placas de ágar MacConkey. Foi determinado o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) das bactérias encontradas no interior dos macrófagos (A). Os macrófagos selvagens (C57Bl/6) e deficientes na caspase-1 (caspase-1^{-/-}) foram infectados com as cepas de EIEC selvagem (WT), deficiente no sistema de secreção (DSS) e deficiente na flagelina (fliC) e previamente incubadas, por 30 minutos, com as bactérias em meio sem gentamicina (fagocitose). Após esse período, as células foram mantidas em meio contendo gentamicina, no intervalo de 2 horas pós-fagocitose. Por fim, a cultura celular foi mantida por 30 minutos em meio sem antibiótico e os sobrenadantes foram semeadas superficialmente em placas de ágar MacConkey. Foi determinado o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) das bactérias extracelulares encontradas no sobrenadante da cultura (B). Os dados são representativos de 2 experimentos independentes.

4.11. A morte dos macrófagos infectados por EIEC é independente da caspase-1 e de apoptose

Para avaliar o papel da caspase-1 na morte dos macrófagos induzida pelas diferentes cepas de EIEC analisamos a concentração de LDH no sobrenadantes de macrófagos provenientes de camundongos C57BL/6 selvagens e caspase-1 deficientes na cinética de 1, 3 e 5 horas pós-fagocitose. A piroptose ou morte celular dependente de caspase-1 é caracterizada por induzir uma intensa resposta inflamatória, sendo crucial para controlar as infecções microbianas. Trabalhos recentes vêm demonstrando a morte de macrófagos dependente de caspase-1 na infecção por varios patógenos, entre eles, *Salmonella*, *Shigella*, *Legionella* e *Pseudomonas*.

No período de 1 hora pós-infecção nenhuma das cepas bacterianas induziram uma porcentagem significativa de morte nos macrófagos de animais selvagens ou caspase-1-/- (**Figura 21**). Já no período de 3 horas, houve um aumento na porcentagem de células mortas em resposta as cepas WT e fliC e, esse perfil foi ainda mais evidente no período de 5 horas, quando cerca de 20% das células estavam mortas. No entanto, a cepa DSS não foi capaz de induzir uma porcentagem significativa de morte celular, nem mesmo após 5 horas de estímulo, sugerindo que a morte é dependente do sistema de secreção. Além disso, nossos resultados mostraram que a morte dos macrófagos em resposta a EIEC é independente da ativação da caspase-1, uma vez que não houve diferenças significativas na morte dos macrófagos de camundongos selvagens e caspase-1-/- induzida por EIEC nos três intervalos de tempo analisados (**Figura 21**).

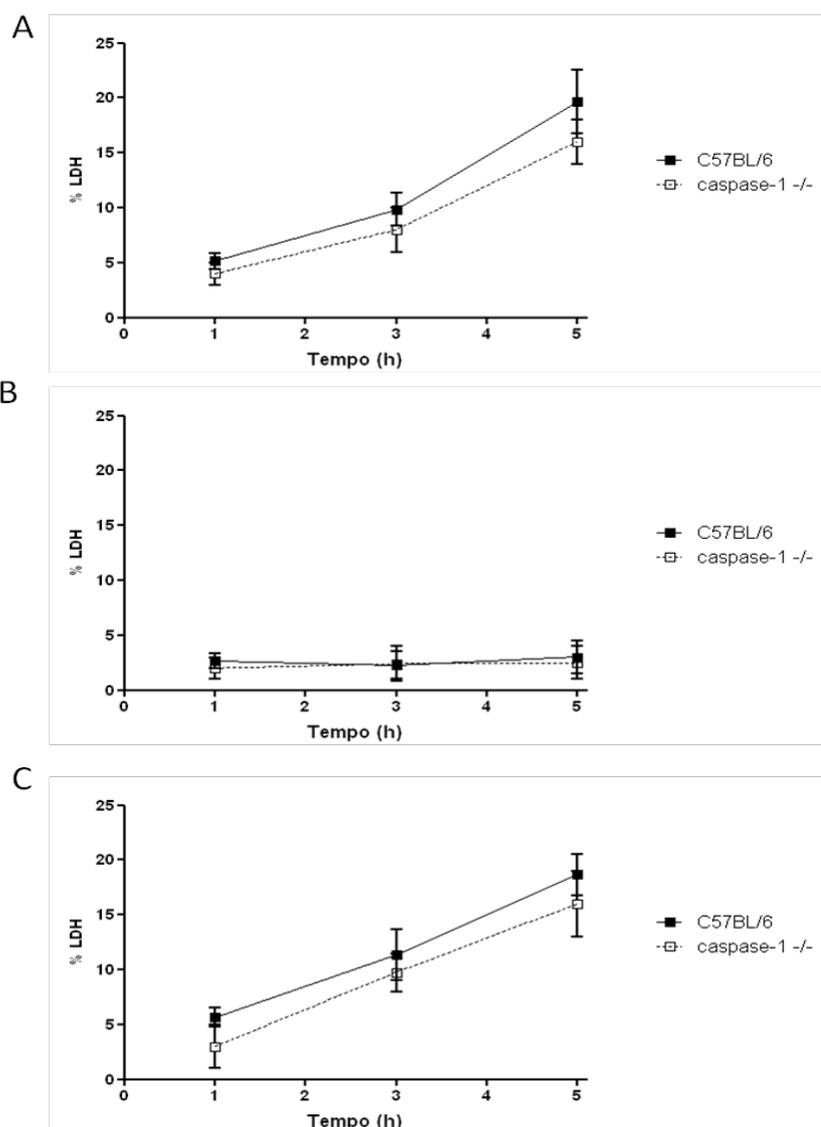


Figura 21: Ensaio de lise celular de macrófagos de animais C57Bl/6 e Caspase-1^{-/-}. Os macrófagos peritoniais provenientes de animais selvagens (C57Bl/6) e deficientes na caspase-1 (caspase-1^{-/-}) foram infectados com as cepas de EIEC selvagem (WT) (A), deficiente no sistema de secreção (DSS) (B) e deficiente em flagelina (fliC) (C) utilizando MOI de 100 e previamente incubadas, por 30 minutos, com as bactérias em meio sem gentamicina (fagocitose). Após esse período, as células foram mantidas em meio contendo gentamicina, por 1, 3 e 5 horas pós-fagocitose, para retirada do sobrenadante. A concentração de LDH foi avaliada a partir dos sobrenadantes das culturas celulares de acordo com as instruções do fabricante. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes.

Além disso, a morte dos macrófagos induzida por EIEC foi independente de IPAF e ASC, uma vez que não houve diferenças na cinética de morte dos macrófagos entre os camundongos selvagens e deficiente do receptor IPAF ou da molécula adaptadora ASC (Figura 22). Esses dados mostram que a morte

induzida por EIEC não é dependente da ativação da caspase-1, sugerindo que os macrófagos infectados com EIEC não entram em piroptose.

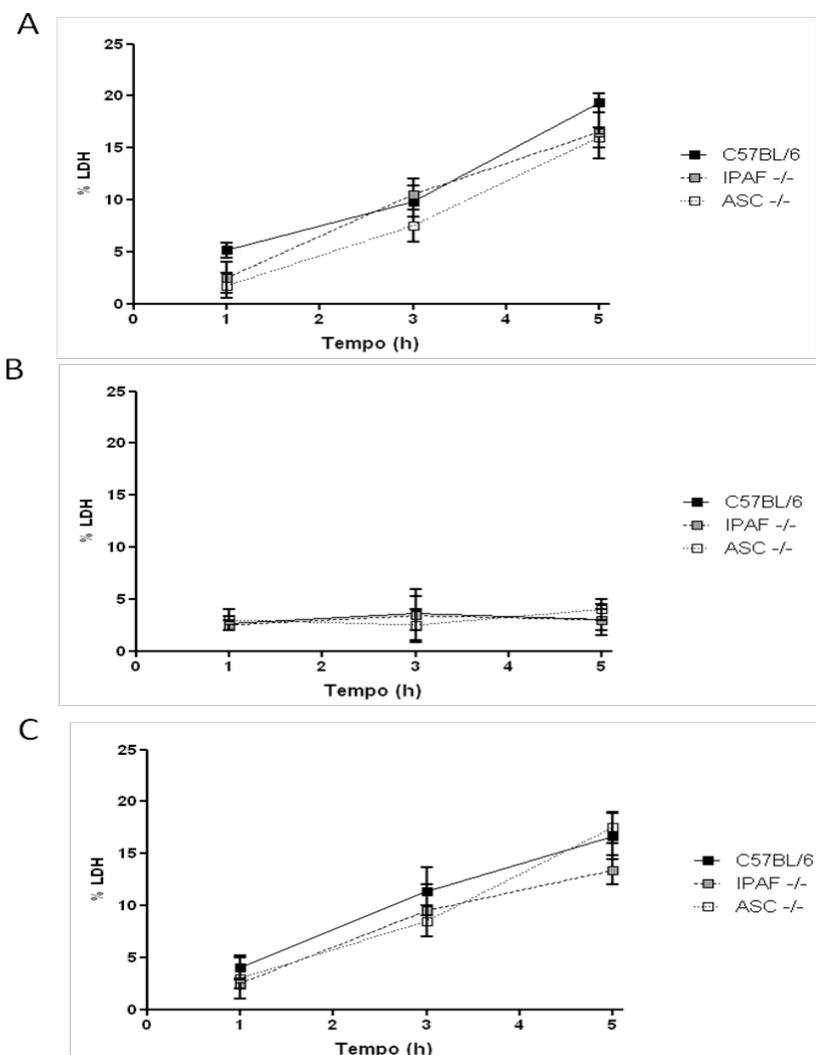


Figura 22: Ensaio de lise celular de macrófagos de animais C57BI/6 IPAF^{-/-} e ASC^{-/-}. Os macrófagos peritoniais provenientes de animais selvagens (C57BI/6), deficientes em IPAF (IPAF^{-/-}) e deficientes em ASC (ASC^{-/-}) foram infectados com as cepas de EIEC selvagem (WT) **(A)**, deficiente no sistema de secreção (DSS) **(B)** e deficiente em flagelina (fliC) **(C)** utilizando MOI de 100 e previamente incubadas, por 30 minutos, com as bactérias em meio sem gentamicina (fagocitose). Após esse período, as células foram mantidas em meio contendo gentamicina, por 1, 3 e 5 horas pós-fagocitose, para retirada do sobrenadante. A concentração de LDH foi avaliada a partir dos sobrenadantes das culturas celulares de acordo com as instruções do fabricante. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes.

