UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

TAISE NATALI LANDGRAF

**Receptor de aerobactina férrica de *Escherichia coli* –
IutA: um novo antígeno T-independente do tipo 1**

Ribeirão Preto
2012

TAISE NATALI LANDGRAF

**Receptor de aerobactina férrica de *Escherichia coli* –
IutA: um novo antígeno T-independente do tipo 1**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientador: Prof. Dr. Ademilson Panunto-Castelo

Ribeirão Preto
2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO OU PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Landgraf, Taise Natali

Receptor de aerobactina férrica de *Escherichia coli* – IutA, um novo antígeno T-independente do tipo 1. Ribeirão Preto, 2012.
71 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Panunto-Castelo, Ademilson.

1. Receptor de sideróforo. 2. Ativação policlonal. 3. Células B. 4. Receptor de IL-1. 5. MyD88.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: LANDGRAF, Taise Natali

Título: Receptor de aerobactina férrica de *Escherichia coli* – IutA: um novo antígeno T-independente do tipo 1

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências – Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Trabalho realizado no Laboratório de Imunologia, Departamento de Biologia da
Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de
São Paulo, com o auxílio financeiro do CNPq (130177/2010-5)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Sidnei e Sonia, pela dedicação e amor aos seus filhos, ao meu irmão Thiago e ao meu noivo Paulo, pelo apoio constante nesta caminhada.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Prof. Dr. Ademilson Panunto-Castelo**, que durante todos esses anos de convivência muito contribuiu para meu crescimento científico e pessoal, pelos seus ensinamentos, paciência, amizade, dedicação, incentivo, e, principalmente, por acreditar em mim.

À **Profa. Dra. Arlete Ap. Martins Coelho-Castelo**, pela colaboração prestada desde minha iniciação científica e por me receber prontamente em seu laboratório, onde grande parte deste trabalho foi realizada

A vocês, minha admiração!

*“De tudo ficaram três coisas:
A certeza de que estamos sempre começando...
A certeza de que é preciso continuar...
A certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar...
Portanto devemos:
Fazer da interrupção um caminho novo...
Da queda, um passo da dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro...”*

Fernando Sabino

Aos meus pais, **Sidnei e Sonia**, pelos bons exemplos, pela segurança e apoio nas horas difíceis, ao meu irmão **Thiago** pelo carinho e companheirismo e a minha avó **Mercedes** por fazer parte de minha educação e compreender minha ausência

Ao meu noivo **Paulo** pelo incentivo, compreensão, por acreditar em meu trabalho e compartilhar meus sonhos

Aos **Professores, Luciana Simon Pereira Crott e Auro Nomizo**, pela contribuição e disponibilidade em participar da avaliação deste trabalho

Aos amigos, **Alan Berlese e Leandro Licursi de Oliveira**, pelos ensinamentos durante minha iniciação científica que tanto contribuíram nesta etapa

Aos amigos do laboratório, **Fabício Freitas Fernandes, Gabriela Peron, José Renato Gatto Júnior, Marcelo Vieira Costa, Isabela Cardoso Fontoura, Renata Ariza Marques Rossetti, Luciana Previatto de Almeida, Éverton Padilha, Bernardo Pereira Moreira, Thiago Malardo**, pela amizade sincera, pelos momentos de risadas, apoio, ensinamentos e auxílio em alguns experimentos

Aos técnicos, **Ana Flávia Gembre, Izaíra Brandão, Ana Masson, Wendy Martins Rios e José Seminatti**, pelo auxílio prestado

À **Ana Cristine Silva Ferreira**, secretária do Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da FMRP-USP pela atenção, competência, disponibilidade e auxílio

À **Leomina de Jesus Silva de Souza**, funcionária da FFCLRP-USP, pelo carinho, pelo cafezinho de todas as manhãs, por fazer nossos dias mais alegres e estar sempre disposta quando precisamos

Aos **amigos do Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada** pela convivência agradável nas disciplinas

Aos **familiares e amigos** que de diferentes formas me apoiaram no desenvolvimento deste trabalho

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo auxílio financeiro

**"Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive."**

Ricardo Reis

RESUMO

LANDGRAF, T. N. **Receptor de aerobactina férrica de *Escherichia coli* – IutA: um novo antígeno T-independente do tipo 1**. 2012. 71 f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Alguns fatores de virulência em bactérias de microbiota normal, tais como sideróforos – moléculas captadoras de ferro – e determinadas fimbrias, possibilitam que esses micro-organismos causem infecção quando a colonização ocorre fora de seu habitat normal. Dentre as diferentes espécies bacterianas da microbiota normal com potencial para causar doenças, como as infecções do trato urinário (ITUs), destaca-se *Escherichia coli*. Certas cepas dessa espécie bacteriana apresentam um plasmídeo (pColV) que contém um gene que codifica IutA, o receptor para a aerobactina férrica, que é um sideróforo frequentemente associado às ITUs. Recentemente, nosso grupo estabeleceu que IutA apresenta a capacidade de induzir proliferação de linfócitos B. Neste trabalho, objetivamos identificar as moléculas e os mecanismos que modulam a proliferação de linfócitos B induzida por IutA recombinante (rIutA) de *E. coli*. Para avaliar se a proliferação era dependente de outras células, foram realizados ensaios de proliferação de células B marcadas com CFSE utilizando o sobrenadante de macrófagos ou células dendríticas estimulados com rIutA, por 24 horas, ou coculturas em placas de *transwell*. As análises desses ensaios revelaram que a proliferação das células B induzida por rIutA é dependente de moléculas liberadas por células acessórias, ou seja, ocorre de forma indireta. Os resultados dos ensaios utilizando células deficientes da molécula adaptadora MyD88 mostraram dependência da sinalização por essa molécula nos linfócitos B, mas não nas células acessórias, para que ocorresse a proliferação. Posteriormente, os ensaios *in vitro* utilizando células de animais deficientes para TLR4, TLR2 e IL-33R mostraram que a sinalização por esses receptores é dispensável. Contrariamente, a utilização do antagonista do receptor de IL-1 reduziu significativamente a proliferação de células B tratadas com esse antagonista. Além disso, identificamos que rIutA leva à expressão de IL-1 em macrófagos e células dendríticas estimuladas com essa proteína. Assim, nossos resultados sugerem que rIutA de *E. coli* induz a proliferação policlonal de linfócitos B de maneira independente de células T, por um mecanismo mediado por células acessórias, como macrófagos e células dendríticas. Embora não identifiquemos o receptor macrofágico ou das células dendríticas a qual rIutA se liga, sugerimos que a ação de rIutA sobre essas células induz a produção de IL-1 que age sobre seu receptor em células B, induzindo-as a proliferação. Esses resultados abrem perspectivas de estudo de IutA como molécula estimuladora do tecido linfóide associado a mucosa, assim como evasina de *E. coli* patogênicas.

Palavras-chave: Receptor de sideróforo. Ativação policlonal. Células B. Receptor de IL-1. MyD88.

ABSTRACT

LANDGRAF, T. N. **Ferric aerobactin receptor from *Escherichia coli* – IutA: a new type 1 T-independent antigen**. 2012. 71 f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Indigenous bacteria may contain some virulence factors, such as siderophores – iron chelator molecules – and fimbriae, that allow these microorganisms to become pathogens in sites others than their normal habitat. Among the different indigenous bacterial species in the gut, *Escherichia coli* is one with potential to cause infections, mainly urinary tract infection (UTI). Certain strains of *E. coli* have a plasmid (pColV), which encode ferric aerobactin outer membrane receptor, IutA, often associated with UTI. Our group has recently described IutA as an inducer of B cell proliferation. Here, we identify the molecules and mechanisms that modulate the proliferation of B lymphocytes induced by recombinant IutA (rIutA) from *E. coli*. To determine whether the B cell proliferation induced by rIutA is dependent on other cell, we carried out assays with CFSE-labeled B cells cocultured separately with macrophages or dendritic cells stimulated with rIutA using transwell membranes or incubated with conditioned medium from these cells. The analysis of the results showed that rIutA indirectly induced the proliferation of B cells in a manner dependent on molecules released by accessory cells. When we analyzed the ability of rIutA in inducing proliferation of cells from mice deficient in adapter molecule MyD88, we found that this signaling molecule is crucial for signaling induced by rIutA in B cells, but not in accessory cells. A similar analysis with cells from mice deficient in Toll like receptor (TLR) 4, TLR2 or interleukin (IL-) 33 receptor revealed that these receptors were not required for rIutA signaling of any tested cells. Conversely, the pretreatment of the B cells with IL-1 receptor antagonist significantly decreased the proliferation of these cells in response to conditioned medium from cultures of IutA-stimulated macrophages. Moreover, we determined that rIutA induced the expression of IL-1 in macrophages and dendritic cells stimulated with IutA. Altogether, our results suggest that IutA from *E. coli* induces polyclonal B-cell proliferation independently of T cells in a mechanism mediated by accessory cells such as macrophages and dendritic cells. Although the IutA-binding receptors from macrophages and dendritic cells have not been identified, we suggested that rIutA induces these cells to produce IL-1, which in turns acts on its receptor on B cells, triggering proliferation. These results open perspectives for studying IutA as a molecule that stimulates the mucosa-associated lymphoid tissue and as an immune-evasion molecule from pathogenic *E. coli*.

Keywords: Siderophore receptor. Polyclonal activation. B cells. IL-1 receptor. MyD88.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC – Células Apresentadoras de Antígenos ou Aloficocianina

APRIL - *proliferation-inducing ligand*

BAFF – *B-cell activating factor belonging to the TNF Family*

BAFF-R/BR3 – *BlyS receptor 3*

BCMA – *B-cell maturation antigen*

BCR – receptores de célula B

CD – *Cluster of Differentiation*

cDNA – DNA complementar

CFSE – *Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester*

CXCL8 (CXC – *chemokine ligand 8*)

DEPC – Dimetil pirocarbonato

dNTP – Desoxirribonucleotídeos trifosfatados

DO – Densidade óptica

EAEC – *Escherichia coli* enteroagregativa

EDTA - Ácido etileno diamina tetra acético

EHEC – *Escherichia coli* enteroemorrágica

EIEC – *Escherichia coli* enteroinvasora

EPEC – *Escherichia coli* enteropatogênica

ETEC – *Escherichia coli* enterotoxigênica

ExPEC – *Escherichia coli* extraintestinais

FACS – *Fluorescence-Activated Cell Sorting*

FITC – isotiaocianato de fluoresceína

FSC – *Forward Scatter*

GALT – *gut-associated lymphoid tissues*

GF – germ free

GM-CSF – fator estimulante de colônia de macrófago-granulócito

Ig - imunoglobulina

IL – Interleucina

IPTG – isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

ITU – Infecção do trato urinário

LPS – Lipopolissacarídeo

LRR – *leucine-rich repeat*

MAMP – *microbe-associated molecular patterns*

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade

MM – Massa Molecular

MyD88 – Fator 88 de Diferenciação Mielóide

NF- κ B – Fator Nuclear κ B

NMEC – *Escherichia coli* de *meningites neonatais*

PAMP – *pathogen-associated molecular patterns*

PBS – Tampão Fosfato

PE – ficoeritrina

PE-Cy 7 – ficoeritrina Cy7

PerCP-Cy 5.5 – proteína clorofila peridina Cy 5.5

PGN – peptidoglicano

PRR – *pattern recognition receptor*

RNA – Ácido Ribonucleico

RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase usando transcrição reversa

SBF – Soro Bovino Fetal

SDS-PAGE – *Sodium Duodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis*

SSC – *Side Scatter*

TA – Temperatura Ambiente

TACI – *transmembrane activator and CAML interactor*

TI – timo-independente

TIR – *Toll/IL-1 receptor*

TLR – *Toll-like Receptors*

TNF – Fator de Necrose Tumoral

TRIF – *TIR domain-containing adapter inducing IFN- β*

UPEC – *Escherichia coli* uropatogênicas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	Microbiota intestinal	15
1.2	Microbiota e sistema imunológico intestinal – Ativação de células B.....	18
1.3	Sideróforos e seus receptores – moléculas essenciais para as bactérias colonizadoras.....	22
2	OBJETIVOS.....	25
3	MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1	Animais e reagentes.....	26
3.2	Subclonagem de iutA em vetor de expressão pQE30 e pREP4.....	27
3.3	Indução e purificação de IutA recombinante	28
3.4	Isolamento e purificação de FliC recombinante.....	29
3.5	Análise eletroforética	29
3.6	Coleta e obtenção de células do baço	30
3.7	Separação de subpopulação de células B.....	30
3.8	Obtenção de macrófagos do baço	31
3.9	Cultivo de macrófago de linhagem J774.....	31
3.10	Diferenciação das células dendríticas a partir de células-tronco da medula óssea.....	31
3.11	Citometria de fluxo	32
3.11.1	Análise da expressão de marcadores característicos de leucócitos.....	32
3.11.2	Caracterização fenotípica de células dendríticas	32
3.12	Ensaio de proliferação com células marcadas com CFSE.....	33
3.12.1	Ensaio de proliferação por estimulação direta	33
3.12.2	Ensaio de proliferação por estimulação indireta	33
3.12.3	Cultura em placas <i>Transwell</i>	35
3.13	Detecção de mensagens para citocinas por RT-PCR em tempo real	35
3.13.1	Extração do RNA total de macrófagos e células dendríticas	35
3.13.2	Confecção do DNA complementar (cDNA).....	36
3.13.3	Amplificação do cDNA específico por RT-PCR em tempo real.....	36
3.14	Análise Estatística	37
4	RESULTADOS	38
4.1	Subclonagem do gene iutA.....	38
4.2	Expressão de rIutA	38
4.3	IutA induz resposta proliferativa de linfócitos B independentemente de LPS.....	39
4.4	Linfócitos B, na ausência de outras células em cultura, não proliferam frente ao estímulo com IutA.....	41
4.5	A resposta proliferativa de linfócitos B é modulada por células acessórias	42
4.6	A proliferação dos linfócitos B é dependente da molécula adaptadora MyD88, mas não ocorre via TLR2 ou TLR4.....	44
4.7	A citocina pró-inflamatória IL-1 participa na indução da resposta proliferativa de linfócitos B.....	49
4.8	Determinação do perfil de citocinas que levam à proliferação de linfócitos B	51
4.9	A proliferação de linfócitos B induzida por IutA também pode ser modulada por fatores liberados por células dendríticas.....	52

4.9.1 A estimulação de células dendríticas com IutA leva à expressão de marcadores de superfície	53
4.9.2 O sobrenadante de células dendríticas estimuladas com IutA leva à proliferação de linfócitos B	54
4.9.3 RNAm das citocinas pró-inflamatórias, IL-1 e IL-6, estão expressos em células dendríticas estimuladas com IutA.....	55
5 DISCUSSÃO.....	56
REFERÊNCIAS	64

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Microbiota intestinal*

A microbiota intestinal é composta por uma infinidade de micro-organismos que colonizam o hospedeiro logo após o nascimento. Embora protozoários, fungos e vírus façam parte dessa microbiota, não somam um número relativamente grande quando comparados às bactérias, cuja predominância é inquestionável. Essa constatação fica patente quando se considera que existem no lúmen intestinal cerca de 1.000 espécies bacterianas, perfazendo aproximadamente 10 trilhões desses micro-organismos por grama de conteúdo intestinal (MACPHERSON; HARRIS, 2004). Em uma situação de homeostase, a microbiota estabelece uma relação de mutualismo ou comensalismo com o hospedeiro. A sequência genômica de muitas bactérias comensais reflete a evolução desses micro-organismos para que realizem diversas funções no ambiente intestinal, como por exemplo, adquirirem nutrientes essenciais ou apresentar metabolismo de polissacarídeos (HOOPER et al., 2001; XU et al., 2003; PRIDMORE et al., 2004). Assim, as bactérias se beneficiam de um habitat estável rico em energia e nutrientes, como componentes presentes no muco – glicoproteínas, lipídeos e glicolipídeos secretados pelas células epiteliais, indispensáveis para o crescimento e colonização (SONNENBURG et al., 2004). Por outro lado, a microbiota é essencial para muitos processos fisiológicos, como participação nos processos digestivos, gerando nutrientes essenciais; regulação da angiogênese intestinal; competição com microrganismos estranhos por espaço e alimento, dificultando a colonização por esses patógenos (STAPPENBECK et al., 2002; LUPP et al., 2007). Alguns trabalhos mostram que as respostas inflamatórias induzidas por componentes da microbiota no ambiente intestinal é uma resposta “fisiológica” controlada, importante para a formação do sistema imunológico associado ao intestino (GALT – do inglês *gut-associated lymphoid tissues*) e de sua função apropriada durante o período pós-natal (revisto por TLASKALOVA-HOGENOVA et al., 2004). De fato, estudos com animais livres de germes (*Germ-free - GF*) têm demonstrado que a presença de bactérias intestinais tem um importante papel no desenvolvimento das estruturas linfóides, uma vez que o baço desses animais GF apresentaram menor número de centros germinativos e estruturas das zonas de células B e T desorganizadas, bem como número reduzido de células produtoras de imunoglobulina (Ig) A e células T CD4⁺ na lâmina própria, quando comparado a animais colonizados.