Os macrófagos podem morrer por diversas vias, como a piroptose, a apoptose, a necrose e a autofagia (SASAZAKI *et al.*, 2005; SUSUKI *et al.*, 2007, WILIIIII 2007; SUZUKI *et al.*, 2008) e como a indução de morte dos

macrófagos infectados por EIEC não é a piroptose (dependente de caspase-1), decidimos avaliar se essas células sofriam apoptose após a infecção com as diferentes cepas de EIEC.

As cepas WT e fliC induziram uma porcentagem semelhante de macrófagos PI⁺, o que indica que esses estímulos induzem a morte dos macrófagos de maneira semelhante (**Figura 23**). No entanto, não foi observada a presença de células Anexina⁺ após a infecção com essas bactérias, indicando que a morte dos macrófagos não é por apoptose (Anexina⁺PI⁻). Como esperado, a cepa SSTT induziu níveis bem inferiores de células marcadas com PI quando comparada com as cepas WT e fliC e também não foram encontradas células marcadas com anexina (**Figura 23**).

Esses dados em conjunto mostram que a morte dos macrófagos infectados por EIEC é um processo independente da piroptose e da apoptose.

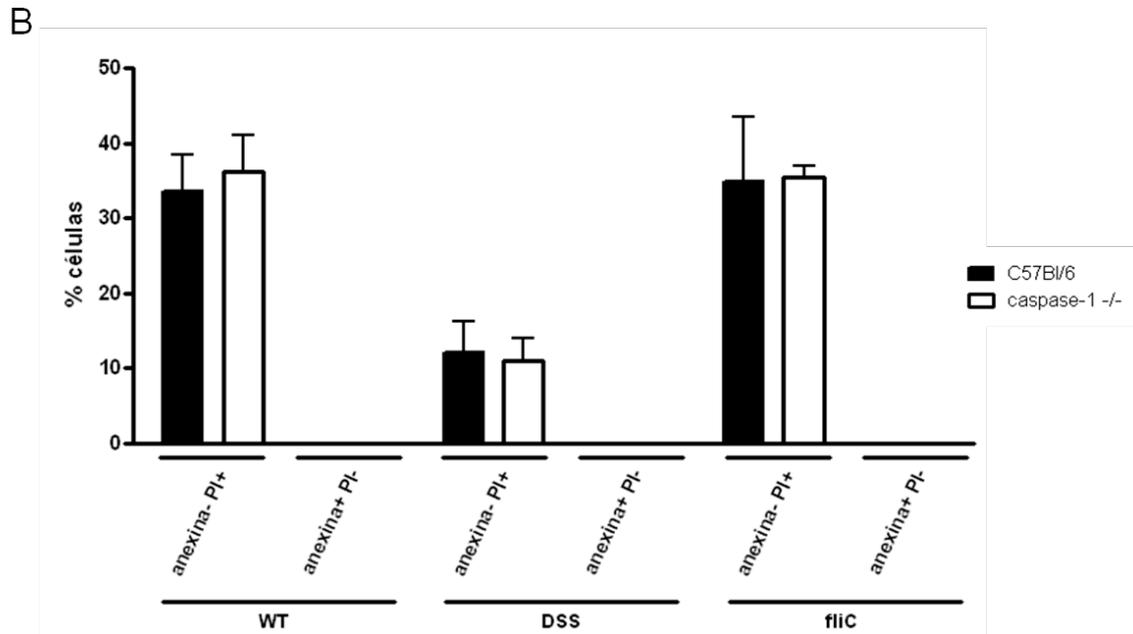
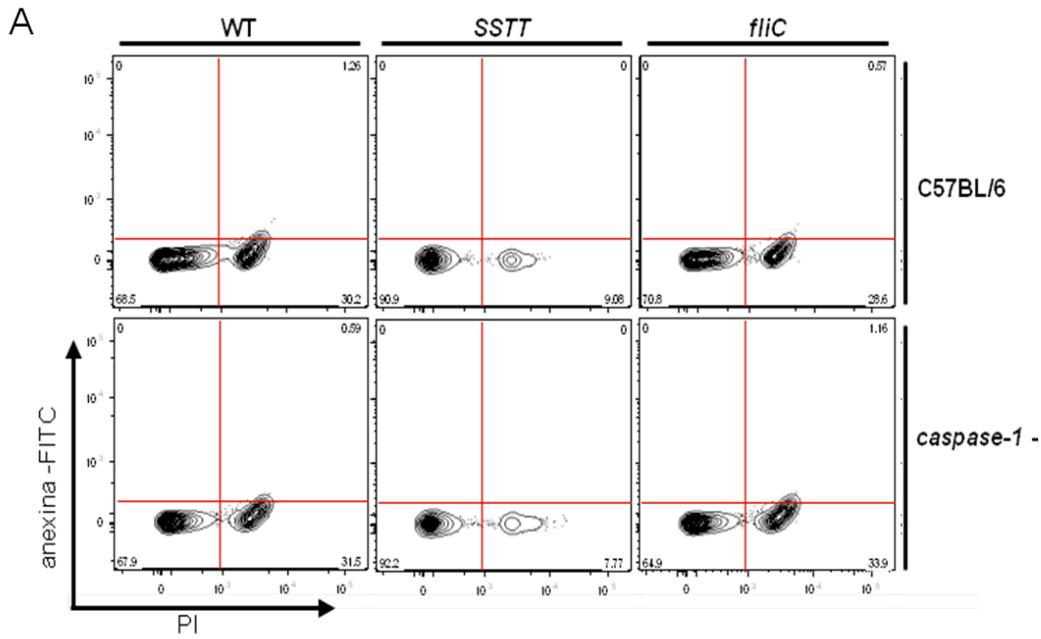


Figura 23: Ensaio de apoptose. Os macrófagos peritoneais provenientes de animais selvagens (C57BL/6) e deficientes em caspase-1 (caspase-1^{-/-}) foram infectados com as cepas de EIEC selvagem (WT), deficiente no sistema de secreção (DSS) e deficiente em flagelina (fliC) utilizando MOI de 100 e previamente incubadas, por 30 minutos, com as bactérias em meio sem gentamicina (fagocitose). Após esse período, as células foram mantidas em meio contendo gentamicina, por 2 horas pós-fagocitose. Após esse período, as células foram marcadas com anexina (FITC) e Iodeto de Propídeo (PI – PE) e analisadas por citometria de fluxo pelo programa *FlowJo* (A). Gráfico representativo da porcentagem de células Anexina⁺PI⁺ infectadas com as diferentes cepas de EIEC (B). Os dados são representativos de 2 experimentos independentes.

4.12. O sistema de secreção de EIEC é importante para a patogênese da infecção por EIEC

No intuito de avaliar o papel do sistema de secreção na patogênese da infecção por EIEC, foram realizados os ensaios de infecção *in vivo* (SANSONETTI *et al.*, 2001). Para isso, os animais C57Bl/6 foram infectados com a cepa de EIEC selvagem (WT) e a cepa deficiente no sistema de secreção (DSS). Após os intervalos de 24, 48 e 96 horas foi realizada a contagem de UFC oriundas das bactérias que se encontravam nos pulmões dos camundongos. Nos três intervalos de tempo analisados, o número de UFC de EIEC encontrada no pulmão dos camundongos infectados com a cepa selvagem foi significativamente maior do que o número de UFC encontrada no pulmão dos animais infectados com bactérias deficientes no sistema de secreção (**Figura 24A**). A análise da sobrevivência dos animais infectados revelou que os animais infectados com a cepa selvagem são mais susceptíveis do que os animais infectados com a cepa deficiente no sistema de secreção. A cepa selvagem induziu a morte de 40% dos animais infectados em até 96 horas (60% de sobrevivência), enquanto a cepa deficiente no sistema de secreção não foi capaz de induzir a morte dos camundongos infectados mesmo após 120 horas de infecção, mantendo um índice de 100% de sobrevivência (**Figura 24B**).

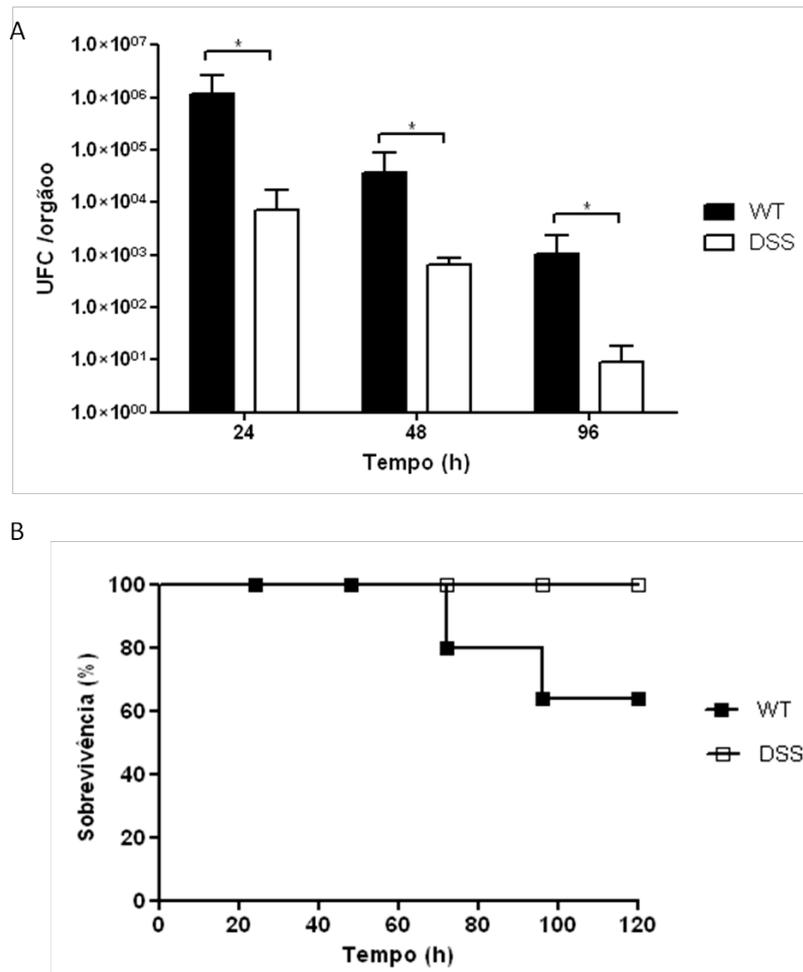


Figura 24: Ensaio de sobrevivência bacteriana e mortalidade. Os animais C57Bl/6 foram infectados intra-traqueal (i.t.) com um inóculo de 2×10^8 bactérias de EIEC selvagem (WT) ou EIEC deficiente no sistema de secreção (DSS). Após os intervalos de 24, 48 e 96 horas foi realizada a contagem de UFC oriundas das bactérias que se encontravam nos pulmões dos camundongos. Para isso, os sobrenadantes do macerado dos órgãos foram semeados superficialmente em placas de ágar MacConkey e o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) foi determinado (A). Análise da sobrevivência de animais infectados com EIEC selvagem (WT) ou EIEC deficiente no sistema de secreção (DSS) por 96 horas (B). * ($p < 0,05$) em relação (WT x DSS) para um mesmo intervalo de tempo analisado. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes.

Os cortes histológicos mostraram que 24 horas após a infecção com a cepa selvagem já foi possível observar uma extensa inflamação pulmonar com a presença de infiltrado celular e alveolite, sendo que esse efeito foi ainda mais expressivo após 96 horas de infecção. Em contraste, a cepa DSS não induziu nenhuma inflamação significativa nos pulmões dos animais infectados nos intervalos de 24 ou 96 horas, apresentando o aspecto morfológico normal dos pulmões, similares aos observados nos animais controles (PBS) (Figura 25).

Esses dados indicam que o sistema de secreção da EIEC é importante para a infecção e essencial para o processo inflamatório induzido por essa bactéria no pulmão dos animais infectados, assim como para a sobrevivência dos animais, mostrando a importância do sistema de secreção durante uma infecção *in vivo*.

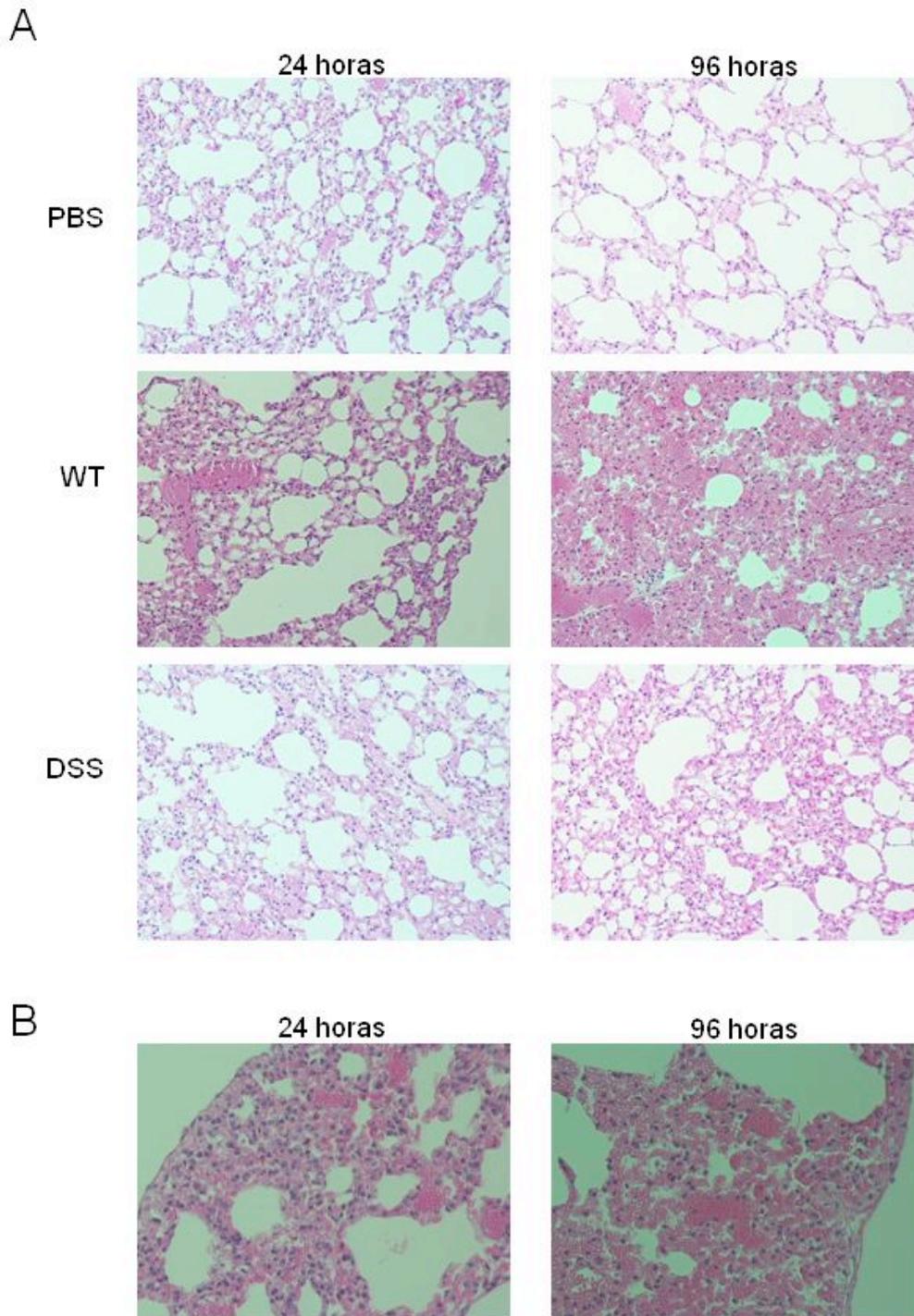


Figura 25: Histologia dos pulmões de animais infectados por EIEC. Os animais C57Bl/6 foram infectados intra-traqueal (i.t.) com um inóculo de 2×10^8 bactérias de EIEC selvagem (WT) ou deficiente no sistema de secreção (DSS). Após os intervalos de 24 e 96 horas o pulmão dos animais controle ou infectados foi removido para obtenção dos cortes histológicos. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina e observadas em microscópio óptico. As figuras representam um aumento de 20x **(A)**. Imagens do pulmão dos animais infectados com a cepa WT em um maior aumento (40x) **(B)**. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes.

4.13. A caspase-1 é importante no controle da infecção de EIEC *in vivo*

No intuito de avaliar o papel da caspase-1 no controle da infecção por EIEC, foram realizados os ensaios de infecção *in vivo* nos animais selvagens (C57Bl/6) e deficientes na caspase-1 (caspase-1^{-/-}). Para isso, os animais foram infectados com a cepa de EIEC selvagem (WT) e após os intervalos de 24 e 48 horas foi realizada a contagem de UFC oriundas das bactérias que se encontravam nos pulmões dos camundongos. Nos dois intervalos de tempo analisados, a quantidade de EIEC selvagem encontrada no pulmão dos animais deficientes em caspase-1 foi significativamente maior quando comparado com o número de bactérias dos animais selvagens (**Figura 25**).

Esses resultados *in vivo*, em conjunto com os dados obtidos *in vitro*, sugerem a participação da caspase-1 na ativação dos macrófagos para a proteção durante uma infecção por EIEC.

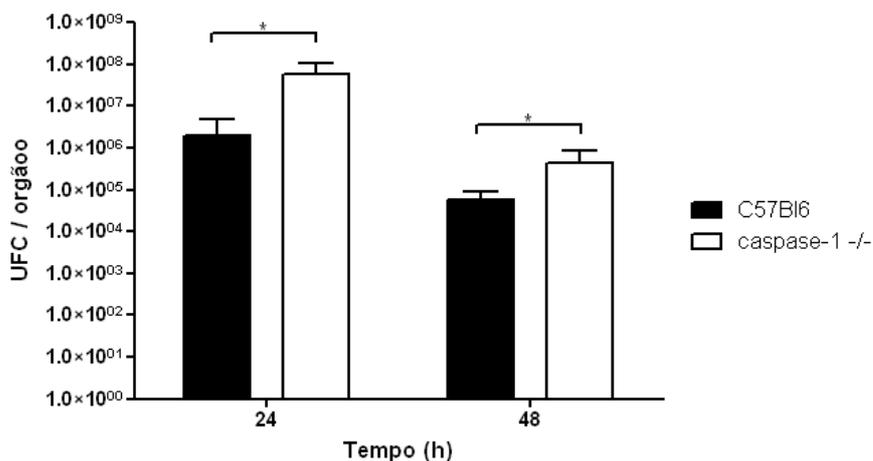


Figura 26: Ensaio de sobrevivência bacteriana *in vivo*. Os animais selvagens (C57Bl/6) e deficientes na caspase-1 (caspase-1^{-/-}) foram infectados intra-traqueal (i.t.) com um inóculo de 2×10^8 bactérias de EIEC selvagem (WT). Após os intervalos de 24 e 48 horas foi realizada a contagem de UFC oriundas das bactérias que se encontravam nos pulmões dos camundongos infectados. Para isso, os sobrenadantes do macerado dos órgãos foram semeados superficialmente em placas de ágar MacConkey e o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) foi determinado. * ($p < 0,05$) em relação (C57Bl/6 x caspase-1^{-/-}) para um mesmo intervalo de tempo analisado.