A relevância da microbiota também foi evidenciada por estudos que mostram que a colonização de animais GF com micróbios comensais resulta no aumento dos níveis de

imunoglobulinas e secreção de anticorpos naturais (revisto por HOOPER; MACPHERSON, 2010). Os anticorpos naturais são definidos como anticorpos que circulam em indivíduos normais na ausência de estimulação antigênica exógena (revisto por AREND, 2011). Essa definição torna-se válida se definirmos a microbiota normal como endógena, haja vista que a indução de resposta imunológica contra estruturas de bactérias comensais correlaciona-se diretamente com a presença de anticorpos naturais. Esses anticorpos são secretados principalmente por células B-1, polirreativos e constituídos principalmente por IgM, embora outros isótipos sejam expressos, como IgA e IgG (revisto por KAVERI, 2012). Um exemplo de anticorpo natural clássico é a IgG contra α -galactosil (α gal), resíduo de galactose terminal presente em glicoconjugados de inúmeros seres vivos, inclusive bactérias. Os estudos sobre esses anticorpos contra α gal mostram que sua presença ocorre em primatas do velho mundo, incluindo os humanos. Esses animais reprimem a expressão de α 1,3 galactosiltransferase, responsável por adicionar resíduos terminais de α gal a lactosamina. Dentre os anticorpos naturais, o mais estudado é o anti-Gal α 1,3Gal, sendo o único anticorpo natural descrito do isótipo IgG no soro humano, com especificidade para Gal α 3Gal β 4GLcNAC. Estima-se que esses anticorpos perfazem 1% de todas as IgG circulantes (revisto por AREND, 2011). Outro anticorpo natural humano é o dirigido contra antígeno NOR (Gal-1-4GalNAc), especificidade compartilhada com a isolectina IB4 de *Griffonia simplicifolia* (DUK et al., 2003). Esses anticorpos apresentam reatividade cruzada para determinantes antigênicos com similaridades em patógenos. Em condições fisiológicas, a extensa reatividade reflete a importância para a proteção durante o período inicial da infecção e ativação de respostas imunológicas adaptativas. Outras funções incluem o reconhecimento e remoção de células apoptóticas e produtos do catabolismo de antígenos próprios. (revisto por BAUMGARTH et al., 2005). Alguns estudos mostram que esses anticorpos são cruciais para a sobrevivência do hospedeiro às infecções por alguns patógenos, tais como *Salmonella typhimurium* e *Streptococcus pneumoniae*, e alguns vírus, como vírus da estomatite vesicular, da vacínia e influenza (CHOI; BAUMGARTH, 2008).

As diferenças entre bactérias comensais e virulentas são determinadas pela presença de moléculas ou mecanismos, nas bactérias virulentas, que predis põem o hospedeiro a uma relação de desequilíbrio com esses micro-organismos. Essas moléculas e mecanismos são coletivamente conhecidos como fatores de virulência, dentre os quais podemos destacar três tipos: (1) os relacionados à permanência da bactéria no hospedeiro, tais como adesinas, invasinas e moléculas capturadoras de ferro (sideróforos); (2) as toxinas, representadas pelas endo e exotoxinas; e (3) as moléculas e estruturas que fazem com que seja possível o escape

da bactéria da resposta imunológica, denominadas genericamente de evasinas (ALTERTHUM; TRABULSI, 2008). Entretanto, o fato de bactérias comensais poderem gerar resposta inflamatória, mesmo que seja uma resposta “fisiológica” controlada, permite sugerir que essa distinção entre as bactérias comensais e patogênicas possa ser tênue. De fato, o número de infecções por bactérias da microbiota normal é relativamente alto, sendo isso um dos fenômenos associados a uma das seguintes situações: (1) colonização de bactérias em um sítio onde não há uma relação de equilíbrio com o hospedeiro, como nos casos de infecções urinárias por bactérias da microbiota intestinal ou pneumonia por bactérias da microbiota do trato respiratório superior; (2) ao rompimento de uma das barreiras epiteliais, como nas inúmeras infecções por *Staphylococcus aureus*, dentre outras bactérias; e (3) infecções por diversos tipos de bactérias de microbiota normal em pacientes com comprometimento imunológico (SEKIROV et al., 2010).

Essa característica das bactérias da microbiota normal de serem potencialmente patogênicas está relacionada com a presença de fatores de virulência nesses micro-organismos. Isso decorre de características comuns aos micro-organismos colonizadores, quer sejam patogênicos ou não, quais sejam: a necessidade de ter adesinas para se fixar ao hospedeiro e colonizar; usar moléculas que mantenham a sua estrutura, como as endotoxinas na camada de externa da parede de bactérias Gram negativas ou ácido teicóico, lipoteicóico e alta quantidade de peptideoglicano em Gram positivas; apresentar moléculas que sequestram nutrientes, como os sideróforos; se desvencilhar de moléculas e produtos do sistema imunológico que as eliminariam (ALTERTHUM; TRABULSI, 2008). Assim, essa inter-relação entre hospedeiro e micro-organismos da microbiota está longe de serem estáveis e estáticas, sendo um processo de adaptação constante (YU et al., 2012).

Dentre as inúmeras espécies de micro-organismos que compõem a microbiota intestinal, destaca-se a bactéria *Escherichia coli*, um bacilo Gram-negativo que coloniza naturalmente a camada mucosa do cólon, sendo caracterizada como a mais abundante bactéria anaeróbica facultativa da microbiota humana (VALLANCE; FINLAY, 2000; HYLAND et al., 2006; SHOAF et al., 2006; ALTERTHUM; TRABULSI, 2008; TENAILLON et al., 2010). O fato de *E. coli* ser a bactéria mais abundante da microbiota intestinal de inúmeros animais, faz com que essa seja uma das bactérias com maior interação com o hospedeiro. Embora a maioria dessas bactérias desenvolva uma relação de mutualismo ou comensalismo com o hospedeiro, destaque maior tem sido dado a grupos e tipos sorológicos com características de virulências distintas, o que gera uma ampla variedade de bactérias patogênicas, também conhecidas como patótipos ou patovar (CROXEN; FINLAY, 2010;

TENAILLON et al, 2010.; KAPER et al., 2004). Atualmente, oito patótipos têm sido extensivamente estudados, sendo esses classificados em dois grandes grupos: (1) *E. coli* diarreiogênicas, contendo seis patótipos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC); e (2) *E. coli* extraintestinais (ExPEC) com dois patótipos: *E. coli* uropatogênicas (UPEC) e *E. coli* de meningites neonatais (NMEC) (revisto por CROXEN; FINLAY, 2010). Essa variedade de patótipos, na maioria das vezes, apresenta fatores de virulências únicos, extremamente relacionados com o sítio de infecção e a patologia, fazendo com que *E. coli* seja o agente etiológico mais comum nas infecções urinárias e de diarreias em crianças (CROXEN; FINLAY, 2010). Embora muito estudada, ainda existe um hiato no conhecimento sobre a inter-relação dessa bactéria com o hospedeiro. Além disso, a emergência de linhagens altamente virulentas, como as EHECs, e a alta prevalência de infecções entéricas e urológicas faz com que o estudo dessas bactérias permaneça um campo aberto para muitas descobertas.

1.2 Microbiota e sistema imunológico intestinal – Ativação de células B

O epitélio intestinal é uma barreira física que separa as bactérias comensais presentes no lúmen intestinal das camadas mais profundas do intestino. Esse epitélio consiste de uma camada de células epiteliais polarizadas e interconectadas separadas por uma membrana basal do tecido conjuntivo e da lâmina própria, onde se encontram vários tipos celulares – miofibroblastos, células B, células T, macrófagos e células dendríticas (MUELLER; MACPHERSON, 2006).

Para manter um ambiente favorável, preservar a homeostase e impedir a colonização por outros microrganismos, geralmente patogênicos, as bactérias da microbiota intestinal desenvolveram estratégias para induzir e modular a resposta imunológica inata no hospedeiro (KELLY; CONWAY, 2005). O início dessas respostas no intestino é desencadeado pelos receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), que atuam como sensores para estruturas moleculares conservadas entre os microrganismos, conhecidas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs – do inglês *pathogen-associated molecular patterns*) (AKIRA et al., 2006). Como essas estruturas conservadas também estão presentes em organismos não patogênicos, conforme descrição acima, o termo padrões moleculares associados a micróbios (MAMP – do inglês *microbe-associated molecular patterns*) tem sido utilizado, principalmente quando se refere às interações entre bactérias comensais e

hospedeiro (WELLS et al., 2011). Os PRRs mais estudados são os receptores do tipo Toll (TLR – do inglês *Toll like receptors*).

TLRs são glicoproteínas transmembrana do tipo I compostas por um domínio extracelular que possui módulos de repetições ricas em leucina (LRR, do inglês *leucine-rich repeat*), que são responsáveis pelo reconhecimento dos PAMPs; uma região transmembrana e domínios citosólicos de receptores de Toll/interleucina (IL-) 1 (TIR – do inglês *Toll/IL-1 receptor*) que iniciam a cascata de sinalização (KAWAI; AKIRA, 2011; GAY; GANGLOFF, 2007). Até o presente, 13 TLRs foram descritos em camundongos e 10 em seres humanos (KUMAR et al., 2009). Esses receptores são expressos em várias células do sistema imunológico, tais como macrófagos, células dendríticas, células B e determinados tipos específicos de células T. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR11 estão localizados na superfície celular e reconhecem componentes microbianos (KUMAR et al., 2009), como por exemplo lipoproteínas e peptidoglicanos (PGN), detectados por TLR2, que forma heterodímeros com TLR1 e TLR6 (TAKEUCHI et al., 2001; TAKEUCHI et al., 2002); LPS de bactéria Gram-negativa é reconhecido por TLR4 (AKIRA et al., 2006), e flagelina, componente protéico do flagelo bacteriano, TLR5 (HAYASHI, 2001). Os outros receptores, como TLR3, TLR7, TLR8, e TLR9 são expressos em compartimentos endocíticos (BLASIUS; BEUTLER, 2010) e detectam RNA de dupla fita (TLR3) (ALEXOPOULOU et al., 2001); RNA de simples fita (TLR7/TLR8) (HEIL et al., 2004), e DNA bacteriano contendo motivos CpG (TLR9). TLR11 é altamente expresso no rim e bexiga e tem sido implicado no reconhecimento de componentes de bactérias uropatogênicas e proteínas de *Toxoplasma gondii* similares a profilinas (KUMAR et al., 2009). Recentemente, foi demonstrado que TLR11, além de ser expresso em superfícies celulares, é também expresso em compartimentos endocíticos (PIFER et al., 2011). Os ligantes de TLR10, TLR12 e 13 ainda não foram identificados (KAWAI; AKIRA, 2011).

TLRs ativam as mesmas moléculas sinalizadoras que são utilizadas na via de sinalização de IL-1R (AKIRA, 2006). Após a interação com seu ligante, estes receptores dimerizam-se e sofrem mudanças conformacionais necessárias para o recrutamento de proteínas adaptoras contendo domínio TIR, como MyD88 (*myeloid differentiation factor-88*), para a porção citoplasmática do TLR pela interação com seus domínios TIR. Isso resulta na ativação de uma cascata de sinalização que culmina na transcrição de genes que são traduzidos em citocinas e quimiocinas (AKIRA, 2006).

De maneira similar às células do sistema imunológico, as células epiteliais expressam receptores para MAMPs, incluindo os receptores TLRs, cuja expressão é polarizada nessas

células, o que contribui para manutenção da homeostase intestinal (revisto por ABREU, 2010). Essa expressão polarizada limita respostas induzidas contra microrganismos comensais. A sinalização por esses receptores nas células epiteliais intestinais tem sido associada à proliferação e expressão de peptídeos antimicrobianos por essas células, produção de citocinas que induzem a produção de imunoglobulina A (IgA) pelas células B, entre outras funções necessárias para impedir que as bactérias presentes no ambiente intestinal penetrem a barreira epitelial (HOOPER; MACPHERSON, 2010).

As bactérias que penetram a camada epitelial são rapidamente capturadas por macrófagos na lâmina própria. Aquelas que residem fora da camada de muco que cobre as células epiteliais podem ser eliminadas por moléculas antibacterianas, como defensinas, que são produzidas por esses tipos celulares. Algumas, ainda, podem ser capturadas por células M, que se encontram sobre as placas de Peyer (NEUTRA et al., 2001) e serem capturadas por macrófagos e células dendríticas. Embora macrófagos sejam células secretoras de mediadores inflamatórios que levam ao recrutamento de neutrófilos e ativação de células T, no microambiente intestinal, essas células não efetuam respostas pró-inflamatórias exacerbadas sob o reconhecimento de componentes bacterianos comensais, porém mantém suas funções fagocítica e bactericida intactas. Isso reflete um mecanismo evolucionário que assegura que essas células, frente ao reconhecimento da extensa carga bacteriana intestinal, não induzam danos ao tecido como consequência de respostas pró-inflamatórias (revisto por HOOPER; MACPHERSON, 2010). Algumas bactérias possuem mecanismos que regulam negativamente as vias de sinalização pró-inflamatórias. Kelly et al., 2004 demonstraram que *Bacteroides thetaiotaomicron* possui um mecanismo anti-inflamatório que atua inibindo a via de sinalização por NF- κ B. Na ocorrência de colonização por patógenos ou, eventualmente, invasão do epitélio intestinal por bactérias comensais, há o recrutamento de neutrófilos em resposta a um gradiente de quimiocinas, como CXCL8 (CXC – *chemokine ligand* 8), produzidas principalmente pelas células epiteliais (revisto por SANSONETTI, 2004). Em condições patológicas, a desregulação dos mecanismos que mantêm a homeostase entre hospedeiro-microbiota pode resultar numa inflamação intestinal crônica, como a observada nas doenças inflamatórias intestinais (NELL et al., 2010).

A captura de bactérias comensais ou seus produtos por células dendríticas nas placas de Peyer permite a interação dessas células com células B e T, ativando mecanismos da resposta imunológica adaptativa (SHREEDHAR et al., 2003). Após ativação, algumas células B formam o centro germinativo dentro das placas de Peyer e linfonodos mesentéricos, onde ocorre a troca de isotipo IgM para IgA (FAGARASAN et al., 2010).

A troca de isotipo pode ocorrer de forma dependente de células T (TD) ou independente de células T (TI) (MOND et al., 1995). Nas respostas timo-dependentes, os antígenos podem ser processados por células apresentadoras de antígenos (APCs) em peptídeos e serem apresentados pelas moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe II - MHC de classe II, às células T. As células T ativadas estimulam células B via interação CD40-CD40L e liberação de citocinas (MILLS; CAMBIER, 2003). Como consequência, as células B proliferam e se diferenciam em células plasmáticas secretoras de imunoglobulinas (VINUESA et al., 2010).

Células B-1 e células B da zona marginal produzem anticorpos IgM, IgG e IgA por uma via mais rápida que envolve o reconhecimento de produtos microbianos conservados por receptores de imunoglobulinas de baixa afinidade e TLRs (DURAND et al., 2009). Esses antígenos, como LPS, induzem proliferação de linfócitos B, ativando essas células de maneira policlonal e são denominados antígenos timo-independentes (TI-) do tipo 1. Os antígenos tipo 2 (TI-2), como polissacarídeos microbianos, são moléculas com epítomos repetitivos, que se ligam aos receptores de célula B (BCR), fazendo com que o linfócito B seja ativado apenas pela ligação de múltiplos BCRs de superfície ao antígeno. Esses TI-2 apresentam ainda a capacidade de ativar o complemento (EL SHIKH et al., 2009). A sequência de eventos que levam a ativação de linfócitos B de maneira independente de célula T para antígenos TI-1 não está bem definida (revisto por CERUTTI et al., 2011). Alguns estudos mostram que a sinalização via receptores TLRs nos linfócitos B pode ocorrer de forma direta, induzida pela ligação de antígenos a esses receptores nessas células, ou de forma indireta, por citocinas produzidas por células ativadas via TLR. A maioria dos ativadores policlonais induz a proliferação dos linfócitos B sem necessitar da participação de células T, no entanto, esta ação pode ser modulada por células como os macrófagos ou as células dendríticas. Por exemplo, células dendríticas e macrófagos podem ser ativados via TLRs, por bactérias intactas ou componentes da parede celular bacteriana, secretando assim citocinas estimuladoras de células B, como IL-4 e IL-6 (RIVA et al., 1996; AIBA; TAGAMI, 1998).

Células dendríticas, macrófagos e células epiteliais estimulados por receptores TLR liberam citocinas como BAFF (*B-cell activating factor belonging to the TNF Family*) e APRIL (*proliferation-inducing ligand*). BAFF, também conhecido como TALL-1, THANK, BlyS e zTNF4, é um potente regulador do desenvolvimento e função de células B (LIED; BERSTAD, 2011). Segundo a literatura, essa citocina interage com três diferentes receptores TACI (*transmembrane activator and CAML interactor*), BCMA (*B-cell maturation antigen*) e BAFF-R/BR3 (*BlyS receptor 3*) (GROSS et al., 2000; THOMPSON et al., 2001). Dois desses

receptores, TACI e BCMA, também se ligam a outro ligante da família de TNF – APRIL, também conhecido como TRDL-1 ou TALL-2 (MARSTERS et al., 2000). Tanto a BAFF quanto APRIL são liberadas como proteínas biologicamente ativas pelas células, sendo que BAFF, além da forma solúvel, possui a forma associada à superfície celular. Foi demonstrado que células dendríticas e macrófagos produzem BAFF e APRIL e levam à modulação da proliferação de linfócitos B para respostas independentes de células T (CRAXTON et al., 2003; HE et al., 2007). Litinskiy et al., 2002 demonstraram, ainda, que BAFF e APRIL induzem a troca de isotipo independente de interação com molécula CD40 nas células B com CD40L nas células T, e diferenciação das células B para plasmócitos. Assim, torna-se claro que essas duas citocinas tem papel importantíssimo para respostas proliferativas de células B induzidas de um modo independente de células T no GALT.