5. DISCUSSÃO



A disenteria bacilar é caracterizada pela destruição da mucosa do cólon intestinal o que é induzido pela resposta inflamatória após o reconhecimento bacteriano pelos receptores da imunidade inata, tanto de macrófagos como de células epiteliais intestinais (SANSONETTI *et al.*, 2006). Entre os microrganismos que causam essa síndrome, EIEC e *Shigella* foram descritos como importantes agentes etiológicos, acometendo cerca de 160 milhões de casos por ano (KOTTLOF *et al.*, 1999). No entanto, devido à maior incidência, os estudos ficaram praticamente restritos a amostras de *Shigella* e estudos que abordam EIEC e o hospedeiro são praticamente inexistentes.

Essa escassez de dados na literatura deixa sem resposta importantes questões sobre a resposta do hospedeiro na infecção por EIEC e, portanto, a proposta deste trabalho foi esclarecer alguns aspectos na resposta imune induzida por esse microrganismo nos macrófagos e na infecção *in vivo*.

Para o presente trabalho foi escolhido um modelo experimental utilizando-se macrófagos peritonias de camundongos previamente estimulados com tioglicolato (**Figura 9**). Os estudos, *in vitro*, com culturas celulares obtidas de animais, em especial os camundongos, são amplamente utilizados. Esses estudos, juntamente com os ensaios *in vivo*, vêm sendo bastante úteis na avaliação da relação entre o patógeno e o hospedeiro. Nesse estudo, foi escolhido o modelo de infecção pulmonar *in vivo*.

EIEC, assim como *Shigella* e *Salmonella*, utilizam as células M presentes na mucosa intestinal como principal porta de entrada para a mucosa intestinal. Penetrando pelas células M, a bactéria encontra macrófagos residentes na lâmina própria e a fagocitose por esses macrófagos é o primeiro passo para o início da resposta inflamatória. Uma vez dentro do macrófago, a

bactéria sobrevive e/ou escapa do vacúolo fagocítico, induzindo a resposta inflamatória e a subsequente morte dessas células (COSSART & SANSONETTI, 2004).

Trabalhos recentes têm salientado a importância da flagelina e do sistema de secreção bacteriano, - tanto o sistema de secreção do tipo III como do tipo IV -, na ativação da resposta imune dos macrófagos. Uma vez que EIEC também é capaz de expressar flagelina e fazer a montagem completa do flagelo e do sistema de secreção do tipo III, a nossa proposta foi avaliar o papel da flagelina e do sistema de secreção de EIEC na resposta imune do hospedeiro.

Para melhor entendimento da patogênese da EIEC, bem como a resposta imune dos macrófagos em relação a essa espécie bacteriana, nos ensaios de infecção deste estudo, utilizamos três cepas de *Escherichia coli* enteroinvasora: a cepa selvagem (WT); a cepa sem o plasmídio de virulência plnv, deficiente no sistema de secreção (DSS); e a cepa com deleção no gene responsável pela síntese da flagelina (fliC) (**Figura 8**).

A capacidade de fagocitose dos macrófagos foi avaliada pela determinação do número de bactérias intracelulares após contato dos macrófagos com as três cepas bacterianas: a selvagem, a deficiente na flagelina e a cepa sem o plasmídio de virulência. A capacidade de captura inicial ou fagocitose dos macrófagos é semelhante, uma vez que em 30 minutos, a quantidade de bactérias intracelulares entre as três cepas de EIEC foi praticamente o mesmo (**Figura 10**). Para se determinar a resposta inflamatória do hospedeiro durante o processo após a fagocitose, escolhemos o tempo de 30 minutos de incubação em meio sem antibiótico (período de

fagocitose) que antecedeu todos ensaios posteriores. Tal cuidado foi tomado com o objetivo de se excluir quaisquer dúvidas sobre a concentração bacteriana no interior dos macrófagos durante o curso da infecção, ou seja, no início dos ensaios as três bactérias estavam presentes na mesma concentração e, dessa forma, inferimos que os estudos comparativos estavam normalizados.

Nossos resultados mostraram uma capacidade similar de sobrevivência no interior dos macrófagos entre as cepas de EIEC, uma vez que não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre a concentração intracelular das três cepas bacterianas nas primeiras três horas pós-fagocitose. Contudo, nossos dados obtidos no escape bacteriano mostram que as cepas EIEC selvagem e EIEC deficiente na flagelina foram encontradas em maior quantidade no sobrenadante da cultura, quando comparada a EIEC deficiente no sistema de secreção (**Figura 11**).

Estudos mostraram que o escape da *Shigella* do vacúolo fagocítico das células epiteliais é dependente do sistema de secreção e das proteínas *ipaB* e *ipaC* (HIGH *et al.*, 1992; TRAN VAN NHIEU *et al.*, 1999). Avaliamos a transcrição relativa dos genes *ipaB* e *ipaC* das três cepas de EIEC nas duas primeiras horas de infecção pós-fagocitose. O nível da transcrição de *ipaB* e *ipaC* foi similar entre a cepa selvagem e a deficiente na flagelina e, como esperado, não foi observado a transcrição desses genes na cepa sem o plasmídeo de virulência (**Figura 12**). Assim, esses dados justificam o escape bacteriano semelhante entre a cepa selvagem e a cepa deficiente na flagelina, e a deficiência no escape da cepa de EIEC sem o plasmídeo de virulência, incapaz de montar o sistema de secreção.

Além disso, a cepa de EIEC incapaz de montar o sistema de secreção não induziu morte dos macrófagos, no entanto, as cepas selvagem e deficiente na flagelina induziram a morte dos macrófagos de maneira semelhante, sendo os danos dependentes do tempo, ou seja, quanto maior tempo de infecção, maior o dano causado nas células (**figura 14**). Esses dados mostram que tanto o espaço bacteriano, assim como a morte dos macrófagos infectados por EIEC, é um processo dependente do sistema de secreção, mas independente da flagelina.

Os macrófagos detectam o enteropatógeno ou seus produtos através de receptores, tanto extracelulares como intracelulares, como os TLRs e NLRs (SANSONETTI et al., 2006). A ativação desses receptores por seus ligantes induz o recrutamento de proteínas adaptadoras específicas, como o Myd88 e ASC, que transduzem o sinal culminando na ativação do fator de transcrição NF- κ B ou da protease caspase-1 (MIAO et al., 2011). Dá-se, dessa maneira, a produção de diferentes moléculas efetoras, citocinas, quimiocinas, entre outros mediadores, responsáveis pelas diferentes respostas.

Foi demonstrado que as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α tem papel fundamental no início da inflamação na infecção por *Shigella* (RAQIB et al., 1995; SANSONETTI et al., 2000, SANSONETTI, 2001). Além disso, a IL-1 β apresenta uma gama de funções, induz tanto a inflamação local como a sistêmica (DINARELLI et al., 1999), e recentemente a IL-1 β foi descrita como essencial na indução da resposta Th17, envolvida no recrutamento de neutrófilos para o foco infeccioso, essenciais no controle das infecções bacterianas (CHUNG et al., 2009; MIAO et al., 2010a). A citocina IL-10 produzidas por macrófagos na infecção tem um importante papel no controle

homeostático das reações da imunidade inata e da imunidade celular (COUPER *et al.*, 2008). A produção de IL-10 tem efeito anti-inflamatório e provavelmente representa uma tentativa das células do hospedeiro em evitar uma resposta imune descontrolada (DEMUTH *et al.*, 1996) que poderá favorecer a colonização do patógeno.

Por esse motivo, investigamos a presença dessas citocinas no sobrenadante de culturas de macrófagos infectadas com as cepas de EIEC. Nossos resultados indicam que a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α , além da citocina anti-inflamatória IL-10 pelos macrófagos infectados por EIEC, ocorre de maneira independente da flagelina de EIEC. Além disso, a produção de IL-1 β e IL-10, mas não de TNF- α , foi dependente do sistema de secreção de EIEC (**Figuras 15 e 16**). Para que ocorra a secreção de IL-1 β em sua forma ativa por macrófagos, é necessária a ativação da caspase-1 e, com isso, a clivagem da pro-IL-1 β (forma inativa) e secreção de IL-1 β em sua forma ativa (MARTINON *et al.*, 2009).

Estudos com *Legionella pneumophila* demonstraram que mutantes de *L. pneumophila* deficientes no gene que codifica a flagelina falharam na ativação da caspase-1 em macrófagos. O aumento da replicação da cepa selvagem de *Legionella* nos pulmões de camundongos deficientes em caspase-1, e o aumento da replicação de *Legionella* deficiente em flagelina nos pulmões de camundongos selvagens indicaram que a ativação da caspase-1 pela flagelina protege contra a infecção respiratória (REN *et al.*, 2006; MOLOFSKY *et al.*, 2006). Além da flagelina, foi evidenciado que o sistema de secreção do tipo IV de *L. pneumophila* também é essencial para que ocorra a ativação de caspase-1 nos macrófagos (ZAMBONI *et al.*, 2006).

Corroborando com esses dados, uma considerável redução da morte celular de macrófagos foi observada após infecção por mutantes de *Salmonella* deficientes de flagelina. A partir desses estudos, foi proposto que a flagelina citosólica age como um agonista que promove a ativação de caspase-1. MIAO e colaboradores (2006), e FRANCHI e colaboradores (2006) mostraram uma falha na sinalização da ativação de caspase-1 nos macrófagos infectados com mutantes de *Salmonella* deficientes na produção de flagelina. Notavelmente, esses estudos mostraram que o sistema de secreção do tipo III da ilha de patogenicidade da *Salmonella* mutante em flagelina era funcional, o que indicaria que a falha na ativação da caspase-1 foi causada diretamente pela ausência de flagelina e não por um efeito indireto de um funcionamento ineficiente do sistema de secreção. Adicionalmente, a hipótese de que a flagelina citosólica era um agonista da ativação de caspase-1 foi fortemente sustentada por experimentos que mostraram a ativação de caspase-1 e posterior secreção de IL-1 β , após flagelinas purificadas serem adicionadas diretamente no citoplasma dos macrófagos por transfecção protéica (MIAO *et al.*, 2006; FRANCHI *et al.*, 2006). Posteriormente, MIAO e colaboradores (2008) evidenciaram que mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* deficientes na flagelina também falharam na ativação da caspase-1 e, conseqüentemente na secreção de IL-1 β e morte celular (MIAO *et al.*, 2008).

Nossos resultados mostraram que EIEC induz a ativação da caspase-1 e com isso, a posterior secreção de IL-1 β , já que os macrófagos de camundongos deficientes em caspase-1 não produziram IL-1 β em resposta a infecção com as diferentes cepas de EIEC. A cepa incapaz de montar o sistema de secreção do tipo III se mostrou ineficiente para a indução da

produção de IL-1 β pelos macrófagos selvagens infectados, ou seja, a ativação da caspase-1 induzida por EIEC parece ser dependente do sistema de secreção do tipo III. No entanto, não houve diferença significativa na produção de IL-1 β pelas células infectadas por EIEC selvagem e deficiente na produção de flagelina, sugerindo que a ativação da caspase-1 induzida por EIEC é independente da flagelina bacteriana (**figura 17**).

Corroborando com nossos dados, SUZUKI e colaboradores (2007) estudaram o mecanismo de regulação da ativação da caspase-1 na infecção por *Shigella*. Os autores demonstraram que o receptor IPAF é necessário para a ativação de caspase-1 e processamento de IL-1 β em macrófagos infectados por *Shigella*, mas esses processos, ao contrário de *Salmonella*, foram independentes de flagelina. Os resultados sugeriram que fatores bacterianos desconhecidos são liberados por *Shigella* intracelular e são detectados para promover a ativação de caspase-1 (SUZUKI *et al.*, 2007).

Após evidenciarmos a participação da caspase-1 na resposta imune dos macrófagos infectados por EIEC, decidimos avaliar o papel do receptor IPAF e da proteína adaptadora ASC na ativação de caspase-1. Nossos resultados sugeriram que ativação da caspase-1 dos macrófagos infectados por EIEC é dependente do receptor IPAF e parcialmente da molécula adaptadora ASC, uma vez que a secreção de IL-1 β por macrófagos provenientes de animais *Ipaf*^{-/-} e *ASC*^{-/-} foi significativamente menor do que a observada nos macrófagos de camundongos selvagens, ainda que a os macrófagos de animais *ASC*^{-/-} conservaram a secreção de níveis mínimos dessa citocina (**Figura 19**).

Devido o sistema de secreção do tipo III de *Shigella* e *Salmonella* formar poros na membrana de macrófagos infectados, esse aparato pode induzir um efluxo de potássio ou outra atividade na membrana celular, um sinal que tem sido sugerido como ativador do inflamassoma NALP3. Entretanto, NALP3 não possui função na ativação de caspase-1 induzida por *Salmonella* (MARIATHASAN *et al.*, 2006).

Um estudo recente demonstrou que as proteínas do aparato do sistema de secreção do tipo III (proteínas Rod), de alguns patógenos, incluindo *Salmonella*, *Pseudomonas* e *Shigella*, são capazes de induzir a ativação de caspase-1 via inflamassoma IPAF (MIAO *et al.*, 2010b). Esses dados podem justificar a deficiência na ativação de caspase-1 da EIEC incapaz de montar o sistema de secreção (**Figura 17 e 19**), sugerindo que a proteína do aparato do sistema de secreção de EIEC seja um possível agonista do receptor IPAF envolvido na ativação da caspase-1.

Os inflamassomas que contêm tanto IPAF quanto ASC estão envolvidos na ativação da caspase-1 e secreção de IL-1 β , em resposta à infecção por *Salmonella* (MARIATHASAN *et al.*, 2004). Entretanto, apenas aqueles que contêm IPAF foram descritos como essenciais na morte celular dependente de caspase-1 (MIAO *et al.*, 2006; FRANCHI *et al.*, 2006). Esses estudos indicam que IPAF é o receptor-chave envolvido no processo de morte celular de macrófagos por *Salmonella*, dependente de caspase-1. Estudo recente, *in vivo*, mostrou que a morte rápida dos macrófagos por piroptose (dependente de caspase-1) é crucial para controlar a infecção por *Salmonella*, uma vez que essas bactérias, escapando dos macrófagos são fagocitadas e mortas pelos neutrófilos (resposta Th17) (MIAO *et al.*, 2010b).

Já foi demonstrado que a *Shigella* é capaz de induzir a morte de macrófagos tanto por apoptose e necrose (NONAKA *et al.*, 2003), como por piroptose (morte rápida dependente do receptor IPAF para que ocorra a ativação de caspase-1) (SUZUKI *et al.*, 2007), pironecrose (morte mais tardia dependente do receptor NALP3 para que ocorra a ativação de caspase-1) (WILLINGHAM *et al.*, 2007) e morte por autofagia (SUZUKI *et al.*, 2008).

Nossos resultados mostraram que a morte induzida por EIEC é independente da ativação da caspase-1, ou seja, os macrófagos infectados com EIEC não morrem por piroptose, uma vez que não houve diferenças significativas na morte dos macrófagos induzida por EIEC de camundongos selvagens quando comparados com macrófagos caspase-1^{-/-}. Além disso, foi observado que a morte não é dependente do receptor IPAF e da proteína ASC, uma vez que não houve diferenças significativas na morte dos macrófagos induzida por EIEC de camundongos selvagens quando comparados com macrófagos IPAF^{-/-} e ASC^{-/-} (**Figura 21 e 22**).

Nossos resultados também mostraram que a morte dos macrófagos infectados por EIEC é um processo independente da apoptose (**Figura 23**), que é caracterizada por ser um tipo de morte que não induz inflamação no local, diferentemente das mortes que induzem inflamação, como a piroptose, necrose ou pironecrose. Nesses tipos de mortes, ocorre a lise da membrana celular, e com isso, a liberação de mediadores inflamatórios do conteúdo citoplasmático. Adicionalmente, na piroptose e pironecrose, juntamente com a liberação dos mediadores inflamatórios são liberadas as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18, e com isso, uma grande inflamação no foco infeccioso (MIAO *et al.*, 2010a). A morte por autofagia, caracterizada por não induzir a inflamação

assim como a apoptose, também é descrita como um importante mecanismo no controle das infecções (BORTOLUCCI & MEDHIZTOV, 2010). Especulamos como possíveis processos de morte celular dos macrófagos infectados por EIEC, em nosso modelo experimental, a necrose e/ou a autofagia.

Nossos resultados, juntamente com os dados da literatura, sugerem que fatores bacterianos desconhecidos pela EIEC são secretados via sistema de secreção do tipo III, e são detectados diretamente ou indiretamente pelo receptor IPAF e pela proteína adaptadora ASC para promover a ativação de caspase-1. Essa ativação da caspase-1 dos macrófagos infectados por EIEC esta envolvida no processamento e secreção da citocina IL-1 β e possivelmente na secreção de IL-18, mas não na morte celular.

No modelo de infecção *in vivo*, o sistema de secreção bacteriano foi importante para a sobrevivência bacteriana no hospedeiro, assim como para a indução de uma resposta inflamatória no local da infecção (**Figura 24 e 25**). Ainda, a caspase-1 parece ter um papel importante para o controle da infecção *in vivo* por EIEC, podendo assim contribuir para uma resposta imune protetora do hospedeiro (**Figura 26**).

Os resultados obtidos neste estudo, em conjunto com os demais realizados pelo nosso grupo de pesquisa, trazem contribuições relevantes acerca da caracterização da resposta inflamatória que a infecção por EIEC desencadeia no hospedeiro.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no modelo experimental *in vitro* demonstram que a fagocitose de EIEC pelos macrófagos é um processo independente do sistema de secreção e da flagelina, contudo o escape bacteriano, a morte dos macrófagos, a produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatória e a ativação da caspase-1 dos macrófagos, é um processo independente da flagelina, mas dependente do sistema de secreção e de suas proteínas efetoras. A ativação da caspase-1 de macrófagos infectados por EIEC é dependente do receptor IPAF e parcialmente da molécula adaptadora ASC e a morte dos macrófagos infectados por EIEC é independente da caspase-1 e de apoptose.

Além disso, foi mostrado que a caspase-1 é importante no controle da infecção de EIEC *in vivo*. Nossos dados também mostraram que em um modelo de infecção *in vivo*, o sistema de secreção de EIEC se mostrou importante para sobrevivência e proliferação bacteriana, além de determinar a maior susceptibilidade dos animais. O que corrobora com o maior infiltrado celular e inflamação encontrada nos animais infectados com a cepa selvagem quando comparado com os animais infectados com a cepa deficiente no sistema de secreção.

Esses dados, em conjunto com os dados obtidos recentemente pelo nosso grupo de pesquisa, nos indicam que o sistema de secreção é essencial para resposta inflamatória induzida pela infecção por EIEC, e apesar da flagelina não ser importante nesse processo, a caspase-1 parece ser um mecanismo de proteção do hospedeiro na infecção por EIEC.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ADEREM A, UNDERHILL DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol.*17:593-623, 1999.

ADEREM, A. AND ULEVITCH, R.J. (2000) Toll-like receptors in the induction of the Innate Immune Response. *Science* 406, 782–787.

ADLER, B.; SASAKAWA, C.; TOBE, T.; MAKINO, S.; KOMATSU, K.; YOSHIKAWA, M. A dual transcriptional activation system for the 230kb plasmid genes coding for virulence-associated antigens of *Shigella flexneri*. *Mol. Microbiol.*, 3:627-635, 1989.

AKIRA, S; UEMATSU, S; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124: 783–801, 2006.

ASHIDA, OGAWA H., MIMURO H, KOBAYASHI T, SANADA T, SASAKAWA C. *Shigella* are versatile mucosal pathogens that circumvent the host innate immune system. *Current Opinion in Immunology*, 23:448–455, 2011.

ALMEIDA, M.T.G.; SILVA, R.M.; DONAIRE, L.M.; MOREIRA, L.E.; MARTINEZ, M.B. Enteropatógenos associados com diarreia aguda em crianças. *J. Pediatria*, 74:291-298, 1998.

AMARANTE-MENDES, G.P.; BOSSY-WETZEL, E.; BRUNNER, T.; GREEN, D. R. Apoptosis Assays. In: Spector, D.L.; Goldman, R.; Leinwand, L. *Cell: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory*, 1998.