1.3 Sideróforos e seus receptores – moléculas essenciais para as bactérias colonizadoras.

Ferro é um elemento essencial no metabolismo de, possivelmente, todos os organismos vivos. Isolado ou incorporado a *cluster* com enxofre ou heme, o ferro participa de reações de oxi-redução em centro calatílico de muitas enzimas, que são fundamentais para processos celulares como transporte, redução de peróxidos, síntese de aminoácidos e nucleosídeo, etc. (WANDERSMAN; DELEPELAIRE, 2004).

Na natureza, o ferro é encontrado como um constituinte de polímeros de oxi-hidróxidos insolúveis. No ambiente inorgânico, em pH 7,0, a concentração do íon férrico em forma solúvel é de apenas $1,4 \times 10^{-9}M$ (RATLEDGE; DOVER, 2000). Já em mamíferos, a concentração sérica do íon férrico solúvel é extremamente baixa, cerca de $10^{-18}M$, uma vez que 99,9% desse íon está carregado por proteínas ligantes de ferro, tais como transferrina, ferritina, lactoferrina e hemoglobina (WANDERSMAN; DELEPELAIRE, 2004; LI; STOCKER, 2009; WEINBERG, 2009). Essas concentrações de ferro livre são muito inferiores às necessárias para o crescimento ótimo de micróbios – 10^{-8} a $10^{-6}M$ (GUERINOT; YI, 1994). As bactérias responderam a esta pressão seletiva, escassez de ferro livre no ambiente e nos hospedeiros, por meio da evolução da capacidade em adquirir ferro por numerosos (e muitas vezes redundantes) mecanismos, incluindo a captura do ferro ligado aos carreadores de ferro e a produção de moléculas de baixo peso molecular com alta afinidade pelo Fe^{3+} , conhecidas como sideróforos (CROSA; WALSH, 2002).

Sideróforos são moléculas quelantes de ferro de baixa massa molecular (KREWULAK; VOGEL, 2008). Atualmente, existem mais de 500 siderofóros diferentes

descritos, sendo que 270 deles foram estruturalmente caracterizados (revisto por HIDER; KONG, 2010). Embora as estruturas dessas moléculas difiram bastante, a natureza química dos grupos funcionais que interagem com o átomo de ferro não são tão diversos, sendo basicamente compostos de ácido hidroxicarboxílico, ácido fênico, catecol ou ácido hidroxâmico e, assim, classificados como sideróforos tipo hidroxicarboxilatos, fenolatos, catecolatos e hidroxamatos (MIETHKE; MARAHIEL, 2007; KREWULAK; VOGEL, 2008). Os micro-organismos podem produzir mais de um tipo de sideróforo. UPECs, por exemplo, podem produzir os sideróforos aerobactina, enterobactina e yersiniabactina (GARCIA et al., 2011), sideróforo característico de virulência de cepas *Yersinia pestis* (PERRY; FETHERSTON, 2011). A cepa de *E. coli* probiótica não patogênica Nissle 1917 pode produzir os sideróforos enterobactina, aerobactina, salmoquelina e yersiniabactina (VALDEBENITO et al., 2006). Enterobactina, também conhecido como enteroquelina, é um sideróforo tipo catecolato produzido e utilizado em quase todas as cepas de *E. coli*, dentre outras cepas bacterianas (CROSA; WALSH, 2002). Salmoquelina, sideróforo tipo catecolato produzido principalmente por espécies de *Salmonella*, cepas de *E. coli* uropatogênicas e algumas cepas de *Klebsiella*, é a forma glicosilada de enterobactina, sendo o primeiro sideróforo glicosilado descrito. Essa glicosilação tem sido associada ao mecanismo de evasão bacteriana às ações da proteína siderocalina ligante de sideróforo catecolatos (NGAL-lipocalina) (MULLER et al., 2009).

Um sistema especial de assimilação de ferro foi descrito em bactérias isoladas de humanos, *E. coli* invasora K1, na qual o receptor para esse sideróforo era codificado a partir do gene *iutA* presente em um plasmídeo pColV-K30 (GROSS et al., 1985). Esse sistema consiste na biossíntese de sideróforo denominado aerobactina férrica e a expressão de um receptor protéico de 74kDa para esse sideróforo, denominado IutA. Além desse plasmídeo, o gene para detecção de IutA tem sido descrito em outros plasmídeos de diferentes sorotipos de *E. coli*, com alta homologia entre esses genes (WATERS; CROSA, 1991).

A presença de IutA e seu precursor na bactéria, também denominados de precursor do receptor de aerobactina férrica ou *mature receptor protein* tem sido correlacionado com a virulência bacteriana (revisto por WATERS; CROSA, 1991; CROSA; WALSH, 2002). No entanto, na literatura, a associação de IutA com linhagens virulentas de *E. coli* é controversa. Nowrouzian et al., 2001 demonstraram que a presença do gene que codifica IutA ocorre com maior frequência entre as linhagens de *E. coli* residentes em comparação às linhagens transitórias no microambiente intestinal de humanos. Outro trabalho do mesmo grupo corrobora esses resultados obtidos sugerindo que a habilidade em sintetizar IutA, entre outros

fatores de virulência estudados – fímbria do tipo P, adesina responsável pela aderência no epitélio intestinal e urinário, e K1 e K5, antígenos presentes na cápsula bacteriana – podem contribuir para a persistência dessa bactéria na microbiota intestinal (NOWROUZIAN et al., 2001). Trabalho recente de nosso grupo demonstrou a purificação de uma proteína de 75kDa de *E. coli* comensal em coluna de Sepharose que foi identificada por espectrometria de massa como o receptor de aerobactina férrica de *E. coli*, atualmente denominado de IutA. Nesse mesmo trabalho, avaliou-se a presença do gene *iutA* em UPECs isoladas de pacientes com infecção urinária. O gene estava presente em 38% dos isolados, sugerindo uma fraca associação com virulência (LANDGRAF et al., 2012 no prelo). Posteriormente, outro estudo revelou que IutA recombinante de *E. coli* comensal apresenta capacidade de estimular o sistema imunológico através da ativação das células B, tanto células B convencionais quanto B-1, mas não de células T (dados não publicados).

A descoberta dos mecanismos induzidos por componentes de bactérias comensais que modulam as respostas imunológicas no intestino abre caminhos para a compreensão de como essas respostas cooperam na manutenção da homeostase entre as bactérias intestinais e o hospedeiro, bem como para o desenvolvimento de estratégias de imunointervenção quando essas respostas tornam-se desreguladas. Assim, no presente estudo, buscamos determinar os mecanismos pelos quais IutA induz a proliferação dos linfócitos B.

2. OBJETIVOS

Determinar moléculas e mecanismos (diretos ou indiretos) envolvidos na proliferação de linfócitos B induzidos por rIutA.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e reagentes

Foram utilizados camundongos isogênicos de ambos os sexos, com idade entre 6 e 8 semanas, das linhagens: C57BL/6 selvagem ou deficiente de uma das seguintes moléculas: MyD88 (MyD88^{-/-}), TLR2 (TLR2^{-/-}) e TLR4 (TLR4^{-/-}); e BALB/c selvagem ou deficiente do receptor da IL-33 (IL-33R^{-/-}). Os animais selvagens foram provenientes do Biotério Central do Câmpus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP), enquanto os deficientes das moléculas sinalizadoras, do Centro de Criação de Camundongos Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP (FMRP/USP). Os animais foram mantidos no Biotério dos Departamentos de Bioquímica e Imunologia e Biologia Celular, Molecular e Bioagentes Patogênicos da FMRP-USP, em microisoladores, numa sala com temperatura, umidade, fluxo de ar e ciclo de luz claro/escuro controlados e livre acesso à água e à ração.

Os animais foram mortos por deslocamento cervical e após o término dos experimentos, colocados em sacos plásticos e incinerados conforme as normas de segurança. Todos os procedimentos foram realizados segundo os preceitos éticos definidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, protocolo nº 002/2007.

Os reagentes dos seguintes fabricantes foram usados: extrato de levedura da INLAB (Diadema, Brasil), peptona e ágar bacteriológico da HIMEDIA (Mumbai, Índia); ácido acético glacial, ácido clorídrico (HCl), cloreto de sódio (NaCl) e hidróxido de sódio (NaOH) da QHEMIS (São Paulo, Brasil); canamicina, ampicilina, estreptomicina, isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG), agarose, penicilina, meio RPMI-1640, soro bovino fetal (SBF), TRIzol®, 5X *FirstStrand Buffer*, dNTP (desoxirribonucleosídeos trifosfatos – dNTPSet, PCR Grade), cloreto de magnésio (MgCl₂) e transcriptase reversa *SuperScript™ II* da Life Technologies (Carlsbad, EUA); fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄), fosfato de sódio monobásico (NaH₂PO₄), cloreto de amônio (NH₄Cl), bicarbonato de potássio (KHCO₃), piruvato de sódio, azida sódica, glicerol, azul de Coomassie (G-250), duodecil sulfato de sódio (SDS), persulfato de amônia, TEMED e imidazol da USB Corporation (Cleveland, EUA); 2-mercaptoetanol, acrilamida, bisacrilamida, polimixina B, Tris e Sepharose CL-4B da GE Healthcare Life Sciences (Uppsala, Suécia); lipopolissacarídeo (LPS) ultra puro de *E. coli* O111:B4 da Invivogen (San Diego, EUA); iniciador Oligo (dT) 12-18 e DNase da Promega (Madison, EUA); aminoácidos não essenciais da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA); ácido

etileno-diamino-tetracético (EDTA) da Lafan (São Paulo, Brasil); e éster succinimidil diacetato carboxifluoresceína (CFSE) da Molecular Probes (Eugene, EUA). GM-CSF, anticorpo contra CD16/CD32 de camundongo (Fc Block) e anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos contra proteínas de superfície celular de camundongos (listados na tabela abaixo) foram obtidos da BD Biosciences (Franklin Lakes, EUA).

Tabela 1: Anticorpos monoclonais contra proteínas de superfície celular (receptores) murinas marcados com fluorocromos.

Receptor	Fluorocromo	Clone	Abreviatura
CD19	Aloficocianina	1D3	CD19-APC
CD11c	Aloficocianina	B-ly6	CD11c-APC
CD11c	ficoeritrina Cy7	HL3	CD11c-PE-Cy 7
CD11b	proteína clorofila peridina Cy 5.5	M1/70	CD11b-PerCP-Cy 5.5
I-A ^b	Ficoeritrina	AF6-120.1	I-A ^b -PE
CD40	Aloficocianina	3/23	CD40-APC
CD80	isotiocianato de fluoresceína	16-10A1	CD80-FITC
CD86	Ficoeritrina	GL1	CD86-PE

3.2 Subclonagem de *iutA* em vetor de expressão *pQE30* e *pREP4*

A etapa inicial dessa subclonagem foi a amplificação do gene *iutA* do plasmídeo pET28a clonado com o gene completo de *iutA*. Para isso, foram utilizados iniciadores direto (*primers forward*), com remoção do códon ATG (5'-GCGGATCCGCGATAAGCAAAAAGTA-3'), e reverso (5'-AATTCATATGATGATAAGCAAAAAG-3'). Na reação de amplificação, utilizou-se 0,1µM de cada *primer*, 0,2mM de cada dNTPs, tampão da Taq DNA polimerase, 1,5mM de MgCl₂ e 1 unidade da enzima Taq DNA polimerase. Essa reação foi realizada no termociclador C1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad) e ocorreu nas seguintes condições: 94°C por 5 minutos, 30 ciclos com 94°C por 1 minuto, 51°C por 1 minuto e 72°C por 2,5 minutos, e ao fim destes 30 ciclos, 72°C por 5 minutos. A reação foi mantida a 10°C até o uso. O fragmento amplificado foi analisado em gel de agarose a 0,8% e purificado utilizando o *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare). O produto de PCR do gene *iutA* foi subclonado no plasmídeo comercial pGEM-T (Promega), conforme instruções do fabricante. Em resumo, o plasmídeo foi submetido à seguinte reação de ligação: 150ng de *iutA* e 100ng

de pGEM-T incubados no tampão da reação contendo 1 unidade da T4 DNA ligase, num volume final de 20µl. A reação foi mantida a 4°C, durante uma noite. Metade do volume da ligação foi utilizada na transformação de *E. coli* DH5α competentes que foram plaqueadas em ágar LB. As colônias foram submetidas à extração do plasmídeo utilizando-se o *plasmidPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare). Os produtos foram analisados em gel de agarose a 0,8%. Esse produto de clonagem foi enviado para o sequenciamento no Centro de Pesquisas do Genoma Humano – USP, São Paulo – SP. Após análise do sequenciamento, o plasmídeo foi submetido à reação de digestão com 1 unidade da enzima *Bam*HI (Fermentas, Glen Burnie, EUA) e 2 unidades da enzima *Hind*III (Fermentas), utilizando-se o tampão de *Bam*HI, em um volume final de 60µL. A digestão foi mantida a 37°C, durante 2 horas, e verificados os produtos da digestão em gel de agarose a 0,8%, como anteriormente citado. O fragmento *iutA* foi recortado do gel, purificado e mantido a -20°C até o uso.

O plasmídeo pQE30 (Qiagen, Valencia, EUA), que determina resistência bacteriana à ampicilina, foi digerido como descrito para o pGEM-T-*iutA*, e o produto da digestão analisado em gel de agarose a 0,8%. O pQE30 digerido e o inserto *iutA* foram submetidos a uma reação de ligação, conforme descrito acima. Os plasmídeos pQE30, contendo o gene de *iutA*, foram transformados em *E. coli* DH5α isolados de bactérias transformadas e analisados em gel de agarose a 0,8%. O pQE30-*iutA* e o plasmídeo repressor pREP4, que confere resistência bacteriana a canamicina, foram transformados em bactérias *E. coli* BL21 competentes. Essas bactérias transformadas foram cultivadas em ágar contendo 100mg/L de ampicilina e 50mg/L de canamicina. Para confirmação da transformação, foi realizada a extração dos plasmídeos e posterior digestão. Os produtos da digestão foram analisados em gel de agarose. O protocolo de indução e purificação de IutA recombinante foi o mesmo descrito a seguir.

3.3 Indução e purificação de IutA recombinante

A IutA recombinante (rIutA) fusionada a um oligopeptídeo com seis resíduos de histidina (His₆) em sua extremidade N-terminal foi obtida de cultura de bactérias *E. coli* BL21 transformadas com o plasmídeo pET-28a-*iutA*, que continha o gene completo do receptor de aerobactina de *E. coli*. O gene foi subclonado no pET28a por (BERLESE, 2009), a partir do inserto obtido do plasmídeo pPOC9-*iutA* gentilmente cedido pelo Dr. Michael O’Connell da *Dublin City University*, Irlanda (CUIV et al., 2006). A fonte do gene foi o plasmídeo de virulência de *E. coli* pColV-K30 (GROSS et al., 1985). Para produção de rIutA, 12L de cultura em caldo LB foram induzidos por 6 horas com 0,8mM de IPTG. Após centrifugação

da suspensão bacteriana a $6000 \times g$, por 10 minutos, a 4°C, o sedimento bacteriano foi ressuspenso em tampão de lise (NaH_2PO_4 a 50mM, NaCl a 300mM e imidazol a 10mM, pH 8,0), em uma razão de 25mg de sedimento para 10mL de tampão de lise, e sonificado em banho de gelo com seis pulsos de 30 segundos cada, a 60Hz (Desruptor de células ultrassônico - Unique, Indaiatuba, Brasil). O lisado bacteriano foi centrifugado a $10.000 \times g$, por 15 minutos, a 4°C, e o sobrenadante submetido à cromatografia de afinidade em colunas HisTrap HP (GE Healthcare Life Sciences), previamente incubada a temperatura ambiente com NaOH a 0,1M, por 45 minutos, para eliminação de endotoxina e, posteriormente, equilibrada com o tampão de lise contendo 20mM de imidazol. O material não adsorvido à resina foi retirado com 20 volumes de coluna do tampão de equilíbrio, enquanto o material adsorvido foi eluído com o tampão de equilíbrio contendo 300mM de imidazol. O tampão do eluato foi substituído por água ultrapura (*Direct-Q 3 UV*, Millipore, Billerica, EUA) em coluna de dessalinização *HiTrap Desalting* (GE Healthcare Life Sciences). As proteínas recombinantes purificadas foram quantificadas (*Coomassie Bradford Protein Assay Kit* – Pierce, Rockford, EUA) e analisadas em eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% sob condições dissociantes (SDS-PAGE 12%).