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

ARBIBE, L., KIM, D.W., BATSCHE, E., PEDRON, T., MATEESCU, B., MUCHARDT, C., PARSOT, C., SANSONETTI, P.J. An injected bacterial effector targets chromatin access for transcription factor NF-kappaB to alter transcription of host genes involved in immune responses. *Nat. Immunol.*, 8:47-56, 2007.

AUFFRAY C, SIEWEKE MH, GEISSMANN F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annual review of immunology.*, 27:669-92, 2009

AZEVEDO, M.E.F. A influência do pH ácido na expressão do lipopolissacarídeo e das proteínas de membrana externa de *Escherichia coli* enteroinvasora. São Paulo, 1998. 120p. Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

BANDO SY, VALLE GRF, MARTINEZ MB, TRABULSI LR, MOUREIRA-FILHO CA. Characterization of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* strains by RAPD analysis. *FEMS Microbiol. Lett.*, 165:159-165, 1998.

BANDO, S.Y.; MORENO, A.C.R.; ALBUQUERQUE, J.A.T.; AMHAZ, J.M.K.; MOUREIRA-FILHO, C.A.; MARTINEZ, M.B. 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*, 105(6):001-006, 2010.

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

BERGSBAKEN T, FINK SL, COOKSON BT: Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol*, 7:99-109, 2009.

BEUTLER, B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature*, 430:257-263, 2004.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immun.*, 10:907-16, 2001.

BORIAN, A.; CSIZMAZIA, F.; KARVALY, E.; MIHALFFY, F.; REDEY, B. Enterocolitis epidemic caused by water contaminated with Coli O124 in Veszpren. *Orv. Hetil*, 100:1072-1074, 1959.

BORTOLUCI, K.R., MEDZHITOV, R. Control of infection by pyroptosis and autophagy: role of TLR and NLR. *Cell. Mol. Life Sci.* 67:1643–1651, 2010.

BROZ, P.; MARIATHASAN, S.; DIXIT, V.M.; MONACK, D.M. Redundant roles for inflammasome receptors NLRP3 and NLRC4 in host defense against Salmonella. *J. Exp. Med.*, 207:1745-1755, 2010.

CASE , CL.; SHIN, S.; ROY, CR. Asc and Ipaf Inflammasomes Direct Distinct Pathways for Caspase-1 Activation in Response to *Legionella pneumophila*. *Infect Immun.*, 19: 1981–1991, 2009.

CHEN, R., SMITH, M.R., THIRUMALAI, K. AND ZYCHLINSKY, A. A bacterial invasin induces macrophage apoptosis by binding directly to ICE. *EMBO J.* 15:3853–3860, 1996.

CHUNG Y, CHANG SH, MARTINEZ GJ, YANG XO, NURIEVA R, KANG HS, MA L. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity* 30: 576–587, 2009.

COIMBRA, R.S., GRIMONT, F., GRIMONT, P.A.D. Colonal relationships among *Shigella* serotypes suggested by cryptic flagellin gene polymorphism. *Journal of clinical microbiology*, 2001.

COHN, Z.A. Influence of rabbit polymorphonuclear leucocytes and macrophages on the immunogenicity of *Escherichia coli*. *Nature*. 15;196:1066-8, 1962a.

COHN, Z.A. Determinants of infection in the peritoneal cavity. Factors influencing the fate of *Staphylococcus aureus* in the mouse. *Yale J Biol Med.*, 35:48-61, 1962b.

COHN, Z.A. Determinants of infection in the peritoneal cavity. Response to and fate of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus albus* in the mouse. *Yale J Biol Med.*, 35:12-28, 1962c.

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

DATSENKO K.A., WANNER. B.L.. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci*, 2000.

DINARELLO, C.A. Interleukin-1b, Interleukin-18 and the Interleukin-1b converting enzyme. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 856:1–11, 1999.

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

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

ECHEVERRIA, P.; SETHABUTR, O.; SERICHANTALERGS, O.; LEXOMBOON, U.; TAMURA, K. *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* infections in households of children with dysentery in Bangkok. *J. Infect. Dis.*, 165:144-147, 1992.

ECKMANN, L.; JUNG, H.C.; SCHURER-MALY, C.; PANJA, A.; MORZYCKA-WROBLEWSKA, E.; KAGNOFF, M.F. Differential cytokine expression by human intestinal epithelial cell lines: regulated expression of interleukin 8. *Gastroenterology*, 105:1689-1697, 1993.

EWING, W.H. Edward's and Ewing's identification of Enterobacteriaceae. 4th Ed., *Elsevier Science, New York*, p.135-172, 1986.

EWING WH, GRAWATTI JL. *Shigella* types encountered in the Mediterranean area. *J. Bacteriol.*, 53:191-195, 1947.

FERNANDEZ-PRADA, C. M., HOOVER, D. L., TALL, B. D. & VENKATESAN, M. Human monocyte-derived macrophages infected with virulent *Shigella flexneri* *in vitro* undergo a rapid cytolytic event similar to oncosis but not apoptosis. *Infect. Immun.*, 65:1486–1496, 1997.

FEULLIT V, MEDJANE S, MONDOR I, FLAVELL RA, ALEXPOULOU L. Involvement of toll-like receptor 5 in the recognition of flagellated bacteria. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 103:487-492, 2006.

FINK, S. L.; B. T. COOKSON. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect. Immun.*, 73:1907–1916, 2005.

FINLAY, B.B., MCFADDEN, G. Anti-immunology: evasion of the host immune system by bacterial and viral pathogens. *Cell*, 124:767-82, 2006.

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

FRANCHI, L., A. AMER, M. BODY-MALAPEL, T. D. KANNEGANTI, N. OZOREN, R. JAGIRDAR, N. INOHARA, P. VANDENABEELE, J. BERTIN, A. COYLE, E. P. GRANT, AND G. NUNEZ. Cytosolic flagellin requires IpaF for activation of caspase-1 and interleukin 1 β in *Salmonella*-infected macrophages. *Nat. Immunol.*, 7:576–582, 2006.

GAY, N.J., KEITH, F.J. *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. *Nature*, 351(6325):355-6, 1991.

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

GORDON, S. The macrophage: past, present and future. *European journal of immunology*, 37:9-17, 2007.

GREAVES, D.R., GORDON, S. Thematic review series: the immune system and atherogenesis. Recent insights into the biology of macrophage scavenger receptors. *J Lipid Res.*, 46:11-20, 2005.

GUICHON, A., HERSH, D., SMITH, M.R., ZYCHLINSKY, A. Structure-function analyses of the *Shigella* virulence factor Ipa B. *J. Bacteriol.*, 183:1269-1276, 2001.

GUTH, B.E.C.; SILVA, R.M.; TOLEDO, M.R.F.; LIMA, T.M.O.; TRABULSI, L.R. Virulence factors and biochemical characteristics of serotypes of *Escherichia coli* serogroup O29. *J. Clin. Microbil.*, 27:2161-2164, 1989.

HAYES, C.S.; STEPHANIE K. AOKI, S.K.; LOW, D.A. Bacterial Contact-Dependent Delivery Systems. *Annu. Rev. Genet.*, 44:71–90, 2010.

HARRIS, J.R.; MARIANO, J.; WELLS, J.G.; PAYNE, B.J.; DONNELL, H.D.; COHEN, M.L. Person-to-person transmission in an outbreak of enteroinvasive *Escherichia coli*. *Am. J. Epidemiol.*, 122:245-252, 1985.

HARRIS, J.R.; WACHSMUTH, I.K.; DAVIS, B.R.; COHEN, M.L. High-molecular-weight plasmid correlates with *Escherichia coli* enteroinvasiveness. *Infect. Immun.*, 37:1295-1298, 1982.

HAYASHI F, SMITH KD, OZINSKY A, HAWN TR, YI EC, GOODLETT DR, ENG JK, AKIRA S, UNDERHILL DM, ADEREM A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*. 410:1099-103, 2001

HERSH, D.; MONACK, D.M.; SMITH, M. R.; GHORI, N.; FALKOW, S. The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc Natl Acad Sci* 96:2396–2401, 1999.

HIGH, N., MOUNIER, J., PREVOST, M.C. AND SANSONETTI, P.J. IpaB of *Shigella flexneri* causes entry into epithelial cells and escape from the phagocytic vacuole. *EMBO J.*, 11:1991–1999, 1992.

HILBI, H., MOSS, J.E., HERSH, D., CHEN, Y., ARONDEL, J., BANERJEE, S., FLAVELL, R.A., YUAN, J., SANSONETTI, P.J., ZYCHLINSKY, A. *Shigella*-induced apoptosis is dependent on caspase-1 which binds to IpaB. *J. Biol. Chem.*, 49:32895-900, 1998.

HUANG, G.T., ECKMANN, L., SAVIDGE, T.C., KAGNOFF, M.F. Infection of human intestinal epithelial cells with invasive bacteria upregulates apical intercellular adhesion molecule-1 (ICAM)-1 expression and neutrophil adhesion. *J. Clin. Invest.*, 98(2):572-83, 1996.

HUECK, C.J. Type III protein secretion systems in bacterial pathogen of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62:379-433, 1998.

INOHARA, N., CHAMAILLARD, M., MCDONALD, C., NUNEZ, G. NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu Rev Biochem.* 74:355-83, 2005.

JANEWAY, C.A. JR., MEDZHITOV, R. Lipoproteins take their toll on the host. *Curr. Biol.*, 9(23):R879-82, 1999.

JUNG, H.C., ECKMANN, L, YANG, S.K., PANJA, A., FIERER, J., MORZYCKA-WROBLEWSKA, E., KAGNOFF, M.F. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J. Clin. Invest.*, 95(1):55-65, 1995.

KIM DW, CHU H, JOO DH, JANG MS, CHOI JH, PARK SM, CHOI YJ, HAN SH, YUN CH. OspF directly attenuates the activity of extracellular signal-regulated kinase during invasion by *Shigella flexneri* in human dendritic cells. *Mol. Immunol.* 11:3295-301, 2008.

KOTLOFF, K.L., WINICKOFF, J.P., IVANOFF, B., CLEMENS, J.D., SWERDLOW, D.L., SANSONETTI, P.J., ADAK, G.K., LEVINE, M.M. Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and

implementation of control strategies. *Bull World Health Organization*, 77:651-666, 1999.

KUFER, T.A., FRITZ, J.H., PHILPOTT, D.J. NACHT-LRR proteins (NLRs) in bacterial infection and immunity. *Trends Microbiol.*, 13:381-8, 2005.

KUWAE A, YOSHIDA S, TAMANO K, MIMURO H, SUZUKI T, SASAKAWA C. *Shigella* invasion of macrophage requires the insertion of IpaC into the host plasma membrane. Functional analysis of IpaC. *J Biol Chem.*, 34:32230-9, 2001.

LARA-TEJERO M, FLAVELL RA, GALAN JE. Role of caspase-1 inflammasome in *Salmonella typhimurium* pathogenesis. *J. Exp. Med.* 203: 1407-1412, 2006.

LEE SH, STARKEY PM, GORDON S. Quantitative analysis of total macrophage content in adult mouse tissues: immunochemical studies with monoclonal antibody F4/80. *J Exp Med*, 161:475-489, 1985.

LETT, M., SASAKAWA, C., OKADA, N., SAKAI, T., MAKINO, S., YAMADA, M., KOMATSU, K. AND YOSHIKAWA, M. *virG*, a plasmid-coded virulence gene of *Shigella flexneri*: identification of the *virG* protein and determination of the complete coding sequence. *J. Bacteriol.* 171:353-359, 1989.

LEIBOVICH SJ, ROSS R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol.* 78(1):71-100, 1975.

MAKINO, S.; SASAKAWA, C.; KAMATA, K.; KURATA, T.; YOSHIKAWA, M. A genetic determinant required for continuous reinfection of adjacent cells on large plasmid in *S. flexneri 2a*. *Cell*, 46:551-555, 1986.

MARIATHASAN, S.; NEWTON, K.; MONACK, D. M.; VUCIC, D.; FRENCH, D. M. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature*, v.430, p.213-218, 2004.

MARIATHASAN, S.; WEISS, D. S.; NEWTON, K.; MCBRIDE, J.; O'ROURKE, K. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 440: 228-232, 2006.

MARIATHASAN, S.; MONACK, D. M. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 7:31-40, 2007.

MARIER, R.; WELLS, J.C.; SWANSON, R.C.; CALLAHAN, W.; MEHLMAN, I.J. An outbreak of enteropathogenic *E. coli* foodborne disease traced to imported cheese. *Lancet*, 1:1376-1378, 1973.

MARTINO, M.C., ROSSI, G., MARTINI, I., TATTOLI, I., CHIAVOLINI, D., PHALLIPON, A., SANSONETTI, P.J., BERNARDINI, M.L. Mucosal lymphoid

infiltrate dominates colonic pathological changes in murine experimental shigellosis. *J. Inf. Dis.*, 192:136-148, 2005.

MARTINON, F., BURNS, K. & TSCHOPP, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β . *Mol. Cell*, 10:417–426 2002.

MARTINON, F., MAYOR, A., TSCHOPP, J. The inflammasomes: Guardians of the body. *Annu. Rev. Immunol.*, 27:229–65, 2009.

MATSUSHITA S, YAMADA S. KAI A. KUDOH, Y. Invasive strains of *Escherichia coli* belonging to serotype O121:NM. *J. Clin. Microbiol.*, 31:3034-5, 1993.

MAURELLI, A.T., BLACKMON, B., CURTIS, R. Loss of pigmentation in *Shigella flexneri* 2a is correlated with the loss of virulence-associated plasmid. *Infect. Immun.*, 43:397-401, 1984.

MAYER, L., SHLIEN, R. E. Evidence for function of Ia molecules on gut epithelial cells in man. *J. Exp. Med.*, 166:1471-1483, 1987.

MCGREAL, E.P., MILLER, J.L., GORDON, S. Ligand recognition by antigen-presenting cell C-type lectin receptors. *Curr. Opin. Immunol.*, 17(1):18-24, 2005.

MEDZHITOV, R., JANEWAY, C. Innate immune Recognition: mechanisms and pathways. *Immunological Reviews*, 173:89-97, 2002.

MEDZHITOV, R., JANEWAY, C. Innate immune: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.*, 9:4-9, 1997.

MENARD, R., SANSONETTI, P.J. AND PARSOT, C. The secretion of the *Shigella flexneri* Ipa invasions is activated by epithelial cells and controlled by IpaB and IpaD. *EMBO J.* 13, 5293–5302, 1994b.

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

MENARD, R.; SANSONETTI, P.J.; PARSOT, C; VASSELON, T. Extracellular association and cytoplasmic partitioning of the IpaB and IpaC invasins of *S. flexneri*. *Cell*, 79:515-525, 1994a.

MIAO, E. A.; ALPUCHE-ARANDA, C. M.; DORS, M.; CLARK, A. E.; BADER, M. W. Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1 β via IpaF. *Nat Immunol* 7: 569–575, 2006.

MIAO, E. A.; ERNST, R.K.; DORS, M.; MAO, D. P.; ADEREM, A. *Pseudomonas aeruginosa* activates caspase 1 through IpaF. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105:2562–2567, 2008.

MIAO EA, LEAF IA, TREUTING PM, MAO DP, DORS M, SARKAR A, WARREN SE, WEWERS MD, ADEREM A. Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. *Nat Immunol* 11(12):1136-42, 2010a.

MIAO EA, MAO DP, YUDKOVSKY N, BONNEAU R, LORANG CG, WARREN SE, LEAF IA, ADEREM A: Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLRC4 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci*, 107:3076-3080, 2010b.

MIAO EA, RAJAN JV. Salmonella and caspase-1: a complex interplay of detection and evasion. *Front Microbiol.*, 2:85-89, 2011.

MOLOFSKY, A. B., B. G. BYRNE, N. N. WHITFIELD, C. A. MADIGAN, E. T. FUSE, K. TATEDA, AND M. S. SWANSON. Cytosolic recognition of flagellin by mouse macrophages restricts *Legionella pneumophila* infection. *J. Exp. Med.* 203:1093–1104, 2006.

MOSSER DM, EDWARDS JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews*. 8(12):958-69, 2008.

MOWAT A, BAIN CC. Mucosal macrophages in intestinal homeostasis and inflammation. *J. Innate immune.*, 3:550-564, 2011.

NATARO JP, KAPER JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 11:142-201, 1998.

NETEA, M.G., VAN DER GRAAF, C., VAN DER MEER, J.W., KULLBERG B.J. Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system. *J. Leukoc. Biol.*, 75(5):749-55, 2004.

NEWBERRY, R.D., LORENZ, R.G. Organizing a mucosal defense. *Immunol. Rev.*, 206:6-21, 2005.

NONAKA, T., KUWABARA, T., MIMURO, H., KUWAE, A., IMAJOH-OHMI, S. *Shigella*-induced necrosis and apoptosis of U937 cells and J774 macrophages. *Microbiology*, 149:2513-2527, 2003.

OGAWA M, HANDA Y, ASHIDA H, SUZUKI M, SASAKAWA C. The versatility of *Shigella* effectors. *Nat Rev Microbiol*, 6:11-16, 2008.

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

OGUNSANYA, T.I.; ROTIMI, V.O.; ADENUGA, A. A study of etiological agents of childhood diarrhoea in Lagos, Nigeria. *J. Med. Microbiol.*, 40:10-14, 1994.

ORSKOV I. WACHSMUTH K. TAYLOR DN. Two new *Escherichia coli* O groups: O172 from 'shiga-like' toxin II-producing strains (EHEC) and O173 from enteroinvasive *E. coli* (EIEC). *APMIS*, 99:30-32, 1991.

PARSOT. C. Shigella type III secretion effectors: how, where, when, for what purposes? *Curr. Opin. Microbiol.*, 12:110-116, 2009.

PARSOT, C. *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors. *FEMS Microbiol. Lett.*, 252:11-18, 2005.

PARSOT, C., SANSONETTI, P.J. Invasion and the pathogenesis of *Shigella* infections. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 209:25-42, 1996.

PAYNE, S.M., FINKELSTEIN, R.A. Detection and differentiation of iron-responsive avirulent mutants on Congo red agar. *Infect. Immun.*, 18(1):94-8., 1977.

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

POLVERINI PJ, COTRAN PS, GIMBRONE MA, JR., UNANUE ER. Activated macrophages induce vascular proliferation. *Nature*, 269(5631):804-6, 1977.

PRATS, G.; LLOVET, T. Enteroinvasive *Escherichia coli*: Pathogenic mechanisms and epidemiology. *Microbiologia*, 11:91-96, 1995.

PUPO GM, KARAOLIS DKR, LAN R, REEVES PR. Evolutionary relationships among pathogenic *Escherichia coli* strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and *mdh* sequence studies. *Infect. Immun.*, 65:2685-2692, 1997.

RAQIB, R., LINDBERG, A.A., WRETLIND, B., BARDHAN, P.K., ANDERSSON, U., ANDERSSON, J. Persistence of local cytokine production in shigellosis in acute and convalescent stages. *Infection and immunity*, 63:289-296, 1995.

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

RAUPACH B, PEUSCHEL SK, MONACK DM, ZYCHLINSKY A. Caspase-1 mediated activation of interleukin-1beta and IL-18 contributes to innate immune defenses against Salmonella enteric serovar Typhimurium infection. *Infect Immun.*, 74:4922-4926, 2006.

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

REN, T.; ZAMBONI, D. S.; ROY, C. R.; DIETRICH, W. F.; VANCE, R. E. Flagellin deficient *Legionella* mutants evade caspase-1- and Naip5-mediated macrophage immunity. *PLoS Pathog*, 2006.

RESTA-LENERT, S., BARRETT, K.E. Enteroinvasive bacteria alter barrier and transport properties of human intestinal epithelium: role of iNOS and COX-2. *Gastroenterology*, 122(4):1070-87, 2002.

ROY, C. R.; ZAMBONI, D. S. Cytosol detection of flagellin: a deadly twist. *Nat. Immunol*, 7:549-551, 2006.