3.4 Isolamento e purificação de *FliC* recombinante

A flagelina recombinante foi obtida de cultura de bactérias (*E. coli* cepa DH5 α) transformadas com o plasmídeo pQE30 contendo o gene completo da flagelina de EPEC (*fliC* da cepa E2348/69) fusionada a um oligopeptídeo com seis resíduos de histidina (His_6) situado na extremidade N-terminal. Essa bactéria transformada foi gentilmente cedida pelo Dr. James B. Kaper da *University of Maryland School of Medicine*, Baltimore, EUA. Para a purificação da proteína recombinante, 2L de cultura em caldo LB foram induzidos por 5 horas com 1mM de IPTG. Após centrifugação, o sedimento bacteriano foi submetido ao mesmo processo de purificação e análise descritos para a proteína recombinante IutA.

3.5 Análise eletroforética

As análises eletroforéticas foram realizadas em gel de poliacrilamida a 12% em condições dissociantes (SDS-PAGE), em sistema *Mini Protean Tetra* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EUA) (LAEMMLI, 1970). Amostras das preparações eluídas das colunas foram ressuspenso em tampão de amostra [Tris-HCl a 0,5M, pH 6,5, contendo 2,5% de SDS (m/v) e 20% de glicerol (v/v)], fervidas a 100°C, por 5 minutos, e aplicadas no gel. As corridas eletroforéticas tiveram duração aproximada de 1 hora (200V). Os géis foram corados com

azul de Coomassie. Em uma das raias de cada corrida foi aplicada uma mistura de proteínas com massas moleculares (MM) conhecidas, sendo usadas como padrão de migração. São elas: fosforilase b (97kDa), albumina sérica bovina (66kDa), albumina de ovo de galinha (45kDa), anidrase carbônica (31kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1kDa) e lisozima (14,4kDa) (GE Healthcare Life Sciences).

3.6 Coleta e obtenção de células do baço

Os baços foram coletados e colocados em placas de Petri de 22mm de diâmetro (Corning, Nova York, EUA) estéreis contendo 2mL de meio RPMI incompleto (sem suplementação). Com o auxílio de pinças estéreis, os baços foram divulsionados separadamente para obtenção de uma suspensão celular homogênea. As suspensões celulares foram destituídas de hemácias pela incubação com tampão de lise Ack (150 mM de NH_4Cl , 10 mM de KHCO_3 e 1 mM de EDTA, pH 7,3), por 5 minutos, a 4°C. Após a contagem das células em câmara de Neubauer, essas foram preparadas para proceder à separação por esferas magnéticas, isolamento de macrófagos em placa de cultura por aderência ou prosseguiram diretamente para a marcação com CFSE para o ensaio de proliferação *in vitro*.

3.7 Separação de subpopulação de células B

As células do baço, obtidas como descrito anteriormente, foram colocadas em garrafas de cultura estéreis de 75cm² (BD Biosciences) e incubadas por 45 minutos a 37°C, em estufa com ar umidificado e acrescido de 5% de CO_2 . Logo após, as células não aderentes foram coletadas, contadas em câmara de Neubauer e, cerca de 1×10^8 células, submetidas ao processo de separação de células B convencionais (CD43⁻), utilizando o sistema de separação magnética MidiMACS™ (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Alemanha), segundo instruções do fabricante. Para tanto, utilizou-se microesferas magnéticas conjugadas a anticorpo de camundongo contra CD43 (Ly-48), colunas LS e separador MidiMACS™. Posteriormente, a suspensão de células que não se ligaram às esferas (em sua maioria células B convencionais) foram submetidas a um processo de depleção das células dendríticas com microesferas magnéticas conjugadas a anticorpo contra CD11c, colunas LS e separador MidiMACS™ (Miltenyi Biotec GmbH), segundo instruções do fabricante.

3.8 Obtenção de macrófagos do baço

Para isolamento dos macrófagos, cerca de 1×10^7 células totais do baço foram distribuídas em placas de cultura de 48 poços e mantidas em cultura durante 45 minutos, a 37°C, em estufa umidificada com atmosfera de 5% de CO₂. Logo em seguida, as células não aderentes foram descartadas e a monocamada de células aderentes, lavada duas vezes com meio RPMI incompleto. Subsequentemente, adicionou-se às células o meio RPMI completo (RPMI suplementado com 10% de SBF, 100mM de piruvato de sódio, 10mM de β -mercaptoetanol, 100U/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina e 100mM de aminoácidos não essenciais), seguido de incubação com IutA 20 μ g/mL ou LPS 10 μ g/mL, por 24 horas a 37°C, em estufa com ar umidificado e acrescido de 5% de CO₂. Células deixadas sem estímulo foram usadas como controle negativo. Em algumas situações, ao meio RPMI completo foi adicionado 30 μ g/mL de polimixina, um inibidor de endotoxina.

3.9 Cultivo de macrófago de linhagem J774

Células J774, gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Arlete A. M. Coelho Castelo da FMRP/USP, foram cultivadas em garrafas de cultura de 75cm² (BD Biosciences), num volume final de 15mL de meio RPMI completo. A garrafa foi então incubada em estufa a 37°C, com ar umidificado e acrescido de 5% CO₂. O crescimento celular foi acompanhado por meio de observação em microscópio invertido Nikon TS-100 e subcultivadas por meio de tripsinização, quando a densidade de células formava uma monocamada confluenta.

3.10 Diferenciação das células dendríticas a partir de células-tronco da medula óssea

Para a obtenção de células de medula óssea, fêmures e tíbias de camundongos C57BL/6 foram retirados. Após sua remoção, esses ossos passaram por uma etapa de desinfecção com etanol a 70% durante 5 minutos, posteriormente lavados com 10mL de PBS e mantidos em RPMI incompleto. Logo após, suas diáfises foram quebradas com o auxílio de um cadinho e pistilo de cerâmica, em uma solução de PBS estéril e *endofree* contendo 1mM de EDTA e 2% de SBF. A suspensão celular foi tratada com 1mL de tampão de lise AcK, durante 2 minutos, no gelo, para lise das hemácias. A suspensão foi ressuspensa em 10mL de PBS e centrifugada por 10 minutos, a $460 \times g$, a 4°C, e novamente ressuspensa em meio RPMI completo. Logo em seguida, as células foram distribuídas, em placas de Petri com 120mm de diâmetro (BD Biosciences). Cada placa continha 2×10^6 células em 10mL de meio RPMI completo, contendo 10ng/mL de GM-CSF. No terceiro dia de cultura, foram acrescidos

20mL de meio RPMI completo contendo GM-CSF, na concentração descrita anteriormente. Essas células foram mantidas em cultura durante 6 dias, a 37°C, em estufa umidificada com atmosfera de 5% de CO₂.

3.11 *Citometria de fluxo*

3.11.1 Análise da expressão de marcadores característicos de leucócitos

As populações de células do baço (após processamento e/ou separação por esferas magnéticas) de camundongos foram caracterizadas em relação à expressão de marcadores de superfície utilizando anticorpos monoclonais específicos conjugados a fluorocromos (Tabela 1). Cerca de 1×10^6 células foram distribuídas em tubos para citometria em um volume de 100µL/tubo e incubadas durante 40 minutos, a 4°C, com *Fc block*, na concentração 0,5µg/ 10^6 células, para bloqueio de receptores de Fc. Posteriormente, essas células foram incubadas com os respectivos anticorpos monoclonais de interesse (0,5 a 0,75µg de anticorpo para 1×10^6 células) durante 30 minutos, a 4°C, no escuro. Após o período de incubação, as células foram lavadas com 2mL de PBS contendo 2% de SBF, centrifugadas a $300 \times g$, 4°C, por 10 minutos, e ressuspensas em 200µL de PBS.

As preparações celulares foram adquiridas no citômetro de fluxo Guava 8HT (Millipore). As células foram selecionadas de acordo com parâmetros de tamanho (FSC – *Forward Scatter*), granularidade (SSC – *Side Scatter*) e intensidade de fluorescência dos anticorpos. Foram adquiridos 5.000 eventos por amostra.

3.11.2 Caracterização fenotípica de células dendríticas

As células dendríticas coletadas 24 horas após os estímulos tiveram seus receptores de Fc bloqueados como descrito no item anterior. As suspensões celulares (aproximadamente 1×10^6 células/tubo) foram incubadas com 0,5 a 2µg dos anticorpos contra CD11c-APC, CD11b-PerCP e I-A^b-PE ou CD11c-PE-Cy-7, CD40-APC; CD80-FITC e CD86-PE, durante 30 minutos, a 4°C, no escuro. Em seguida, as células foram lavadas com PBS contendo 2% de SBF e fixadas com 1% de formaldeído em PBS. A população de células dendríticas diferenciadas foram selecionadas de acordo com os parâmetros de tamanho (FSC), granularidade (SSC) e intensidade de fluorescência dos anticorpos contra CD11c. A ativação dessas células foi avaliada pela média de intensidade de fluorescência dos anticorpos contra CD80, CD86, CD40 e I-A^b. A aquisição dos dados foi feita em citômetro de fluxo Guava 8HT (Millipore), sendo adquiridos 5.000 eventos por amostra.

3.12 *Ensaio de proliferação com células marcadas com CFSE*

3.12.1 Ensaio de proliferação por estimulação direta

Células totais isoladas do baço ou células B purificadas de camundongos selvagens e deficientes da molécula adaptadora MyD88 foram obtidas e diluídas em uma concentração de 1×10^7 células/mL de PBS estéril livre de endotoxina e, em seguida, marcadas com CFSE em concentração final de $1,25\mu\text{M}$. A solução foi incubada a temperatura ambiente por 5 minutos e, então, às células foi adicionado SBF (aproximadamente 5% do volume total) para interromper o processo de marcação. As células foram lavadas duas vezes com PBS estéril livre de endotoxinas, sendo centrifugadas a $300 \times g$ por 10 minutos. Após este procedimento, as células foram cultivadas em 1mL de RPMI completo, na concentração de 1×10^6 células em placa de 48 poços, incubadas com IutA $20\mu\text{g/mL}$ ou LPS $25\mu\text{g/mL}$, durante 72 horas, a 37°C , em estufa com ar umidificado e acrescido de 5% de CO_2 . Após o período de incubação, as células foram recuperadas e analisadas por citometria de fluxo. Foram adquiridos de 5.000 eventos e a determinação da porcentagem de células que sofreram proliferação mediante cada estímulo testado foi realizada na população de linfócitos (determinada pelos parâmetros de tamanho e granularidade – FSC x SSC).

3.12.2 Ensaio de proliferação por estimulação indireta

A fim de verificar se a proliferação de células B pode ser induzida por moléculas liberadas por outras células ou se há a necessidade de contato entre as células, primeiramente, foi realizada uma cultura na qual o sobrenadante de macrófagos de linhagem J774, estimulados com IutA ($20\mu\text{g/mL}$), LPS ($10\mu\text{g/mL}$) ou deixados sem estímulo, foi transferido para células esplênicas. Esse experimento foi conduzido da seguinte forma: Macrófagos J774 foram estimulados com IutA ou LPS por 2 horas, nas concentrações descritas anteriormente. Após esse período de estimulação, os poços foram lavados ou não com meio RPMI incompleto. As células foram mantidas por diferentes tempos com o estímulo (4, 8, 24 ou 48 horas). Logo após, os sobrenadantes dessas células J774 foram transferidos para culturas de células totais do baço ($1 \times 10^6/\text{poço}$), previamente marcadas com CFSE e distribuídas em placa de 24 poços. Após a transferência dos sobrenadantes, as células esplênicas permaneceram em cultura por 72 horas, sendo, posteriormente, marcadas com anticorpos contra CD19-APC e analisadas por citometria de fluxo. A porcentagem de células que

proliferaram foi determinada por histograma, dentro da região de linfócitos, delimitada pelos parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC).

Outros ensaios de transferência de sobrenadante foram feitos utilizando células de animais TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-} ou IL-33R^{-/-} ou utilizando o inibidor do receptor de IL-1 (IL-1Ra *Anakinra*®, gentilmente cedido pelo Prof. Dr. José Carlos Alves Filho da FMRP-USP). Para esses ensaios, macrófagos do baço (plaqueados como descrito anteriormente) foram estimulados por 24 horas com IutA (20µg/mL) ou LPS (10µg/mL) ou deixados sem estímulo. Após esse período, o sobrenadante foi transferido para cultura de células B, realizada como descrito acima. Para os ensaios com células dendríticas, utilizou-se somente células diferenciadas a partir de medula óssea de animais selvagens, e o sobrenadante da cultura das células estimuladas foi transferido somente para células B selvagens. O esquema de transferência dos sobrenadantes dos macrófagos selvagens ou deficientes para células B selvagens ou deficientes segue abaixo (figura 1):

Figura 1. Esquema de transferência de sobrenadante de cultura de macrófagos estimulados para cultura de células B.

Para os experimentos nos quais IL-1Ra foi utilizado, os macrófagos foram isolados e ressuspendidos em meio RPMI completo contendo 100µg/mL do inibidor ou somente em meio RPMI completo. Essas células foram distribuídas em placas de 48 poços e mantidas por 2 horas. Após esse período, as células foram estimuladas e a cultura permaneceu por 24 horas. O sobrenadante foi coletado e transferido para células B que receberam o tratamento com IL-1Ra ou não. O esquema de transferência do sobrenadante para as células B é similar ao das células selvagens e deficientes (2).

Figura 2. Esquema de transferência de sobrenadante de cultura de macrófagos tratados ou não com IL-1Ra para as células B cultivadas na presença ou ausência de IL-1Ra.

3.12.3 Cultura em placas *Transwell*

As culturas foram realizadas em placas de 24 poços, contendo membrana de policarbonato com poros de 8µm (Corning) ou insertos de tereftalato de polietileno com poros de 0,4µm (BD Biosciences). Os macrófagos do baço, de animais selvagens ou MyD88^{-/-}, foram plaqueados como descrito no item 3.7, nas câmaras inferiores da placa *Transwell* e estimulados como descrito. As células totais do baço ou células B purificadas do baço de camundongos selvagens ou MyD88^{-/-} (1 x 10⁵ células/100µL), marcadas com CFSE, foram adicionadas às câmaras superiores. As coculturas foram mantidas por 72 horas, 37°C, em estufa umidificada com atmosfera contendo 5% de CO₂. As preparações celulares foram adquiridas em citômetro de fluxo Guava 8HT (Millipore) e analisadas como descrito acima.

3.13 ***Deteção de mensagens para citocinas por RT-PCR em tempo real***

3.13.1 Extração do RNA total de macrófagos e células dendríticas

A extração do RNA total foi realizada utilizando o reagente TRIzol, conforme instrução do fabricante, após 24 horas de cultura, feita na ausência de estímulos ou em presença de LPS (10µg/mL) ou IutA recombinante (20µg/mL). Brevemente, os macrófagos ou as células dendríticas cultivados na ausência ou presença de estímulos foram lisados com 1mL de TRIzol e os lisados transferidos para um tubo de 1,5mL. Para cada 1mL da suspensão foram adicionados 200µL de clorofórmio, e os tubos centrifugados a 12.000 × g, por 15 minutos, a 4°C. A fase aquosa foi transferida para outro tubo e ressuspendida em 500µL de isopropanol. Essa solução foi mantida a -70°C, por 16 horas. Após esse período, o RNA total foi precipitado por centrifugação a 12.000 × g, por 30 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi

retirado e o sedimento lavado duas vezes com 1mL de etanol a 75% gelado e ressuspendido em água DEPC (água estéril livre de nucleases pelo tratamento com dimetil pirocarbonato e autoclavagem). O RNA total extraído foi quantificado no espectrofotômetro NanoDrop (ThermoScientific, Wilmington, EUA) e sua integridade foi avaliada em gel de agarose a 1,5%. A leitura foi realizada nos comprimentos de onda de 260nm, 280nm e 230nm, para obtenção da concentração de RNA/ μ L e contaminação por fenol ou proteínas. Em seguida, 1 μ g de RNA foi submetido ao tratamento com DNase. Para isso, foram adicionados à amostra 1 μ L de tampão da DNase (concentrado 10 vezes), 1 unidade de DNase (1U/ μ l) livre de RNase, e o volume foi ajustado q.s.p. 10 μ L com água ultrapura. Essa reação foi incubada por 15 minutos, a 25°C, seguido da adição de 1 μ L de EDTA a 25mM e uma nova incubação por 10 minutos, a 65°C.

3.13.2 Confecção do DNA complementar (cDNA)

O cDNA foi sintetizado a partir de 1 μ g de RNA por reação de transcriptase reversa. Para sua confecção, foi adicionado 1 μ L do iniciador Oligo (dT) 12-18 (0,5 μ g/ μ L), sendo a reação incubada a 70°C, por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 4 μ L de tampão da reação (concentrado 5 vezes – 5X *FirstStrand Buffer*), 1 μ L de dNTP (desoxirribonucleotídeos trifosfatados – 0,1M de *dNTPSet, PCR Grade*), 2 μ L de MgCl₂ e 1 μ l de transcriptase reversa *SuperScript*TM II. A reação foi realizada a 42°C, por 60 minutos e inativada pela incubação da amostra a 70°C, por 15 minutos. A concentração do cDNA de fita simples foi determinada em espectrofotômetro NanoDrop (ThermoScientific).