SAKAZAKI R, TAMURA K. SAITO M. Enteropathogenic *Escherichia coli* associated with diarrhea in children and adults. *Jap. J. Med. Sci. Biol.*, 20:387-399, 1967.

SANSONETTI, P. J.; HAUTEVILLE, H.; FORMAL, S.B.; TOUCAS, M. Plasmid mediated invasiveness of 'Shigella-like' *Escherichia coli*. *Ann. Microbiol. Inst. Pasteur*, 132A:351-355, 1982a.

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

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

SANSONETTI, P.J. Rupture, invasion and inflammatory destruction of the intestinal barrier by *Shigella*: The yin and yang of innate immunity. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.*, 17(2):117-119, 2006b.

SANSONETTI, P.J. The bacterial weaponry: lessons from *Shigella*. *Ann NY Acad Sci.*, 1072:307-12, 2006a.

SANSONETTI, P.J., ARONDEL, J., HUERRE, M., HARADA, A., MATSUSHIMA, K. Interleukin-8 controls bacterial transepithelial translocation at the cost of epithelial destruction in experimental shigellosis. *Infect. Immun.*, 3:1471-80, 1999.

SANSONETTI, P.J., DI SANTO, J.P. Debugging how bacteria manipulate the immune response. *Immunity*, 26(2):149-61, 2007.

SANSONETTI, P.J., PHALIPON, A., ARONDEL, J., THIRUMALAI, K., BANERJEE, S., AKIRA, S., TAKEDA, K., ZYCHLINSKY, A. Caspase-1 activation of IL-1beta and IL-18 are essential for *Shigella flexneri*-induced inflammation. *Immunity*, 12(5):581-90, 2000.

SANSONETTI, P.J.; PHALIPON, A. M. cells as ports of entry for enteroinvasive pathogens: mechanisms of interaction, consequences for the disease process. *Semin. Immunol.* 11, 193–203, 1999.

SASAKAWA, C.; ADLER, B.; TOBE, T.; OKADA, N.; NAGAI, S.; KOMATSU, K.; YOSHIKAWA, M. Functional organization and nucleotide sequence of virulence region-2 on the large virulence plasmid in *Shigella flexneri* 2a. *Mol. Microbiol.*, 3:1191-1201, 1989.

SASAKAWA, C.; KOMATSU, K.; TOBE, T.; SUZUKI, T.; YOSHIKAWA, M. Eight genes in region 5 that form an operon are essential for invasion of epithelial cells by *Shigella flexneri* 2a. *J. bacteriol.*, 182:2416-2421, 1993.

SCHLEICHE, U., BOGDAN, C. Macrophages and Dendritic Cells. *Methods in Molecular Biology*, vol. 531, 2009.

SCHMIDT, H., HENSEL, M. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 17(1):14-56, 2004.

SCHOTTELIUS, A.J., DINTER, H. Cytokines, NF-kappaB, microenvironment, intestinal inflammation and cancer. *Cancer Treat. Res.*, 130:67-87, 2006.

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

SERÉNY B. Experimental keratoconjunctivitis shigellosa. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, 4:367-376, 1957.

PHILLIP D. SMITH, PD, JAMBOR CO, SMYTHIES LE. Intestinal macrophages: unique effector cells of the innate immune system. *Immunological Reviews*, 206: 149–159, 2005.

SUBRAMANIAN, N.; QADRI, A. Lysophospholipid sensing triggers secretion of flagellin from pathogenic salmonella. *Nat. Immunol.*, v.7, p.583-589, 2006.

SUTTERWALA, F. S., L. A. MIJARES, L. LI, Y. OGURA, B. I. KAZMIERCZAK, AND R. A. FLAVELL. Immune recognition of *Pseudomonas aeruginosa* mediated by the IPAF/NLRC4 inflammasome. *J. Exp. Med.*, 204:3235–3245, 2007.

SUZUKI, T. FRANCHI, L.; TOMA, C. Differential regulation of caspase-1 activation, pyroptosis, and autophagy via IpaF and ASC in *Shigella*-infected macrophages. *PLoS Pathog.* 3:111, 2007.

SUZUKI, T; NUNEZ, G. A role for Nod-like receptors in autophagy induced by *Shigella* infection. *Autophagy* 4: 73–75, 2008.

TAMURA, K.; SAKAZAKI, R.; MURASE, M.; KOSAKO, Y. Serotyping and categorization of *Escherichia coli* strains isolated between 1958 and 1992 from diarrhoeal diseases in Asia. *J. Med. Microbiol.*, 45:353-358, 1996.

TAYLOR PR, MARTINEZ-POMARES L, STACEY M, LIN HH, BROWN GD, GORDON S. Macrophage receptors and immune recognition. *Annual review of immunology.*, 23:901-44, 2005.

TAYLOR, D.N.; ESCHEVERRIA, P.; PAL, T.; SETHABUTR, O.; ROWE, B.; CROSS, J. The role of *Shigella sp*, enteroinvasive *Escherichia coli* and other enteropathogens as causes of childhood dysentery in Thailand. *J. infect. Dis.*, 153:1132-1138, 1986.

TOMINAGA, A, MUKAHARA, T., MAHMOUND, M. A., ENOMOTO, M. Molecular characterization of intact, but cryptic, flagellin genes in the genus *Shigella*. *Molecular Microbiology*, 12, 227-285, 1994.

TOLEDO, M.R.F.; REIS, M.H.L.; TRABULSI, L.R. New invasive *Escherichia coli* strain. *J. Clin. Microbiol.*, 11:422-423, 1980.

TOLEDO, M.R.F.; TRABULSI, L.R. Frequency of enteroinvasive *Escherichia coli* in children with diarrhea and healthy controls, in São Paulo, SP, Brazil. *Rev. Microbiol.*, 21:1-4, 1990.

TRABULSI LR, FERNANDES MRF. Antigenic identity of culture 193T-64 and *E. coli* O136:K78 (B22). *Rev. Inst. Med. Trop.*, 11:101-103, 1969.

TRABULSI LR, FERNANDES MRF, ZULIANI ME. Novas bactérias patogênicas para o intestino do homem. *Rev. Inst. Med. Trop.*, 9:31-39, 1967.

TRABULSI LR, ZULIANI ME, SERRANO JA. On two new enterobacteria pathogenic to the guinea-pig eye (cultures 185T-64 and 193T-64). *Rev. Inst. Med. Trop.*, 7:241-6, 1965.

TRAN VAN NHIEU, G. AND SANSONETTI, P.J. Mechanism of *Shigella* entry into epithelial cells. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 51-55, 1999.

TULLOCH, J.E.F.; RYAN, K.J.; FORMAL, S.B.; FRANKLIN, F.A. Invasive enteropathic *Escherichia coli* dysentery. *Ann. Intern. Med.*, 79:13-17, 1973.

VALENTINI, S.R.; GOMES, T.A.T.; FALCAO, D.P. Lack of virulence factors in *Escherichia coli* strains of enteropathogenic serogroups isolated from water. *Appl. Envir. Microbiol.*, 58:412-414, 1992.

VAN FURTH R. Monocyte production during inflammation. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 8(2):205-11, 1985.

VAN DEN BELD MJC, REUBSAET FAG. Differentiation between *Shigella*, enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and noninvasive *Escherichia coli*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 11:1395-7, 2011.

VENKATESAN, N.M.; BUYSSE, J.M. Nucleotide sequence of invasion plasmid antigen gene *ipaA* from *Shigella flexneri* 5a. *Nucleic Acids Res.*, 18:1648, 1990.

VENKATESAN, N.M.; BUYSSE, J.M.; OAKS, E.V. Surface presentation of *Shigella flexneri* invasion plasmid antigens requires the products of the *spa* locus. *J. Bacteriol.*, 174:1990-2001, 1992.

VIEIRA, N., BATES, S.J., SOLBERG, O.D., PONCE, K., HOWSMON, R., CEVALLOS, W., TRUEBA, G., RILEY, L., EISENBERG, J.N. High prevalence of enteroinvasive *Escherichia coli* isolated in a remote region of northern coastal Ecuador. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 76(3):528-33, 2007.

VOLKMAN A, GOWANS JL. The Origin of Macrophages from Bone Marrow in the Rat. *J Exp Pathol.* 46:62-70, 1965.

WEBER B, SAURER L, MUELLER C. Intestinal macrophages: differentiation and involvement in intestinal immunopathologies. *Semin Immunopathol*, 31:171-184, 2009.

WERB Z, GORDON S. Secretion of a specific collagenase by stimulated macrophages. *J Exp Med.*,142(2):346-60, 1975.

WILLINGHAM, S. B. Microbial pathogen-induced necrotic cell death mediated by the inflammasome components CIAS1/cryopyrin/NLRP3 and ASC. *Cell Host Microbe* 2, 2:147–159, 2007.

WITTHÖFT, T., ECKMANN, L., KIM, J.M., KAGNOFF, M.F. Enteroinvasive bacteria directly activate expression of iNOS and NO production in human colon epithelial cells. *Am. J. Physiol.*, 275:564-71, 1998.

YU, H. B., AND B. B. FINLAY. The caspase-1 inflammasome: a pilot of innate immune responses. *Cell Host Microbe*, 4:198–208 2008.

ZAMBONI, D. S., K. S. KOBAYASHI, T. KOHLSDORF, Y. OGURA, E. M. LONG, R. E. VANCE, K. KUIDA, S. MARIATHASAN, V. M. DIXIT, R. A. FLAVELL, W. F. DIETRICH, AND C. R. ROY. The Birc1e cytosolic pattern-recognition receptor contributes to the detection and control of *Legionella pneumophila* infection. *Nat. Immunol.* 7:318–325, 2006.

ZYCHLINSKY, A., PREVOST, M.C., SANSONETTI, P.J. *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature*, 358:167-9, 1992.

ZYCHLINSKY, A., THIRUMALAI, K., ARONDEL, J., CANTEY. J,R,, ALIPRANTIS. A,O,, SANSONETTI. P,J. In vivo apoptosis in *Shigella flexneri* infections. *Infect. Immun.*, 64:5357-65, 1996.