3.13.3 Amplificação do cDNA específico por RT-PCR em tempo real

Para essas reações, 200ng/ μ L de cDNA (sintetizado conforme descrito acima) foram utilizados como molde para a amplificação do alvo específico. A reação foi realizada com 1 μ L de cada par de iniciadores a 10 μ M, 1 μ L da amostra de cDNA, 12,5 μ L de *Platinum SYBR Green pPCRSuperMix-UDG with ROX* (Invitrogen) e 9,5 μ L de água ultrapura. As reações foram realizadas no aparelho Rotor-gene 6000 (Corbett Life Science, Mortlake, Austrália) e as análises realizadas no Rotor-Gene 6000 Series Software (Corbett Life Science). Os parâmetros foram: aquecimento a 50°C por 2 minutos, pré-desnaturação a 95°C por 30 segundos, seguido de 40 ciclos de amplificação e ao final, 72°C por 30 segundos. A amplificação da β -actina foi usada como controle da integridade das amostras, baseando na metodologia desenvolvida por Livak e Schmittgen (2001). As sequências e as temperaturas de

anelamento de cada par de iniciadores usados na RT-PCR em tempo real estão descritas na tabela 2.

Tabela 2: Sequência dos iniciadores diretos (*forward ou sense*) e reversos (*anti-sense*) usados na RT-PCR em tempo real.

Iniciadores referentes a proteína	Iniciador Direto (5' → 3') Iniciador Reverso (3' → 5')	Temperaturas de Anelamento (°C)
β-actina	AGC TGC GTT TTA CAC CCT TT AAG CCA TGC CAA TGT TGT CT	58
IL-1	GAT CCA CAC TCT CCA GCT GCA CAA CCA ACA AGT GAT ATT CTC CAT G	60
IL-6	CGGCAAACCTAGTGCGTTAT TCTGACCACAGTGAGGAATGTC	56
BAFF	CGC CGA CTA TAC GAA AAG GAA CTT A CTC CTC CAA GGC ATT TCC TCT TT	61,4
APRIL	TCACAATGGGTCAGGTGGTATC TGTAATGAAAGACACCTGCACTGT	61,4
IL-18	CAGGCCTGACATCTTCTGCAA CTGACATGGCAGCCATTGT	60
TGF-β	GCTGAACCAAGGAGACGGAAT GCTGATCCCGTTGATTTC	58

3.14 Análise Estatística

A determinação estatística das diferenças entre as médias dos grupos experimentais foi feita por análise da variância (ANOVA), seguida pelo pós-teste de Tukey. Diferenças com $p < 0,01$ foram consideradas estatisticamente significativas. Todos os experimentos foram realizados ao menos duas vezes.

4. RESULTADOS

4.1 Subclonagem do gene *iutA*

Com o intuito de aumentar o rendimento da proteína solúvel, iniciamos a subclonagem de *iutA* em um plasmídeo de expressão, pQE30, que vem sendo utilizado em nosso laboratório para a expressão da proteína rFliC. Esse plasmídeo tem o promotor T5, que é eficientemente regulado pela presença de altos níveis da proteína repressora *lac*, expressa pelo plasmídeo pREP4 (FARABAUGH et al., 1978). Após a subclonagem, foi feita a expressão e purificação da proteína recombinante. Nessa etapa, notamos que a proteína não estava sendo adsorvida pela coluna contendo níquel. A análise eletroforética do material que passou pela coluna revelou uma banda homogênea de 75kDa, condizente com o tamanho esperado de IutA (dados não mostrados). Possivelmente, a cauda de histidina nesse construto estava ausente, inacessível ou, então, sendo degradada. Como o tempo era fator limitante para propormos métodos de avaliação, optamos por utilizar o outro sistema de expressão da proteína recombinante já presente no laboratório, com a bactéria contendo o gene de *iutA* subclonado em pET28a. Foram, então, feitas fermentações bacterianas e purificações da proteína em larga escala para sua utilização nos ensaios *in vitro*.

4.2 Expressão de rIutA

Para a realização dos ensaios de estimulação *in vitro* de células do sistema imunológico, primeiramente, foi feita a purificação de rIutA em larga escala. A proteína recombinante contendo uma etiqueta de seis histidinas foi isolada por cromatografia de afinidade em coluna imobilizada com níquel a partir do lisado de 12 litros de cultura de bactérias transformadas com pET28a-*iutA* e induzidas com IPTG. A análise eletroforética da preparação de rIutA demonstrou alto grau de homogeneidade, com uma proteína majoritária cuja migração correspondeu a uma massa molecular aparente (MM) de 75kDa (figura 3). A dosagem protéica da preparação IutA, pelo método de Bradford, revelou um rendimento médio de 180µg de rIutA/mL, num volume total de 20mL, ou seja, 300µg de proteína recombinante/L de cultura.

Figura 3. SDS-PAGE da preparação de rIutA. Lisados de *E. coli* BL21 transformadas com o plasmídeo pET28a contendo o gene completo de IutA de *E. coli* foram submetidos à cromatografia de afinidade em coluna contendo níquel imobilizado, em sistema de cromatografia líquida *ÄKTA Purifier* (GE Healthcare). O material adsorvido à coluna e eluído com 300mM de imidazol foi dialisado, concentrado e analisado por eletroforese (SDS-PAGE 12%) (raia 2). Gel corado com azul de Coomassie. A migração eletroforética de proteínas com massas moleculares conhecidas (raia 1) está indicada na figura (expressa em kDa).

4.3 IutA induz resposta proliferativa de linfócitos B independentemente de LPS

Resultados preliminares de nosso laboratório mostraram que rIutA leva à proliferação de linfócitos B. Como produtos bacterianos podem ser mitógenos de linfócitos B (RODO et al., 2006), não poderíamos *a priori* descartar que as respostas proliferativas eram devidas à contaminação da preparação de proteína recombinante por outras moléculas bacterianas.

Na tentativa de comprovar que a proliferação dos linfócitos B foi desencadeada por rIutA e não por contaminação com LPS ou outras putativas moléculas bacterianas na amostra purificada, foram usadas duas abordagens: (1) ensaio de linfoproliferação na presença ou ausência de polimixina B, um antibiótico potente que se liga e neutraliza LPS por possuir uma alta afinidade de ligação à porção lipídica (lipídeo A), componente principal das endotoxinas (MORRISON; JACOBS, 1976), e (2) estimulação de culturas com rFliC expressa e isolada pelo mesmo processo utilizado na purificação de rIutA. Como pode ser observado na figura 4, não houve diminuição significativa na porcentagem de proliferação de linfócitos B das células esplênicas totais de camundongos C57BL/6 estimuladas com rIutA (20µg/mL) quando ao meio de cultura foi acrescido 30µg/mL de polimixina B. A queda foi de 23,28% ($\pm 0,27$) em meio sem polimixina para 19,55% ($\pm 1,64$) em meio contendo esse antibiótico. Contrariamente, a resposta proliferativa de linfócitos B ao LPS (25µg/mL) sofreu uma acentuada redução após a adição de polimixina B. As células cultivadas na presença de LPS

em meio sem polimixina B proliferaram 15,6% ($\pm 1,20$), enquanto as cultivadas em meio acrescido de 30 μ g/mL de polimixina B proliferaram apenas 4,5% ($\pm 0,07$). Assim, esses resultados demonstram que a proliferação de linfócitos B foi induzida por rIutA, sugerindo que uma possível contaminação por LPS não contribuiu para a linfoproliferação observada. Além disso, observou-se que a preparação de rFliC (25 μ g/mL) foi incapaz de induzir a proliferação dos linfócitos B (figura 4), sugerindo que não havia nas amostras purificadas uma contaminação com LPS que fosse suficiente para induzir proliferação de células B. Ademais, essa ausência de proliferação observada em linfócitos estimulados com rFliC sugere ainda que outros contaminantes, como lipoproteínas, não são responsáveis pela proliferação observada em resposta às preparações de rIutA.

Figura 4. IutA induz a proliferação de linfócitos B. Células esplênicas (1×10^6) foram marcadas com CFSE e cultivadas sem estimulação (Meio) ou na presença de rIutA (20 μ g/mL), rFliC (25 μ g/mL) ou de LPS (25 μ g/mL). Após 72 horas, as células esplênicas foram marcadas com anticorpos monoclonais contra CD19-APC e analisadas por citometria de fluxo. A porcentagem de células que proliferaram foi determinada por histograma, dentro da região de linfócitos, delimitada pelos parâmetros de tamanho e granularidade. Resultados expressos como a porcentagem $\pm$ desvio padrão da média da frequência de células que proliferaram. * $p < 0,01$ em relação aos controles (meio e rFliC) e grupo LPS tratado com polimixina.

4.4 Linfócitos B, na ausência de outras células em cultura, não proliferam frente ao estímulo com *IutA*

Uma vez verificado que *IutA*, e não outras moléculas bacterianas contaminantes, era responsável pelas respostas proliferativas, interessamo-nos em determinar se *rIutA* estimulava os linfócitos B de uma forma direta. Para isso, linfócitos B convencionais ($CD43^-$), isolados a partir de células esplênicas destituídas de células $CD43^+$ e células dendríticas ($CD11c^+$), foram cultivados na presença de *rIutA*. Os resultados da citometria de fluxo revelaram que linfócitos B estimulados com a *rIutA*, na ausência das demais células esplênicas, apresentavam uma porcentagem de proliferação basal, similar aos linfócitos B não estimulados (meio) (figura 5).

Figura 5. Linfócitos B esplênicos, na ausência das demais células do baço, não proliferam frente ao estímulo com *rIutA*. Linfócitos B (1×10^6) isolados por esferas magnéticas (seleção negativa para $CD43$ e $CD11c$) foram marcados com CFSE e cultivados sem estimulação (Meio) ou na presença *rIutA* ($20\mu\text{g/mL}$) ou de LPS ($25\mu\text{g/mL}$). O estímulo com LPS foi realizado na presença ou ausência de polimixina B. Após 72 horas, a porcentagem de células que proliferaram foram analisadas por citometria de fluxo e determinada por histograma, delimitada pelos parâmetros tamanho e granularidade. Resultados expressos como a porcentagem $\pm$ desvio padrão da média da frequência de células que proliferaram. * $p < 0,01$ em relação aos demais grupos.

4.5 A resposta proliferativa de linfócitos B é modulada por células acessórias

O fato de IutA estimular a proliferação de linfócitos B em culturas de células esplênicas e não atuar diretamente sobre esses linfócitos, permitiu-nos propor que a ação dessa molécula ocorria de modo indireto, ou seja, de algum modo outras células esplênicas estimuladas por IutA induzia a proliferação das células B.

A fim de verificar se a proliferação dos linfócitos B poderia ser induzida por moléculas liberadas por células acessórias e se havia a necessidade de contato entre as células, realizou-se um experimento no qual sobrenadantes de macrófagos J774, estimulados ou não com IutA (20µg/mL) ou LPS (10µg/mL) por tempos variados, foram transferidos para células esplênicas totais. Em alguns experimentos, os macrófagos J774 foram lavados após 2 horas de estimulação, sendo transferidos os sobrenadantes como descrito previamente. Como observado na figura 6, houve visível proliferação de células B (~20%) de culturas de células esplênicas que receberam sobrenadantes das culturas de macrófagos estimuladas com IutA por 24 ou 48 horas. Já quando essas células receberam o sobrenadante do estímulo de 4 ou 8 horas, a proliferação celular foi basal, como a do controle (meio). O fato de o tempo de cultura das células esplênicas que receberam os sobrenadantes ser o mesmo, permitiu-nos sugerir que o antígeno usado para estimular as células J774 não estava sendo transferido com o sobrenadante para as células esplênicas. Provavelmente, algum fator solúvel presente nesse sobrenadante, produzido pelos macrófagos a partir de 24 horas de estímulo ou que se acumulava a partir desses tempo, foi responsável pela indução dessa proliferação. Os resultados com LPS diferiram dos observados com IutA, haja vista que houve proliferação em todos os tempos testados. De um modo interessante, os linfócitos B não proliferaram quando receberam o sobrenadante dos poços que tiveram a remoção, por lavagem, de IutA e LPS. Os resultados sugerem que a proliferação de células B induzida por rIutA ocorre de um modo indireto e independente do contato dessas células com as células acessórias (macrófagos).

O tempo de estimulação de 24 horas, sem a remoção do antígeno da cultura celular, foi escolhido para os ensaios *in vitro* posteriores.

Figura 6. A proliferação de células B induzida por rIutA é modulada por macrófagos, ou seja, ocorre de forma indireta. Macrófagos J774 foram cultivados na ausência (Meio) ou presença de IutA (20µg/mL) ou LPS (10µg/mL). Em alguns experimentos, os poços foram lavados com meio RPMI incompleto após 2 horas de estímulo (linha tracejada, símbolos vazios). Independentemente se os poços foram lavados ou não, os sobrenadantes foram colhidos após 4, 8, 24 ou 48 horas de estimulação. Esse sobrenadante foi transferido para uma cultura de células esplênicas (1×10^6) marcadas com CFSE. Após 72 horas, essas células foram marcadas com anticorpos monoclonais contra CD19-APC e analisadas por citometria de fluxo. A porcentagem de células que proliferaram foi determinada por histograma, dentro da região de linfócitos, delimitada pelos parâmetros tamanho e granularidade. Resultados expressos como a porcentagem de células que proliferaram.

Para determinar se o fenômeno descrito acima era restrito a células de linhagem ou extensivo a macrófagos esplênicos e confirmar se havia a necessidade de contato entre os macrófagos e células B para que essas últimas proliferassem, realizou-se um ensaio de cocultura com placas *transwell*, onde células esplênicas ou linfócitos B isolados marcados com CFSE foram mantidos na câmara superior de uma placa de cultura, enquanto na câmara inferior, foram cultivados macrófagos esplênicos plaqueados e estimulados com IutA (20µg/mL) ou LPS (10µg/mL), ou deixados sem estimulação. Os resultados expressos na figura 7 mostram que macrófagos esplênicos estimulados com rIutA também produzem fator indutor de proliferação de células B e corroboram os dados obtidos anteriormente de que o contato entre macrófago e linfócitos B é dispensável para que ocorra a proliferação de células B.

Figura 7. A proliferação de linfócitos B induzida por IutA ocorre de forma indireta. Macrófagos esplênicos foram adicionados na câmara inferior de uma placa de *transwell* (24 poços) na ausência (Meio) ou presença de IutA (20µg/mL) ou LPS (10µg/mL). Na câmara superior foram adicionados (A) linfócitos B isolados ou (B) células esplênicas totais marcadas com CFSE. Após 72 horas, as células da câmara superior foram marcadas com anticorpos monoclonais contra CD19-APC e analisadas por citometria de fluxo. A porcentagem de células que proliferaram foi determinada por histograma, dentro da região de linfócitos, delimitada pelos parâmetros de tamanho e granularidade. Resultados expressos como a porcentagem $\pm$ desvio padrão da média da frequência de células que proliferaram. * $p < 0,01$ em relação ao grupo controle (meio).

4.6 A proliferação dos linfócitos B é dependente da molécula adaptadora MyD88, mas não ocorre via TLR2 ou TLR4

Para avaliar a via de sinalização pela qual IutA leva a proliferação dos linfócitos B, animais deficientes em diferentes moléculas de sinalização foram utilizados. Células esplênicas de animais deficientes de MyD88 (MyD88^{-/-}) foram cultivadas na presença de IutA (20µg/mL) ou LPS (25µg/mL), ou deixadas sem estímulo (meio). A figura 8 mostra que não houve aumento significativo na proliferação de células dos animais MyD88^{-/-} estimuladas com IutA quando comparadas ao grupo controle. Esse resultado revelou que a molécula adaptadora MyD88 está envolvida na sinalização estimulada por IutA que resulta na proliferação dos linfócitos B.

Figura 8. A proliferação de linfócitos B é dependente da molécula adaptadora MyD88. Células esplênicas (1×10^6) de animais deficientes de MyD88 ou selvagens (WT) foram marcadas com CFSE e cultivadas na ausência (Meio) ou presença de rIutA (20 μ g/mL) ou LPS (25 μ g/mL). Após 72 horas, as células esplênicas foram marcadas com anticorpos monoclonais contra CD19-APC e analisadas por citometria de fluxo. A porcentagem de células que proliferaram foi determinada por histograma, dentro da região de linfócitos, delimitada pelos parâmetros tamanho e granularidade. Resultados expressos como a porcentagem $\pm$ desvio padrão da média da frequência de células que proliferaram. * $p < 0,01$ em relação ao grupo controle (Meio).

Como a proliferação ocorre de forma indireta, a dependência de MyD88 para a proliferação de linfócitos B induzida por IutA nos motivou a avaliar em qual célula – macrófago ou célula B, a sinalização por essa molécula era importante. Para isso, foi realizado um ensaio de co-cultura em placas de *transwell*, com células B e macrófagos selvagens ou deficientes de MyD88 distribuídas nos poços conforme a legenda da figura 9. Como observado, a falta de sinalização dependente de MyD88 nas células B inibiu a proliferação induzida por rIutA, o que não ocorreu nas outras condições testadas.

Figura 9. A ausência de sinalização pela molécula adaptadora MyD88 inibe a proliferação induzida por IutA em linfócitos B. Macrófagos esplênicos deficientes de MyD88 (MyD88^{-/-}) ou selvagens (WT) foram adicionados na câmara inferior de uma placa de *transwell* (24 poços) na ausência (Meio) ou presença de IutA (20µg/mL) ou LPS (10µg/mL). Na câmara superior foram adicionados linfócitos B deficientes de MyD88 (MyD88^{-/-}) ou selvagens (WT) marcados com CFSE, conforme descrição na legenda. Após 72 horas, as células da câmara superior foram marcadas com anticorpos monoclonais contra CD19-APC e analisadas por citometria de fluxo. A porcentagem de células que proliferaram foi determinada por histograma, dentro da região de linfócitos, delimitada pelos parâmetros de tamanho e granularidade. Resultados expressos como a porcentagem $\pm$ desvio padrão da média da frequência de células que proliferaram. * $p < 0,01$ em relação aos outros grupos.

Posteriormente, avaliamos se um dos dois receptores dependentes dessa proteína adaptadora mais estudados – TLR4 ou TLR2 – pudesse ser o responsável pelo fenômeno. Assim, macrófagos de animais deficientes de TLR2 ou TLR4 foram utilizados para avaliar se IutA estaria interagindo com esses receptores, em um ensaio de transferência de sobrenadantes de culturas de macrófagos estimulados. As figuras 10 e 11 mostram uma significativa proliferação de células B esplênicas de animais selvagens que receberam o sobrenadante da cultura de macrófagos de animais deficientes de TLR2 ou TLR4 (figura 10A e 11A, respectivamente) ou selvagens (figura 10B e 11B) estimulados com IutA quando comparada ao controle sem estímulo (meio). Assim, a ausência desses receptores nos macrófagos deficientes de TLR2 e TLR4 não resultou em uma inibição da proliferação de células B induzida por IutA. Para verificar se a ausência de sinalização por esses receptores nos linfócitos B poderia inibir a proliferação induzida por IutA, transferiu-se o sobrenadante da cultura de macrófagos deficientes de um dos receptores Toll para células B esplênicas

também deficientes. Da mesma forma, houve uma significativa proliferação induzida por IutA quando comparado ao controle sem estímulo (meio) e aos agonistas de TLR2 (Pam3CSK4) e TLR4 (LPS) (figura 10C e 11C).

Figura 10. A proliferação induzida por IutA não é dependente da sinalização por TLR2. Macrófagos esplênicos de animais deficientes de TLR2 (TLR2^{-/-}) ou selvagens (WT) foram estimulados com IutA (20μg/mL) ou Pam3CysCSK4 (2μg/mL), ou deixadas sem estímulo (Meio) por 24 horas. Após esse período, os sobrenadantes das culturas desses macrófagos foram transferidos para células esplênicas de animais selvagens (WT) ou TLR2^{-/-}, conforme descrição na parte superior de cada gráfico. Após 72 horas, as células esplênicas previamente marcadas com CFSE foram incubadas com anticorpos monoclonais contra CD19-APC e analisadas por citometria de fluxo. A porcentagem de células que proliferaram foi determinada por histograma, dentro da região de linfócitos, delimitada pelos parâmetros tamanho e granularidade. Resultados expressos como a porcentagem ± desvio padrão da média da frequência de células que proliferaram. **p* < 0,01 em relação ao controle (Meio).

Figura 11. A proliferação induzida por IutA não é dependente da sinalização por TLR4. Macrófagos esplênicos de animais deficientes de TLR4 (TLR4^{-/-}) ou selvagens (WT) foram estimulados com IutA (20μg/mL) ou LPS (25μg/mL), ou deixadas sem estímulo (meio) por 24 horas. Após esse período, os sobrenadantes das células foram transferidos para células esplênicas de animais selvagens (WT) ou TLR4^{-/-}, conforme descrição na parte superior de cada gráfico. Após 72 horas, as células esplênicas previamente marcadas com CFSE foram incubadas com anticorpos monoclonais contra CD19-APC e analisadas por citometria de fluxo. A porcentagem de células que proliferaram foi determinada por histograma, dentro da região de linfócitos, delimitada pelos parâmetros tamanho e granularidade. Resultados expressos como a porcentagem ± desvio padrão da média da frequência de células que proliferaram. **p* < 0,01 em relação ao controle (Meio).

Em conjunto, esses resultados sugerem que IutA sinaliza para a proliferação de células B de um modo independente de TLR2 ou TLR4, porém, dependente de algum outro receptor que utiliza uma via de sinalização onde a proteína adaptadora MyD88 tem um papel fundamental. Ademais, os resultados obtidos com esses animais deficientes confirmam os dados obtidos de que a proliferação de células B estimulada por IutA não ocorre devida à contaminação por LPS ou lipoproteínas, já que as células B desses animais TLR4^{-/-} e TLR2^{-/-} não proliferam frente aos respectivos agonistas desses receptores.

4.7 A citocina pró-inflamatória IL-1 participa na indução da resposta proliferativa de linfócitos B

A família de citocinas IL-1, IL-18 e IL-33 são relacionadas pela origem, estrutura do receptor e vias de sinalização dependente da molécula adaptadora MyD88 (AREND et al., 2008). Com base nos resultados anteriores de que a sinalização para a proliferação é uma via dependente da proteína adaptadora MyD88, investigamos se IutA estaria interagindo com os receptores de IL-1 (IL-1R) e IL-33R.

Nessa etapa do estudo, procuramos determinar se a resposta proliferativa era induzida pela interação de IutA com receptor de IL-1 (IL-1R) localizados na superfície de macrófagos, levando assim à produção de fatores que induzem a proliferação dos linfócitos B, ou se a interação de IutA, também na superfície do macrófago, induzia a produção de IL-1, que poderia interagir com IL-1R na superfície do linfócito B. Para isso, foi utilizado o antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra).

Quando sobrenadantes das culturas de macrófagos incubados ou não com o IL-1Ra e estimulados com IutA ou LPS foram transferidos para cultura de linfócitos B isolados, não tratados com o antagonista, não houve diferença na média de proliferação entre os grupos (figura 12). Entretanto, a proliferação de linfócitos B induzida por IutA teve uma redução significativa de aproximadamente 50%, quando ocorreu o bloqueio de IL-1R nessas células. Essa inibição parcial de proliferação nos permitiu sugerir que IutA não interage com IL-1R presente na superfície de macrófagos. A interação com receptores ainda desconhecidos levam à produção da citocina pró-inflamatória IL-1, que se liga a IL-1R nos linfócitos B e induz a proliferação.

Figura 12. O bloqueio de IL-1R nos linfócitos B, mas não nos macrófagos, altera de um modo significativo a proliferação induzida por IutA. Macrófagos esplênicos de camundongos C57BL/6 foram cultivados na ausência (MØ / Meio) ou presença de IL-1Ra (MØ / IL-1Ra). Após 2 horas, essas células foram estimuladas com IutA (20µg/mL) ou LPS (10µg/mL), ou deixadas sem estímulo (Meio), por 24 horas. Os sobrenadantes desses macrófagos foram, então, transferidos para culturas de linfócitos B esplênicos de camundongos C57BL/6, previamente incubadas na ausência (Linf. B / meio) ou presença do antagonista (Linf. B / IL-1Ra), por 2 horas. Após 72 horas, as células B foram marcadas com anticorpos monoclonais contra CD19-APC e analisadas por citometria de fluxo. A porcentagem de células que proliferaram foi determinada por histograma, dentro da região de linfócitos, delimitada pelos parâmetros tamanho e granularidade. Resultados expressos como a porcentagem $\pm$ desvio padrão da média da frequência de células que proliferaram. * $p < 0,01$ em relação ao controle (Meio) e # $p < 0,01$ em relação ao grupo de linfócitos B tratados com IL-1Ra e estimulados com IutA (IL-1Ra).

Outro receptor avaliado foi o IL-33R, utilizando-se células deficientes desse receptor. Nota-se na figura 13 que não houve inibição da proliferação induzida por IutA em nenhuma das condições avaliadas. Assim, descartamos a participação de IL-33R na proliferação dos linfócitos B.

Figura 13. A proliferação induzida por rIutA não é dependente da sinalização por IL-33R. Macrófagos esplênicos de animais BALB/c deficientes de IL-33R (IL-33R^{-/-}) ou selvagens (WT) foram estimulados com IutA (20µg/mL) ou LPS (10µg/mL), ou deixadas sem estímulo (Meio), por 24 horas. Após esse período, os sobrenadantes das células foram transferidos para cultura células esplênicas de animais selvagens (WT) ou IL-33R^{-/-}, conforme descrição na parte superior do gráfico. Após 72 horas, essas células previamente marcadas com CFSE foram incubadas com anticorpos monoclonais contra CD19-APC e analisadas por citometria de fluxo. A porcentagem de células que proliferaram foi determinada por histograma, dentro da região de linfócitos, delimitada pelos parâmetros tamanho e granularidade. Resultados expressos como a porcentagem $\pm$ desvio padrão da média da frequência de células que proliferaram. * $p < 0,01$ em relação ao controle (Meio).

4.8 Determinação do perfil de citocinas que levam à proliferação de linfócitos B

Para a detecção do perfil de citocinas expresso nas células acessórias estimuladas com IutA, foram realizadas reações de RT-PCR em tempo real para a detecção dos RNAm para IL-1, IL-18, IL-6, BAFF, APRIL e TGF- β . Para verificar a integridade e qualidade dos cDNAs, foram utilizados pares de iniciadores específicos para β -actina nas reações iniciais. Essas reações de amplificação de β -actina também foram utilizadas como normalizadoras das quantidades de cDNA de cada amostra.

A figura 14 mostra um aumento na expressão relativa de mensagens para as citocinas IL-1 e IL-6 nas reações cujo cDNA foi confeccionado a partir de RNA extraído de macrófagos estimulados com IutA, quando comparado às reações utilizando cDNA das células não estimuladas. Vale salientar que a expressão relativa para IL-1 foi superior à encontrada para IL-6. LPS foi utilizado como controle positivo nessas reações. Não houve expressão de mensagens para as outras citocinas estudadas (dados não mostrados). A expressão de IL-10, avaliada por citometria de fluxo utilizando marcadores intracelulares, não foi detectada em macrófagos estimulados com a proteína (dados não mostrados).

Figura 14. Quantificação da expressão do RNAm das citocinas de macrófagos por RT-PCR em tempo real. O RNA total de macrófagos foi extraído após 24 horas da estimulação com IutA recombinante. Após a extração do RNA, o cDNA foi confeccionado para uso na quantificação da expressão das citocinas. Como controle negativo usou-se o RNA total de células não estimuladas, e como controle positivo, RNA de células estimuladas com LPS (10µg/mL). * $p < 0,01$ em relação ao controle (Meio).

4.9 A proliferação de linfócitos B induzida por IutA também pode ser modulada por fatores liberados por células dendríticas

Os resultados anteriores mostraram a participação de macrófagos na indução de proliferação de linfócitos B em resposta à IutA. Além de macrófagos, células dendríticas também constituem uma ponte importante entre as imunidades inata e adaptativa, desempenhando funções como secreção de citocinas e apresentação de antígenos (KALUPAHANA et al., 2005). Assim, com o intuito de avaliar se essas células possuem um papel modulador nas respostas proliferativas de linfócitos B estimuladas por IutA, utilizamos células dendríticas diferenciadas a partir de precursores da medula óssea.

4.9.1 A estimulação de células dendríticas com IutA leva à expressão de marcadores de superfície

Primeiramente, foi realizada a caracterização de mudanças fenotípicas das células dendríticas em resposta à estimulação com a proteína. Células dendríticas foram avaliadas 24 horas após a estimulação com IutA e LPS quanto à expressão dos marcadores de superfície CD40, CD80, CD86 e MHC de classe II, por citometria de fluxo. Nota-se que a IutA foi capaz de levar ao aumento da expressão dos coestimuladores CD80 e CD86, e também de CD40, quando comparado às células não estimuladas e que esse aumento foi similar ao controle positivo de estimulação (LPS) (figura 15).

Figura 15. IutA é capaz de aumentar a expressão de CD80, CD86 e CD40 na superfície de células dendríticas diferenciadas a partir de precursores da medula óssea. Células dendríticas foram diferenciadas a partir de precursores da medula óssea. Posteriormente, foram estimuladas com IutA (20µg/mL) ou LPS (10µg/mL) ou mantidas sem estimulação (Meio). Após 24 horas, as células foram marcadas com anticorpos monoclonais específicos contra CD40-APC, CD80-FITC, CD86-PE e I-A^b-PE. A expressão desses marcadores foi verificada por citometria de fluxo. * $p < 0,01$ em relação ao controle (Meio).

4.9.2 O sobrenadante de células dendríticas estimuladas com IutA leva à proliferação de linfócitos B

Para determinar se, além da regulação da expressão dos marcadores de superfície, a estimulação dessas células com a proteína poderia levar à produção de fatores solúveis, foi realizado um experimento de transferência de sobrenadante da cultura de células dendríticas estimuladas para células B purificadas, semelhante aos experimentos utilizando macrófagos. A figura 16 mostra que as células B que receberam o sobrenadante das células dendríticas estimuladas com IutA apresentaram proliferação significativa em relação ao controle não estimulado. A utilização de polimixina B permitiu sugerir que a atividade de IutA sobre células dendríticas também não foi dependente de LPS.

Figura 16. A proliferação de linfócitos B também pode ser modulada por moléculas liberadas por células dendríticas. Células dendríticas diferenciadas a partir de precursores da medula óssea foram cultivados na presença de IutA (20µg/mL) ou LPS (10µg/mL) ou meio, por 24 horas, na presença de polimixina B. Algumas culturas estimuladas com LPS foram mantidas sem polimixina B. Após esse período o sobrenadante foi transferido para uma cultura de linfócitos B isolados e marcados com CFSE, que foram cultivado por 72 horas. Essas células foram marcadas com anticorpos monoclonais contra CD19-APC e analisadas por citometria de fluxo. A porcentagem de células que proliferaram foi determinada por histograma, dentro da região de linfócitos, delimitada pelos parâmetros tamanho e granularidade. Resultados expressos como a porcentagem $\pm$ desvio padrão da média da frequência de células que proliferaram. * $p < 0,01$ em relação ao controle (Meio).

4.9.3 RNAm das citocinas pró-inflamatórias, IL-1 e IL-6, estão expressos em células dendríticas estimuladas com IutA

O mesmo protocolo experimental utilizado na detecção de mensagens para citocinas em macrófagos estimulados com IutA foi utilizado para as células dendríticas. O perfil de citocinas expressas por essas células foi similar a dos macrófagos, ou seja, há expressão significativa de RNAm de IL-1 e IL-6 (figura 16). Ademais, detectou-se mensagem para BAFF (*B cell activating-factor of the TNF family*), um conhecido indutor de proliferação de células B.

Figura 17. Quantificação da expressão do RNAm das citocinas por RT-PCR em tempo real. O RNA total das células dendríticas foi extraído após 24 horas da estimulação com IutA. Após a extração desse RNA, o cDNA foi confeccionado para uso na quantificação da expressão das citocinas. Como controle negativo usou-se o RNA total de células não estimuladas, e como controle positivo, RNA de células estimuladas com LPS (10 μ g/mL). * $p < 0,01$ em relação ao controle (Meio).

5. DISCUSSÃO

Algumas moléculas bacterianas são capazes de induzir a proliferação policlonal de linfócitos B, independentemente do contato com linfócito T (revisto por MONTES et al., 2007). Recentemente, nosso grupo demonstrou que uma molécula de *E. coli*, o receptor do sideróforo aerobactina, também conhecido como IutA, era capaz de modular respostas imunológicas de camundongos pela indução de proliferação de linfócitos B. Aparentemente, IutA induzia a proliferação de um modo dependente de MyD88 (BERLESE, 2009). No presente estudo, demonstramos que a proliferação dos linfócitos B induzida por rIutA ocorre de maneira policlonal, independente de células T e indireta por um mecanismo dependente de células acessórias como macrófagos e células dendríticas. Embora não tenhamos identificado o receptor macrofágico ou das células dendríticas ao qual rIutA se liga, identificamos que a ação de rIutA sobre essas células induz a produção de IL-1 que age sobre seu receptor em células B, induzindo-as a proliferação. Estas observações corroboram alguns trabalhos que mostram a necessidade de células acessórias em respostas policlonais de linfócitos B de um modo T-independente (RIVA et al., 1996; AIBA; TAGAMI, 1998; MONTES et al., 2007).

A alta expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* resulta, frequentemente, na produção de agregados insolúveis conhecidos como corpúsculos de inclusão (SABATE et al., 2010). Resultados preliminares de purificação e dosagem de rIutA mostraram que o rendimento da proteína solúvel é baixo e há expressão, em sua maior parte, como corpúsculos de inclusão que são destituídos de atividade biológica. Os processos de padronização da solubilização e purificação desses corpúsculos aumentaram o rendimento da proteína solúvel, no entanto, quando sua atividade imunoestimulatória foi avaliada *in vitro* não houve estimulação de linfócitos B, como observado com a proteína nativa. A IutA parece ter uma estrutura com vários pontos de hidrofobicidade similar a porinas que apresentam estrutura tipo β -barril (dados não publicados), o que indica que essa proteína está inserida na membrana externa da parede de *E. coli*. Provavelmente, durante a remoção da solução de desnaturação contendo uréia, a proteína não dobrou de forma adequada, como ocorre comumente com esse tipo de proteína de membrana, e essa conformação tridimensional correta é necessária para que a mesma estimule as células acessórias a produzir citocinas que modulam a proliferação dos linfócitos B.

Uma desvantagem da produção de proteínas recombinantes em *E. coli* é a contaminação com LPS, o que limita o uso dessas preparações protéicas em culturas celulares que visam avaliar a estimulação de células do sistema imunológico. Essa endotoxina afeta a

produção de citocinas, o padrão de proliferação de linfócitos T (JENSEN et al., 2008), e, em cultura de células murinas, estimula linfócitos B de maneira independente de outros tipos celulares (antígeno timo-independente) (RODO et al., 2006). Trabalho publicado por Gao e Tsan, 2003, demonstrou que a proteína Hsp-70 recombinante humana, expressa em *E. coli*, não induz a secreção de TNF- α por macrófagos murinos, atividade atribuída ao LPS contaminante das preparações protéicas.

Para excluir a possibilidade de que a proliferação dos linfócitos B estava sendo induzida por LPS contaminante nas amostras da proteína purificada, utilizamos polimixina B, um potente inibidor de endotoxinas que possui alta afinidade pela porção do lipopolissacarídeo lipídio A (MORRISON; JACOBS, 1976). A comparação das culturas realizadas com ou sem esse inibidor revelaram que a proliferação induzida por rIutA não é inibida na presença de polimixina, contrariamente, 30 μ g/mL foi capaz de bloquear a proliferação induzida por LPS, levando a níveis semelhantes ao controle negativo do experimento (meio). Os resultados da proliferação celular com 25 μ g/mL da proteína rFliC, experimento controle com rFliC isolada pelo mesmo processo de purificação da proteína IutA, não mostraram proliferação de linfócitos B. Semelhantemente, os resultados da cinética de proliferação com essa proteína (6,25, 12,5, 25 e 50 μ g/mL) foram negativos – dados não mostrados. Isso nos permitiu sugerir que a quantidade de LPS contaminante na amostra, bem como outros produtos bacterianos advindos do processo de lise bacteriana, como lipoproteínas, peptidoglicanos não eram responsáveis pela proliferação observada.

Ao analisar se essa proliferação ocorria de forma direta ou indireta, e quais tipos celulares estavam envolvidos, identificamos que, utilizando células B isoladas, não houve proliferação induzida por rIutA. Provavelmente, havia a necessidade de outras células em cultura para que induzisse proliferação. Alguns estudos preliminares *in vitro* e *in vivo* tem demonstrado que respostas de células B independentes de células T necessitam de fatores liberados por macrófagos ou células dendríticas (COLINO et al., 2002; LITINSKIY et al., 2002). Corroborando esses dados, quando utilizamos o sobrenadante de macrófagos de linhagem J774, sob estímulo com IutA, houve proliferação das células B do baço. Um fato notável nesse protocolo experimental foi que, após remoção dos estímulos protéicos e do controle positivo de proliferação – LPS – após 2 horas de estimulação, o sobrenadante do macrófago, colhido após diferentes tempos, não foi capaz de induzir respostas dos linfócitos B. Macrófagos ativados por LPS sintetizam e secretam uma sequência de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α IL-6 e IL-1 (BODE et al., 2012). A acumulação de precursores de TNF- α no complexo de Golgi pode ser observada em 20 minutos e sua

secreção ocorre 40 minutos após a estimulação com LPS, atingindo o pico entre 4 e 6 horas, antes do declínio. Já para IL-6, baixos níveis da citocina solúvel são detectados no sobrenadante de macrófagos estimulados com LPS após 4 horas (MANDERSON et al., 2007). Diante dessas observações, sugerimos que o tempo de estimulação de 2 horas não foi necessário para a secreção adequada dessas citocinas, que estaria participando da indução de proliferação dos linfócitos B induzidas por LPS. Diferentemente da cinética descrita na literatura de produção de citocinas produzidas por macrófagos quando estimulados com LPS, sugerimos que as moléculas induzidas por IutA nos macrófagos, que são liberadas no sobrenadante e medeiam as respostas proliferativas, atingem seu pico de secreção, ou se acumulam, após 24h de estímulo.

Uma vez verificada a participação de outras células em cultura mediando as respostas proliferativas de células B, independentemente de contato, analisamos qual possível receptor IutA se ligaria. Os resultados dos ensaios utilizando células deficientes da molécula adaptadora molecular MyD88 (MyD88^{-/-}) mostraram dependência da sinalização por essa molécula para que ocorresse a proliferação. De fato, a proliferação dessas células sob estímulo de IutA foi abolida. Com exceção de TLR3, cuja via de sinalização é dependente de TRIF (do inglês *TIR domain-containing adapter inducing IFN-β*) (YAMAMOTO et al., 2002), e TLR4, que possui duas vias de sinalização – uma dependente de MyD88 e outra independente, mediada também por TRIF (AKIRA, 2006), MyD88 é o adaptador universal dos demais TLRs, além de membro da subfamília dos receptores de IL-1, que, assim como os TLRs, sinalizam via o domínio TIR (MEDZHITOV et al., 1998). De início, sugerimos que TLR5 não era o ligante de IutA, já que células B não expressam esse receptor (GURURAJAN et al., 2007). Dentre os possíveis TLRs, excluímos também os TLRs endossômicos (TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9) (BLASIUS; BEUTLER, 2010), uma vez que, previamente, nosso grupo observou que o bloqueio de vesículas endossômicas com cloroquina não diminuía a estimulação induzida por IutA. Em relação a TLR2 e TLR4, nossos dados prévios mostravam que esses receptores pareciam não ser importantes para a estimulação com IutA, porém os resultados não foram suficientemente convincentes (BERLESE, 2009).

O limitado número de possíveis receptores ligantes de IutA, permitiu que avaliássemos alguns desses receptores. Inicialmente, avaliamos a proliferação *in vitro* de células B de animais TLR4^{-/-} ou TLR2^{-/-}. A possível sinalização induzida pela ligação de IutA a esses receptores foi completamente excluída, dado que IutA induziu uma significativa proliferação de células B TLR4^{-/-} ou TLR2^{-/-}, o que, de um modo esperado, não foi observado com os respectivos agonistas desses TLRs, LPS e Pam3CSK4. Além disso, esses resultados

confirmaram que a proliferação foi estimulada pela proteína, e não por LPS ou lipoproteínas ou outros componentes bacterianos que sinalizam via TLR4 ou TLR2 (KAWAI; AKIRA, 2011). A indicação de que TLR2 não era o ligante de IutA em células B exclui outros dois TLRs – TLR1 e TLR6, visto que a sinalização por esses receptores somente ocorre em associação destes ao TLR2. Contrário aos outros TLRs, o TLR2 forma heterodímeros com TLR1 e TLR6, o que tem sido correlacionado evolutivamente com o aumento no espectro de detecção de PAMPs (FARHAT *et al.*, 2008).

As dificuldades de se avaliar TLR10, TLR11, TLR12 e TLR13, fez com que passássemos a avaliar possíveis ligantes de IutA cuja a sinalização ocorre via MyD88, mas que não são TLRs. Dessa forma, analisamos se essa proliferação poderia ser mediada por receptores das citocinas IL-1 e IL-33, que também sinalizam via proteína adaptadora MyD88 (SMITH, 2011).

A função de IL-33 em induzir a produção de IgA e IgE em camundongos *naives* e aumentar a secreção de IgG1 e IgG2a em doenças inflamatórias tem sido descrita. Estudos recentes mostraram o papel de IL-33 na indução de proliferação de linfócitos B-1, síntese de citocinas do padrão tipo 2 e produção de IgM *in vitro* e *in vivo*, e indução de proliferação de células B-2 *in vivo* (KOMAI-KOMA et al., 2011). Nossos experimentos utilizando células deficientes do receptor de IL-33 para avaliação da possível participação de IL-33 na proliferação de linfócitos B mostraram que a falta de sinalização por esses receptores não altera o padrão proliferativo, sugerindo que IL-33 não está envolvida.

As células do sistema imunológico inato – macrófagos e monócitos, são a principal fonte de IL-1 α e IL-1 β . A principal função das citocinas tipo IL-1 é controlar reações pró-inflamatórias em resposta ao dano tecidual induzido por PAMPs (WEBER et al., 2010). A sinalização é iniciada quando IL-1 liga-se a subunidade do receptor de IL-1 tipo I- IL-1R1. IL-1, LPS, imunocomplexos de IgG ou citocinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10), podem induzir a expressão de IL-1Ra em muitos tipos celulares. Esse antagonista interage com o receptor IL-1R1, inibindo a interação de IL-1 α e IL-1 β . Outra proteína ligante de IL-1 é o IL-1R tipo II, ou IL-1R2, que possui uma região extracelular similar a IL-1R1, no entanto, o domínio da região citoplasmática é curto, impedindo que ocorra a sinalização. Além dessa característica, é descrito que IL-1Ra interage fracamente com IL-1R2 (revisto por SIMS; SMITH, 2010). De interesse singular foram os resultados com o antagonista comercial do receptor de IL-1. Nesse experimento, culturas de macrófagos ou células B foram tratadas com IL-1Ra. Ao se transferir sobrenadantes de macrófagos estimulados com IutA para células B, observamos que o tratamento do macrófago com IL-1Ra não alterava a proliferação de células

B não tratadas. Contrariamente, IL-1Ra reduziu significativamente a proliferação de células B tratadas com IL-1Ra, independentemente se o sobrenadante de macrófagos estimulados com IutA tinha recebido ou não o tratamento com IL-1Ra. Em concordância com esse resultado obtido com IL-1Ra, observamos que células B MyD88^{-/-}, cultivadas separadamente em placas de *transwell* de macrófagos selvagens ou MyD88^{-/-} estimulados com IutA, tiveram inibição total da proliferação induzida por rIutA, evidenciando que a sinalização por essa molécula adaptadora fora relevante nessas células. Essa dependência de MyD88 não foi observada para os macrófagos que, independentemente da presença desse adaptador, liberava o fator responsável pela proliferação policlonal de linfócitos B. Em conjunto esses resultados sugerem que IutA estimula um receptor macrofágico que sinaliza de modo independente de MyD88, o que induz a produção de um fator estimulador da proliferação de células B. Esse fator se liga a um receptor que sinaliza via MyD88, provavelmente IL-1R. Alguns trabalhos têm descrito receptores macrofágicos cuja ativação ocorre independentemente de MyD88 levando a transcrição de genes e secreção de mediadores pró-inflamatórios, dentre eles IL-1. Em 1998, Rocha et al., demonstraram que a toxina A (TxA) de *Clostridium difficile* induz a secreção de IL-1 β pela interação a receptores acoplados à proteína G nos macrófagos. Em 2006, Khan et al., mostraram que fragmentos de cininogênio de alto peso molecular estimulam a secreção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, pela interação com receptores como uPAR (do inglês *urokinase plasminogen receptor*), Mac-1 (CD11b/CD18) e gC1qR (do inglês *receptor for the globular domain of C1q*) na superfície de macrófagos. Receptores citoplasmáticos, como o inflamassoma NLRC4, também têm sido implicados no reconhecimento e ativação de vias de sinalização que levam à secreção de IL-1 (revisto por PLUDDMANN et al., 2011). Novos estudos serão necessários para a determinação do receptor ao qual IutA se liga.

As mensagens para IL-1 foram detectadas após estimulação de macrófagos e células dendríticas com IutA. Essa citocina tem sido descrita por alguns trabalhos como fator responsável pela indução de proliferação de linfócitos B (revisto por SIMS; SMITH, 2010). De um modo interessante, nesses estudos, a substituição de macrófagos produtores de IL-1 pela citocina recombinante nos modelos de cultura celular, não inibiu as respostas de células B independentes de células T, mostrando um importante papel dessa citocina na modulação dessas respostas. Outras células secretoras de IL-1 também foram capazes de substituir as respostas observadas com macrófagos do baço em cultura (SINHA et al., 1987). Nossos resultados demonstram, de fato, que IL-1 está envolvida na proliferação de linfócitos B

induzida por rIutA, no entanto, a inibição parcial da proliferação observada sugere que outros fatores poderiam estar mediando essas respostas proliferativas.

Os resultados da expressão de mRNA de citocinas nas células dendríticas estimuladas com a proteína mostraram que IutA leva à expressão de BAFF nessas células. Trabalho de Montes et al., 2007, mostra que BAFF produzida por células mielóides está envolvida na proliferação policlonal induzida pela proteína glutamato desidrogenase (GDH) de *Trypanosoma cruzi* pelo bloqueio da interação dessa citocina com seu receptor da família de TNF, TACI e BAFF-R, o que reduziu de forma acentuada a proliferação de células B. Assim, não podemos excluir que células dendríticas residuais do processo de isolamento dos macrófagos do baço, por aderência em placas de cultura, são também estimuladas por IutA, o que levaria à expressão de BAFF e, conseqüentemente, a proliferação observada quando há o bloqueio de IL-1R.

Em conjunto, os resultados dos experimentos bloqueando o receptor de IL-1 nas células B e utilizando células deficientes da molécula adaptadora MyD88 sugerem que IL-1 é o principal fator modulador das respostas proliferativas de linfócitos B, produzidas por macrófagos. Nas respostas mediadas por células dendríticas, além da expressão da citocina pró-inflamatória IL-1, há a expressão de BAFF, que se liga a TACI, receptor que também utiliza a via de sinalização mediada por MyD88 (revisto por CERUTTI et al., 2011). Assim, quando utilizamos células B deficientes dessa molécula adaptadora, nota-se a inibição total de proliferação.

Embora mensagem para IL-6 esteja expressa significativamente em macrófagos e células dendríticas estimuladas com a IutA, provavelmente essa citocina não contribua para a proliferação de células B. IL-6R utiliza a via de sinalização de Jak/Stat (do inglês *Janus kinase/Signal transducer and activator of transcription*) (revisto HEINRICH et al., 2003), e, assim, seria capaz de induzir a proliferação quando a sinalização via MyD88 estava ausente nas células B. Uma hipótese seria a participação de IL-6 no processo de diferenciação das células B em plasmócitos secretores de IgA (SATO et al., 2003). Novos ensaios são necessários para verificar o papel dessa citocina nas respostas induzidas por rIutA.

Outra célula apresentadora de antígeno testada foi a célula dendrítica. Essas células podem ser diferenciadas e cultivadas *in vitro* a partir de monócitos circulantes presentes no sangue, na medula óssea e no baço com a utilização do fator estimulante de colônia de macrófago-granulócito (GM-CSF), como descrito na literatura (LUTZ et al., 1999). Nossos dados mostram que de fato estávamos trabalhando com células dendríticas, uma vez que os resultados obtidos da citometria de fluxo revelaram que, na presença do fator GM-CSF,

obtivemos porcentagens de células marcadas com CD11c superiores a 70%. Componentes bacterianos, virais e citocinas pró-inflamatórias podem induzir a maturação de células dendríticas, que passam a expressar marcadores característicos como CD80, CD86 e CD40, tornando-as eficientes apresentadoras antigênicas e ativadoras de linfócitos T (STEINMAN, 2001). A média de intensidade de fluorescência observada para esses marcadores mostra que a estimulação com IutA é capaz de levar à maturação dessas células de modo semelhante ao observado para LPS, fato relevante visto que somente células dendríticas maduras apresentam antígenos de forma eficiente (STEINMAN, 2007). Novos estudos de cocultura dessas células sob estímulo com IutA, com células T, por exemplo, serão necessários para verificação dessa função. Além da modulação da expressão de moléculas co-estimuladoras, o sobrenadante das células dendríticas estimuladas com a proteína foi capaz de induzir a proliferação de linfócitos B de modo semelhante ao observado para macrófagos, evidenciando sua participação na modulação dessas respostas.

Em síntese, demonstramos que o receptor de aerobactina, IutA, isolado de *E. coli* comensal induz a proliferação policlonal de linfócitos B (figura 18). Isso pode ser uma estratégia usada por esse microrganismo para o escape das respostas imunológicas adaptativas específicas, como resultado da ativação de clones de linfócitos B com especificidades irrelevantes. Embora muitos trabalhos correlacionem a presença de IutA à virulência, como ocorre com cepas de UPEC (GARCIA et al., 2011), esse receptor de sideróforo é expresso também em *E. coli* comensais. Componentes microbianos capazes de induzir a proliferação policlonal de linfócitos B levam ao aumento das respostas imunológicas humorais, importantes para o controle ou resolução das infecções ocasionadas por patógenos ou microrganismos potencialmente patogênicos. O conhecimento dos mecanismos e moléculas envolvidas nessas respostas proliferativas propiciam o estudo e desenvolvimento de estratégias de imunointervenção.

Figura 18. Esquema de proliferação de linfócitos B induzida por IutA.

REFERÊNCIAS

- ABREU, M. T. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 10, n. 2, p. 131-144, 2010.
- AIBA, S.; TAGAMI, H. Dendritic cell activation induced by various stimuli, e.g. exposure to microorganisms, their products, cytokines, and simple chemicals as well as adhesion to extracellular matrix. **Journal of Dermatological Science**, Amsterdam, v. 20, n. 1, p. 1-13, 1998.
- AKIRA, S. TLR signaling. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, Berlin, v. 311, p. 1-16, 2006.
- AKIRA, S., et al. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, Cambridge, v. 124, n. 4, p. 783-801, 2006.
- ALEXOPOULOU, L., et al. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. **Nature**, London, v. 413, n. 6857, p. 732-738, 2001.
- ALTERTHUM, F.; TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 2008.
- AREND, P. "Natural" antibodies and histo-blood groups in biological development with respect to histo-blood group A. A perspective review. **Immunobiology**, Stuttgart, v. 216, n. 12, p. 1318-1321, 2011.
- AREND, W. P., et al. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v. 223, p. 20-38, 2008.
- BAUMGARTH, N., et al. Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion. **Springer Seminars in Immunopathology**, Berlin, v. 26, n. 4, p. 347-362, 2005.
- BERLESE, A. **Receptor de Aerobactina Férrica de *Escherichia coli* Comensal Induz Proliferação de Células B-1**. Programa de Pós Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.
- BLASIUS, A. L.; BEUTLER, B. Intracellular toll-like receptors. **Immunity**, Cambridge, v. 32, n. 3, p. 305-315, 2010.
- BODE, J. G., et al. The macrophage response towards LPS and its control through the p38 (MAPK)-STAT3 axis. **Cell Signaling**, Oxford, v. 24, p. 1185-1194, 2012.
- CERUTTI, A., et al. Innate control of B cell responses. **Trends in Immunology**, Oxford, v. 32, n. 5, p. 202-211, 2011.
- CHOI, Y. S.; BAUMGARTH, N. Dual role for B-1a cells in immunity to influenza virus infection. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 205, n. 13, p. 3053-3064, 2008.

- COLINO, J., et al. Dendritic cells pulsed with intact *Streptococcus pneumoniae* elicit both protein- and polysaccharide-specific immunoglobulin isotype responses in vivo through distinct mechanisms. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 195, n. 1, p. 1-13, 2002.
- CRAXTON, A., et al. Macrophage- and dendritic cell--dependent regulation of human B-cell proliferation requires the TNF family ligand BAFF. **Blood**, New York, v. 101, n. 11, p. 4464-4471, 2003.
- CROSA, J. H.; WALSH, C. T. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 66, n. 2, p. 223-2249, 2002.
- CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 8, n. 1, p. 26-38, 2010.
- CUIV, P. O., et al. Identification and characterization of an iron-regulated gene, *chtA*, required for the utilization of the xenosiderophores aerobactin, rhizobactin 1021 and schizokinen by *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology**, Reading, v. 152, n. 4, p. 945-954, 2006.
- DUK, M., et al. Specificity of human anti-NOR antibodies, a distinct species of "natural" anti-alpha-galactosyl antibodies. **Glycobiology**, Oxford, v. 13, n. 4, p. 279-284, 2003.
- DURAND, C. A, et al. Phosphoinositide 3-kinase p110 delta regulates natural antibody production, marginal zone and B-1 B cell function, and autoantibody responses. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 183, n. 9, p. 5673-5684, 2009.
- EL SHIKH, M. E., et al. T-independent antibody responses to T-dependent antigens: a novel follicular dendritic cell-dependent activity. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 182, n. 6, p. 3482-3491, 2009.
- FAGARASAN, S., et al. Adaptive immune regulation in the gut: T cell-dependent and T cell-independent IgA synthesis. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 28, p. 243-273, 2010.
- FARABAUGH, P. J., et al. Genetic studies of the lac repressor. VII. On the molecular nature of spontaneous hotspots in the *lacI* gene of *Escherichia coli*. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 126, n. 4, p. 847-857, 1978.
- FARHAT, K., et al. Heterodimerization of TLR2 with TLR1 or TLR6 expands the ligand spectrum but does not lead to differential signaling. **Journal of Leukocyte Biology**, Winston Salem, v. 83, n. 3, p. 692-701, 2008.
- GAO, B.; TSAN, M. F. Endotoxin contamination in recombinant human heat shock protein 70 (Hsp70) preparation is responsible for the induction of tumor necrosis factor alpha release by murine macrophages. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 278, n. 1, p. 174-179, 2003.
- GARCIA, E. C., et al. Redundancy and specificity of *Escherichia coli* iron acquisition

systems during urinary tract infection. **Infection and Immunity**, Washington, v. 79, n. 3, p. 1225-1235, 2011.

GAY, N. J.; GANGLOFF, M. Structure and function of Toll receptors and their ligands. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 76, p. 141-165, 2007.

GROSS, J. A., et al. TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease. **Nature**, London v. 404, n. 6781, p. 995-999, 2000.

GROSS, R., et al. Identification of the genes and their polypeptide products responsible for aerobactin synthesis by pColV plasmids. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 201, n. 2, p. 204-212, 1985.

GUERINOT, M. L.; YI, Y. Iron: Nutritious, Noxious, and Not Readily Available. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 104, n. 3, p. 815-820, 1994.

GURURAJAN, M., et al. Toll-like receptor expression and responsiveness of distinct murine splenic and mucosal B-cell subsets. **PLoS One**, San Francisco, v. 2, n. 9, p. e863, 2007.

HE, B., et al. Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A(2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL. **Immunity**, Cambridge, v. 26, n. 6, p. 812-826, 2007.

HEIL, F., et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. **Science**, Washington, v. 303, n. 5663, p. 1526-1529, 2004.

HEINRICH, P. C., et al. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. **Biochemical Journal**, London, v. 374, n. 1, p. 1-20, 2003.

HIDER, R. C.; KONG, X. Chemistry and biology of siderophores. **Natural Product Report**, London, v. 27, n. 5, p. 637-657, 2010.

HOOPER, L. V.; MACPHERSON, A. J. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 10, n. 3, p. 159-169, 2010.

HOOPER, L. V., et al. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. **Science**, Washington, v. 291, n. 5505, p. 881-884, 2001.

HYLAND, R. M., et al. Basis for N-acetyllactosamine-mediated inhibition of enteropathogenic Escherichia coli localized adherence. **Journal of Medical Microbiology**, Stuttgart, v. 55, n. 6, p. 669-675, 2006.

JENSEN, L. B., et al. The biological activity of a recombinantly expressed (His)(6)-tagged peanut allergen (rAra h 1) is unaffected by endotoxin removal. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 335, n. 1-2, p. 116-120, 2008.

KALUPAHANA, R. S., et al. Activation of murine dendritic cells and macrophages induced by Salmonella enterica serovar Typhimurium. **Immunology**, Oxford, v. 115, n. 4, p. 462-472, 2005.

- KAPER, J. B., et al. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 2, n. 2, p. 123-140, 2004.
- KAVERI, S. V. Intravenous immunoglobulin: Exploiting the potential of natural antibodies. **Autoimmunity Reviews**, Amsterdam, Feb 12, 2012.
- KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. **Immunity**, Cambridge, v. 34, n. 5, p. 637-650, 2011.
- KELLY, D., et al. Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA. **Nature Immunology**, London, v. 5, n. 1, p. 104-112, 2004.
- KELLY, D.; CONWAY, S. Bacterial modulation of mucosal innate immunity. **Molecular Immunology**, Oxford, v. 42, n. 8, p. 895-901, 2005.
- KHAN, M. M., et al. High-molecular-weight kininogen fragments stimulate the secretion of cytokines and chemokines through uPAR, Mac-1, and gC1qR in monocytes. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, Dallas, v. 26, n. 10, p. 2260-2266, 2006.
- KOMAI-KOMA, M., et al. IL-33 activates B1 cells and exacerbates contact sensitivity. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 186, n. 4, p. 2584-91, 2011.
- KREWULAK, K. D.; VOGEL, H. J. Structural biology of bacterial iron uptake. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1778, n. 9, p. 1781-804, 2008.
- KUMAR, H., et al. Pathogen recognition in the innate immune response. **Biochemical Journal**, London, v. 420, n. 1, p. 1-16, 2009.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.
- LI, C.; STOCKER, R. Heme oxygenase and iron: from bacteria to humans. **Redox Report**, Edinburgh, v. 14, n. 3, p. 95-101, 2009.
- LIED, G. A.; BERSTAD, A. Functional and clinical aspects of the B-cell-activating factor (BAFF): a narrative review. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oslo, v. 73, n. 1, p. 1-7, 2011.
- LITINSKIY, M. B., et al. DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL. **Nature Immunology**, London, v. 3, n. 9, p. 822-829, 2002.
- LUPP, C., et al. Host-mediated inflammation disrupts the intestinal microbiota and promotes the overgrowth of Enterobacteriaceae. **Cell Host & Microbe**, Cambridge, v. 2, n. 3, p. 204, 2007.
- LUTZ, M. B., et al. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 223, n. 1, p. 77-92, 1999.

- MACPHERSON, A. J.; HARRIS, N. L. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 4, n. 6, p. 478-485, 2004.
- MANDERSON, A. P., et al. Subcompartments of the macrophage recycling endosome direct the differential secretion of IL-6 and TNF α . **Journal Cell Biology**, New York, v. 178, n. 1, p. 57-69, 2007.
- MARSTERS, S. A., et al. Interaction of the TNF homologues BLyS and APRIL with the TNF receptor homologues BCMA and TACI. **Current Biology**, London, v. 10, n. 13, p. 785-788, 2000.
- MEDZHITOV, R., et al. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 2, n. 2, p. 253-258, 1998.
- MIETHKE, M.; MARAHIEL, M. A. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 71, n. 3, p. 413-451, 2007.
- MILLS, D. M.; CAMBIER, J. C. B lymphocyte activation during cognate interactions with CD4⁺ T lymphocytes: molecular dynamics and immunologic consequences. **Seminars in Immunology**, Philadelphia, v. 15, n. 6, p. 325-329, 2003.
- MOND, J. J., et al. T cell independent antigens. **Current Opinion in Immunology**, Philadelphia, v. 7, n. 3, p. 349-354, 1995.
- MONTES, C. L., et al. Polyclonal B cell activation in infections: infectious agents' devilry or defense mechanism of the host? **Journal of Leukocyte Biology**, Winston-Salem, v. 82, n. 5, p. 1027-1032, 2007.
- MORRISON, D. C.; JACOBS, D. M. Binding of polymyxin B to the lipid A portion of bacterial lipopolysaccharides. **Immunochemistry**, Oxford, v. 13, n. 10, p. 813-818, 1976.
- MUELLER, C.; MACPHERSON, A. J. Layers of mutualism with commensal bacteria protect us from intestinal inflammation. **Gut**, London, v. 55, n. 2, p. 276-284, 2006.
- MULLER, S. I., et al. Salmochelin, the long-overlooked catecholate siderophore of Salmonella. **Biometals**, Oxford, v. 22, n. 4, p. 691-695, 2009.
- NELL, S., et al. The impact of the microbiota on the pathogenesis of IBD: lessons from mouse infection models. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 8, n. 8, p. 564-577, 2010.
- NEUTRA, M. R., et al. Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. **Nature Immunology**, London, v. 2, n. 11, p. 1004-1009, 2001.
- NOWROUZIAN, F., et al. P fimbriae, capsule and aerobactin characterize colonic resident Escherichia coli. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 126, n. 1, p. 11-18, 2001.
- NOWROUZIAN, F., et al. P fimbriae and aerobactin as intestinal colonization factors for

- Escherichia coli in Pakistani infants. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 126, n. 1, p. 19-23, 2001.
- PERRY, R. D.; FETHERSTON, J. D. Yersiniabactin iron uptake: mechanisms and role in *Yersinia pestis* pathogenesis. **Microbes and Infection**, Paris, v. 13, n. 10, p. 808-817, 2011.
- PIFER, R., et al. UNC93B1 is essential for TLR11 activation and IL-12-dependent host resistance to *Toxoplasma gondii*. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 286, n. 5, p. 3307-3314, 2011.
- PLUDDMANN, A., et al. Innate immunity to intracellular pathogens: macrophage receptors and responses to microbial entry. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v. 240, n. 1, p. 11-24, 2011.
- PRIDMORE, R. D., et al. The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. **Proceedings of the National Academic Sciences of the United States of American**, Washington, v. 101, n. 8, p. 2512-2517, 2004.
- RATLEDGE, C.; DOVER, L. G. Iron metabolism in pathogenic bacteria. **Annual Reviews of Microbiology**, Palo Alto, v. 54, p. 881-941, 2000.
- RIVA, S., et al. Bacteria and bacterial cell wall constituents induce the production of regulatory cytokines in dendritic cell clones. **Journal of Inflammation**, New York, v. 46, n. 2, p. 98-105, 1996.
- ROCHA, M. F., et al. Intestinal secretory factor released by macrophages stimulated with *Clostridium difficile* toxin A: role of interleukin 1beta. **Infection and Immunity**, Washington, v. 66, n. 10, p. 4910-4916, 1998.
- RODO, J., et al. MHC class II molecules control murine B cell responsiveness to lipopolysaccharide stimulation. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 177, n. 7, p. 4620-4626, 2006.
- SABATE, R., et al. Protein folding and aggregation in bacteria. **Cell and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 67, n. 16, p. 2695-2715, 2010.
- SANSONETTI, P. J. War and peace at mucosal surfaces. **Nature Reviews of Immunology**, London, v. 4, n. 12, p. 953-964, 2004.
- SATO, A., et al. CD11b⁺ Peyer's patch dendritic cells secrete IL-6 and induce IgA secretion from naive B cells. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 171, n. 7, p. 3684-3690, 2003.
- SEKIROV, I., et al. Gut microbiota in health and disease. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 90, n. 3, p. 859-904, 2010.
- SHOAF, K., et al. Prebiotic galactooligosaccharides reduce adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to tissue culture cells. **Infection and Immunity**, Washington, v. 74, n. 12, p. 6920-6928, 2006.
- SHREEDHAR, V. K., et al. Cholera toxin induces migration of dendritic cells from the

subepithelial dome region to T- and B-cell areas of Peyer's patches. **Infection and Immunity**, Washington, v. 71, n. 1, p. 504-509, 2003.

SIMS, J. E.; SMITH, D. E. The IL-1 family: regulators of immunity. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 10, n. 2, p. 89-102, 2010.

SINHA, A. A., et al. Functions of accessory cells in B cell responses to thymus-independent antigens. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 138, n. 12, p. 4143-9, 1987.

SMITH, D. E. The biological paths of IL-1 family members IL-18 and IL-33. **Journal of Leukocyte Biology**, Winston-Salem, v. 89, n. 3, p. 383-92, 2011.

SONNENBURG, J. L., et al. Getting a grip on things: how do communities of bacterial symbionts become established in our intestine? **Nature Immunology**, London, v. 5, n. 6, p. 569-573, 2004.

STAPPENBECK, T. S., et al. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. **Proceedings of the National Academic Sciences of the United States of American**, Washington, v. 99, n. 24, p. 15451-15455, 2002.

STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity: enhancing the efficiency of antigen presentation. **Mount Sinai Journal of Medicine**, New York, v. 68, n. 3, p. 160-166, 2001.

_____. Dendritic cells: understanding immunogenicity. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 37 Suppl 1, p. S53-60, 2007.

TAKEUCHI, O., et al. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. **International Immunology**, Oxford, v. 13, n. 7, p. 933-940, 2001.

TAKEUCHI, O., et al. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 169, n. 1, p. 10-14, 2002.

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

THOMPSON, J. S., et al. BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF. **Science**, Washington, v. 293, n. 5537, p. 2108-2111, 2001.

TLASKALOVA-HOGENOVA, H., et al. Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. **Immunology Letters**, Amsterdam, v. 93, n. 2-3, p. 97-108, 2004.

VALDEBENITO, M., et al. Environmental factors influence the production of enterobactin, salmochelin, aerobactin, and yersiniabactin in *Escherichia coli* strain Nissle 1917. **International Journal of Medical Microbiology**, Stuttgart, v. 296, n. 8, p. 513-520, 2006.

VALLANCE, B. A.; FINLAY, B. B. Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academic Sciences of the United States of**

American, Washington, v. 97, n. 16, p. 8799-8806, 2000.

VINUESA, C. G., et al. T cells and follicular dendritic cells in germinal center B-cell formation and selection. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v. 237, n. 1, p. 72-89, 2010.

WANDERSMAN, C.; DELEPELAIRE, P. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 58, p. 611-647, 2004.

WATERS, V. L.; CROSA, J. H. Colicin V virulence plasmids. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 55, n. 3, p. 437-450, 1991.

WEBER, A., et al. Interleukin-1 (IL-1) pathway. **Science Signaling**, Washington, v. 3, n. 105, p. cm1, 2010.

WEINBERG, E. D. Iron availability and infection. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam v. 1790, n. 7, p. 600-605, 2009.

WELLS, J. M., et al. Epithelial crosstalk at the microbiota-mucosal interface. **Proceedings of the National Academic Sciences of the United States of American**, Washington, v. 108 Suppl 1, p. 4607-4614, 2011.

XU, J., et al. A genomic view of the human-Bacteroides thetaiotaomicron symbiosis. **Science**, Washington, v. 299, n. 5615, p. 2074-2076, 2003.

YAMAMOTO, M., et al. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 169, n. 12, p. 6668-6672, 2002.

YU, L. C., et al. Host-microbial interactions and regulation of intestinal epithelial barrier function: From physiology to pathology. **World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology**, Beijing, v. 3, n. 1, p. 27-43, 2012.